

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**Simultane Inhibierung der Checkpoint-Kinase  
„ataxia telangiectasia and Rad3-related protein  
(Atr)“ und des Glukosetransporters  
„Glut1“ führen zu signifikant reduziertem  
Tumorwachstum in einem autochthonen  
Mausmodell *Kras*<sup>G12D</sup>-getriebener  
Weichteilsarkome.**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Joachim David Steiner  
aus Marburg

promoviert am 23. August 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. C. Reinhardt
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. R. T. Ullrich

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Tierversuche, d.h. die tägliche Inspektion aller Mäuse sowie Applikation der verwendeten Pharmakologika nach Studienplan, wurden von mir selbst in der Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Medizin durchgeführt.

Die Anfertigung und Auswertung der MRT-Bilder aller verwendeten Mäuse wurde von mir selbst nach entsprechender Anleitung und Mithilfe durch den Facharzt für Radiologie, Herrn Priv.-Doz. Dr. Florian Siedeck, durchgeführt.

Die Entnahme von Geweben aus der Maus post mortem sowie deren Fixierung zur Konservierung ist durch mich selbst durchgeführt worden.

Die folgenden histologische Färbungen sind durch das Institut für Pathologie der Uniklinik Köln durchgeführt worden.

Die Auswertung der histologischen Färbungen der aus der Maus gewonnenen Organe wurde von mir selbst nach entsprechender Anleitung durch die wissenschaftliche Mitarbeiterin Frau Dr. Anna Schmitt ausgeführt.

Die Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente wurden regelmäßig mit Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Christian Reinhardt besprochen und durch ihn betreut.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 11.04.2024

Unterschrift: Joachim D. Steiner

## **Danksagung**

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Christian Reinhardt herzlich dafür danken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, die hier vorgelegte Arbeit in seinem Labor durchzuführen. Dabei ging seine Unterstützung weit über die Planung und intensive Diskussion aller Experimente hinaus. Insbesondere möchte ich ihm dafür danken, auch bei Rückschlägen stets ansprechbar gewesen zu sein und dafür gesorgt zu haben, dass ich mich schon als Doktorand als vollwertiger Teil seines Labors fühlen durfte. Nicht zuletzt die Möglichkeit, unter anderem an zahlreichen Konferenzen teilzunehmen sowie alle Ergebnisse auch kritisch zu diskutieren, hat den Grundstein dafür gelegt, dass ich auch nach Abschluss des Studiums weiterhin wissenschaftlich tätig sein möchte.

Meinem Großvater Karlheinz Steiner gewidmet, der mich bis zuletzt ermuntert hat, diese  
Arbeit zu vollenden.

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	12
2. EINLEITUNG	13
2.1 Epidemiologie	13
2.1.1. Qualität globaler epidemiologischer Daten	13
2.1.2. Krebs ist im Jahr 2019 die zweithäufigste Todesursache weltweit	15
2.1.3. Tumorerkrankungen in Deutschland	15
2.1.4. Disability adjusted life years (DALYs)	16
2.1.5. Inzidenz und Mortalität von organspezifischen Krebserkrankungen	17
(1) Geschlechtsspezifische Unterschiede	17
(2) Unterschiede in Abhängigkeit vom Soziodemographischen Index (SDI)	19
2.1.6. Demographische Veränderungen und Fallzahlprognosen	20
2.1.7. Häufigkeiten bestimmter Mutationen bei Krebserkrankungen	22
2.1.8. Zwischenfazit	23
2.2 Biologie von Krebserkrankungen	24
2.2.1. Tumorigenese	25
2.2.2. Die Kennzeichen von Krebs	26
2.2.3. Tumorprogression	27
(1) p53	29
(2) Ras	33
2.2.4. Reparatur von DNA-Schäden in Krebszellen	37
2.2.5. Tumormetabolismus	41
2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	46
3. MATERIAL UND METHODEN	46
3.1 Autochthones Mausmodell	46
3.2 Immunhistochemie	46
4. ERGEBNISSE	47

<b>4.1</b>	<b>Die Kombination aus Inhibierung von Atr und Glut1 zeigt synergistische Toxizität in einem <i>Kras</i><sup>G12D</sup>-getriebenen autochthonen Mausmodell von Weichteilsarkomen</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Kombination aus Inhibierung von Atr und Glut1 zeigt eine erhöhte Expression von Ki67 in Gewebeschnitten von murinen <i>Kras</i><sup>G12D</sup>-getriebenen Weichteilsarkomen</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>58</b>
<b>5.1</b>	<b>Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapien</b>	<b>61</b>
5.1.1.	Mechanismen der Resistenzentwicklung	61
5.1.2.	Kombinationstherapien als Strategie gegenüber Resistenzen	62
<b>5.2</b>	<b>Sicherheit der Kombination aus Inhibition der ATR- und GLUT1-Achse</b>	<b>63</b>
5.2.1.	Daten zum Sicherheitsprofil von VE822	64
5.2.2.	Daten zum Sicherheitsprofil von WZB117	65
<b>5.3</b>	<b>Wirkmechanismus der kombinierten Blockade von ATR und GLUT1</b>	<b>66</b>
<b>5.4</b>	<b>Abschließende Bemerkung</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>79</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA .....	<i>acetyl coenzyme A</i>
ALK .....	anaplastische Lymphomkinase
ANOVA .....	<i>Analysis of variance</i>
APC/C .....	<i>Anaphase-promoting complex/cyclosome</i>
ARF .....	<i>alternate reading frame</i>
ATM .....	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP .....	Adenosintriphosphat
ATR .....	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
ATRIP .....	<i>ATR-interacting protein</i>
BAD .....	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>
BCL-2 .....	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMI .....	<i>body mass index</i>
BPDE .....	<i>anti-Benzo(a)pyren-diol-epoxid</i>
BRCA1/2 .....	<i>breast cancer type 1/2 susceptibility protein</i>
CAR .....	<i>chimärer Antigenrezeptor</i>
CDK .....	Cyclin abhängige Kinase ( <i>engl.: cyclin dependent kinase</i> )
Chk1/2 .....	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
CLL .....	chronisch lymphatische Leukämie
CML .....	<i>chronisch myeloische Leukämie</i>
CMV .....	Cytomegalovirus
Cre .....	<i>cyclization recombination</i> oder <i>causes recombination</i>
CT .....	Computertomographie
DALYs .....	<i>disability-adjusted life years</i>
DNA .....	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.: deoxyribonucleic acid</i> )
EGFR .....	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK1/2 .....	<i>extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
ER $\alpha$ .....	Östrogen Rezeptors $\alpha$
ESMO .....	<i>European Society for Medical Oncology</i>
FDG .....	18-Fluor-Deoxyglukose
FFPE .....	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe ( <i>engl.: formalin-fixed paraffin-embedded tissue</i> )
Floxed .....	von loxP-Stellen flankiert ( <i>engl.: flanked by loxP</i> )
FOXO .....	<i>forkhead-box O</i>
GAP .....	<i>GTPase activating proteins</i>
GBD .....	<i>global burden of disease</i>
GDP .....	Guanosindiphosphat
GEF .....	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GHE .....	<i>Global Health Estimates</i>
GLUT .....	Glukose-Transporter
GLUT1 .....	<i>glucose transporter protein type 1</i>
GR .....	<i>genomisches Rearrangement</i>
GRB2 .....	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK-3 $\beta$ .....	<i>glycogen synthase kinase-3 beta</i>
GTP .....	Guanosintriphosphat
HDI .....	Index der menschlichen Entwicklung ( <i>engl.: Human Development Index</i> )
HE .....	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2 .....	<i>epidermal growth factor-receptor 2</i>
HIC .....	<i>Länder mit hohem Einkommen (engl.: high-income countries)</i>
HR .....	<i>homologe Rekombination</i>
HRAS .....	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

ICD-10.....	10. Version der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (engl.: 10th revision of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)
ICGC.....	International Cancer Genome Consortium
kg KG.....	Kilogramm Körpergewicht
KRAS.....	Kirsten rat sarcoma virus
LDH.....	Laktatdehydrogenase
MAPK.....	mitogen-activated protein kinase
MDM2.....	Mouse double minute 2 homolog
MEFs.....	embryonale Fibroblasten der Maus (engl.: mouse embryonic fibroblasts)
MRE11.....	meiotic recombination 11 homolog
MRT.....	Magnetresonanztomographie
mTOR.....	mechanistic target of Rapamycin
NAD(H).....	Nicotinamidadeninukleotid
NADPH.....	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NBS.....	Nijmegen breakage syndrome
NER.....	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NGS.....	next-generation sequencing
NHEJ.....	nicht-homologe Endverknüpfung (engl.: non-homologous end joining)
NRAS.....	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NSCLC.....	nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (engl.: non-small cell lung cancer)
OXPPOS.....	oxidative Phosphorylierung
PBS.....	Phosphate-buffered saline
PCAWG.....	Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes
PDH.....	Pyruvatedehydrogenase
PDK1.....	phosphoinositide-dependent kinase 1
PEP.....	Phosphoenolpyruvat
PI3K.....	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub> .....	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub> .....	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat
PK.....	Pyruvatkinase
PKB.....	Proteinkinase B
PR.....	Progesteron Rezeptor
PTEN.....	phosphatase and zensin homolog
PURE.....	Prospective Urban Rural Epidemiology Study
RAF.....	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras.....	rat sarcoma virus
Rb.....	Retinoblastom
REFs.....	embryonale Fibroblasten der Ratte (engl.: rat embryonic fibroblasts)
ROS.....	reaktive Oxygenspezies
RPA.....	replication protein A
SARS-CoV-2.....	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SCNA.....	somatische Kopienzahlalteration (engl.: somatic copy number alteration)
SDI.....	soziodemographischer Index
SGLT1/2.....	sodium–glucose cotransporter 1/2
SGR.....	somatisches Genom-Rearrangement
shRNA.....	short hairpin RNA
siRNA.....	short interfering RNA
SLC2.....	solute carrier family 2
SOS.....	son of sevenless
ssDNA.....	Einzelstrang-DNA (engl.: single-stranded DNA)
SWEET.....	Sugars Will Eventually Be Exported Transporter
T-ALL.....	T-Zell akute lymphatischen Leukämie
TCGA.....	The Cancer Genome Atlas
TKI.....	Tyrosinkinaseinhibitor
TNBC.....	triple-negative breast cancer

TSC1 ..... *tuberous sclerosis 1/2*  
TSG ..... *Tumor-Suppressor Gen*  
USA ..... *Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: United States of America)*  
UTR ..... *untranslatierte Region*  
VEGF ..... *vascular endothelial growth factor*  
VHL ..... *Von Hippel-Lindau*  
WHO ..... *Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization)*

## **Vorabbemerkung**

Die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse sind in ihren wesentlichen Teilen bereits in der beigefügten Publikation: „Dual Inhibition of GLUT1 and the ATR/CHK1 Kinase Axis Displays Synergistic Cytotoxicity in *KRAS*-Mutant Cancer Cells“, die am 12. August 2019 in der Fachzeitschrift „Cancer Research“ erschienen ist, veröffentlicht (siehe Kapitel 8 auf Seite 79). Die hier beschriebenen Arbeiten sind daher maßgeblich durch die dort veröffentlichten Ergebnisse motiviert.

Daher werden hier nun einerseits Daten zu bereits veröffentlichten Experimenten präsentiert, die über die Darstellung in der Publikation hinausgehen. Andererseits werden außerdem Daten zu zusätzlichen Experimenten vorgelegt, die keinen Eingang in die Publikation gefunden haben.

## 1. Zusammenfassung

Krebserkrankungen weisen vor allem in der westlichen Welt nach wie vor eine hohe Prävalenz und insbesondere bei bestimmten Entitäten auch eine hohe Mortalität auf. Das Verständnis von Krebserkrankungen fußte in der frühen onkologischen Forschung zunächst auf der Annahme, dass prinzipiell jedes Ursprungsgewebe maligne entarten kann, sodass man Tumorentitäten nach dem Herkunftsgewebe einteilte. Folgerichtig unterschieden sich auch die Therapieansätze vor allem je nach betroffenem Organsystem. Mit der aufkommenden Möglichkeit, das Genom von Tumorgeweben zu sequenzieren, setzte sich in den vergangenen Jahren jedoch die Überzeugung durch, dass das Verhalten eines Tumors vielmehr durch bestimmte Mutationen bestimmt wird als durch das befallene Organsystem. Somit konnten erfolgreich hoch spezialisierte Therapien entwickelt werden, deren Wirkmechanismen zielgerichtet auf bestimmte Mutationen sind.

Vergleichsweise häufig sind Mutationen in der Familie der Ras GTPasen, die potente Onkogene darstellen. Der als Folge solcher Mutationen hyperaktivierte RAS/MAPK-Signalweg ist gut charakterisiert und reguliert im Zusammenspiel mit zahlreichen weiteren Proteinen letztlich unter anderem Zellteilung und -proliferation bzw. Apoptose. Damit eignet sich der Signalweg gut für pharmakologische Interventionen, da er unterschiedliche potentielle Angriffspunkte beinhaltet.

In der vorliegenden Arbeit konnte dementsprechend gezeigt werden, dass eine simultane pharmakologische Inhibierung der Checkpoint-Kinase „Atr“ und des Glukosetransporters „Glut1“ das Tumorwachstum von *Kras*-mutierten Tumoren reduziert. Hervorzuheben sind dabei zum einen, dass der Wirkeintritt hauptsächlich vom Vorliegen der Mutation abhängt, während das Ursprungsgewebe keine Rolle zu spielen scheint. Zum anderen tritt die erwünschte Wirkung nur bei gleichzeitiger Inhibierung beider Proteine ein, nicht jedoch bei alleiniger Verabreichung nur einer der Inhibitoren. Der Effekt der pharmakologischen Inhibierung ist damit nicht additiv, sondern synergistisch. Das scheint vor allem aus zwei Gründen relevant. Einerseits können so toxische Nebenwirkungen eher vermieden werden, da keiner der Inhibitoren besonders hoch dosiert werden muss. Andererseits wird es dem Tumor so erschwert, dieser Intervention bspw. durch weitere Mutationen zu entgehen, da die Intervention an zwei voneinander separaten Punkten ansetzt.

In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck ein autochthones Tumormodell von *Kras*<sup>G12D</sup>-getriebenen Weichteilsarkomen in der Maus genutzt. Nach einwöchiger Behandlung mit entweder einem der beiden Therapeutika, der Kombination aus beiden, oder einem Placebo konnte mittels Magnetresonanztomographie das Tumorwachstum analysiert werden. Hier zeigte sich bei Therapie mit der Kombination ein im Vergleich zu allen anderen Therapien signifikant reduziertes Tumorwachstum. In histologischen Schnitten konnte dieser Trend zu reduziertem Wachstum, wenn auch in diesem Fall nicht signifikant, bestätigt werden.

## **2. Einleitung**

Auch wenn die jüngere Vergangenheit – vor allem die Jahre 2020 und 2021 und etwas weniger dramatisch auch 2022 und 2023 – ganz im Zeichen der SARS-CoV-2 Pandemie stand, und damit das gesellschaftliche Interesse nahezu gänzlich auf Infektionserkrankungen gerichtet war und ist, stellen Krebserkrankungen weiterhin eine sehr ernst zu nehmende Herausforderung dar. Trotz Erfolgen in der Prävention und Früherkennung bestimmter Krebsarten sind Prävalenz und Mortalität weiterhin hoch, da hohes Alter für die Entstehung von Neubildungen prädisponiert und die Bevölkerung stetig altert. Somit ist eine kontinuierliche Erforschung von effektiven Therapieoptionen weiterhin hochrelevant, um sowohl tragische Einzelschicksale verhindern zu können als auch den Anforderungen des demographischen Wandels gerecht zu werden.

### **2.1 Epidemiologie**

Verlässliche epidemiologische Daten über globale Inzidenzen von Krankheiten sind methodisch schwer zu gewinnen, da eine Vielzahl von medizinischen sowie politischen Systemen zu großen Unterschieden in der Art der Datenerhebung und –speicherung führen, sodass in manche Gegenden sogar gar keine Daten systematisch erhoben werden.<sup>11</sup> Des Weiteren klassifizieren verschiedene Länder teilweise dieselbe Krankheit unterschiedlich; ebenso gibt es erhebliche Differenzen bei der Feststellung, welche Krankheit zum Tod geführt hat.

#### **2.1.1. Qualität globaler epidemiologischer Daten**

In einer Übersichtsarbeit von Colin Mathers, der selbst von 2002-2018 in leitender Funktion für die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gearbeitet hat, sind die Bemühungen, systematisch globale Daten zur Epidemiologie von Krankheiten zu generieren, detailliert aufgeführt.<sup>12</sup> Einer der ersten Versuche, weltweit möglichst vollständige Daten über die Epidemiologie von Krankheiten zu erlangen, wurde von der Weltbank in Auftrag gegeben und 1993 veröffentlicht.<sup>13</sup> Diese „Global burden of disease (GBD)“ getaufte Studie wurde von der WHO durchgeführt und lieferte zum ersten Mal Daten, die über 100 Krankheiten separat behandelten, an Stelle von großen, sehr heterogenen Gruppen von Krankheiten, wie es in älteren Studien der Fall gewesen war. Des Weiteren wurden hier zum ersten Mal innovative Parameter wie die „disability adjusted life years (DALY)“ verwendet,<sup>14</sup> einem Maß, das nicht nur die Mortalität einer Krankheit berücksichtigt, sondern auch versucht, den Verlust an Lebensqualität auf Grund von Krankheit sowie deren Therapie zu quantifizieren.<sup>15</sup> In den darauf folgenden Jahren entwickelte die WHO die GBD-Studien kontinuierlich weiter und erweiterte sowohl die Anzahl eingeschlossener Krankheiten als auch die untersuchten Parameter. Mit steigendem weltweitem Interesse an den Studien wurde jedoch auch von ehemaligen Mitarbeitern der WHO in Frage gestellt, ob die WHO überhaupt grundsätzlich in

der Lage ist, valide Daten zu erheben.<sup>16</sup> So sei es ein institutionelles Problem, dass die WHO auf ihre Mitgliedsstaaten angewiesen ist, belastbare Daten zur Verfügung zu stellen. Da die WHO selbst auch finanzielle Mittel in Abhängigkeit vom angeblichen Erfolg bestimmter Interventionsmaßnahmen verteilt, der sich wiederum zumindest teilweise an den bereitgestellten Daten bemisst, würde die WHO so Anreize liefern, diese Daten zu manipulieren.<sup>17</sup> Neben Kritik an der wissenschaftlichen Interpretation der Daten wurde vor allem bemängelt, dass die WHO keine unabhängigen Messungen durchführen, sondern nur Daten auswerten könne, die unter erheblichem politischen Druck erhoben würden.<sup>18</sup> Als Versuch, systematisch valide Daten zu generieren, die unabhängig von finanziellen oder politischen Zwängen erhoben werden, gab die Bill-und-Melinda-Gates-Stiftung in Konkurrenz zu den von der WHO publizierten Daten eigene Studien in Auftrag, die seit 2007 am „Institute for Health Metrics and Evaluation“ der Universität von Washington, Seattle (USA), durchgeführt werden und ebenfalls unter dem Namen „Global burden of disease (GBD)“ alle 2 Jahre in der Fachzeitschrift „Lancet“ veröffentlicht werden.<sup>19</sup>

Um eine Verwechslung zu vermeiden, werden die weiterhin von der WHO gesammelten Daten hingegen seit 2013 als „Global Health Estimates (GHE)“ veröffentlicht.<sup>20</sup> Die GBD unterscheidet sich grundlegend dadurch von den GHE, dass die Auswertungen der GHE hauptsächlich auf den von den Mitgliedsstaaten gemeldeten Zahlen beruhen, während die GBD versucht, die Auswertung möglichst unabhängig von den nationalen Behörden der Mitgliedsstaaten durchzuführen, indem mittels mathematischer Modelle weltweit epidemiologische Datensätze errechnet werden, wobei in diese Schätzungen sowohl offizielle Inzidenz- sowie Mortalitätsstatistiken eingehen, aber auch verbal übermittelte Autopsiebefunde, regionale Umfragen oder Test- und Laborauswertungen. Somit werden Datensätze generiert, die miteinander kompatibel sind und damit genaue Vergleiche untereinander zulassen.<sup>21-23</sup> Genau diese im GBD angestrebte Nutzung von Quellen jenseits der offiziellen nationalen Statistiken wird wiederum von Befürwortern der GHE als nicht verlässlich kritisiert.<sup>24</sup> Ein weiterer wiederkehrender Kritikpunkt an den GBD-Studien ist, dass die Daten, auf denen die Berechnungen basieren, nur teilweise öffentlich zugänglich sind und die Validität der mathematischen Modelle daher nicht von unabhängigen Wissenschaftlern verifiziert werden kann.<sup>25</sup> Welche der beiden Institutionen die robusteren Daten liefert, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Für bestimmte Krankheitsbilder und deren Bewertung finden sich auf Grund der unterschiedlichen Methodik erheblich differierende Zahlen.<sup>26</sup> Systematische Unterschiede finden sich schon deshalb, weil für die GBD-Studien eigene Schätzungen über regionale Neugeburtenraten angestrengt werden.<sup>27</sup> Betrachtet man für unsere Zwecke hingegen nur die krebsspezifischen Daten, zeigt die GBD in der Version von 2016 weitgehende Übereinstimmung mit entsprechenden Statistiken der WHO, sodass von einer ähnlichen Qualität beider Modelle ausgegangen werden kann.<sup>28</sup> Die aktuellsten Daten liefert

die jüngste Version der GBD-Studie von 2019, in der Daten aus den Jahren 1990-2017 analysiert und miteinander verglichen werden.<sup>1</sup>

### 2.1.2. Krebs ist im Jahr 2019 die zweithäufigste Todesursache weltweit

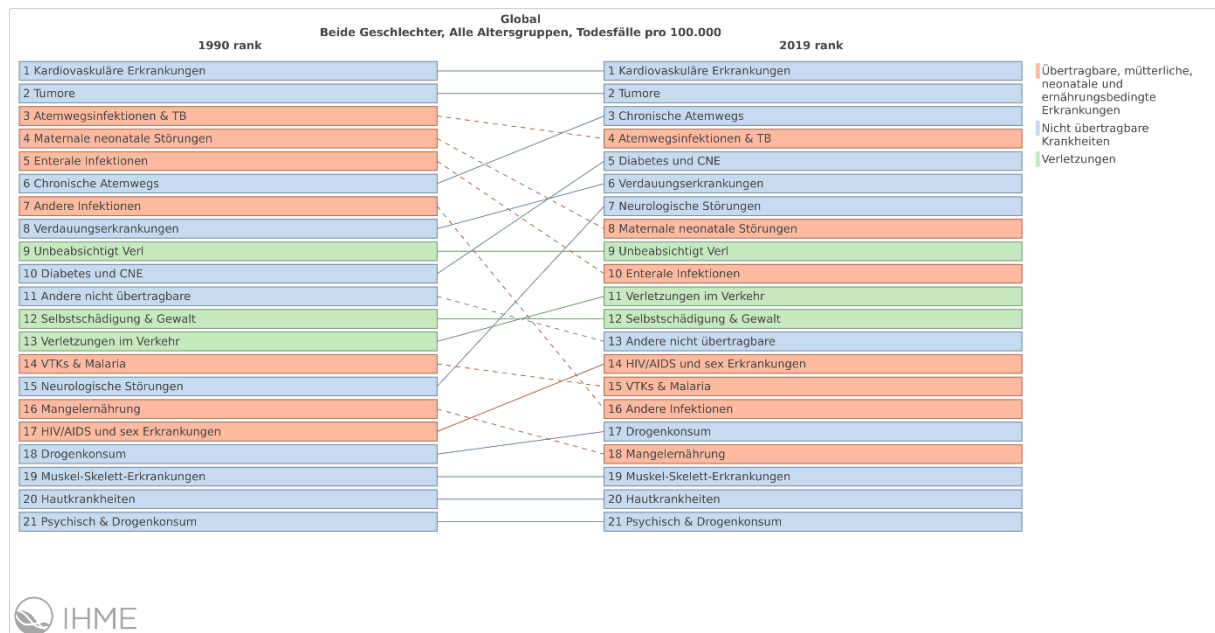


Abbildung 1: Globale Todesursachen 1990 vs. 2019 laut GBD 2019. Modifiziert nach Vos T et al., The Lancet, 2020.<sup>1</sup>

Nach der neuesten Version der GBD-Studie, die im Oktober 2020 veröffentlicht wurde und Daten bis 2019 berücksichtigt, sind Krebserkrankungen im Vergleich zu anderen Diagnosen, die im ICD-10 auf derselben hierarchischen Ebene stehen, die zweithäufigste Todesursache weltweit (Abbildung 1). Mit 130,27 Todesfällen pro 100.000 Einwohner ist die Zahl der Todesfälle damit um 21,09% gestiegen. Betrachtet man Patienten männlichen bzw. weiblichen Geschlechts separat, erhält man ein sehr ähnliches Ergebnis, wobei Krebserkrankungen in beiden Fällen die zweithäufigste Todesursache darstellen. Vergleicht man nur bestimmte Altersgruppen, wird deutlich, dass Krebs als Todesursache eher ein Phänomen des mittleren und höheren Alters und weniger des Kindes- und Jugendalters ist. In allen untersuchten Altersklassen ab dem 40. Lebensjahr rangieren Krebserkrankungen auf dem 2. Platz der häufigsten Todesursachen. In den jüngeren Altersgruppen sind dabei erhebliche Rückgänge im Vergleich zu 2019 zu beobachten, wobei der größte Rückgang von -50,24% in der Gruppe der unter 5-Jährigen zu verzeichnen ist. Bemerkenswerterweise ist auch insgesamt ein Rückgang von -15,22% zu verzeichnen, wenn man die altersstandardisierten Zahlen betrachtet, wobei auch in diesem Fall Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache darstellen.

### 2.1.3. Tumorerkrankungen in Deutschland

Betrachtet man ausschließlich die Daten des GBD für Deutschland, ergibt sich ein ähnliches Bild. Auch hier rangieren Tumorerkrankungen hinter kardiovaskulären Erkrankungen an 2.



Stelle der häufigsten Todesursachen im Jahr 2019. Mit 322,78 Todesfällen auf 100.000 Einwohner ist die Anzahl der durch Tumorerkrankungen verursachten Todesfälle damit pro Kopf sogar mehr als doppelt so hoch wie es global der Fall ist. Daten aus der „Prospective Urban Rural Epidemiology Study (PURE)“ Studie, die prospektive Zusammenhänge zwischen sozioökonomischen Lebensbedingungen und dem Auftreten bestimmter Krankheitsentitäten untersucht, legen sogar nahe, dass Krebserkrankungen in Ländern mit hohem Einkommen („high income countries (HIC)“) und manchen Ländern mit mittlerem Einkommen („medium income countries (MIC)“) kardiovaskuläre Erkrankungen bereits als führende Todesursache in der Altersspanne zwischen 35-70 Jahren abgelöst haben.<sup>29</sup>

Auch die Zahlen des Robert-Koch-Institutes zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 bestätigen diese Einschätzung. Hier werden die altersstandardisierten Raten für Krebserkrankungen für Frauen mit 126,7/100.000 und für Männer mit 196,5/100.000 beziffert.<sup>30</sup>

Zusammengenommen finden sich in unterschiedlichen Publikationen mit differierenden Messmethoden zwar leicht verschiedene absolute Zahlen, aber eine gemeinsame Schlussfolgerung. Krebserkrankungen stellen unabhängig vom Geschlecht weltweit die zweithäufigste Todesursache dar und sind in HIC wie Deutschland möglicherweise sogar die führende Todesursache. Sowohl global als auch in Deutschland ist Krebs eine Erkrankung des höheren Alters, während Tumorerkrankungen als Todesursache im Kindesalter deutlich rückläufig sind.

#### **2.1.4. Disability adjusted life years (DALYs)**

Auf Grund des rasanten Fortschrittes in der Behandlung von Krebserkrankungen verlängert sich auch das mittlere Überleben nach Diagnosestellung erheblich. Nimmt man alle Krebserkrankungen zusammen, liegt das relative 10-Jahres-Überleben in Deutschland für Frauen bei 61% und für Männer bei 57%.<sup>30</sup> Das hebt hervor, dass Mortalität und Inzidenz alleine nicht ausreichen, um den Stellenwert von Krebserkrankungen in der Bevölkerung zu quantifizieren. Betrachtet man die DALYs, sind Tumore für die zweitmeisten verlorenen gesunden Lebensjahre verantwortlich, nämlich 3,249 DALYs pro 100.000.<sup>1</sup> Vor allem der Vergleich zu 1990, als Tumore noch an sechster Stelle standen, spiegelt die weiter zunehmende Bedeutung von Tumorerkrankungen wider. Obwohl kardiovaskuläre Erkrankungen im selben Zeitraum vom dritten auf den ersten Platz vorgerückt sind, ist hier in absoluten Zahlen ein Rückgang zu verzeichnen. Wenn sich dieser Trend fortsetzt, könnte Tumorerkrankungen in Zukunft im Vergleich zu anderen Erkrankungen somit sogar ein noch höherer Stellenwert zukommen.

## 2.1.5. Inzidenz und Mortalität von organspezifischen Krebserkrankungen

### (1) Geschlechtsspezifische Unterschiede

Wie bereits oben gezeigt, finden sich bei Inzidenz und Mortalität von Tumorerkrankungen, wenn darunter verschiedenste Krebsarten subsummiert werden, nur geringe Unterschiede zwischen Frauen und Männern. Betrachtet man hingegen die Häufigkeit der Primärlokalisationen von neu diagnostizierten Krebserkrankungen, finden sich erhebliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Weltweit machten 2017 Krebserkrankungen der Haut, der Prostata sowie der Lunge und des Bronchialsystems 54% der Neuerkrankungen bei männlichen Patienten aus. Bei Frauen sind es hingegen nicht-melanotischer Hautkrebs, Brustkrebs und kolorektale Krebserkrankungen, die bei 54% aller Neuerkrankungen festgestellt werden.<sup>2</sup> Auch bei den Krebsarten mit der höchsten Mortalität unterscheiden sich beide Geschlechter stark: Während Krebs der Leber, des Magens sowie der Lunge und des Bronchialsystems für die meisten Todesfälle bei Männern verantwortlich sind, häufen sich bei Frauen Tumore der Brust, ebenfalls Tumore der Lunge und des Bronchialsystems sowie Tumore des Magens.<sup>2</sup>

Neueste Schätzungen aus dem Jahr 2020 geben für die USA beim Mann die Prostata als das am häufigsten befallene Organ an, während es bei der Frau die Brust ist (Abbildung 2), wenn man von nicht-melanotischem Hautkrebs und anderen nicht näher bezeichneten malignen Neoplasien absieht.<sup>5</sup> Alle im Folgenden präsentierten Daten beziehen diese beiden Entitäten gleichfalls nicht mit ein.


Geschätzte Neudiagnosen 2020 in den USA							
				Männlich	Weiblich		
Prostata	191,930	21%		Brust	276,480	30%	
Lunge und Bronchialsystem	116,300	13%		Lunge und Bronchialsystem	112,520	12%	
Kolon und Rektum	78,300	9%		Kolon und Rektum	69,650	8%	
Harnblase	62,100	7%		Uterus	65,620	7%	
Melanom der Haut	60,190	7%		Schilddrüse	40,170	4%	
Nieren und ableitende Harnwege	45,520	5%		Melanom der Haut	40,160	4%	
Non-Hodgkin-Lymphom	42,380	5%		Non-Hodgkin-Lymphom	34,860	4%	
Mundhöhle und Pharynx	38,380	4%		Nieren und ableitende Harnwege	28,230	3%	
Leukämie	35,470	4%		Pankreas	27,200	3%	
Pankreas	30,400	3%		Leukämie	25,060	3%	
<b>Alle Lokalisationen</b>	<b>893,660</b>	<b>100%</b>	<b>Alle Lokalisationen</b>	<b>912,930</b>	<b>100%</b>		

Abbildung 2: Vergleich der Primärlokalisationen von neudiagnostizierten Tumoren im Jahre 2020 in den USA zwischen Männern und Frauen. Modifiziert nach Siegel RL et al., *A Cancer Journal for Clinicians*, 2020.<sup>5</sup>

Vergleicht man die krebspezifischen Daten einzelner Länder, zeigen sich auffällige regionale Besonderheiten. Je nach Region variiert auch die Tumorentität mit der höchsten Inzidenz. Beim Mann weisen Tumore der Prostata zwar in den meisten Ländern die höchste Inzidenz auf (112 Länder), in anderen Ländern sind jedoch Tumore der Lunge (36

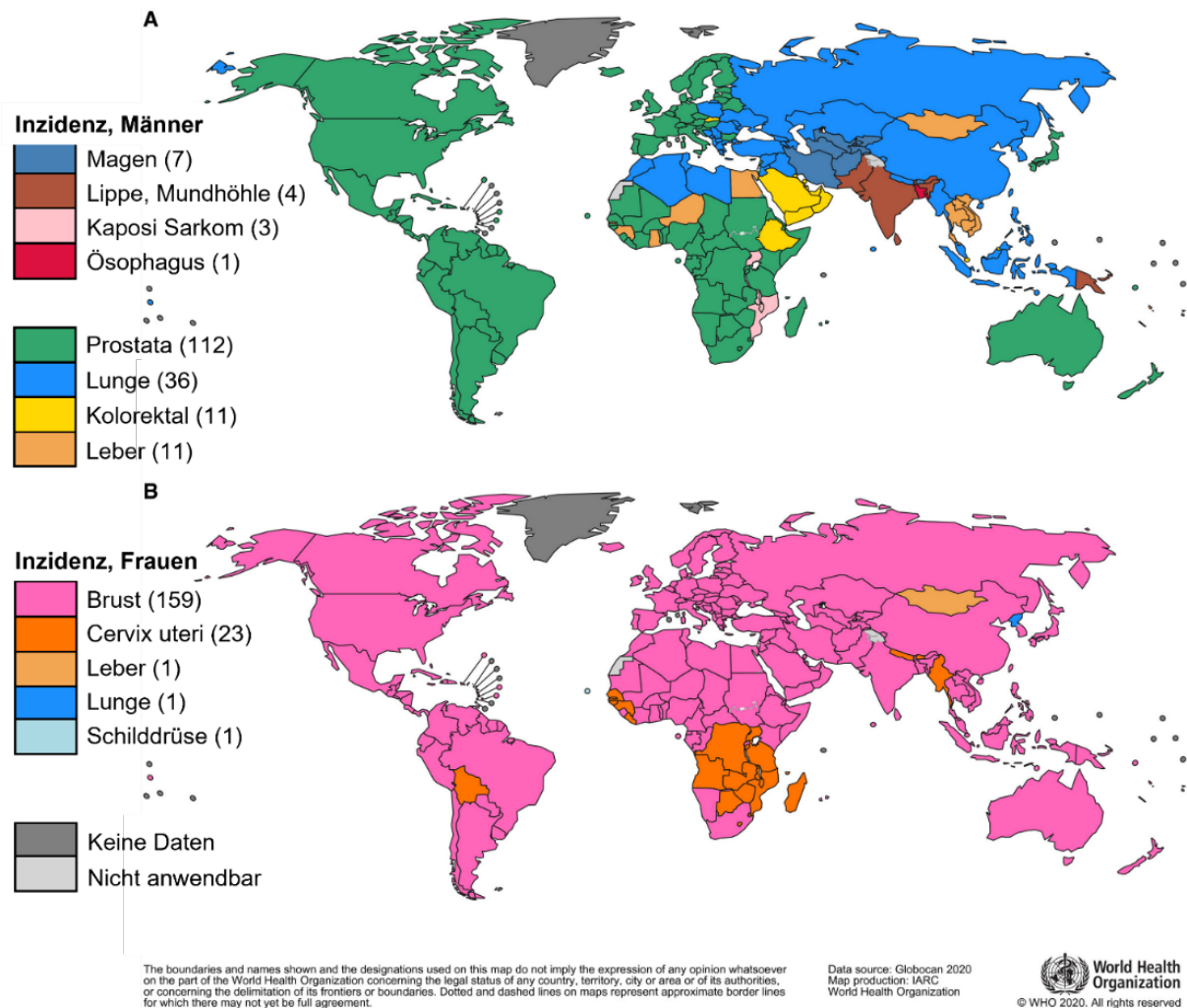


Abbildung 3: Vorkommen der häufigsten Krebsarten weltweit bei Männern (A) und Frauen (B). In Klammern findet sich die Anzahl der Länder, in denen die jeweilige Krebsart führend ist. Modifiziert nach Sung H et al., *A Cancer Journal for Clinicians*, 2021.<sup>7</sup>

führend (Abbildung 3A).<sup>7</sup> Bei Frauen ist die globale Verteilung der Tumore mit der höchsten Inzidenz etwas homogener, wobei in fast allen Ländern, für die Daten vorliegen, entweder Tumore der Brust (159) oder des Gebärmutterhalses (23) die höchste Inzidenz aufweisen (Abbildung 3B).<sup>7</sup> Da es sich bei Gebärmutterhalskrebs um eine prinzipiell in vielen Fällen durch Primärprävention vermeidbare Erkrankung handelt, zu deren Ausrottung die WHO aufgerufen hat, zeigen sich hier beispielhaft die Auswirkungen verschiedener Gesundheitssysteme auf die Inzidenz einzelner Krebserkrankungen.<sup>31-34</sup>

Vergleicht man an Stelle der Inzidenz die Mortalität einzelner Krebsarten, zeigt sich ein ähnlich variables Bild. Bei Männern wird die Liste von Krebserkrankungen mit der höchsten Mortalität in der Mehrzahl der Länder von Lungentumoren angeführt (93), in anderen Ländern weisen jedoch Prostata- (48) bzw. Lebertumoren (23) eine höhere Mortalität auf. Bei Frauen zeichnen sich in den meisten Ländern, wie schon bei der Inzidenz, Tumore der Brust bzw. des Gebärmutterhalses auch durch die höchste Mortalität unter den Krebserkrankungen aus (110 bzw. 36). Trotz der Tatsache, dass Lungentumore in nur einem Land die höchste Inzidenz bei

den Krebserkrankungen der Frau aufweisen, stellen sie in 25 Ländern die Krebserkrankung mit der höchsten Mortalität dar.

## (2) Unterschiede in Abhängigkeit vom Soziodemographischen Index (SDI)

Die Diskrepanz zwischen Inzidenz und Mortalität sowie die regionale Häufung von potentiell vermeidbaren Erkrankungen wie Gebärmutterhalskrebs legen den Schluss nahe, dass nicht nur regionale Unterschiede in der Exposition zu kanzerogenen Substanzen, sondern auch systemische Unterschiede in den jeweiligen Gesundheitssystemen dafür kausal sind. In der Tat korrelieren regionale Unterschiede in Inzidenz und Mortalität bestimmter Krebsarten auch mit den soziodemographischen Indices (SDI) dieser Länder. Der SDI, der sich aus Messungen des Pro-Kopf-Einkommens, der durchschnittlichen Schulzeit in Jahren und der absoluten Fruchtbarkeitsrate errechnet, soll Rückschlüsse auf den Entwicklungsgrad eines Landes ermöglichen.<sup>35</sup> So werden zwar circa 50% aller Neudiagnosen in Ländern mit hohem SDI gestellt, gleichzeitig finden sich hier jedoch nur 30% aller durch Krebs verursachten Tode und 25% aller durch Krebs bedingten DALYs.<sup>2</sup>

Dennoch überwiegen die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei weitem gegenüber regionalen Unterschieden. Vergleicht man nämlich die Inzidenz von Tumoren in Ländern mit verschiedenen SDIs, ähnelt sich die prozentuale Verteilung der am häufigsten von Krebs betroffenen Organe, wenn auch die absoluten Zahlen deutlich voneinander abweichen (Abbildung 4). Erhebliche Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern finden sich hingegen unabhängig vom SDI in allen Ländern, für die Daten erhoben werden.<sup>1</sup>

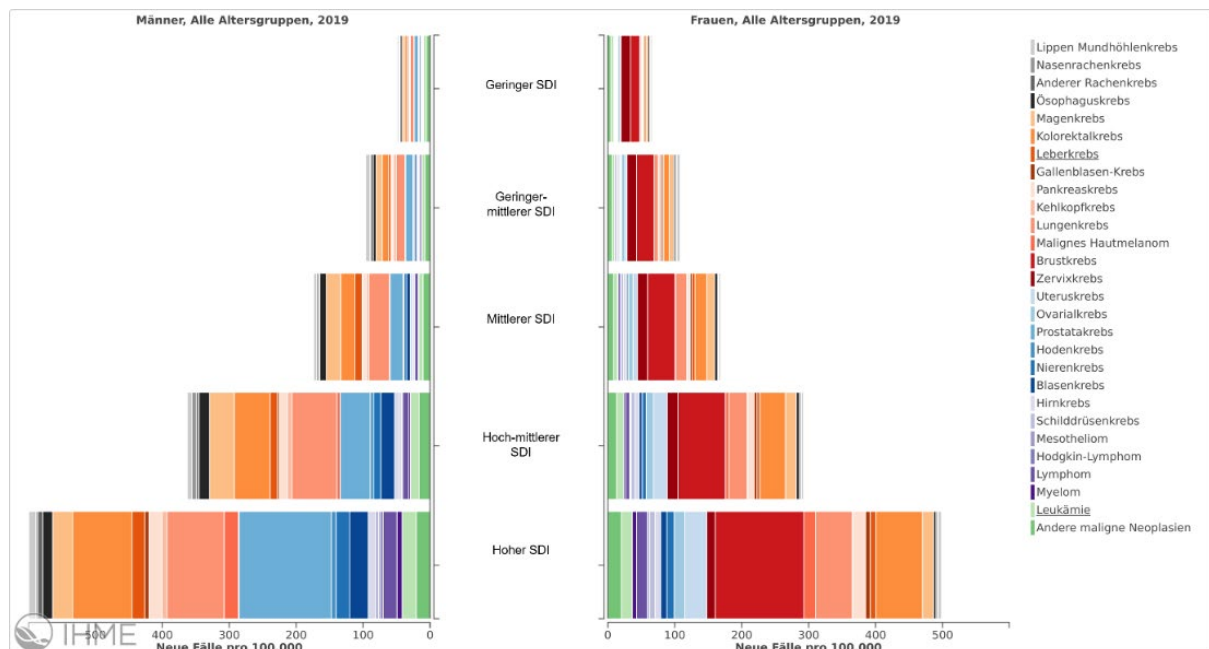


Abbildung 4: Vergleich von organspezifischen Tumorinzidenzen zwischen Ländern mit unterschiedlichen soziodemographischen Indices (SDI) von gering bis hoch. Erstellt mit <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare><sup>4</sup> basierend auf Daten des GBD 2019.<sup>1</sup>

Analog zur Inzidenz gilt auch für die Mortalität, dass sich die Proportionen, mit denen unterschiedliche Krebsarten zur Gesamtmortalität beitragen, auch in Ländern mit

unterschiedlichen SDIs ähneln. Einen erheblichen Unterschied zwischen beiden Geschlechtern findet sich hingegen unabhängig von regionalen Besonderheiten.<sup>1</sup>

### 2.1.6. Demographische Veränderungen und Fallzahlprognosen

Die vorhandenen epidemiologischen Daten beschreiben Krebs eindeutig als eine Erkrankung des mittleren und hohen Alters, deren Inzidenz und Mortalität unter anderem mit dem SDI eines Landes korrelieren. Demographische Entwicklungen sowie der SDI – in dessen Berechnung die durchschnittliche Lebenserwartung ja mit eingeht – lassen sich anhand mathematischer Modelle prognostizieren. Dementsprechend lassen sich auch die Fallzahlen von Krebserkrankungen in der Zukunft näherungsweise berechnen. Geht man beispielsweise davon aus, dass das jeweilige Bevölkerungswachstum in bestimmten Regionen konstant

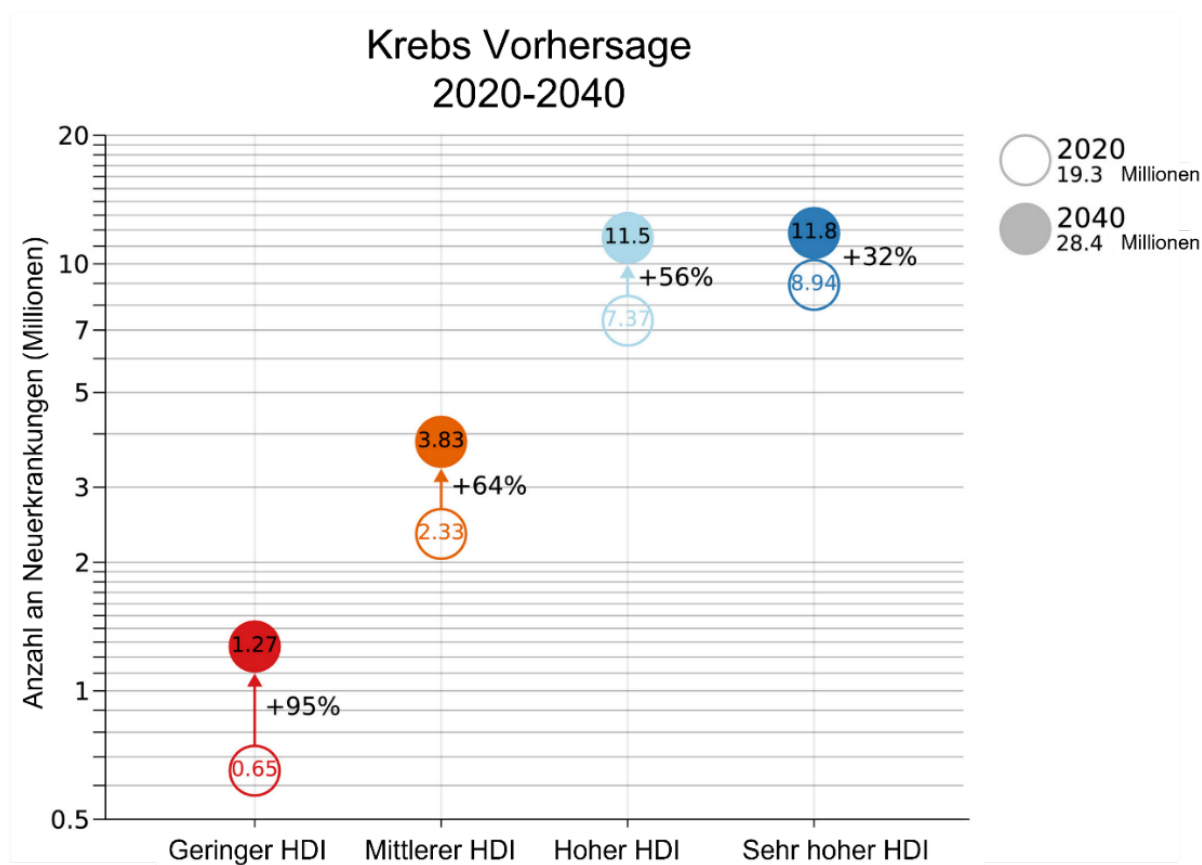


Abbildung 5: Vorhersagen über die Entwicklung der Anzahl an Neuerkrankungen im Jahr 2040 relativ zum Jahr 2020 in Abhängigkeit vom human development index (HDI). Modifiziert nach Sung H et al., A Cancer Journal for Clinicians, 2021.<sup>7</sup>

bleibt, ist im Jahr 2040 mit einer weltweiten Zunahme der Fallzahlen von 28,4 Millionen auszugehen, was einem Zuwachs von 47% oder 19,3 Millionen im Vergleich zu 2020 entspricht (bei Nichtberücksichtigung von Basalzellkarzinomen).<sup>7</sup> Da das Bevölkerungswachstum regional unterschiedlich ist und vom sogenannten „human development index (HDI)“ – einem Maß, das die Möglichkeit, ein langes und gesundes Leben zu führen, angeben soll – abhängt, können ebenso spezifische Prognosen für unterschiedliche Regionen getroffen werden (Abbildung 5).<sup>7</sup>

Dabei ist in Ländern mit geringem HDI mit der höchsten prozentualen Zunahme an Neuerkrankungen auszugehen, während für Länder mit hohem HDI der höchste absolute Zuwachs erwartet wird.

Da für die Zeiträume, in denen bspw. im Rahmen der GBD-Studien systematisch Daten erhoben wurden, auch Messungen zu Wachstums- und zu Alterungsprozessen der Bevölkerung vorliegen, kann retrospektiv auch der jeweilige Anteil berechnet werden, den einzelne Faktoren an Zu- oder Abnahme einzelner Krebsarten haben. Setzt man bspw. die Daten von 2007 und 2017 in Relation, zeigt sich eindrücklich, dass das Bevölkerungswachstum sowie die relative Zunahme von alten Menschen innerhalb der Altersverteilung der Bevölkerung bei allen untersuchten Krebsarten zum Anstieg von Neudiagnosen beiträgt (Abbildung 6, hier beispielhaft für Länder mit hohem SDI).<sup>2</sup>

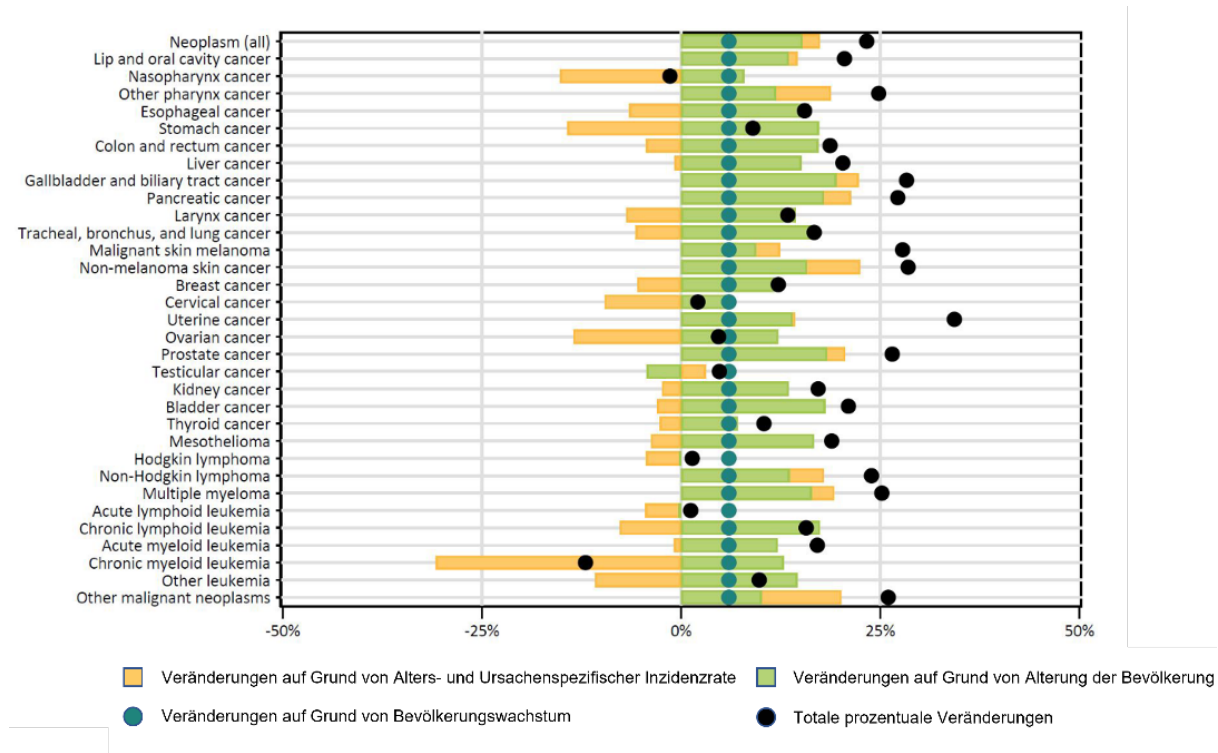


Abbildung 6: Totale prozentuale Veränderungen in der Inzidenzrate von bestimmten Krebsarten sowie die relativen Anteile, die Veränderungen in der Altersspezifischen Inzidenzrate, des Bevölkerungswachstums sowie der Bevölkerungsalterung daran haben. Dargestellt für Länder mit einem SDI im oberen Quintil. Modifiziert nach Fitzmaurice C et al., JAMA Oncol, 2019.<sup>2</sup>

Da sich demographische Veränderungen regional stark unterscheiden, sind auch hier separate Analysen in Abhängigkeit vom SDI sinnvoll. Betrachtet man hingegen die alters- und ursachenspezifische Inzidenzrate – also die Anzahl der Personen in einem bestimmten Alter, die auf Grund einer spezifischen Ursache an einer Krebsart erkranken, bezogen auf die Gesamtzahl an Personen im selben Alter – lässt sich bei manchen Krebsarten hinsichtlich dieser Ursache sogar eine Abnahme der Fallzahlen betrachten. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn auslösende Ursachen gut bekannt und hinreichend bekämpfbar sind. In

Ländern mit hohem SDI, ist dieser Aspekt im Fall der chronisch myeloischen Leukämie (CML) sogar so ausgeprägt, dass trotz Bevölkerungswachstum und -alterung insgesamt ein Rückgang zu verzeichnen war.<sup>2</sup>

Betrachtet man auf diese Art die Zahlen für Deutschland, ist vom Jahre 2020 bis zum Jahre 2030 bei den meisten Krebsarten von einer Zunahme der Inzidenz auszugehen.<sup>36</sup> Dabei wird eine Veränderung der relativen Häufigkeit einzelner Krebsentitäten prognostiziert. So könnte beispielsweise Lungenkrebs bei Frauen den kolorektalen Krebs als zweithäufigste Krebsart ablösen.

### **2.1.7. Häufigkeiten bestimmter Mutationen bei Krebserkrankungen**

Unabhängig vom betroffenen Organ oder der Lokalisation, ist nahezu allen Krebsarten gemein, dass sich die Krebszellen von den gesunden organspezifischen Zellen durch Mutationen in ihrer DNA-Sequenz unterscheiden.<sup>37</sup> Dabei können spezifische Mutationen in bestimmten Genen als ursächlich für die Entwicklung von Krebs angenommen werden, die daher Treibermutationen genannt werden.<sup>38</sup> Daher können Krebserkrankungen nicht nur nach Lokalisation unterschieden werden, sondern auch danach, ob eine solche als Treibermutation bekannte Veränderung der DNA vorliegt. Seit 2005 werden daher im „Cancer Genome Atlas (TCGA)“ genaue Daten zum Vorkommen von Mutationen im Genom von verschiedenen Krebsarten gesammelt.<sup>39</sup> Mit immer weiteren Verbesserungen der technischen Möglichkeiten, schnell und kostengünstig ganze Genome zu sequenzieren, waren schließlich auch die Voraussetzungen gegeben, bei immer mehr Krebspatienten eine Sequenzierung des gesamten Genoms durchzuführen. Im „Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes (PCAWG)“ Konsortium, das gemeinsam vom „International Cancer Genome Consortium (ICGC)“ und dem TCGA verwaltet wird, sind 2.658 genomweite Sequenzierungen aus 38 verschiedenen Krebsentitäten analysiert worden.<sup>3</sup> Hier zeigt sich eindrucklich die Häufung bestimmter Treibermutationen, die wiederum typisch für ganz unterschiedliche Krebsarten sein können (Abbildung 7).

Die am häufigsten beobachtete Mutation, nämlich im Tumorsuppressorgen *TP53*, kommt beispielsweise bei Krebserkrankungen fast aller Organsysteme vor. Mutationen im Tumorsuppressorgen *Von Hippel-Lindau (VHL)* sind hingegen nahezu ausnahmslos bei Nierenzellkarzinomen zu finden. Da diese Treibermutationen zumindest teilweise ursächlich für die Krebsentstehung sind, hat eine Einteilung von Krebserkrankungen anhand dieser Mutationen an Stelle von betroffenen Organsystemen den Vorteil, dass man so Tumoren zusammen betrachtet, die sich in ihren biologischen Eigenschaften ähneln. Das wiederum erlaubt es, für eine größere Gruppe von Tumoren molekulare Strukturen auszumachen, die potentiell Ziel von pharmakologischen Interventionen sein können.

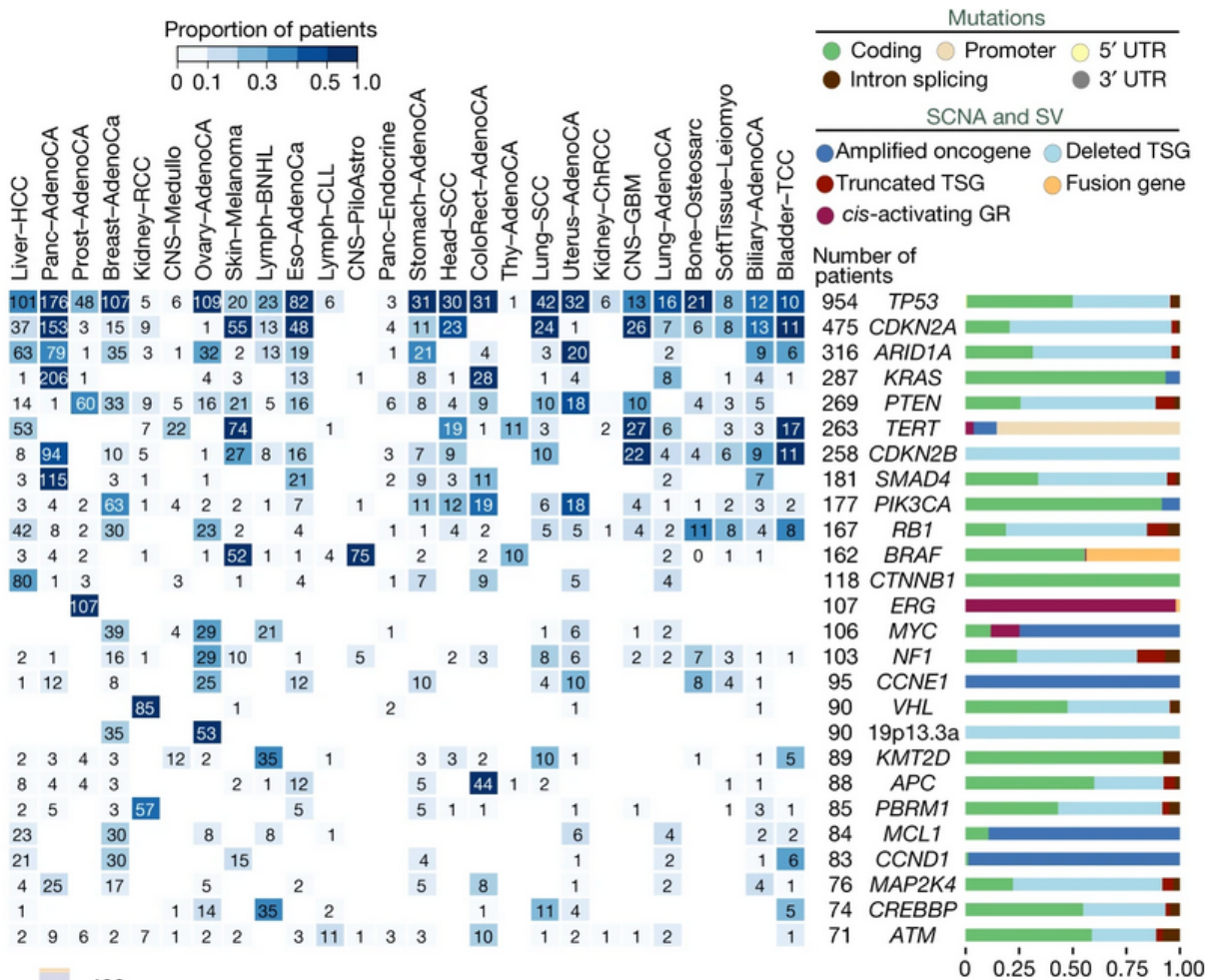


Abbildung 7: Übersicht über genomische Elemente, die in mindestens 65 Tumoren aus der Kohorte Ziel verschiedener Arten von Mutationen sind. Sowohl somatische als auch Keimbahnmutation sind berücksichtigt. Links: Heatmap, die das Auftreten von Mutationen in verschiedenen Krebsarten zeigt. Die Farbe spiegelt den Anteil betroffener Tumoren wider und die Zahl gibt die absolute Anzahl von mutierten Tumoren an. Rechts: Der Anteil bestimmter Arten von Mutationen, die jeweils ein spezifisches genomisches Element betreffen.

GR, genomisches Rearrangement; SCNA, somatische Kopienzahlalteration; SGR, somatisches Genom-Rearrangement; TSG, Tumor-Suppressor Gen; UTR, untranslatierte Region. Modifiziert nach The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium, Nature, 2020.<sup>3</sup>

**2.1.8. Zwischenfazit**

Die epidemiologischen Daten weisen Krebs eindeutig als eine Erkrankung von hoher Relevanz für die Gesamtbevölkerung aus, die das Gesundheitssystem vor große Herausforderungen stellt. Sowohl eine vergleichsweise hohe weltweite Inzidenz aber auch eine hohe Mortalität belegen eindrücklich, dass es sich um eine sehr gefährliche Erkrankung handelt. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass diese Relevanz in einer stetig alternden Bevölkerung voraussichtlich immer weiter zunehmen wird. Allein diese Daten würden ein großes Forschungsinteresse zum besseren Verständnis und Entwicklung neuer Therapieoptionen rechtfertigen. Zusätzlich zeigt der Vergleich von Mortalitätsentwicklungen einzelner Krebsarten zwischen ärmeren und reichern Ländern auch die praktische Anwendbarkeit, die diese Forschung für die Allgemeinbevölkerung hat. So konnten in reicheren Ländern, in denen



die Möglichkeit besteht, neueste Forschungsergebnisse in Therapiekonzepten für individuelle Patienten umzusetzen, einzelne Krebsarten so erfolgreich bekämpft werden, dass die Todeszahlen deutlich gesunken sind.<sup>40</sup> Analog kann ein besseres Verständnis auslösender Ursachen dazu genutzt werden, schon die Inzidenzen relevant zu senken.

Zuletzt eröffnet die Anwendung und kontinuierliche Weiterentwicklung von Verfahren zur Genomsequenzierung die Möglichkeit, Krebs als Folge bestimmter Treibermutationen zu verstehen. Daraus folgt eine Vielzahl von potentiellen Angriffsmöglichkeiten zielgerichteter Therapien, die bereits in einigen weiter entwickelten Ländern zu bahnbrechenden Erfolgen im Kampf gegen Krebs geführt haben. Hier ist davon auszugehen, dass mit zunehmender Verfügbarkeit von Sequenzierungsdaten immer mehr solcher bislang unbekanntem Mutationen entdeckt werden, was wiederum zur Entwicklung neuer, potentiell kausalen Therapieansätze führen kann.

Bisherige Bemühungen und die Prognosen für die kommenden Jahrzehnte belegen damit eindrücklich, dass Krebsforschung einen direkten Nutzen für die Bevölkerung haben kann und in Zukunft eher noch an Relevanz gewinnen wird.

Dies deckt sich mit der Agenda der WHO, die 2020 als eines von fünf Zielen für nachhaltige Entwicklung („sustainable development goals“) auch die Intensivierung der Bemühungen gegen nicht-übertragbare Krankheiten wie Krebs fordert.<sup>41</sup>

## **2.2 Biologie von Krebserkrankungen**

Schon im sogenannten „Edwin Smith Papyrus“, einem medizinischen Text aus dem alten Ägypten, das um circa 3000 v. Chr. entstanden ist, wird Brustkrebs als lebensgefährliche, unheilbare Krankheit beschrieben. Hippokrates (ca. 460 – ca. 375 v. Chr.) und seine Schüler postulierten im alten Griechenland, dass Krebs durch äußere Ursachen ausgelöst wird und möglichst früh bspw. durch chirurgische Entfernung behandelt werden muss.<sup>42</sup> Seit den ersten bekannten rein deskriptiven Beschreibungen von Krebserkrankungen als Geschwulst (Tumor) wurden bahnbrechende Erkenntnisse über die Molekularbiologie von Krebserkrankungen gewonnen. Dieser immense Fortschritt spiegelt sich in der Behandlung von Krebserkrankungen wider, der vor allem in den letzten 20 Jahren mit Beginn der personalisierten Krebstherapie noch einmal einen Paradigmenwechsel erlebt hat.

Beispielsweise standen zur Behandlung von Lungenkrebs in den 1980er Jahren noch hauptsächlich Chemotherapeutika wie Taxane, Vinorelbine und Gemcitabine zur Verfügung.<sup>43</sup> Bereits 1984 wurde der Zusammenhang zwischen einer aktivierenden Punktmutation im Onkogen *KRAS* und besonders starker Malignität beschrieben.<sup>44</sup> Mit fortschreitendem biologischem Verständnis konnten Chemotherapeutika durch zielgerichtetere Therapien ergänzt werden. Die Entdeckung von Mutationen im *EGFR*-Gen (2004) und Rearrangements im *ALK*-Gen (2007) erlaubte es, Patienten zu identifizieren, die vom Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) besonders profitieren würden.<sup>45</sup> Mittlerweile ist die

Sequenzierung von Tumoren und damit die Suche nach möglichen individuellen Therapieoptionen in einigen Gesundheitssystemen zur Routine geworden. So stehen heutzutage neben Chemotherapeutika auch antikörperbasierte Therapien, die zielgerichtet in die Regulation spezifischer Signalwegen eingreifen, sowie immunmodulatorische Therapien und Kombinationstherapien aus Medikamenten verschiedener Klassen zur Verfügung.

### **2.2.1. Tumorigenese**

Tumore sind keine Fremdkörper, die in den betroffenen Patienten eingedrungen sind, sondern gehen aus gesunden körpereigenen Zellen hervor. Die Tatsache, dass sämtliche Zellen des menschlichen Organismus aus nur einer befruchteten Eizelle hervorgehen, wird dadurch ermöglicht, dass alle Informationen, die zur Ausbildung verschiedener Zelllinien benötigt werden, schon in der Eizelle in Form von DNA vorliegen. Da Zellen aus Zellteilung bereits bestehender Zellen hervorgehen, liegt diese Information – nämlich das Genom – in den meisten Zelle in Gänze vor, obwohl gesunde Zellen davon nur den für ihre regelrechte Funktion nötigen Bruchteil verwenden. Die Fähigkeit zur Zellteilung und -differenzierung ist nicht nur während der Embryogenese für das Körperwachstum und die Ausbildung von Organen nötig, sondern ist auch im ausgewachsenen Organismus überlebensnotwendig wie bspw. bei der Regeneration von bestimmten Geweben, der Funktion des Immunsystems bei der Infektabwehr oder bei der Wundheilung.<sup>6</sup> Damit Zellteilung und -differenzierung im Gesamtorganismus zur richtigen Zeit, am richtigen Ort (bzw. dem richtigen Gewebe) und im gewünschten Ausmaß stattfinden, unterliegen sie einer Vielzahl von hochkomplexen, miteinander kommunizierenden Kaskaden regulierender Signale.<sup>46</sup> Eine Fehlfunktion in einem oder mehreren dieser Signalwege kann somit zu unkontrollierter Zellteilung führen – dem Kernaspekt von Krebserkrankungen. Ein großer Teil der onkologischen Grundlagenforschung beschäftigt sich daher mit der Frage, was auf molekularer Ebene zum Versagen der Kontrollmechanismen führt.<sup>47</sup> Folgt man nun der Hypothese, dass die Entstehung von Krebs grundsätzlich die Folge pathologisch gesteigerter Vermehrung von Zellverbänden durch Zellteilung ist, lässt sich verstehen, inwiefern sich Tumore unterschiedlicher Gewebe unterscheiden. Krebszellen behalten nämlich viele Eigenschaften der Zellen bei, aus denen sie hervorgehen. So gehen Karzinome aus Epithelzellen hervor und zeichnen sich durch Attribute aus, die sonst nur in spezialisierten Epithelzellen zu finden sind, wie etwa die Sekretion von Mukus durch Adenokarzinome, die aus drüsenhaltigen Epithelzellen hervorgehen.<sup>6</sup> In analoger Weise entstehen Sarkome aus Zellen des Mesoderm, während Lymphome aus Zellen des hämatopoetischen Systems hervorgehen.

Eine gesteigerte Zellteilung allein kann zwar das schnelle Größenwachstum von Tumoren erklären, nicht aber viele weitere Eigenschaften insbesondere maligner Tumoren. Da beispielsweise Krebszellen, bei denen mit Hilfe histologischer Methoden mit Sicherheit gesagt werden kann, dass sie aus dem Epithel der Lunge hervorgegangen sind, auch in anderen

Organen als der Lunge gefunden werden, muss es weitere Aspekte geben, die Krebszellen von gesunden Zellen unterscheiden.

### **2.2.2. Die Kennzeichen von Krebs**

Im Jahr 2000 veröffentlichten Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg eine Übersichtsarbeit zu den damals bekannten Kennzeichen („hallmarks“), die eine Krebserkrankung im biologischen Sinn ausmachen.<sup>48</sup> 2011 ließen sie eine überarbeitete Version mit weiteren potentiellen Kennzeichen folgen, um die seit der Erstveröffentlichung hinzugewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse zu berücksichtigen.<sup>49</sup> Zusammengefasst formulierten sie 10 Kennzeichen, die jeweils auch Grundlage zielgerichteter Therapien sind. Die ursprünglich beschriebenen Kennzeichen sind die dauerhafte Aktivierung proliferativer Signalwege („sustaining proliferative signaling“), die Fähigkeit, sich dem Einfluss von Wachstumsinhibitoren zu entziehen („evading growth suppressors“), das Umgehen des Zelltods („resisting cell death“), Immortalität bei fortgesetzter Zellteilung („enabling replicative immortality“), das Induzieren der Angiogenese („inducing angiogenesis“) und die Ermöglichung von Invasion und Metastasierung („activating invasion and metastasis“). Weitere Merkmale, die sich als Kennzeichen etablieren könnten, sind schließlich eine Prädisposition zur genomischen Instabilität sowie Mutationen („genome instability and mutation“), das Tumorwachstum begünstigende Entzündungsreaktionen („tumor promoting inflammation“), die Deregulation des zellulären Energiehaushaltes („deregulation cellular energetics“) und die Fähigkeit, der Zerstörung durch das Immunsystem auszuweichen („avoiding immune destruction“). Die vier ersten Kennzeichen sind im Kontext der Haupteigenschaft von Krebszellen, nämlich des unkontrollierten Wachstums zu verstehen. Für eine sich endlos fortsetzende Zellteilung müssen zunächst die Signalwege, die für gewöhnlich eine zeitlich begrenzte Zellteilung ermöglichen, dauerhaft aktiviert sein. Gleichzeitig müssen Kontrollmechanismen wie Wachstumsinhibitoren, die einer unkontrollierten Zellteilung entgegenwirken können, ausgeschaltet werden. Schließlich können gesunde Zellen, aus denen Krebszellen entstehen, nur eine endliche Zahl von Zellteilungen durchführen, bevor der programmierte Zelltod eintritt. Tumorzellen müssen diesen Mechanismus umgehen, da sie als besonders proliferative Zellen sonst sehr schnell diesem Zelltod zum Opfer fallen würden. Grundlegend betrifft diese Eigenschaft vor allem die Telomere, den definierten repetitiven DNA-Sequenzen an den Enden von Chromosomen. Bei jeder Zellteilung geht zwangsläufig ein Teil der Sequenz an den Enden der Chromosomen verloren. Damit dies keine proteinkodierenden Sequenzen betrifft, deren Verlust fehlerhafte oder gänzlich fehlende Proteine zu Folge hätte, befinden sich dort die Telomere, deren Abbau keinen Verlust von Information bedeutet. Erst wenn während des natürlichen Alterungsprozess eine hohe Zahl von Zellteilungen stattgefunden hat, sind die Telomere derart gekürzt, dass die Zelle seneszent wird oder die Apoptose einleitet. Tumorzellen können dem, vereinfacht gesagt,

durch die Expression des Enzyms Telomerase entgegenwirken, das bei jeder Zellteilung wieder zusätzliche Telomersequenzen synthetisiert.<sup>50</sup>

Die beiden verbleibenden ursprünglichen Kennzeichen beschreiben hingegen Prozesse, die über das reine Größenwachstum hinausgehen. So zeichnet Krebszellen die Fähigkeit aus, den Gewebeverbund, dem sie entsprungen sind, zu verlassen und aktiv in angrenzendes Gewebe einzudringen (Invasion) sowie sich in anderen, vom Ursprungsgewebe entfernten Organen anzusiedeln (Metastasierung). Zuletzt sind alle bisher genannten Prozesse durch einen hohen Energieumsatz gekennzeichnet, der vieler Ressourcen bedarf. Dem werden Krebszellen unter anderem durch die gezielte Neubildung von Gefäßen gerecht (Angiogenese), die den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Bestimmte Tumoren stimulieren beispielsweise die Proliferation von gefäßbildenden Endothelzellen durch die vermehrte Ausschüttung von „vascular endothelial growth factor (VEGF)“. Therapeutisch kann man sich das bereits in bestimmten Fällen durch Behandlungen mit Antikörpern wie Bevacizumab zu Nutze machen, die lösliche VEGFs binden und damit die Signalkaskade unterbrechen können.<sup>51</sup>

Die neueren Kennzeichen, die sich als Merkmale herausstellen könnten, bezeichnen demgegenüber weniger zellspezifische Eigenheiten, sondern eher generelle Prinzipien, die das Krebswachstum begünstigen. So müssen Tumorzellen einerseits der Destruktion durch das körpereigene Immunsystem entgehen. In einigen Tumoren des hämatopoetischen Systems versucht man genau diese Destruktion zu fördern, indem man T-Zellen des Patienten für krebspezifische Antigene durch Modifizierung mit chimärischen Antigenrezeptoren (CARs) sensibilisiert.<sup>52</sup> Andererseits fördern chronische Entzündungsreaktionen das Tumorwachstum. Beispielsweise steigert eine chronische Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus das Risiko für die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome.<sup>53</sup> Für manche Tumore wie Brustkrebs oder kolorektale Karzinome ist außerdem eine Reduktion des relativen Risikos bei langjähriger Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika wie Aspirin beschrieben.<sup>54,55</sup>

Jedweder der genannten Eigenschaften können bestimmte Mutationen im Krebsgenom kausal zu Grunde liegen. Eine Instabilität des Genoms, das die Wahrscheinlichkeit von Mutationen steigen lässt, kann somit als Grundvoraussetzung der beschriebenen Merkmale gelten. Gleichzeitig begünstigt eine gesteigerte Proliferation schon stochastisch das Auftreten neuer Mutationen, da jeder Zellteilung die Gefahr von fehlerhafter DNA-Synthese inhärent ist.

### **2.2.3. Tumorprogression**

Die beschriebenen Kennzeichen erleichtern zwar den Versuch, die Entstehung von Krebs systematisch zu verstehen, geben aber noch keine Auskunft über den zeitlichen Ablauf der Verwandlung einer gesunden Zelle in eine maligne Krebszelle. Wie bereits erwähnt, ist Krebs für gewöhnlich eine Erkrankung des höheren Alters. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Entstehung von Krebs einen Prozess darstellt, der Jahrzehnte in Anspruch nehmen kann. In der Tat zeigt eine Metaanalyse von 19 Studien, dass bei Autopsien 70-79 Jahre alter Männer

in 36% (Kaukasier) bzw. 51% (Afroamerikaner) der Fälle Prostatakarzinome entdeckt wurden, die klinisch nicht auffällig geworden waren.<sup>56</sup> In einigen Fällen scheint damit die Entwicklung von einer entarteten Zelle zu einem klinisch sichtbaren Tumor so lange zu dauern, dass der betroffene Mensch vorher eines natürlichen Todes oder an einer anderen Erkrankung stirbt. Krebserkrankungen des unteren gastrointestinalen Traktes können, da sie durch wenig invasive Verfahren, wie der Koloskopie, einer Diagnostik vergleichsweise einfach zugänglich sind, im selben Patienten longitudinal verfolgt werden. So konnte gezeigt werden, dass einige dieser Tumore distinkte Phänotypen in einer bestimmten Abfolge durchlaufen. Zunächst erfolgt die Wandlung gesunder Epithelzellen zum adenomatösen Polyp, der schließlich eine Transition zum Karzinom erfährt.<sup>57</sup> Schon 1971 mutmaßte Alfred G. Knudson, dass die unterschiedlichen Kinetiken, mit denen laterales bzw. bilaterales Retinoblastom (Rb) bei Kindern beobachtet werden, ihren Ursprung in verschiedenartigen Mutationen haben.<sup>58</sup> In der Tat müssen für die Manifestation der Krankheit beide Allele des Tumorsuppressorgen *RB1* mutiert sein. Bei der familiären Variante werden Kinder bereits mit einem mutierten Allel geboren. Es bedarf also lediglich einer weiteren sporadisch auftretenden Mutation, damit eine Zelle phänotypisch betroffen ist. Dies passiert mit einiger Wahrscheinlichkeit, sodass häufig Zelllinien in beiden Augen betroffen sind, was den bilateralen Phänotyp erklärt. Beim sporadischen Rb werden die Kinder hingegen mit zwei funktionalen Allelen geboren. Es bedarf demnach zwei aufeinander folgenden Mutationen, welche dieselbe Zelllinie betreffen, was wiederum mathematisch so unwahrscheinlich ist, dass fast immer nur eine Zelllinie und damit ein Auge den Phänotyp aufweist.<sup>59</sup> Eine der vielfältigen Funktionen des *RB*-Gen ist es, das Voranschreiten durch den Zellzyklus zu kontrollieren. Unter anderem durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor E2F und durch Stabilisierung des Zellzyklus Inhibitors p21 via Interaktion mit dem „anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)“ kann das RB-Protein Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus arretieren. Der Verlust von RB kann also im Sinne der Kennzeichen von Krebs als die Fähigkeit klassifiziert werden, dem Einfluss von Wachstumsinhibitoren zu entgehen.<sup>60</sup> Genauere Betrachtungen zeigten jedoch, dass auch ein kompletter Funktionsverlust des *RB*-Gens allein für die Entstehung von Retinoblastomen noch nicht ausreichend ist. Vielmehr scheint die Inaktivierung des *RB*-Gens eine Instabilität des Genoms zu fördern, was wiederum zu weiteren Mutationen führt, welche die klinische Manifestation von Retinoblastomen begünstigen.<sup>61</sup> Zur Entstehung von Krebs ist also nicht nur eine bestimmte Abfolge von Mutationen nötig, was zwangsläufig einer gewissen Zeitspanne bedarf, sondern vermutlich auch, dass Zellen gleich mehrere Kennzeichen für Krebs parallel erwerben. In der Tat bestätigen Arbeiten in der Zellkultur diese Annahmen. *In vitro* können embryonale Fibroblasten aus der Maus (MEFs) oder der Ratte (REFs) mit einer aktivierten Form des Onkogen *Ras* transfiziert werden, was zu übermäßig gesteigerter Zellproliferation, also einer der definierten Kennzeichen von Krebs führt. Die damit begonnene Transformation

zu Tumorzellen vollenden die Zellen allerdings nur, wenn sie bereits vorher immortalisiert waren, das heißt bereits ein Krebskennzeichen einer weiteren Kategorie gegeben ist. Die Transformation zu Tumorzellen bleibt hingegen aus, wenn primäre, nicht immortalisierte MEFs oder REFs verwendet werden.<sup>62</sup> Diese Immortalisierung gelingt, wenn man RETs mit einer mutierten Variante des für die Kontrolle des Zellzyklus verantwortlichen *TP53*-Gen transfiziert, die in der durch das Friend-Virus induzierten Erythroleukämie vorkommt.<sup>63</sup> Auch eine Ko-Transfektion von RETs mit aktiviertem *RAS* und einer für kolorektale Karzinome typischen mutierten Form von *TP53* führt zur Transformation von primären RETs zu Tumorzellen *in vitro*.<sup>64</sup> Weder solitäre Mutationen im *TP53*-Gen, noch aktivierende Mutationen im *RAS*-Gen allein reichen also aus, um gesunde Zellen vollständig zu Tumorzellen zu transformieren. Erst die Kombination aus Mutationen beider Gene und den damit einhergehenden Veränderungen in den entsprechenden Signalwegen, die jeweils ein separates Krebskennzeichen darstellen, hat eine Tumormorphose in RETs zur Folge.<sup>65</sup>

Das Herbeiführen von spezifischen Mutationen in ebendiesen Genen kann in der Maus auch *in vivo* zur Ausbildung von Tumoren führen. Nutzt man hierfür das Cre/loxP-System, ist es außerdem möglich zu bestimmen, in welchem Gewebe und zu welchem Zeitpunkt Tumore auftreten. Vereinfacht gesagt, bringt man dabei nicht nur die gewünschte Mutation (bspw. eine Punktmutation) in das Maus-Genom ein, sondern stellt der Mutation noch ein Stopcodon voran, das von zwei loxP-Stellen (zwei definierten Basensequenzen mit palindromischem Anfang und Ende beidseits eines Mittelteils, die sonst im Mausgenom nicht vorkommen) flankiert wird. Bei der Transkription des Gens führt das Stopcodon daher zunächst dazu, dass der mutierte Teil nicht transkribiert wird. Erst wenn der Genabschnitt mit dem Enzym Cre (*causes recombination*) in Verbindung kommt, das spezifisch an loxP-Stellen bindet, wird das Stopcodon durch Cre exzidiert. In der Folge bricht die Transkription daher nicht ab, wodurch auch der nachfolgende Teil des Gens transkribiert wird, der die Mutation beherbergt.<sup>66-68</sup> Das Enzym Cre kann beispielsweise durch intramuskuläre Injektion von Cre exprimierenden Adenoviren in ein bestimmtes Gewebe des Organismus zu einem festgelegten Zeitpunkt eingebracht werden. So kann mit einer gewissen Latenz die Ausbildung von Weichteilsarkomen im zur Injektion ausgewählten Muskel induziert werden.<sup>69</sup> Dieses Modell wird im Folgenden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Weichteilsarkome im Oberschenkel zu generieren.

## **(1) p53**

*TP53* ist womöglich das potenteste Tumorsuppressorgen im menschlichen Organismus und wohl gerade deshalb das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen bei Krebserkrankungen des Menschen, wenn man alle Krebsarten gemeinsam betrachtet.<sup>70</sup> Das vom *TP53*-Gen kodierte Protein p53 kann als Wächter über den Zellzyklus betrachtet werden. In Abhängigkeit davon, ob die DNA-Replikation fehlerfrei abläuft, gewährt es entweder das

vollständige Durchlaufen des Zellzyklus oder unternimmt Maßnahmen, um den Zellzyklus zu unterbrechen oder notfalls sogar den programmierten Zelltod einzuleiten. Zu diesem Zweck kann p53 durch mannigfaltige Stresssignale unterschiedlichster Signalwege aktiviert werden und selbst verschiedene Signalkaskaden mit unterschiedlichen Konsequenzen auslösen. So können sowohl der Verlust von Nukleotiden, der Einfluss von ultravioletter oder ionisierender Strahlung, als auch Signale von Onkogenen, das Auftreten von Hypoxie oder ein Transkriptionstopp zu erhöhten Leveln von p53 führen. Zu den nachgeschalteten Signalwegen, die durch p53 aktiviert werden, gehören unter anderem die Arretierung des Zellzyklus, das Auslösen von DNA-Reparaturmechanismen, die Inhibition der Angiogenese und die Einleitung der Apoptose oder Ferroptose.<sup>6</sup> Bei Krebs kommt es auf Grund aberranter Signalübertragung durch aktivierte Onkogene, DNA-Replikationsstress und des vermehrten Auftretens reaktiver Oxygenspezies (ROS), typischerweise zu den p53 aktivierenden Stresssignalen, was die hervorgehobene Rolle von p53 in der Krebsabwehr verdeutlicht.<sup>71</sup> Im Sinne eines negativen Feedbackloops steigert p53 auch die Transkription des Gens, dessen Produkt die E3 Ubiquitin-Protein Ligase MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) ist. MDM2 führt über Ubiquitinierung schließlich zur Degradation von p53.<sup>71</sup> Dabei unterscheidet sich p53 grundlegend von anderen Tumorsuppressorgenen. Wie bereits beim *Rb*-Gen beschrieben, ist für den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen normalerweise ein Ausfall von beiden Allelen nötig, weil sonst das gesunde Allel die Funktionen aufrechterhalten kann. Daher formulierte Knudson die Hypothese, dass 2 aufeinander folgende Mutationen notwendig sind („two-hit hypothesis“), bis Mutationen in Tumorsuppressorgenen phänotypisch relevant werden.<sup>72</sup> Durch die oben beschriebenen Experimenten mit RETs ist jedoch evident, dass schon die Transfektion mit einem mutierten *TP53*-Allel ausreicht, um die Zellen tumorös zu transformieren, ohne dass das weiterhin vorhandene Wildtyp *TP53*-Allel mutiert werden müsste. Mutationen in einem Allel des *TP53*-Gen können nämlich das ebenfalls vorhandene Wildtyp-Allel funktional inaktivieren, was als dominant-negativ bezeichnet wird.<sup>73</sup> Das wird dadurch vereinfacht, dass das Protein p53 als Homotetramer vorliegt und mutierte Teile des Proteins dadurch in engem Kontakt mit den Anteilen liegen, die durch das Wildtyp Allel kodiert werden.<sup>74</sup> Untersucht man die Mutationen genauer, die typischerweise im *TP53*-Gen von Krebszellen gefunden werden, fällt auf, dass es sich weniger um Nonsense-Mutationen handelt, die üblicherweise zum Verlust von Funktionen des betroffenen Proteins führen, sondern vor allem um Missense-Mutationen, die eine Veränderung der Funktion des Proteins zu Folge haben können.<sup>75</sup> Aus diesem Grund wird gelegentlich auch die These vertreten, dass es sich bei *TP53* definitionsgemäß gar nicht um ein Tumorsuppressorgen handelt, sondern vielmehr um ein Onkogen.<sup>76</sup>

Dass es sich bei p53 nicht um einen gewöhnlichen Regulator des Zellzyklus handelt, sondern um ein Protein mit spezifisch antikanzerogener Aktivität, wird außerdem durch Knockout-

Experimente in der Maus deutlich. Homozygoter Verlust von p53 führt nämlich, anders als die Funktion vielleicht erwarten lassen würde, nicht zu ungehemmter Proliferation. Auch ohne die Aktivität von p53 ist eine weitgehend normale Embryogenese möglich.<sup>77</sup> Allerdings entwickeln Mäuse mit homozygotem Verlust von p53 mit weitaus höherer Wahrscheinlichkeit Tumore und haben in Folge dessen eine deutliche verkürzte Lebenserwartung.<sup>78</sup> Beim Menschen zeigt sich eine analoge Prädisposition zur Entwicklung von Tumoren beim nach seinen beiden Erstbeschreibern benannten Li-Fraumeni-Syndrom. In diesem Fall führt die Vererbung von Mutationen im *TP53*-Gen dazu, dass vor allem lymphatische und myeloische Leukämien sowie myelodysplastische Syndrome schon im Kindes- und Jugendalter auftreten.<sup>79</sup> Der Umkehrschluss konnte in einem Mausmodell zu Leberkrebs gezeigt werden. In mit dem Onkogen *HRAS* transduzierten Hepatoblasten wurde p53 mittels short interfering RNA (siRNA) supprimiert, was zur Ausbildung und Größenwachstum von Krebs führt. Wird p53 nun reaktiviert, werden die Tumorzellen seneszent und es lässt sich ein ausgeprägter Rückgang des Tumolvolumens beobachten.<sup>80</sup> Angesichts der Tatsache, wie effektiv p53 Krebsformation und -wachstum verhindert, ist die Häufigkeit, mit der sich in Krebszellen Mutationen im *TP53*-Gen finden, nicht verwunderlich. Es ist davon auszugehen, dass die meisten malignen Transformationen bereits in ihrer Entstehung durch die Aktivitäten von p53 verhindert werden. P53 kann es sogar mit aktivierten Onkogenen aufnehmen. Wird nämlich in Fibroblasten aus der Ratte das Onkogen *Myc* konstitutiv exprimiert, sind diese Zellen auf Grund der proliferationsfördernden Eigenschaften, die c-Myc unter anderem via den Transkriptionsfaktor E2F ausübt, nicht mehr in der Lage, den Zellzyklus zu arretieren (Abbildung 8).<sup>81,82</sup> Da das *p14<sup>ARF</sup>*-Gen in seinem Promotor eine Erkennungssequenz für E2F trägt, führen erhöhte Spiegel von E2F zur Transkription des Protein ARF.<sup>83,84</sup> ARF wiederum blockiert die enzymatische Aktivität von MDM2 und damit die Inhibition von p53.<sup>85</sup> Als Konsequenz kann p53 im Gegenzug nun pro-apoptotische Mechanismen fördern, woraus resultiert, dass die Zellzahl insgesamt nicht zunimmt, was für die Entstehung von Krebs essentiell wäre.<sup>82,86</sup>

Entscheidend sind aber nicht nur die vielen direkten Antworten, die p53 auf Stresssignale geben kann. P53 kommt auch eine zentrale Rolle bei der Reparatur von Fehlern zu, die bei der DNA-Replikation entstehen können.<sup>87</sup> Bleibt diese Reparatur auf Grund von Mutationen im *TP53*-Gen aus, wird so das Auftreten weiterer Mutationen begünstigt. Mit dieser genomischen Instabilität ist damit neben der Umgehung der wachstumsinhibierenden Signale von p53 schon das zweite distinkte Kennzeichen von Krebs verwirklicht.

Ein Versuch sämtliche Funktionen und Interaktionen von p53 zu skizzieren, endet auf Grund der zentralen Rolle, die p53 in vielen Signalwegen einnimmt, unweigerlich in einem unübersichtlichen Diagramm. Fokussiert man sich lediglich auf die wichtigsten Merkmale, die



p53 bei der Reparatur von Fehlern in der DNA-Sequenz kennzeichnen, kann der Ablauf näherungsweise wie folgt beschrieben werden (Abbildung 8):

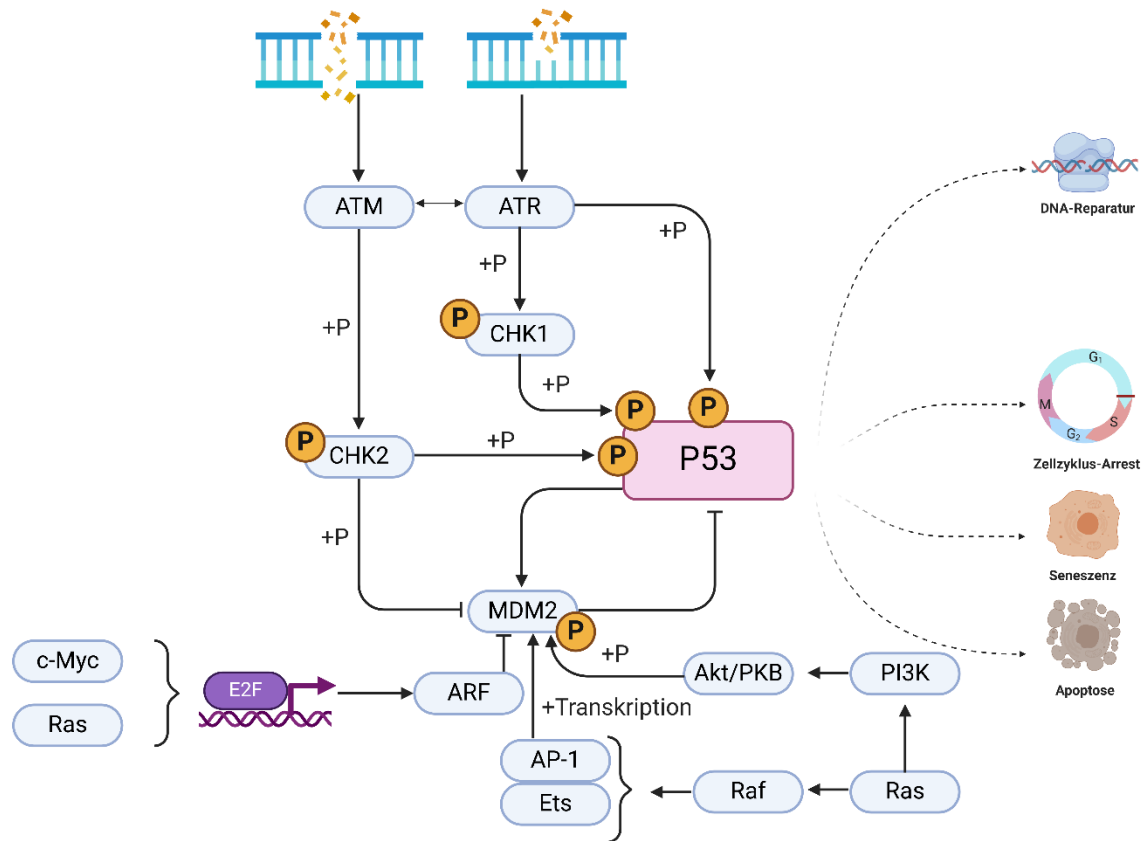


Abbildung 8: Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen durch p53 in Folge von Schädigungen der DNA (oben) sowie Kontrolle von p53 durch verschiedene Kinasen (unten).

ATM, Ataxia telangiectasia mutated; CHK1 bzw. CHK2, Checkpoint Kinase 1 bzw. 2; ATR, ataxia telangiectasia and Rad3-related protein; Ras, Rat sarcoma; ARF, alternate reading frame; MDM2, mouse double minute 2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKB, protein kinase B; AP-1, activator protein 1; Ets, E26 transformation-specific. Modifiziert nach Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2021<sup>8</sup> und dem Template „P53 Regulation and Signaling“ von <https://app.biorender.com/biorender-templates>.<sup>9</sup> Erstellt mit [BioRender.com](https://www.biorender.com).

In Folge eines Doppelstrangbruch im Genom phosphoryliert die Proteinkinase „Ataxia telangiectasia mutated (ATM)“ die Checkpointkinase Chk2, welche dadurch selbst aktiviert wird. Chk2 wiederum phosphoryliert sowohl p53, was direkt aktivierende Funktion hat, als auch MDM2, was die Bindung von MDM2 an p53 blockiert und damit die Degradierung von p53 inhibiert. Analoges gilt bei Einzelstrangbrüchen für das Enzym „ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)“ und die nachgeschaltete Checkpointkinase Chk1. Diese Darstellung ist zwar eine starke Vereinfachung der tatsächlich ablaufenden Vorgänge, da mittlerweile bekannt ist, dass die durch ATM bzw. ATR ausgelösten Kaskaden nicht einfach parallel nebeneinander ablaufen. Genau genommen sind sie auf so komplexe Weise miteinander verbunden, dass bspw. die ATR-Chk1-Achse zunächst durch ATM aktiviert werden muss, weshalb keine strikte Unterteilung je nach Arten der DNA-Schädigungen vorgenommen werden kann.<sup>88</sup> Sie demonstriert aber die zentrale Rolle, die p53 bei der

Reparatur von Schäden in der DNA-Sequenz spielt. Behandelt man humane Fibroblasten mit *anti*-Benzo(a)pyren-diol-epoxid (BPDE), einem hoch reaktiven elektrophilen Metaboliten des Kanzerogens Benzo(a)pyren, verursacht dies Mutationen in der DNA in Form von Addukten. In Wildtyp-Zellen wird mittels Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) ein Segment, das den Schaden beinhaltet, herausgeschnitten und neu synthetisiert, was den Schaden erfolgreich behebt. In p53 defizienten oder mutierten Fibroblasten bleibt diese Reparatur jedoch aus, was den Zustand vieler Krebszellen reflektiert, in denen nach Mutation von p53 weitere Mutationen folgen, weil effiziente Reparaturmechanismen nicht aktiviert werden.<sup>89</sup>

## (2) Ras

Bei ca. 19% aller Krebserkrankungen finden sich „Gain-of-function“-Mutationen in Onkogenen der RAS-Familie.<sup>90</sup> Im Menschen sind drei RAS Gene bekannt, nämlich *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), das in ca. 76% der Fälle mutiert ist, *NRAS* (*neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*), das in 13% der Fälle betroffen ist, und *HRAS* (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), das in den verbleibenden ca. 7% Mutationen aufweist. Diese Gene kodieren für insgesamt vier Ras Proteine, da es von KRAS durch alternatives RNA Splicing zwei Varianten gibt, namentlich KRAS4A und KRAS4B. Die vier Isoformen des Proteins weisen sowohl hinsichtlich ihrer Struktur als auch ihrer biologischen Eigenschaften kaum Unterschiede auf. Dies spiegelt sich in einer zu 80-92% identischen Aminosäuresequenz wider, wobei die meisten Differenzen in der hypervariablen Region des C-Terminus zu finden sind, jedoch kaum in der katalytischen Domäne des N-Terminus.<sup>91</sup> Insbesondere sind alle Isoformen in der Lage, nachgeschaltete Signalkaskaden zu aktivieren. Dennoch unterscheiden sich die relativen Häufigkeiten, mit der die drei Gene jeweils von Mutationen betroffen sind, wenn man spezifische Gewebe betrachtet. Während Mutationen im *KRAS*-Gen typisch für kolorektale Tumoren sind, finden sich Mutationen in *NRAS* häufiger in Tumoren der Haut sowie des endokrinen Systems. *HRAS* ist hingegen vor allem in Tumoren des Kopf- und Halsbereiches mutiert. Allen Isoformen gemein ist die Tatsache, dass die Mutationen in ca. 98% der Fälle einen von drei spezifischen Aminosäureresten betreffen, nämlich G12, G13 oder Q61, die alle die Hydrolyse von Guanosin triphosphat (GTP) zu beeinträchtigen scheinen, was zur dauerhaften Aktivierung von Ras führt (s.u.).<sup>92</sup> Da alle Isoformen ihr onkogenes Potential über dieselben nachgeschalteten Signalwege ausüben, kann im Folgenden auf eine Unterscheidung zwischen den Isoformen verzichtet werden, wenn die zellulären Auswirkungen von Mutationen in einem der RAS-Gene betrachtet werden.

Ras gehört zur Familie der G-Proteine und liegt meist an die zyttoplasmatische Seite der Plasmamembran gebunden vor. In seiner inaktiven Form ist Ras an ein Guanosindiphosphat (GDP) Molekül gebunden. Erst durch den Austausch von GDP durch GTP gelangt Ras in seine aktive Form (Abbildung 9, oben).

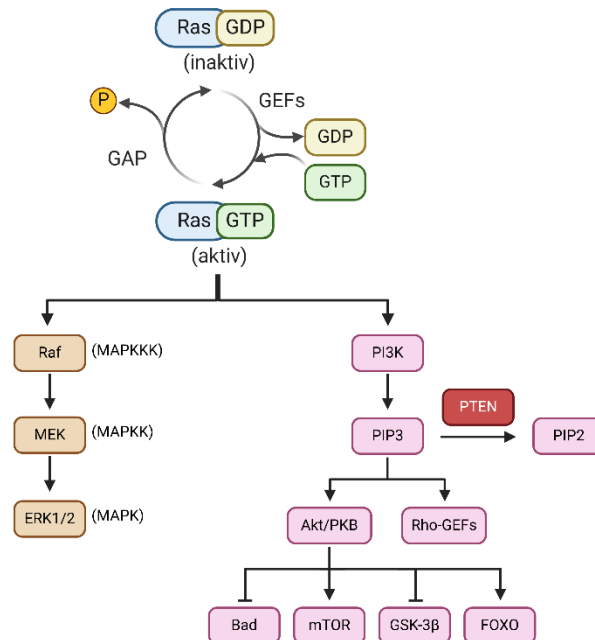


Abbildung 9: Mechanismus der Aktivierung von Ras durch Austausch von gebundenem GDP durch GTP (oben) sowie schematische Darstellung des Ablaufs zweier nachgeschalteter Signalkaskaden (unten).

GTP, Guanosintriphosphat; GDP, Guanosindiphosphat; GEF, Guanine nucleotide exchange factor; GAP, GTPase-activating proteins; MAP(K), Mitogen-activated protein (kinase) MEK, MAPK/ERK kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PIP3, Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat; PKB, Proteinkinase B; Bad, BCL2 associated agonist of cell death; mTOR, mechanistic target of rapamycin; GSK-3β, Glycogen synthase kinase 3 beta; FOXO, forkhead box transcription factors of class O. Modifiziert nach dem Template „Ras Activation“ von <https://app.biorender.com/biorender-templates> basierend auf Ausführungen in Weinberg RA, Garland Science, 2014.<sup>6</sup> Erstellt mit [BioRender.com](https://app.biorender.com/biorender-templates).

Die Bindung von GTP führt zu Konformationsänderungen in der G-Domäne von Ras, die einerseits die folgende Hydrolyse von GTP zu GDP fördern, was wiederum den Rückgang von Ras in seine inaktive Form bewirkt. Andererseits ermöglichen sie die Interaktion von Ras mit verschiedenen Effektormolekülen und damit die Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalwege. Dabei wird der Austausch von GDP zu GTP durch sogenannte „guanine nucleotide exchange factors (GEFs)“ und die nachfolgende Hydrolyse von GTP zu GDP durch „GTPase-activating proteins (GAPs)“ katalysiert. Säugetiere exprimieren drei Klassen von GEFs, nämlich SOS, Ras-GRF und Ras-GRP, wobei SOS ubiquitär exprimiert wird und Ras-GRF sowie Ras-GRP hauptsächlich in Neuronen eine Rolle spielen.<sup>93</sup> Ein Modell der Funktionsweise von GEFs postuliert, dass der entscheidende Schritt die physische Annäherung von GEFs an das Membran-gebundene Ras ist. Dies gelingt über Linkerproteine wie GRB2, die mit ihrer SH3-Domäne an GEFs wie Sos binden können und gleichzeitig mit ihrer SH2-Domäne an Phosphotyrosine binden.<sup>94</sup> Damit ist die Brücke zu den

transmembranen Rezeptortyrosinkinasen geschlagen, die nach Aktivierung ein solches Phosphotyrosin auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran präsentieren. Die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie EGF erfolgt wiederum durch verschiedene Wachstumsfaktoren, die als Liganden fungieren. Der schematische Ablauf der Aktivierung von RAS kann daher wie folgt skizziert werden:<sup>6</sup>

Wachstumsfaktoren → Rezeptortyrosinkinase → GRB2 → SOS → Ras

In der aktivierten Form kann Ras verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden aktivieren. Zu den wichtigsten Signalwegen gehören unter anderem der Ras/Raf/MAP-Kinase-Weg (Abbildung 9, links unten) sowie der PI3-Kinase-Weg (Abbildung 9, rechts unten). Das Übermitteln extrazellulärer Signale an intrazelluläre Effektoren ist ein häufig beobachtetes Prinzip und kann daher auch mit allgemeingültigen Termini bezeichnet werden: „MAPK“ steht dabei für „mitogen-activated protein kinase“, also eine durch Mitogene aktivierte Proteinkinase. Mit diesem Terminus kann allgemein die Kaskade beschrieben werden, mit der von Mitogenen (wie bspw. Wachstumsfaktoren) ausgehend über nachgeschaltete Proteinkinasen zelluläre Prozesse reguliert werden. In dieser Terminologie wird die im Signalweg an letzter Stelle stehende Proteinkinase MAPK genannt und bei jeder vorgeschalteten Kinase jeweils das Suffix „Kinase“ angehängt.

Der Ras/Raf/MAP-Kinase-Weg beginnt mit der Aktivierung von Ras durch GTP. Die dadurch folgenden Konformationsänderungen erlauben die Bindung von Raf (oder MAPKKK in der allgemeinen Terminologie). Damit ist Raf, das sonst im Zytosol vorliegt, über Ras auch an die Plasmamembran gebunden. In der Bindung an Ras erfährt auch Raf Konformationsänderungen, die teilweise über weitere Gerüstproteine vermittelt werden, und wird dadurch befähigt, die Kinase MEK (MAPKK) durch Phosphorylierung zu aktivieren. Bei MEK handelt es sich um eine Kinase mit dualer Spezifität, die sowohl Tyrosin- als auch Serin- und Threoninreste phosphorylieren kann. MEK phosphoryliert schließlich zwei „extracellular signal-regulated kinases (ERK1 und ERK2)“ bzw. MAPKs, die verschiedene zelluläre Prozesse regulieren.<sup>6</sup> Die Phosphorylierung von ERKs führt u.a. zu deren Translokation aus dem Zytosol in den Nukleus, wo sie die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren regulieren. Außerdem können ERKs weitere Kinasen im Zytosol phosphorylieren, die unter anderem die Proteintranslation sowie ebenfalls Transkriptionsfaktoren im Nukleus regulieren.<sup>95</sup> Dadurch regulieren ERKs die Expression von Genen, die entscheidend für Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie Apoptose und Proteinsynthese sind. Bedenkt man, dass unkontrollierte Zellproliferation ein entscheidendes Merkmal von Krebszellen ist, verwundert es nicht, dass verschiedene Teile dieser Signalwege in bestimmten Tumoren hyperaktiv sind. So ist BRAF aus der Klasse der Raf-Proteine in ca. 66% aller malignen Melanome und mit geringerer Frequenz auch in anderen menschlichen Tumoren mutiert.<sup>96</sup> Dabei betreffen diese Mutationen immer die Kinase-Domäne von BRAF – in ca. 80% liegt eine

einzelne Punktmutation (V599E) vor – was zur konstitutiven Aktivierung von BRAF führt. Ebenso zeigt die histologische Analyse von kolorektalen Tumoren, dass das Verhältnis der phosphorylierten (also aktivierten) Form von MEK zur nicht-phosphorylierten (also inaktivierten) Form in Tumorgewebe deutlich höher als im gesunden Gewebe ist, was eine entscheidende Rolle für den MAPK-Signalweg in der Tumorphprogression nahelegt.<sup>97</sup>

Ein weiterer entscheidender Signalweg ist die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch Ras (Abbildung 9, rechts unten), an dessen Ende u.a. die Regulation des Zellwachstums, des Eintritts in den Zellzyklus, des Zellüberlebens, der Reorganisation des Zytoskelettes und die Regulation des Zellmetabolismus steht.<sup>98</sup> Durch GTP aktiviertes Ras kann an die katalytische Untereinheit p110 von PI3K binden und – analog zur Aktivierung von Raf – PI3K damit indirekt an die Zellmembran binden, wo auch die Substrate des Enzyms lokalisiert sind. PI3K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), das mit seiner hydrophoben Kohlenstoffkette in der Zellmembran verankert ist, zu Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), das wiederum als sekundärer Botenstoff fungiert. Diese Reaktion kann in beide Richtungen ablaufen, wobei die umgekehrte Reaktion von PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> durch das Enzym PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) katalysiert wird.

PIP<sub>3</sub> kann durch die Konfiguration der drei Phosphatgruppen am Inositolring Proteine binden, die eine PH-Domäne exprimieren, und sie dadurch indirekt an der Plasmamembran verankern. Auf diese Weise bindet PIP<sub>3</sub> sowohl die Kinase PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) als auch die Kinase AKT (manchmal auch als Proteinkinase B (PKB) benannt), was zur Phosphorylierung von AKT durch PDK1 an einem Threoninrest führt. AKT wird dadurch aktiviert und vermittelt über verschiedene Substrate wachstumsfördernde Signale. Durch die Inhibierung von pro-apoptotisch wirkenden Molekülen wie BAD (*BCL2 associated agonist of cell death*), Caspase-9 und FOXO sowie der Aktivierung des anti-apoptotisch wirkenden MDM2 verhindert AKT den Eintritt der Zelle in die Apoptose. Parallel stimuliert AKT die Zellteilung durch Inhibierung der antiproliferativ wirkenden Moleküle GSK-3β, FOXO4 und p21<sup>Cip1</sup>. Schließlich aktiviert AKT indirekt mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), indem es die Dissoziation des Komplexes aus TSC 1 und TSC 2 (*Tuberous sclerosis 1 und 2*) fördert, der mTOR ansonsten in seine inaktive Form überführt. In seiner aktiven Form stimuliert mTOR die Proteinsynthese und damit das Zellwachstum.<sup>6</sup>

Wie schon beim Ras/Raf/MAPK-Signalweg beobachtet, hat also auch die Aktivierung des Ras/PI3K-Signalweges eine Stimulierung der Zellproliferation zu Folge, die zu einem Kennzeichen von Krebs werden kann, wenn sie unkontrolliert abläuft. In der Tat sind Mutationen, welche die Entstehung von Krebs begünstigen, für fast alle Stationen des Ras/PI3K-Signalweges bekannt. Bspw. kann die Überexpression von AKT1 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) Resistenz gegenüber der Therapie mit cisplatinhaltiger

Chemotherapie verleihen.<sup>99</sup> Ebenfalls zeichnen sich eine Reihe von Tumoren wie bspw. Glioblastome oder Lungentumore durch Funktionsverlust von PTEN aus, wobei hier vermutlich seltener Mutationen in der kodierenden Sequenz ursächlich sind.<sup>100</sup>

Da Ras an der Spitze dieser Signalwege steht, ist es essentiell, dass Ras nicht dauerhaft aktiv ist, sondern nur für kurze Zeit Impulse aussendet. Dies wird erreicht, indem die Hydrolyse von GTP zu GDP durch GAPs katalysiert wird (Abbildung 9, oben). Dies erklärt, warum 98% der Fälle die Aminosäuren G12, G13 oder Q61 betreffen.<sup>92</sup> Die Aminosäurereste an Position 12, 13 und 61 sind nämlich alle an der Stelle im Ras-Protein lokalisiert, wo die Hydrolyse von GTP – also die Inaktivierung von Ras – stattfindet.

Beim Menschen scheinen KRAS G12 Mutationen vorherrschend zu sein, unter denen G12D wahrscheinlich vor G12V und G12C am häufigsten auftritt.<sup>92</sup>

Die auch im Mausmodell der vorliegenden Arbeit untersuchte Mutation G12D, also das Vorliegen von Aspartat an Stelle von Glycin, führt vermutlich zu Konformationsänderungen, in den katalytisch aktiven Regionen (spezifisch der Switch-II (SII) und der  $\alpha$ 3-helix Region), die eine effektive Hydrolyse von GTP verhindern.<sup>101</sup>

Dadurch sendet Ras nicht mehr lediglich wohl dosierte Signal aus, bevor es wieder inaktiviert wird, sondern verharrt in seiner aktiven Form, was zur dauerhaften Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege führt.

#### **2.2.4. Reparatur von DNA-Schäden in Krebszellen**

Auch gesunde Zellen sind permanent mit dem Auftreten von Schäden in ihrer DNA konfrontiert. Es wird davon ausgegangen, dass selbst ohne schädigende äußere Einflüsse jede Zelle pro Zellzyklus circa 50 Doppelstrangbrüche erleidet.<sup>102</sup> Schäden in der DNA können einerseits endogen durch spontan ablaufende chemische Reaktionen oder als Folge von Fehlern im komplexen Ablauf der DNA-Replikation entstehen. Andererseits können sie exogen durch den Einfluss von Chemikalien oder von ultravioletter bzw. ionisierender Strahlung induziert werden. Würden diese Schäden in der DNA nicht behoben und könnten Zellen, deren Genom diese Schäden aufweist, sich ungehindert weiter replizieren, hätte dies die Akkumulation von defekten Zellen zu Folge. Defekte können sich dabei entweder als Verlust von Funktionen manifestieren, deren Fehlen für den gesamten Organismus lebensbedrohlich sein kann, oder als Kontrollverlust über zelluläre Prozesse, die dann ausufernd ablaufen und letztlich zu Krebs führen können. Daher wird der Zellzyklus menschlicher Zellen eng kontrolliert. Sowohl der Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase als auch der Übergang von G<sub>2</sub>- in die M-Phase stellen Kontrollpunkte („checkpoints“) dar, an denen die Integrität der DNA überprüft wird. Werden an diesen Punkten Schäden in der DNA detektiert, kann die Progression durch den Zellzyklus so lange unterbrochen werden, bis der Schaden behoben ist. Stellt sich der Schaden jedoch als so schwerwiegend heraus, dass eine Reparatur nicht möglich ist, wird gegebenenfalls der programmierte Zelltod eingeleitet, um den Gesamtorganismus vor Schäden zu schützen.<sup>103</sup>

Wie bereits skizziert, wird diese Aufgabe von den Kinasen ATM und ATR wahrgenommen. Werden Schäden in der DNA detektiert, phosphorylieren ATR und ATM die Checkpointkinasen Chk1 bzw. Chk2. Die nachgeschaltete Aktivierung von p53 ermöglicht es dabei, den Zellzyklus am Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase zu arretieren, während die nachgeschaltete Inhibierung von Cdc25 den Übergang von der G<sub>2</sub>-Phase zur Mitose verhindert. Diese vereinfachte Betrachtung suggeriert, dass ein Ausfall der ATR-Chk1- oder der ATM-Chk2-Achse zu einer Fortsetzung der Zellteilung in der Gegenwart von DNA-Schäden führen müsste. Das wiederum würde zu einer Akkumulation von Mutationen im Genom führen, was als genomische Instabilität eines der Hauptkennzeichen von Krebs darstellt. In der Tat wurden sowohl *ATM* als auch *ATR* nach ihrer Entdeckung als Tumorsuppressorgene verstanden, deren Fehlen die Entstehung von Krebs begünstigt. Für diese These spricht, dass Keimbahnmutationen im *ATM*-Gen zur Entwicklung von Krebs prädisponieren. Dieses sogenannte „ataxia telangiectasia syndrome“ zeichnet sich durch ein 20-30% höheres Lebensrisiko der Entwicklung von Krebs aus. Außerdem finden sich vor allem in Neoplasien der lymphoiden Zellen auch somatische Mutationen oder ein gänzlichliches Fehlen von *ATM*.<sup>104</sup> Vor diesem Hintergrund erscheint es zunächst paradox, dass in einem Maus-Modell, das eine schwere *Atr*-Defizienz induziert, zwar eine reduzierte Lebensspanne, aber selbst in Abwesenheit von p53 keine Tumorentwicklung beobachtet wurde.<sup>105</sup> Dabei handelt es sich nicht um Eigenschaften, die spezifisch für die Funktion des Protein ATR selbst sind. Die Beobachtung, dass Chk1 in der T-Zell-akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) überexprimiert und hyperaktiviert sein kann, deutet vielmehr darauf hin, dass die gesamte ATR-Chk1-Achse onkogenes Potential haben könnte.<sup>106</sup>

Diese vermeintlichen Widersprüche hinsichtlich der Onkogenität lassen sich durch ein genaueres Betrachten der Wirkmechanismen von ATM und ATR auflösen.

Das Genom wird durch MRN, einem heterotrimeren Komplex bestehend aus MRE11, RAD50 und NBS1, permanent nach Doppelstrangbrüchen abgesucht. Wird ein Doppelstrangbruch detektiert, sorgt MRN dafür, dass ATM in unmittelbare Nähe dazu gebracht wird, damit es dort seine Funktion ausüben kann.<sup>107</sup> Neben der Arretierung des Zellzyklus führt die Aktivierung von ATM auch zur Akkumulation von Proteinen wie BRCA1 und 2 sowie Rad51, die zur Reparatur der DNA mittels homologer Rekombination (HR) benötigt werden. HR nutzt dabei eine DNA-Matrize als Vorlage, was eine Reparatur mit hoher Genauigkeit ermöglicht. Daher ist HR auf die S- und G<sub>2</sub>-Phase beschränkt, weil das Vorliegen eines Schwester-Chromatid notwendig ist. Im Gegensatz dazu wird bei der Reparatur mittels nicht-homologer Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) für die Ligatur keine Matrize als Vorlage benötigt, weshalb NHEJ in jeder Phase des Zellzyklus ablaufen kann. Mittels NHEJ wird der Reparaturprozess beschleunigt, aber eine höhere Fehleranfälligkeit in Kauf genommen.<sup>108</sup> Bei den durch ATM ausgelösten Reparaturvorgängen entstehen schließlich durch Endresektion

auch Einzelstrang-DNA-Anteile (ssDNA), an die sich RPA (*replication protein A*) anlagert. RPA führt seinerseits dazu, dass ATR zum DNA-Schaden rekrutiert wird. ATR bildet dabei in seiner aktiven Form ein Heterodimer mit ATRIP (*ATR-Interacting Protein*), wobei sich jeweils zwei solcher Heterodimere zu einem weiteren Heterodimer aneinanderlagern. Durch die Inhibierung der Aktivierung des CDK1/Cyclin B-Komplexes durch Cdc25 verhindert ATR schließlich den Eintritt in die Mitose.<sup>107</sup> Diese Betrachtung zeigt, dass sowohl ATM als auch ATR in die Reparatur von Doppelstrangbrüchen involviert sind, aber noch nicht warum nur ATM ein Tumorsuppressorgen zu sein scheint.

Neben Doppelstrangbrüchen, die repariert werden müssen, stellt auch die fehlerhafte Replikation von DNA ein relevantes Risiko für Zellen dar, Mutationen in ihrem Genom zu akquirieren. Damit das Genom während der Replikation vollständig und in einer angemessenen Geschwindigkeit dupliziert werden kann, müssen die Prozesse, die darin involviert sind, genau reguliert werden. Die DNA-Replikation beginnt daher an zahlreichen einzelnen Replikationsursprüngen, an denen sich jeweils Replikationsgabeln bilden.<sup>109</sup> Dabei muss sowohl die zeitliche Abfolge, mit der diese Replikationsursprünge auftreten, als auch die Distanz, welche zwischen ihnen liegt, koordiniert werden.<sup>110</sup> Dabei lassen sich Replikationsursprünge unterscheiden, die in der frühen bzw. späten Phase der Replikation aktiv werden. Die meisten Ursprünge scheinen jedoch in einer ungestörten S-Phase gar nicht zu feuern („origin firing“), sondern still („dormant“) zu liegen. So soll es der Zelle ermöglicht werden, weitere Replikationsursprünge zu aktivieren, falls es an einem bereits feuernenden Ursprung zu Problemen kommt.<sup>109</sup> Probleme bei der Replikation machen sich unter anderem durch die Kollision von mehreren Replikationsgabeln oder ein verlangsamtes Fortschreiten einer einzelnen Replikationsgabel bemerkbar, was bis zum kompletten Anhalten und Zerfall der Replikationsgabel führen kann. Diese Phänomene werden als Replikationsstress bezeichnet. Einige der für Krebszellen typischen Eigenschaften sind auch für das Auftreten von erhöhten Replikationsstress ursächlich. Die gesteigerte Zellproliferation führt notwendigerweise zum Verbrauch der vorhandenen Nukleotide, was einen Replikationsstress darstellt. Ebenso löst das für Krebs typische vermehrte Auftreten von ROS Replikationsstress aus. Außerdem führen bestimmte Onkogene wie bspw. *MYC* direkt zur Deregulierung der Prozesse, die für eine koordiniertes Feuern der Replikationsursprünge essentiell sind.<sup>109</sup> Das Anhalten von Replikationsgabeln führt dazu, dass ssDNA-Stränge, die normalerweise wieder zu einem Doppelstrang zusammengesetzt werden, für längere Zeit exponiert bleiben.<sup>111</sup> Diese Einzelstrang-DNA wird nun mit RPA besetzt, was zur Aktivierung von ATR führt. Anders als beim Doppelstrangbruch – bei dem es zunächst zur Aktivierung von ATM und erst anschließend zur Aktivierung von ATR durch die bei der Endresektion generierten Einzelstrang-DNA kommt – lösen angehaltene Replikationsgabeln also primär eine Aktivierung von ATR und nicht ATM aus. Die ATR-Chk1-Achse führt nun wie bereits beschrieben zum



Zellzyklusarrest über die Degradierung von Cdc25 sowie Aktivierung von p53. Zusätzlich kann ATR sowohl selbst als auch vermittelt durch Chk1 die in der Nähe der betroffenen Region liegenden Replikationsursprünge aktivieren und gleichzeitig das Feuern von Ursprüngen, die normalerweise am Ende der S-Phase aktiv sind, inhibieren.<sup>112</sup> Die durch ATR ausgelösten Mechanismen sorgen also dafür, dass die Replikation vollendet werden kann, bevor die Zelle in die Mitose eintritt. Zellkulturexperimente können diese spezifische Funktion von ATR rekapitulieren. So kann man in Atr-defizienten Huhn-Zellen beobachten, dass sich die Replikationsgabeln langsamer fortbewegen und häufiger komplett zerfallen, während der Anteil der feuernden Replikationsursprünge gesteigert ist. Auf Ebene der DNA lassen sich wiederum häufiger Fehler wie Chromatidlücken oder der Verlust von Chromosomen beobachten.<sup>113</sup> Ein Teil der beobachteten Effekte lässt sich durch die pharmakologische Inhibition von CDK1 abmildern, was die spezifische Rolle von ATR noch unterstreicht, da am Ende der ATR-Chk1-Kaskade die Inhibition der CDK1-aktivierenden Funktion von Cdc25 steht.

Den Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ATR durch Replikationsstress und der Reparatur von DNA-Schäden durch HR zeigt die zytogenetische Untersuchung von Eierstockkrebs. Hier korreliert das Ausmaß der genomischen Instabilität mit der Aktivierung von ATR und Chk1. Außerdem kann durch Depletion von Rad51 mittels short hairpin RNA (shRNA) die erfolgreiche Reparatur von DNA-Schäden durch HR verhindert werden, da Rad51 für den korrekten Ablauf der HR essentiell ist. In diesen Zellen ist eine weitere Aktivitätszunahme der ATR-Chk1-Achse zu beobachten.<sup>114</sup> Das ist vor allem eingedenk der Tatsache interessant, dass viele Tumore Defekte im HR-Signalweg aufweisen, was zu genomischer Instabilität und damit Abhängigkeit von ATR führen kann.

In der Zusammenschau scheint es daher plausibel, dass es für Tumore zwar von Vorteil ist, die Zellproliferation zu steigern und bestimmte Mutationen im Genom zuzulassen. Dennoch ist es auch für eine Krebszelle unabdingbar, dass die Replikation des Genoms – unter Umständen mitsamt den vorhandenen Mutationen – komplett ablaufen kann, bevor die Mitose eingeleitet wird. Genau diese Hypothese liegt der Erprobung von ATR-Inhibitoren zu Grunde. Krebszellen, die durch ihre intrinsischen Eigenschaften ein hohes Maß an Replikationsstress tolerieren müssen, soll die Möglichkeit der Koordination von Replikationsursprüngen und Reparatur von stockenden Replikationsgabeln durch ATR genommen werden. Die Inhibition hat zum Ziel, dass die Mitose in Zellen eingeleitet wird, deren Genom nur unvollständig repliziert ist. Das führt zur mitotischen Katastrophe und damit dem Tod der Zelle.<sup>115</sup> Zellkulturexperimente zeigen in der Tat, dass die Inhibition von ATR für Zellen besonders dann toxisch ist, wenn Bedingungen vorliegen, die das Maß an Replikationsstress fördern. Im Experiment wird dies durch die übermäßige Expression des Onkogen Cyclin E erreicht, was

typisch für bestimmte Karzinome im Menschen ist und nachweislich zu vermehrten Schäden in der DNA führt.<sup>116</sup>

Der Zusammenhang zwischen Replikationsstress und Abhängigkeit von ATR lässt sich auch bei der malignen Transformation von kultivierten Zellen beobachten. Die Kombination aus Transformation von MEFs durch konstitutive Aktivierung des Onkogen *Ras* und Inhibition von ATR führt zu signifikant höherer genomischer Instabilität als die alleinige Inhibition von ATR in nicht transformierten Zellen. Dabei reicht eine Reduktion der Aktivität des ATR-Signalweges auf ca. 16% der üblichen Aktivität aus, um für Zellen in Kombination mit der onkogenen Aktivierung von *Ras* tödlich zu sein.<sup>117</sup> Dieses Phänomen, dass zwei verschiedene Interventionen in Kombination tödlich wirken, während die alleinige Intervention mit jeweils nur einem der beiden Partner lediglich bedingt toxisch ist, wird als synthetische Letalität bezeichnet.

Dass das Ausmaß der Restaktivität von *Atr* für die Tumorigenese entscheidend ist, belegen *in vivo* Studien. In Mäusen, die sowohl für *Atr* als auch *Tp53* haploinsuffizient sind, gelingt beispielsweise trotz der verringerten Aktivität von *Atr* die Induktion von Adenokarzinomen der Lunge in einem *Kras*<sup>G12D</sup> Hintergrund.<sup>117</sup>

### 2.2.5. Tumormetabolismus

Eines der Kennzeichen von Krebs, nämlich die Deregulierung des zellulären Energiehaushaltes, ergibt sich aus den vorangegangenen Betrachtungen. Die starke Beschleunigung der Zellteilung sowie die Zunahme des Zellwachstums und die damit verbundene gesteigerte Proteinbiosynthese sind anabole Prozesse, die mit einem deutlich erhöhten Energiebedarf einhergehen. Wie bereits erwähnt, reagieren Tumorzellen auf den gesteigerten Energiebedarf einerseits mit der Neubildung von Gefäßen. Andererseits unterscheidet sich auch die Art der Energiegewinnung in Tumorzellen von der in gesunden Zellen.

Physiologischerweise gewinnen Zellen Energie durch Glykolyse, einen Prozess, der die Konvertierung von Glukose in ATP beschreibt. Dabei werden zwei Arten der Glykolyse voneinander unterschieden. Bei beiden Arten wird zunächst in 10 aufeinander folgenden enzymatischen Reaktionen ein Molekül Glucose zu 2 Molekülen Pyruvat umgewandelt, woraus ein Nettoenergiegewinn von 2 ATP und 2 NADH resultiert. Der weitere Abbau des Pyruvats ist dann von der Verfügbarkeit von Sauerstoff abhängig. Steht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung, kann Pyruvat in die Mitochondrien importiert werden, wo es durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) katalysiert zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Das so gewonnene Acetyl-CoA kann dann dem in den Mitochondrien ablaufendem Citratzyklus zugeführt werden, wo es unter Energiegewinnung zu CO<sub>2</sub> abgebaut werden kann.<sup>118</sup> Insgesamt können auf diese Weise durch die Oxidation eines Glukosemoleküls 32-36 Moleküle ATP gewonnen werden, was als aerobe Glykolyse bezeichnet wird.<sup>119,120</sup>

Sind Zellen hingegen sauerstoffarmen Bedingungen ausgesetzt oder besitzen keine Mitochondrien, betreiben sie die sogenannte anaerobe Glykolyse. Dabei wird Pyruvat durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert zu Laktat reduziert. Diese Reaktion dient der Regeneration von NAD<sup>+</sup>. Außerdem wird Laktat an die Umgebung abgegeben und kann schließlich in der Leber wieder zur Glukoneogenese genutzt werden.<sup>118</sup>

Da Krebszellen einen besonders hohen Energiebedarf haben, liegt also der Schluss nahe, dass sie, wann immer die äußeren Bedingungen es zulassen, aerobe Glykolyse betreiben. 1923 beschrieb jedoch der Physiologe Otto Warburg die paradox scheinende Eigenart von Karzinomzellen, auch in der Gegenwart von Sauerstoff die Mechanismen der anaeroben Glykolyse zu nutzen (von Warburg selbst als aerobe Glykolyse, da in der Gegenwart von Sauerstoff, bezeichnet).<sup>121</sup> 1956 postulierte er weiter, dass diese Eigenschaft sogar zur Entstehung von Krebs notwendig sei, was mittlerweile als Warburg Effekt bezeichnet wird.<sup>122,123</sup> Der Vorteil, den Krebszellen aus dieser unökonomisch erscheinenden Art der Energiegewinnung ziehen, lässt sich verstehen, wenn man nicht nur die reine Energiebilanz betrachtet. Für Zellteilung und -wachstum ist es ebenso notwendig, dass genug Substrate für DNA-Replikation und Proteinsynthese zur Verfügung stehen. Diese Substrate entstehen im ersten Abschnitt der Glykolyse, die dem aeroben und anaeroben Abbau gemein ist. So kann Glukose-6-phosphat in den oxidativen Arm des Pentosephosphatweges eingeschleust werden und der Biosynthese von Nukleotiden dienen, die für die DNA-Replikation essentiell sind. Des Weiteren können Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat zum Aufbau der Zellmembran genutzt werden. 3-Phosphoglycerat kann schließlich dem C<sub>1</sub>-Metabolismus („one-carbon metabolism“) zugeführt werden.<sup>120</sup> Unterschiedliche Indizien bekräftigen die Plausibilität dieser Perspektive. Es lohnt beispielsweise ein Blick auf das Enzym Pyruvatkinase (PK). Die PK katalysiert im letzten Schritt des ersten Teils der Glykolyse die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat. Im Menschen sind vier Isoformen der PK bekannt, nämlich PKR, PKL und die beiden durch alternatives Splicing entstehenden Varianten PKM1 und PKM2. Während PKR, PKL und PKM1 in unterschiedlichen adulten Geweben vorkommen, ist die Expression von PKM2 auf embryonale Zellen beschränkt.<sup>124</sup> Interessanterweise scheint auch in Krebszellen hauptsächlich PKM2 exprimiert zu sein.<sup>125</sup> Dennoch scheinen nicht alle Krebszellen von der Funktion von PKM2 abzuhängen, da sich bspw. Tumore der Brust auch nach Deletion von PKM2 weiterentwickeln.<sup>126</sup> Eine genauere Betrachtung zeigt, dass PKM2 vor allem in nicht-proliferierende Krebszellen aktiv ist und durch Signale, welche die Zellteilung fördern, inaktiviert wird, und daher in aktiv proliferierenden Zellen kaum Aktivität aufweist. Ein struktureller Vergleich von PKM1 und PKM2 belegt, dass sich die Aktivität der PKM2 durch allosterische Regulation deutlich einfacher regulieren lässt, als es bei PKM1 der Fall ist.<sup>124</sup> Im Vergleich zur PKM1 ist die Katalyse der Reaktion von PEP zu Pyruvat durch PKM2 ineffektiver

und läuft langsamer ab. Daher erscheint es plausibel, dass die bereits erwähnten Reaktionsprodukte, die bei den ersten Reaktionsschritten der Glykolyse entstehen, vor allem dann akkumulieren, wenn PKM2 aktiv ist. Innerhalb des Krebsgewebes finden sich immer aktiv proliferierende Zellen und solche, in denen gerade vermehrt andere anabole Reaktionen ablaufen. Über die Steuerung der Aktivität von PKM2 können Krebszellen daher beeinflussen, ob vermehrt Zwischenprodukte abfallen sollen oder vermehrt ATP generiert werden soll. Versuche in primären Zellen bestätigen diesen Ansatz. Deletiert man in diesen Zellen PKM2, wird in der Folge PKM1 hochreguliert, was schließlich zum Proliferationsstopp führt. Substituiert man nun jedoch Nukleotide, wird der Zellzyklus wieder aufgenommen.<sup>127</sup> Das Ausmaß der vermehrt anfallenden Zwischenprodukte scheint also in der Tat eine für die Zelle relevante Größe zu erreichen.

Ein Vergleich mit anderen körpereigenen Zellen demonstriert ebenfalls, dass der Warburg Effekt nicht etwa eine Fehlfunktion von Krebszellen darstellt, sondern vielmehr das Ablaufen anaboler Prozesse fördert. Zum einen sind Erythrozyten ebenfalls grundsätzlich von der Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse abhängig, weil sie auf Grund von fehlenden Mitochondrien keine oxidative Phosphorylierung betreiben können. Das dabei vermehrt entstehende NADPH nutzen sie effektiv zur Reduktion von Glutathion.<sup>128</sup> Zum anderen scheinen auch gesunde Zellen während der Embryogenese unabhängig vom Sauerstoffgehalt vor allem anaerobe Glykolyse zu betreiben.<sup>129</sup> In der Zusammenschau scheint die Energiegewinnung mittels anaerober Glykolyse für stark anabole Zellen – wie embryonale Zellen und Tumorzellen – insgesamt vorteilhaft zu sein.

Dass Tumorzellen die Energiegewinnung mittels anaerober Glykolyse präferieren, zeigt außerdem die enzymatische Regulierung der dafür typischen Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Das diese Reaktion katalysierende Enzym LDH kommt im Menschen nämlich in vier verschiedenen Isoformen vor. Die Isoform LDHA fördert vermehrt die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat, während die Isoform LDHB eher die Umkehrreaktion, also die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, katalysiert. Bezeichnenderweise scheint in bestimmten Tumoren die Expression von LDHA zu Gunsten der Expression von LDHB erhöht zu sein, was sich diagnostisch nutzen lässt.<sup>130</sup>

Zudem läuft die Energiegewinnung mittels anaerober Glykolyse deutlich schneller ab. Zwar ist die Energiegewinnung aus einem Molekül deutlich ineffizienter, jedoch ist die pro Zeiteinheit generierte Menge von ATP bei der anaeroben Glykolyse höher, solange genug Glukose zur Verfügung steht.<sup>120</sup> Dies macht allerdings eine weitreichende Einschränkung deutlich, die Tumorzellen eingehen, wenn sie auf Energiegewinnung mittels OXPHOS verzichten. Die energetisch ineffiziente Verwertung eines Moleküls Glukose zwingt Tumorzellen dazu, die intrazelluläre Glukosekonzentration besonders hochzuhalten. Diagnostisch wird sich diese Eigenschaft bereits in der klinischen Routine zu Nutze gemacht. Sowohl bei der initialen

Tumorsuche als auch der Frage nach dem Vorliegen von Metastasen spielt die Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie, die auf der radioaktiven Markierung von Glukose mit dem Radionuklid Fluor-18 basiert, eine entscheidende Rolle.<sup>131</sup> Nach der intravenösen Applikation von 18-Fluor-Deoxyglukose (FDG) kann anschließend an Hand des Signals, das durch den radioaktiven Zerfall des Nuklids entsteht, die Aufnahme von FDG in unterschiedliche Gewebe quantifiziert werden. Tumore lassen sich auf diese Weise nur auf Grund ihrer im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöhten Aufnahme von Glukose sehr sensitiv detektieren. Die Glukoseaufnahme wird in menschlichen Zellen durch drei verschiedene Systeme ermöglicht.<sup>132</sup> Die Symporter SGLT1 und 2 (*sodium–glucose cotransporter*) werden in intestinalen Zellen bzw. Nierenzellen exprimiert und vermitteln dort sekundär aktiv die an Na<sup>+</sup> gekoppelte Aufnahme von Glukose über die apikale Membran. SGLT1 dient dabei der Aufnahme von Glukose in die Blutbahn, während SGLT2 die Rückresorption von Glukose aus dem Lumen von Tubuluszellen ermöglicht. Eine weitere Klasse von Glukosetransportern gehört zur Familie der sogenannten „SWEETS“ und ist im Menschen bisher kaum charakterisiert, sondern vor allem in Pflanzen erforscht. Schließlich gibt es die durch das *SLC2*-Gen kodierte Klasse der GLUT (Glukose Transporter), die als transmembranäre Uniporter den Transport von Hexosen nach intrazellulär ermöglichen.<sup>133</sup> Bisher sind 14 verschiedene GLUTs bekannt, wobei sich vor allem die zur Klasse 1 gehörigen GLUT1, 2, 3, 4 und 14 durch eine hohe Affinität für Glukose auszeichnen, während die übrigen GLUTs andere Funktionen wahrnehmen. GLUT1 zeichnet sich unter den GLUTs der Klasse 1 durch die höchste Affinität zu Glukose aus und scheint auf den meisten menschlichen Zellen exprimiert zu werden. Die entscheidende Bedeutung, die GLUT1 zukommt, wird durch das sogenannte GLUT1-Defizienz-Syndrom unterstrichen: Heterozygote Mutationen im *SLC2A*-Gen, das für GLUT1 kodiert, führen neben anderen Symptomen zu Entwicklungsverzögerungen, Epilepsieeigung und Bewegungsstörungen in den betroffenen Patienten.<sup>134</sup>

Tumorzellen hingegen, scheinen ihren hohen Bedarf an Glukose durch eine Heraufregulierung der Expression von GLUT1 zu decken. Eine Metaanalyse von 26 Studien, in denen jeweils die Expression von GLUT1 in verschiedenen Krebsentitäten untersucht wurde, zeigte, dass GLUT1 in einer Vielzahl verschiedener Tumoren überexprimiert wird.<sup>135</sup> Dabei scheint die Expression von GLUT1 in bestimmten Krebsarten, wie bspw. Tumoren der Brust, mit einer kürzeren mittleren Überlebenszeit zu korrelieren, während eine Hochregulierung in Tumoren des Kolons keine Assoziation mit der mittleren Überlebenszeit zu zeigen scheint. Das Expressionslevel von GLUT1 scheint also bei Brustkrebs prognostische Aussagekraft für das Überleben der betroffenen Patienten zu haben.<sup>136</sup> Damit stellt sich auch die Frage, ob GLUT1 ein möglicher Angriffspunkt zielgerichteter Therapien sein kann.

Tatsächlich zeigt die Inhibierung von GLUT1 in der Zellkultur therapeutisches Potential bei der Behandlung von dreifach-negativem Brustkrebs (TNBC). TNBC ist eine besonders aggressive Form von Brustkrebs, die durch die fehlende Expression sowohl des Östrogen Rezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), als auch des Progesteron Rezeptors (PR) sowie des „epidermal growth factor“-Rezeptors 2 (HER2) definiert ist. Betrachtet man die Proben von TNBC, die im TCGA gesammelt wurden, fällt auf, dass TNBC auch durch eine erhöhte Expression von *SLC2A1*, dem Gen, das für GLUT1 kodiert, gekennzeichnet sind. Das könnte erklären, warum die pharmakologische Inhibierung von GLUT1 in der Zellkultur oder der Knockdown von GLUT1 mittels siRNA in einigen TNBC-Zelllinien zu einem Wachstumsstopp der Zellen führen. Bezeichnenderweise scheinen dabei vor allem jene Zellen sensibel gegenüber der Inhibierung von GLUT1 zu sein, die in ihrem Grundzustand besonders wenig OXPHOS betreiben und in denen daher der Warburg Effekt stark ausgeprägt ist.<sup>137</sup>

Auch *in vivo* konnte bereits ein potentieller Nutzen der Inhibition von GLUT1 gezeigt werden. In einem Xenograft-Modell wurden sowohl Nierenzellkarzinome mit Verlust des Tumorsuppressorgens *VHL* als auch Nierenzellkarzinome mit funktionstüchtigen *VHL* mit einem GLUT1-Inhibitor behandelt. *VHL* defiziente Zellen zeichnen sich durch einen besonders prominenten Warburg Effekt aus, der sich in der Hochregulation von Schlüsselenzymen der Glykolyse sowie von GLUT1 äußert. Tatsächlich konnte nur in solchen Tumoren mit funktionslosem *VHL* ein Wachstumsstopp in Folge der Therapie mit einem GLUT1 Inhibitor verzeichnet werden.<sup>138</sup>

Zusammengenommen sprechen diese Befunde also dafür, dass die alleinige Inhibierung von GLUT1 das Wachstum von einigen besonders auf Glukose angewiesenen Krebszellen adäquat stoppen kann. Dennoch ist diese Wirkung, selbst wenn man einzelne Krebsarten isoliert betrachtet, nicht allgemeingültig, sondern auf bestimmte Zellen beschränkt.

Den Versuch, die Abhängigkeit der Tumorzellen von Glukose therapeutisch auszunutzen, zeigt auch die Arbeit an der Entwicklung bestimmter Diätregime, die sich durch einen besonders niedrigen Gehalt von Kohlenstoffen auszeichnen.<sup>139</sup> Hier konnte bisher allerdings kein kausaler Zusammenhang zwischen einer bestimmter Diätform und einem protektiven Effekt auf die Krebsentwicklung gezeigt werden, auch wenn in einigen Studien eine positive Korrelation zwischen kohlenstoffarmer Ernährung und dem Ansprechen auf etablierte Therapien gezeigt werden konnte. Ein kausaler Zusammenhang lässt sich hier jedoch schwer beweisen, weil generell ein normwertiger BMI, der durch kohlenstoffarme Diäten gefördert wird, oder der Verzicht auf möglicherweise kanzerogene Nahrungsmittel wie rotes Fleisch mit einem geringeren Krebsrisiko assoziiert sind.

Zukünftige Forschung muss also noch zeigen, wodurch sich voraussagen lässt, ob Krebszellen auf die Inhibierung von GLUT1 ansprechen und wodurch sie sich eventuell dafür sensibilisieren lassen.

## **2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

In dem mitvorgelegten Artikel konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus der Inhibierung der Proteinkinase ATR und des Glukosetransporter GLUT1 in *Kras*-mutierten Tumoren *in vitro* zu synergistischer Letalität führt (siehe Seite 79). In der vorgelegten Arbeit soll untersucht werden, ob sich diese Ergebnisse auch *in vivo* bestätigen lassen. Zu diesem Zweck wird ein autochthones Mausmodell *Kras*<sup>G12D</sup>-getriebener Weichteilsarkome verwendet. Nach der Induktion von Sarkomen im Oberschenkel erhalten die Mäuse der Therapiegruppe entweder eine 7-tägige Behandlung mit dem ATR-Inhibitor VE822, dem GLUT1-Inhibitor WZB117 oder einer Kombination aus beiden Inhibitoren, während die Mäuse der Kontrollgruppe nur ein Vehikel erhielten. Jeweils zu Beginn und nach Abschluss der Behandlung werden die Volumina der Tumore durch Bildgebung mittels MRT quantifiziert. Dadurch können Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich des Größenwachstum der Tumore ermittelt werden. Nach Abschluss der Behandlung werden die Tiere zur histologischen Analyse des Tumorgewebes getötet, um unter anderem potentielle Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppen hinsichtlich der Kinetik der Proliferation der Tumorzellen aufzudecken.

Der Transfer dieser Kombinationstherapie von der Zellkultur in das Mausmodell soll außerdem erste Anhaltspunkte über die Verträglichkeit der Applikation *in vivo* liefern. Die Verifizierung von Verträglichkeit und Wirksamkeit sowie Spezifität der Therapie *in vivo* ist Grundlage für eine mögliche Anwendung dieser Therapie bei der Behandlung von Krebserkrankungen des Menschen in der Zukunft.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Autochthones Mausmodell**

Für eine Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden zur Generierung des autochthonen Mausmodells, der Therapieregime und der Bildgebung mittels MRT sowie Auswertung dieser Bilder sei auf den Material- und Methodenteil des mitvorgelegten Artikels verwiesen (siehe Seite 79, Kapitel „Material and Methods“ im Abschnitt „Autochthonous model“ und Kapitel „Supplementary Methods“ im Abschnitt „Analysis of tumor progression of the autochthonous model“).

### **3.2 Immunhistochemie**

Im Anschluss an die abschließende MRT Untersuchung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Tumorgewebe chirurgisch reseziert. Einzelne Tumorknötchen wurden dann in 4% Paraformaldehyd-Lösung über Nacht fixiert und anschließend in PBS gelagert. Nach Einbettung in Paraffin (englisch: *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE)) wurden aus den FFPE Sarkomproben mittels Mikrotom 4 µm dicke Schnitte gewonnen und

auf Objektträger aufgebracht. Nach Anfärbung mit Hematotoxylin und Eosin (HE) sowie einem Antikörper gegen Ki67 (Verdünnung 1:50, Cell Marque, 275R) wurden die Schnitte mit der Software ImmunoRatio analysiert. ImmunoRatio ist eine gut etablierte Internetanwendung für die Analyse immunhistochemisch gefärbter Schnitte, mit der sich auswerten lässt, welcher Anteil des Gewebes positiv für eine bestimmte Färbung ist.<sup>140</sup> Von jeder angefertigten Probe wurden 3 repräsentative Bildausschnitte mit ImmuoRatio ausgewertet und der Anteil des Ki67-positiven Gewebes analysiert. Anschließend wurde für jede analysierte Probe der Mittelwert aus den 3 Messungen gebildet. Zur statistischen Auswertung wurden die verschiedenen Kohorten gegeneinander mittels einfaktorier ANOVA mit anschließendem Tukey-multiple-Vergleiche-Test verglichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Kombination aus Inhibierung von Atr und Glut1 zeigt synergistische Toxizität in einem *Kras*<sup>G12D</sup>-getriebenen autochthonen Mausmodell von Weichteilsarkomen

Die durch Bildgebung mittels MRT gewonnenen Ergebnisse sind bereits in Gänze in dem mitvorgelegten Artikel veröffentlicht (siehe Seite 79). Daher können an dieser Stelle einerseits nur die bereits veröffentlichten Ergebnisse wiedergegeben werden. Andererseits kann hier zusätzliches Bildmaterial präsentiert werden, das über das bereits Veröffentlichte hinausgeht, da in der Originalarbeit auf Grund von Platzrestriktionen nur eine Auswahl publiziert werden konnte. Die Injektion von Adeno-CMV-Cre in den Oberschenkelmuskel von *Kras*<sup>LSLG12D/wt; Trp53<sup>fl/fl</sup></sup> C57BL/6-Mäusen führt zur Transkription eines onkogenen *Kras*-Allels und der homozygoten Deletion des Tumorsuppressorgens *Trp53* in den transfizierten Zellen.<sup>69</sup> Diese Modifikation des Genoms der Mauszellen führt zur autochthonen Entwicklung von Weichteilsarkomen. Nach der Injektion von Adeno-CMV-Cre in den Oberschenkelmuskel wurde einmal pro Woche eine Schnittbildgebung mittels MRT bei allen Mäusen durchgeführt, um die Entwicklung von Sarkomen zu beobachten. Nach Diagnose eines Tumors in der MRT (Tag 0) wurde die jeweilige Maus am Folgetag randomisiert einer von 4 verschiedenen Behandlungskohorten zugeordnet und die entsprechende Therapie initiiert (Tag 1).



Die Behandlungsregime bestanden entweder in der täglichen Behandlung mit dem ATR-Inhibitor VE822 (40 mg/kg KG per os), dem GLUT1-Inhibitor WZB117 (50 mg/kg KG intraperitoneal), der Kombination aus VE822 und WZB117 oder in der Kontrollgruppe die Gabe gleicher Volumina von Vehikellösung an 7 aufeinander folgenden Tagen (Abbildungen 10A und 11B).

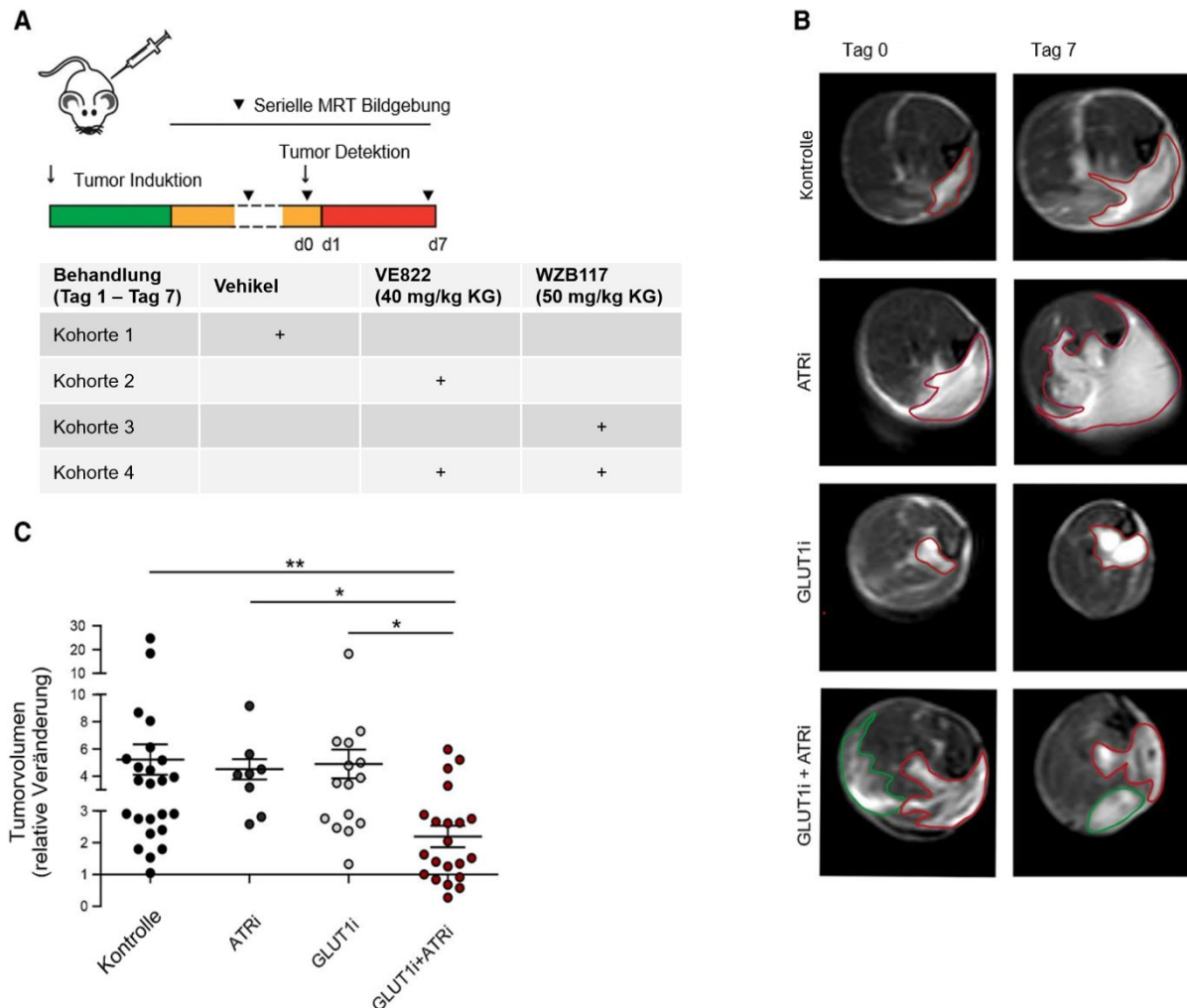


Abbildung 10: Kombinierte Inhibition von Atr und Glut1 zeigt synergistische Toxizität in einem durch  $Kras^{G12D}$ -getriebenen Sarkommodell in vivo. **A**,  $Kras^{LSL.G12D/wt}; Trp53^{fl/fl}$  Mäuse wurden in 4 verschiedene Behandlungskohorten aufgeteilt. 30 Tage nach der Injektion von Ad-Cre (grüne Leiste) wurde wöchentlich eine Bildgebung mittels MRT durchgeführt, um die Entwicklung von Tumorknötchen zu detektieren (gelbe Leiste). Ab dem Tag der Tumordetektion (Tag 0) wurden die Mäuse für 7 aufeinander folgende Tage mit der entsprechenden Therapie behandelt (rote Leiste). Mit Abschluss der Therapie wurde eine finale MRT-Bildgebung durchgeführt (Tag 7). **B**, repräsentative transversale MRT-Schnittbilder werden für die 4 verschiedenen Kohorten jeweils vor und nach Abschluss der Therapie gezeigt. Tumorknötchen sind durch Umrandungen hervorgehoben. Rote bzw. grüne Umrandung bedeuten verschiedene Tumoren innerhalb eines Tieres. **C**, Tumorzummen wurden für jede Läsion berechnet und in Bezug auf die jeweiligen Volumina vor Beginn der Therapie normalisiert und sind daher als relative Volumenänderungen angegeben (Y-Achse). Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die relativen Volumenänderungen wurden jeweils mit den Veränderungen der Kontrollgruppe mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn-multiple-Vergleiche-Test verglichen. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen gekennzeichnet. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; nicht-signifikante Level sind nicht gekennzeichnet. Modifiziert nach Erber J et al., Cancer Research 2019.<sup>10</sup>

Mit Vollendung der Therapie (Tag 7) wurde eine abschließende Bildgebung mittels MRT durchgeführt, um die Auswirkungen der verschiedenen Therapien auf das Tumorstadium quantifizieren zu können (Abbildung 10B). Ein Vergleich der Größenveränderung der Tumore in Bezug zum Ausgangswert (Tag 0) zeigte eine relative Zunahme der Tumorstadium unter der alleinigen Behandlung mit VE822 (n=8) bzw. WZB117 (n=15) und in der Kontrollgruppe (n=24) (Abbildungen 10C und 11B). Die Behandlung mit der Kombinationstherapie aus VE822 und WZB117 (n=21) zeigte hingegen eine im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikante Verringerung der Größenzunahme und in 5 Mäusen sogar eine Reduktion des Tumorstadium im Vergleich zum Ausgangswert (Abbildungen 10C und 11B).

Um die Verträglichkeit der verschiedenen Behandlungsregime beurteilen zu können, wurde außerdem das Körpergewicht der Mäuse aller Kohorten jeweils an Tag 0 (vor Therapiebeginn) und Tag 7 (mit Vollendung der Therapie) gemessen (Abbildung 11C).

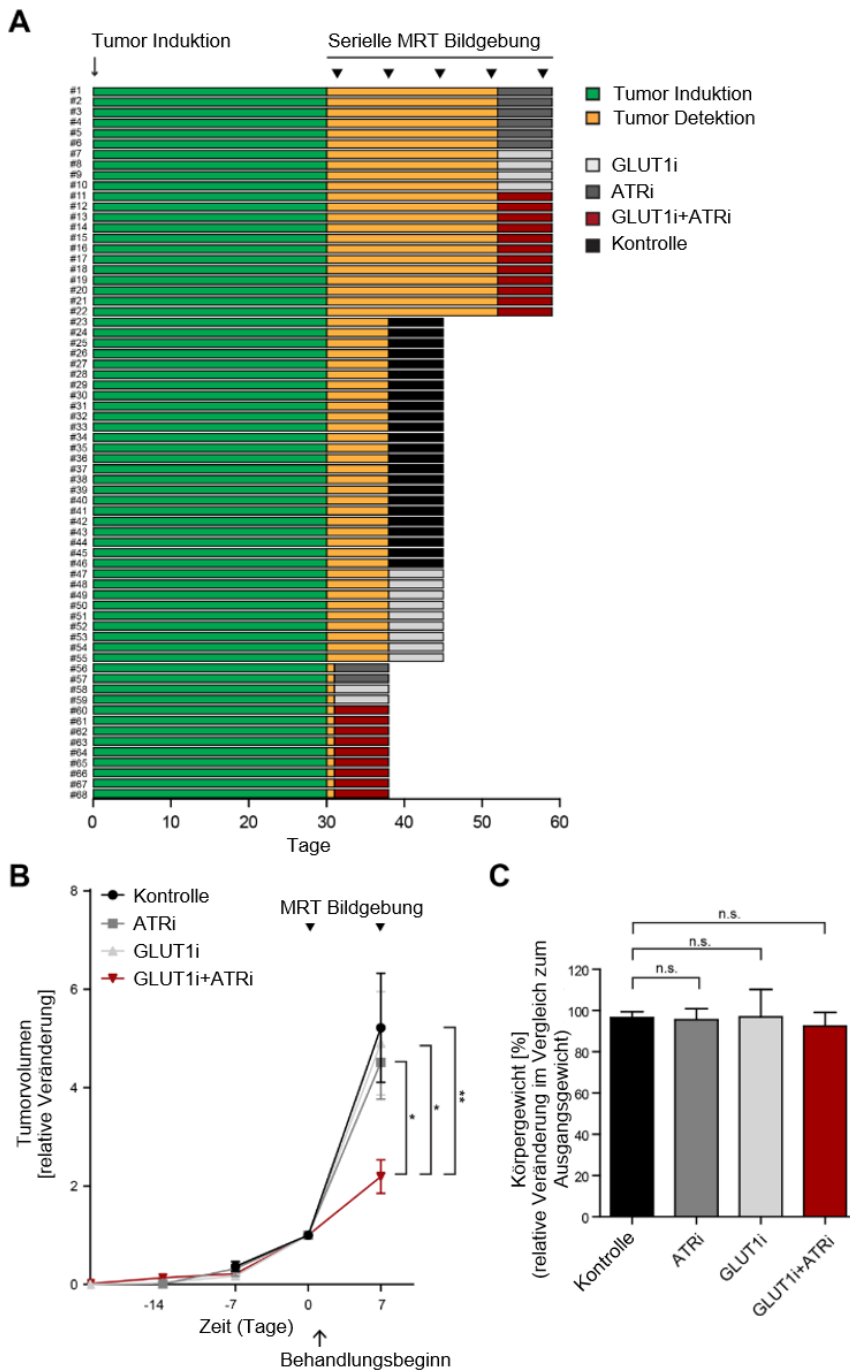


Abbildung 11: Unterschiedliche Behandlungsregime zeigen keine signifikante Auswirkung auf die Entwicklung des Körpergewichts unter Therapie in  $Kras^{LSL.G12D/wt}; Trp53^{fl/fl}$  Mäusen. **A**, Darstellung der individuellen Zeitabläufe für jede Maus der Studie. 30 Tage nach Tumorinduktion durch Injektion von Ad-Cre (grüne Leiste) erhielten die Mäuse ihre erste MRT-Bildgebung, die bis zur Detektion von Tumorknötchen wöchentlich wiederholt wurde (gelbe Leiste). Mit Detektion des Tumors erhielten die Mäuse an 7 aufeinander folgenden Tagen entweder eine Therapie mit VE822 (ATRi, 40 mg/kg KG, einmal täglich per os), WZB117 (GLUT1i, 50 mg/kg KG, einmal täglich intraperitoneal), der Kombination aus VE822 und WZB17 oder Vehikellösung (Kontrolle). Mit Beendigung der Therapie (Tag 7) erfolgte eine abschließende Bildgebung mittels MRT. **B**, Tumorstadien wurden für jede Läsion einmal pro Woche berechnet und mit Bezug auf die jeweiligen Volumina vor Beginn der Therapie normalisiert (Tag 0), um die relative Größenveränderung zu quantifizieren (Y-Achse). Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler wider. Die relativen Größenveränderungen an Tag 7 der verschiedenen Kohorten wurden untereinander mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-multiple-Vergleiche-Test verglichen. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen gekennzeichnet. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; nicht-signifikante Level sind nicht gekennzeichnet. **C**, das Körpergewicht der Tiere aller Kohorten wurde jeweils unmittelbar vor und im Anschluss an die 7-tägige Therapie gemessen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn-multiple-Vergleiche-Test berechnet (n.s., nicht signifikant,  $p \geq 0,05$ ). Modifiziert nach Erber J et al., Cancer Research 2019.<sup>10</sup>

Die vorliegenden Daten sprechen daher für eine spezifische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus VE822 und WZB117 in *Kras*<sup>G12D</sup>-mutierten Tumoren *in vivo*. Dabei ist von einer synergistischen Interaktion auszugehen, da keine der Therapien mit nur einem der Inhibitoren einen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum *in vivo* zeigte.

In den Abbildungen 12A, 13A, 14A und 15A finden sich 3D-Rekonstruktionen der in Abbildung 10C repräsentativ gezeigten Tumore – jeweils für ein Kontrolltier, ein Tier unter Behandlung mit VE822, ein Tier unter Behandlung mit WZB117 und ein Tier unter Behandlung mit der Kombinationstherapie aus VE822 und WZB117. Dreidimensionale Darstellungen der Tumore lassen sich durch Kombination der Daten aus allen erfassten Schnittebenen interpolieren. Analog können auch die in jeder erfassten Schnittebene manuell eingezeichneten Tumorumfänge zu dreidimensionalen Objekten rekonstruiert werden. Diese sind in den Abbildungen 12A, 13A, 14A und 15A für einzelne Läsionen farbkodiert dargestellt. Durch Vergleich mit den 3D-Rekonstruktionen der Tumore ohne Einzeichnung der berechneten Volumina (Abbildungen 12B, 13B, 14B und 15B) lässt sich visuell überprüfen, ob die berechneten Volumina den tatsächlichen Volumina entsprechen, wodurch Ungenauigkeiten bei der manuellen Einzeichnung der Tumorumfänge in den einzelnen Schnittebenen erkannt und korrigiert werden können.

In den Abbildungen 12C, 13C, 14C und 15C finden sich jeweils die koronaren Schnitte der MRT Bildgebung, die mit den in Abbildung 10C dargestellten Transversalschnitten korrespondieren.

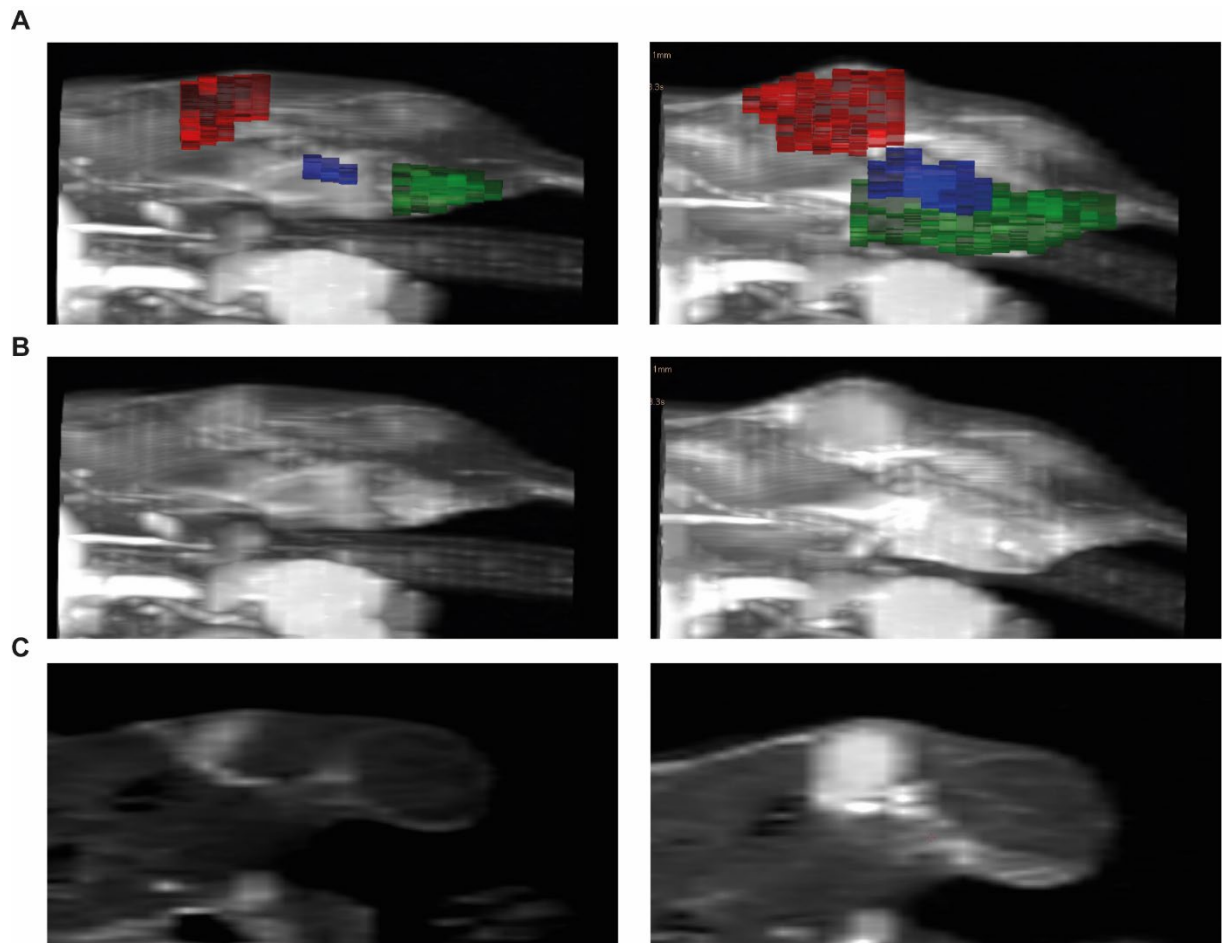


Abbildung 12: Tumorwachstum bei einem Kontrolltier zwischen Detektion an Tag 0 (linke Spalte) und 7 Tage später (rechte Spalte) **A**, 3D-Rekonstruktion der Tumore durch Interpolation aus den Daten sämtlicher Schnittebenen. Die in jeder Schnittebene für jede Läsion manuell eingezeichneten Tumorumfänge werden ebenfalls zu 3D-Objekten rekonstruiert, die entsprechend der jeweiligen Läsion farbkodiert dargestellt sind. Ansicht von medial. **B**, 3D-Rekonstruktionen wie in **A**, ohne Darstellung der berechneten Volumina. Ansicht von medial. **C**, Koronarschnitte der rechten hinteren Extremität ohne Einzeichnung des Tumorumfangs.

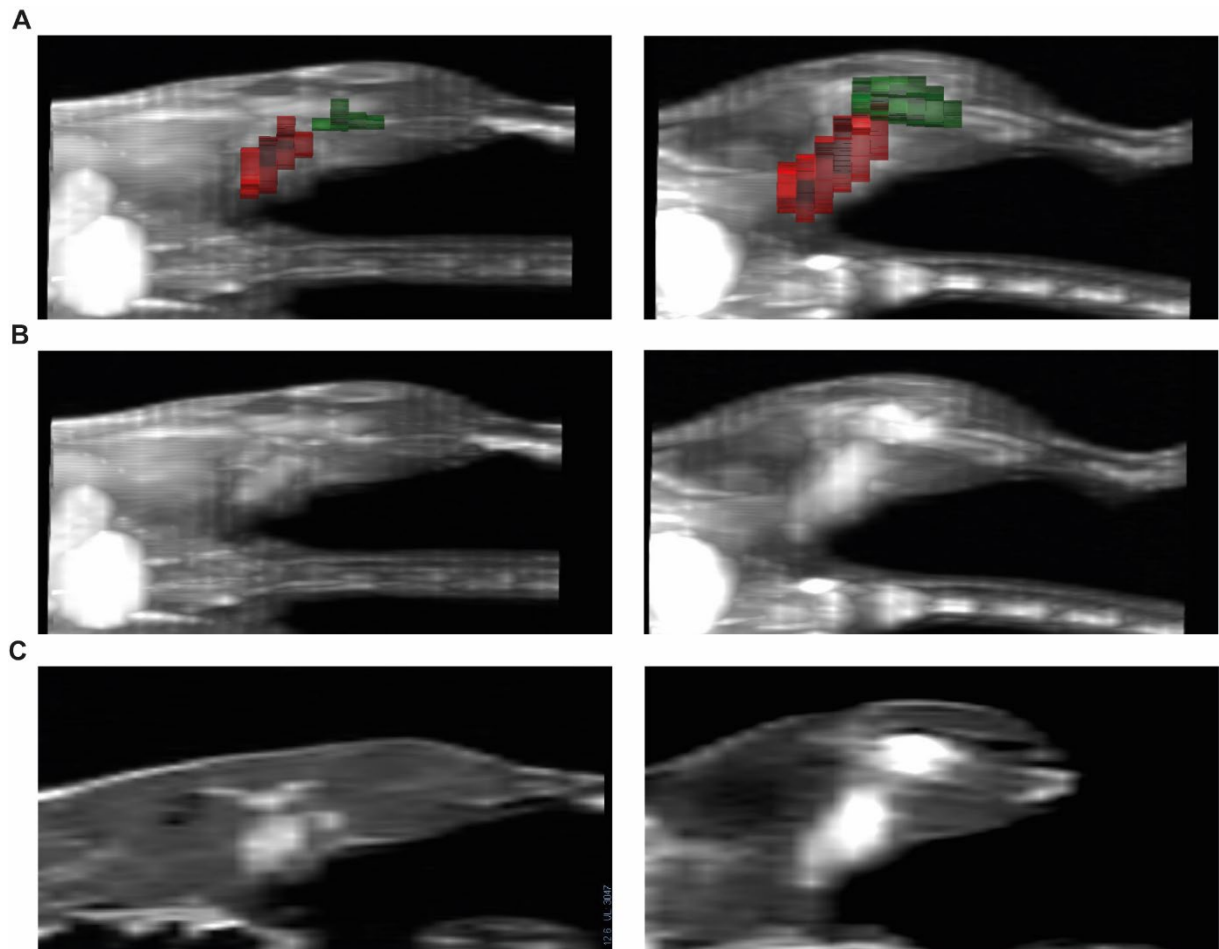


Abbildung 13: Tumorwachstum zwischen Detektion an Tag 0 (linke Spalte) und nach 7-tägiger Behandlung mit dem GLUT1-Inhibitor WZB117 (rechte Spalte) **A**, 3D-Rekonstruktion der Tumore durch Interpolation aus den Daten sämtlicher Schnittebenen. Die in jeder Schnittebene für jede Läsion manuell eingezeichneten Tumorumfänge werden ebenfalls zu 3D-Objekten rekonstruiert, die entsprechend der jeweiligen Läsion farbkodiert dargestellt sind. Ansicht von medial. **B**, 3D-Rekonstruktionen wie in **A**, ohne Darstellung der berechneten Volumina. Ansicht von medial. **C**, Koronarschnitte der rechten hinteren Extremität ohne Einzeichnung des Tumorumfangs.

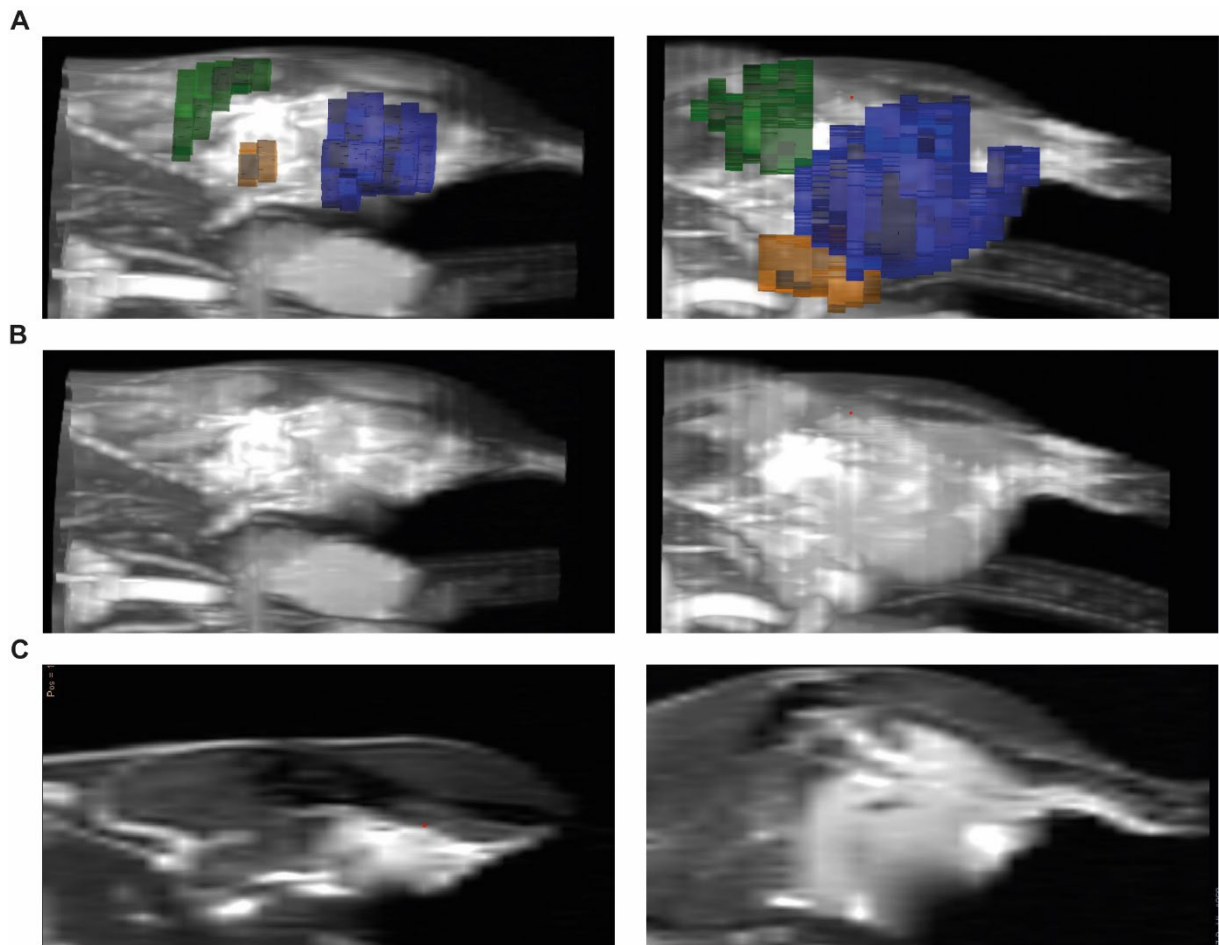


Abbildung 14: Tumorwachstum zwischen Detektion an Tag 0 (linke Spalte) und nach 7-tägiger Behandlung mit dem ATR-Inhibitor VE822 (rechte Spalte) **A**, 3D-Rekonstruktion der Tumore durch Interpolation aus den Daten sämtlicher Schnittebenen. Die in jeder Schnittebene für jede Läsion manuell eingezeichneten Tumorumfänge werden ebenfalls zu 3D-Objekten rekonstruiert, die entsprechend der jeweiligen Läsion farbkodiert dargestellt sind. Ansicht von medial. **B**, 3D-Rekonstruktionen wie in A, ohne Darstellung der berechneten Volumina. Ansicht von medial. **C**, Koronarschnitte der rechten hinteren Extremität ohne Einzeichnung des Tumorumfangs.

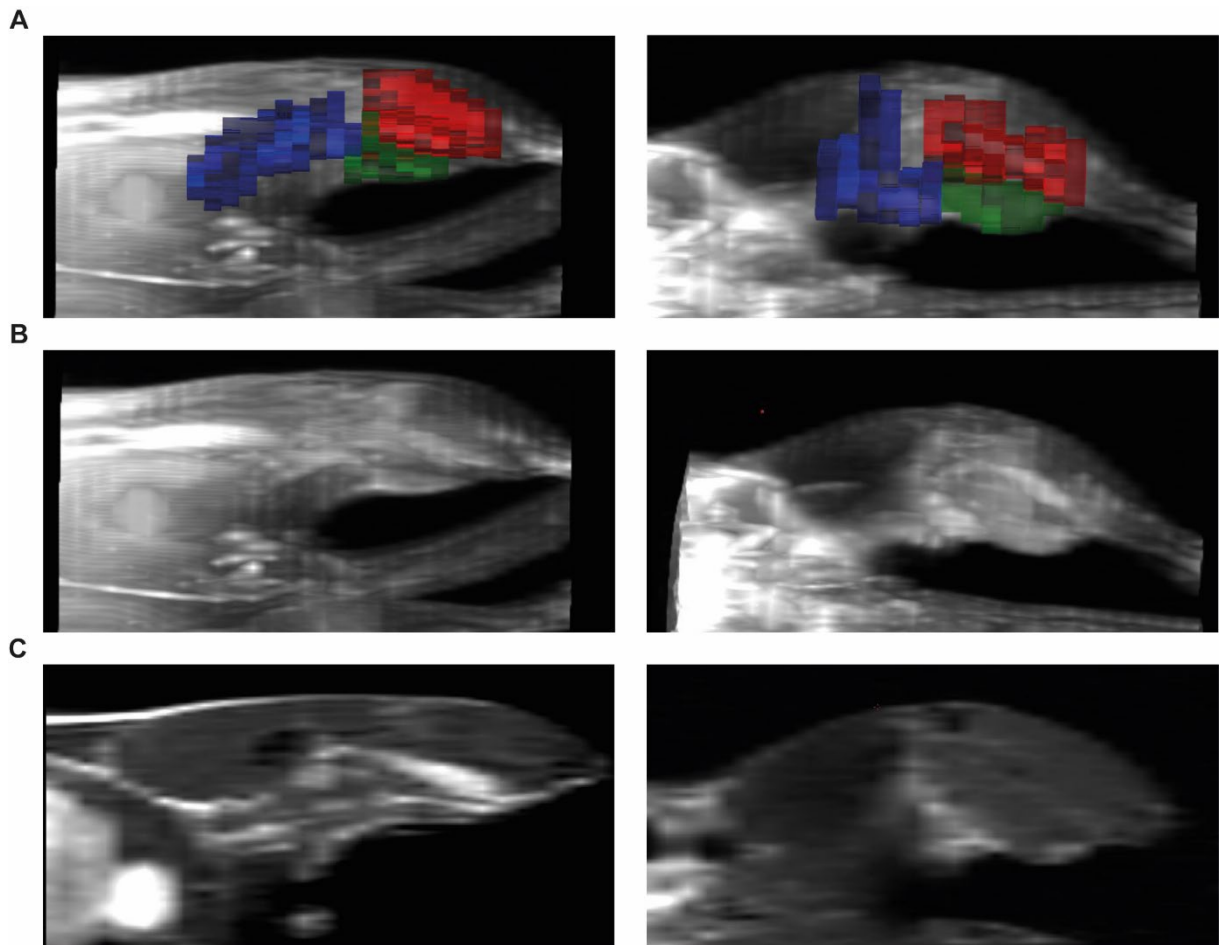


Abbildung 15: Tumorwachstum zwischen Detektion an Tag 0 (linke Spalte) und nach 7-tägiger Behandlung mit der Kombination aus dem ATR-Inhibitor VE822 und dem GLUT1-Inhibitor WZB117 (rechte Spalte) **A**, 3D-Rekonstruktion der Tumore durch Interpolation aus den Daten sämtlicher Schnittebenen. Die in jeder Schnittebene für jede Läsion manuell eingezeichneten Tumorumfänge werden ebenfalls zu 3D-Objekten rekonstruiert, die entsprechend der jeweiligen Läsion farbkodiert dargestellt sind. Ansicht von medial. **B**, 3D-Rekonstruktionen wie in A, ohne Darstellung der berechneten Volumina. Ansicht von medial. **C**, Koronarschnitte der rechten hinteren Extremität ohne Einzeichnung des Tumorumfangs.



## **4.2 Die Kombination aus Inhibierung von Atr und Glut1 zeigt eine erhöhte Expression von Ki67 in Gewebeschnitten von murinen *Kras*<sup>G12D</sup>-getriebenen Weichteilsarkomen**

Im Anschluss an die abschließende MRT-Bildgebung wurden die Mäuse getötet und das Tumorgewebe chirurgisch reseziert und fixiert, um immunhistochemische Untersuchungen durchzuführen. Mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) kann an Hand der Struktur des Gewebes verifiziert werden, dass es sich tatsächlich um Tumorgewebe und keine versehentlich angeschnittenen benachbarten Strukturen handelt (Abbildung 16A). Die Anfärbung von Ki67 gibt Auskunft über das Ausmaß der Zellproliferation. Ki67 wird in der G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert und fehlt in ruhenden Zellen, die sich in der G<sub>0</sub>-Phase befinden. Daher kann Ki67 in der Diagnostik als Marker für das Ausmaß der Proliferation und des Größenwachstums von Tumorzellen benutzt werden.<sup>141</sup> Außerdem korreliert der Anteil der Ki67-positiven Zellen mit einer geringeren Zelldifferenzierung und größeren Neigung zur Metastasierung und wird daher auch als prognostischer Marker genutzt.<sup>141</sup> Tumorgewebe aus allen 4 Kohorten wurde deshalb auch mit einem Antikörper gegen Ki67 angefärbt, um herauszufinden, wie sich die verschiedenen Regime auf die Zellproliferation auswirken (Abbildung 16B). Die automatisierte Quantifizierung des Anteils an Ki67-positiven Zellen (Abbildung 16C) zeigt in der Tat Unterschiede in der Ki67-Expression zwischen den 4 Kohorten (Abbildung 16D). Der Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen ist jedoch lediglich als vorläufiges Ergebnis zu betrachten, da sich auf Grund der geringen Probenzahl keine statistisch robusten Schlüsse ziehen lassen. Nach einem üblicherweise verwendeten Index gilt ein Anteil von ≤15% positiver Zellen als niedrig, 16%–30% als intermediär und >30% als hoch.<sup>142</sup> Sowohl die Tumore der Kontrollgruppe als auch die Tumore, die mit WZB117 behandelt wurden, wiesen einen hoch-intermediären bis niedrig-hohen Anteil positiver Zellen auf, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand. Für die Behandlung mit VE822 zeigte sich hingegen ein Ki67-positiver Anteil, der der intermediären Gruppe zuzurechnen ist, was einen schwach signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe und den mit WZB117 behandelten Tumoren darstellt. Die mit der Kombination aus WZB117 und VE822 behandelten Tumore wiesen schließlich nur noch einen niedrigen Anteil Ki67-positiver Zellen auf, was einen hochsignifikanten Unterschied zu den mit WZB117 allein behandelten Tumoren sowie Tumoren der Kontrollgruppe darstellt, allerdings keinen signifikanten Unterschied relativ zu den mit VE822 behandelten Tumoren bedeutet.

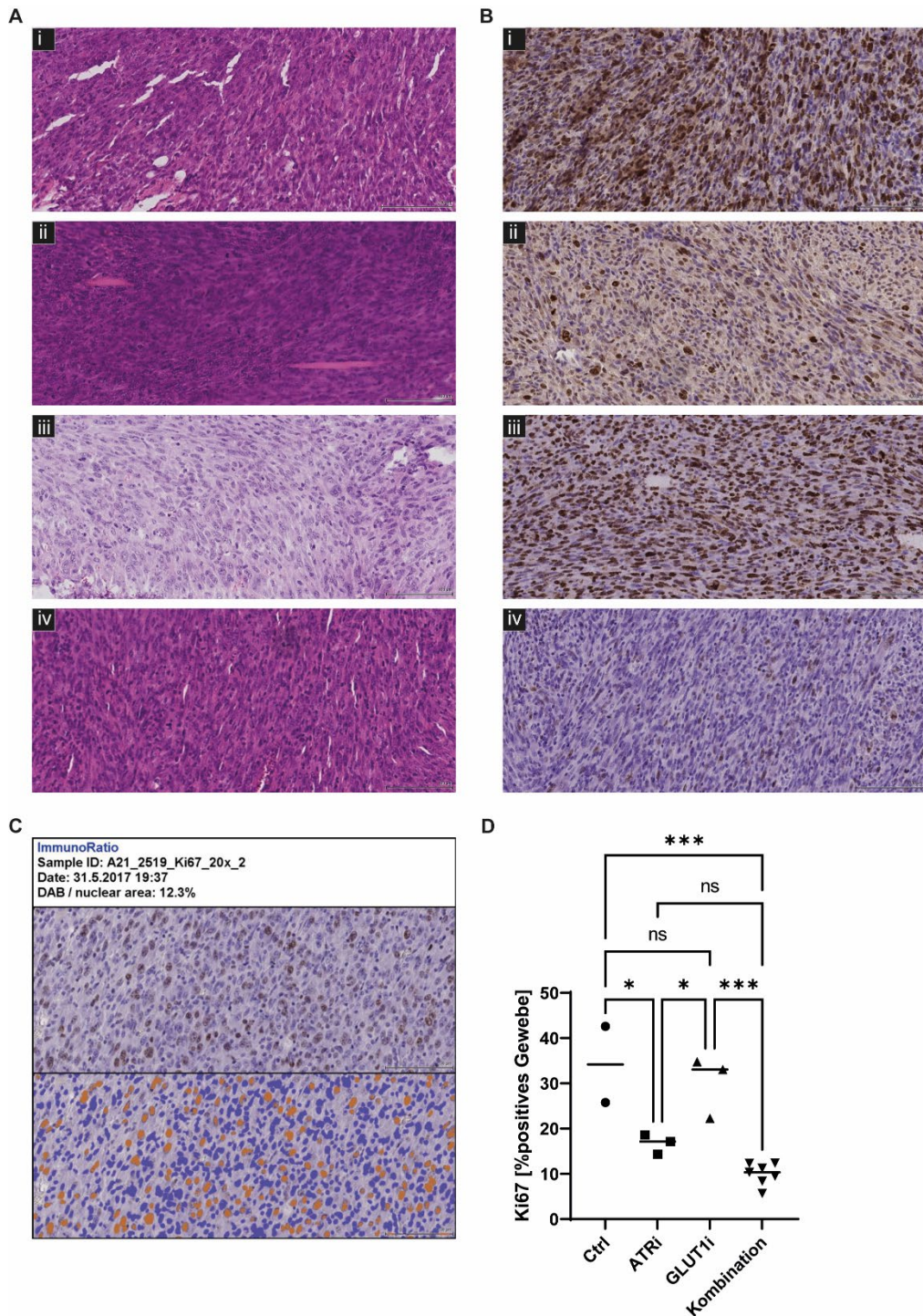


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbungen zeigen verminderte Zellproliferation in *Kras*<sup>G12D</sup>-getriebenen Weichteilsarkomen unter Therapie mit VE822 und WZB117. **A**, HE-Färbung von Tumorgewebe *i*, der Kontrollgruppe oder nach 7-tägiger Therapie mit *ii*, WZB117; *iii*, VE822; *iv*, WZB117 und VE822. **B**, Ki67-Färbung von Tumorgewebe der *i*, Kontrollgruppe oder nach 7-tägiger Therapie mit *ii*, WZB117; *iii*, VE822; *iv*, WZB117 und VE822. **C**, Beispiel der automatischen Detektion von Ki67-positiven Zellen mittels ImmunoRatio. Blau, negativ; orange, positiv für Ki67. **D**, Quantifizierung des Anteils Ki67-positiver Zellen. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Analyse von 3 repräsentativen Bildausschnitten einer Probe. Die relativen Anteile positiver Zellen der verschiedenen Kohorten wurden untereinander mittels einfaktorier ANOVA mit anschließendem Tukey-multiple-Vergleiche-Test verglichen. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen gekennzeichnet. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; ns, nicht-signifikant.

Vergleichbare Studien zeigen für die Inhibition von ATR teilweise ähnliche Ergebnisse, unterscheiden sich jedoch in der Methodik. In Zellen, die für *Atr* haploinsuffizient sind und eine onkogene *Ras*-Mutation aufweisen, zeigt sich beispielsweise eine Abnahme der Proliferation,

die mittels Messung der Generationszeit (englisch: „population doubling time“) bestimmt wurde.<sup>117</sup> Dies ist jedoch nur bedingt mit einer pharmakologischen Inhibition von Atr *in vivo* vergleichbar. Auch die Inhibition von ATR mit VE822 in der Zellkultur führt im Versuch mit Eierstockkrebszellen zur Abnahme der Proliferation, die durch Koloniebildungstests (englisch: „clonogenic assay“) gemessen wurde.<sup>143</sup> In diesem Fall wurden jedoch keine *Ras*-mutierten Zellen verwendet. In einer weiteren Studie führte die Inhibition von ATR mit dem kleinen Molekül AZD6738 in einem Xenograft-Modell von dreifach negativem Brustkrebs (TNBC), der außerdem eine onkogene *Kras*-Mutation aufwies, zu einer reduzierten Anfärbung von Ki67 *in vivo*, wobei die Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ausfiel als in den hier vorliegenden Ergebnissen.<sup>144</sup>

Die Datenlage zur Auswirkung der Inhibition von Glut1 auf die Zellproliferation ist ebenfalls komplex, da sich die Ergebnisse je nach verwendeter Methodik voneinander unterscheiden. Inhibiert man GLUT1 in TNBC-Organoiden mit dem Molekül BAY-876, ist in einer Studie der Effekt auf die Zellproliferation abhängig von der Expression von Rb: In Rb-positiven Organoiden führte die Inhibition von GLUT1 zu einer Abnahme des Anteils Ki67-positiver Zellen, während sich in Rb-negativen Organoiden keine Auswirkung auf die Ki67-Expression feststellen ließ.<sup>137</sup> In einem Lungenkrebs-Xenograft-Modell mit onkogener *KRAS*-Mutation führte die Behandlung mit dem Molekül DRB18, das sämtliche Glukose Transporter der Klasse 1 inhibiert, zu einer Reduktion der Ki67-Expression.<sup>145</sup> Allerdings bestand das Behandlungsregime hier in der 3 mal wöchentlichen Applikation von DRB18 über einen Zeitraum von 5 Wochen. Die Behandlung derselben Zelllinie, die auch für das Xenograftmodell genutzt wurde, mit WZB117 führte *in vitro* ebenfalls zu einer Abnahme der Zellproliferation im Koloniebildungstest.<sup>146</sup> Keine dieser Studien rekapituliert jedoch die hier vorliegende Situation der *in vivo* Behandlung mit WZB117 in einem autochthonen Tumormodell.

Es ist davon auszugehen, dass die Auswirkungen der Behandlung mit VE822 oder WZB117 auf die Zellproliferation entscheidend von der Dosierung, der Dauer der Anwendung, dem verwendeten Tumormodell und dem exakten Mutationsstatus abhängen.

Insgesamt lassen die hier gezeigten Ergebnisse auf Grund der zu geringen Probenzahl in den einzelnen Kohorten keine definitiven Rückschlüsse zu, sondern können lediglich als Hinweise auf die Wirksamkeit der Kombinationstherapie dienen. Tendenziell zeigt sich jedoch auch hier ein potentiell synergistischer Effekt der Kombinationstherapie, da die Behandlung mit WZB117 allein keinen Einfluss auf die Zellproliferation zu haben scheint, aber die Wirkung von VE822 verstärkt.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte im Mausmodell ein synergistischer Effekt der Kombinationstherapie aus Glut1- und Atr-Inhibition bei *Kras*<sup>G12D</sup>-mutierten Weichteilsarkomen

gezeigt werden. Für eine sinnvolle Anwendung dieser Therapie muss daher notwendigerweise der *Kras*-Mutationsstatus bekannt sein. Tatsächlich ist die Suche nach bestimmten Treibermutationen bei einigen Krebserkrankungen bereits als Teil der Routinediagnostik etabliert, was die Anwendung von Erkenntnissen aus der onkologischen Forschung in der Patientenversorgung ermöglichen kann.

Die onkologische Forschung der letzten Jahrzehnte hat zu einem Paradigmenwechsel im Verständnis von Krebserkrankungen geführt. Galt Krebs lange Zeit noch als distinkte Erkrankung eines bestimmten Organsystem, werden Krebserkrankungen mittlerweile als Erkrankungen des Genoms angesehen.<sup>40</sup> Krebs stellt einen Überbegriff dar, unter dem mehr als hundert Krebsentitäten zusammengefasst werden, die sich in der klinischen Manifestation ähneln, aber sich molekulargenetisch deutlich voneinander unterscheiden.<sup>147</sup> Die Suche nach den Treibermutationen, die eine Krebserkrankung molekulargenetisch ausmacht, ist dabei nicht nur von Interesse in der Grundlagenforschung, sondern findet vielmehr bereits Eingang in klinische Leitlinien. So empfiehlt beispielsweise die Europäische Gesellschaft für medizinische Onkologie (*European Society for Medical Oncology* (ESMO)) die Anwendung von „Next-Generation-Sequencing (NGS)“ abseits von klinischen Studien auch in der klinischen Routine.<sup>148</sup> Nach dieser Empfehlung sollen insbesondere Patienten, die an fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Prostatakarzinomen oder Cholangiokarzinomen leiden, davon profitieren. Diese Empfehlungen finden in den entsprechenden klinischen Leitlinien zur Diagnostik dieser Erkrankungen Anwendung. Beispielsweise empfiehlt die deutsche S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom bei metastasierten Tumoren nach *KRAS*-Mutationen zu suchen,<sup>149</sup> während die deutsche S3-Leitlinie zur Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms bei multiplen Lungentumoren explizit die Suche nach Mutationen in den Genen *KRAS*, *PTEN* und *TP53* vorschlägt.<sup>150</sup> Gleichfalls findet sich in den amerikanischen Leitlinien zur molekulargenetischen Charakterisierung von fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen die Empfehlung, sowohl nach *KRAS* als auch nach *BRAF* Mutationen zu suchen.<sup>151</sup> Bereits jetzt besteht also ein breiter Konsens zwischen den medizinischen Fachgesellschaften verschiedener Länder und Disziplinen, dass bestimmten Patienten die molekulargenetische Charakterisierung ihrer jeweiligen Tumorerkrankungen angeboten werden sollte, wenn es die medizinische Infrastruktur erlaubt. Patienten profitieren insbesondere dann von einer molekulargenetischen Diagnostik, wenn sich die für eine bestimmte Krebsart in Frage kommenden Mutationen therapeutisch nutzen lassen oder zumindest prognostischen Wert haben. Aktuell ist dies vor allem bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen der Fall.<sup>152</sup> Mit der kontinuierlichen Weiterentwicklung vorhandener Methoden und Etablierung neuer Techniken zur Detektion von Treibermutationen ist davon auszugehen, dass eine molekulargenetische Diagnostik zukünftig noch kostengünstiger

werden und damit einer breiteren Öffentlichkeit zur Verfügung stehen wird. Prognostisch sollte jedem Krebspatienten, für den eine Mutationsanalyse praktischen Nutzen haben könnte, eine molekulargenetische Diagnostik angeboten werden, wobei die Anzahl dieser Patienten mit fortschreitenden Erkenntnissen zu zielgerichteten Therapien in gleichem Maße wachsen wird. Die spezifische Analyse des *KRAS*-Mutationsstatus spielt in der klinische Routine zur Zeit vor allem im Zusammenhang mit der zielgerichteten Therapie mit EGFR-Inhibitoren beim kolorektalen Karzinom eine Rolle und wird jedem Patienten vor Beginn einer solchen Therapie empfohlen.<sup>153</sup> Dies geschieht, um Patienten zu identifizieren, denen von dieser Therapie abzuraten ist, weil bei ihnen eine Resistenzentwicklung gegenüber der Therapie auf Grund von Mutationen im *KRAS*-Gen wahrscheinlich ist.<sup>154</sup> Andererseits kämen für diese Patienten Therapien in Frage, deren Wirksamkeit vom Vorkommen von Mutationen im *KRAS*-Gen abhängt, wie es für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kombinationstherapie der Fall ist. Die eigenständige Suche nach *KRAS*-Mutationen unabhängig von anderen Mutationen ließe sich demnach vergleichsweise unaufwändig in bestehende Strukturen integrieren. Analog zur Behandlung mit EGFR-Inhibitoren liegt es nahe, Patienten mit konstitutiv aktivem *KRAS* mit spezifischen Inhibitoren zu behandeln, anstatt eine Kombinationstherapie zu entwickeln, bei der keiner der Bestandteile direkt mit *KRAS* interagiert. Tatsächlich blieben die Versuche einen spezifischen *KRAS*-Inhibitor zu entwickeln lange Zeit fruchtlos, da die dreidimensionale Struktur keine optimale Bindungstasche für kleine Moleküle bietet und eine kompetitive Inhibition durch die Affinität von *KRAS* zu GTP erschwert wird.<sup>155,156</sup> Dennoch ist mittlerweile die Entwicklung von verschiedenen kleinen Molekülen (wie AMG510, MRTX849, JNJ-74699157 und LY3499446) gelungen, die spezifisch *KRAS*<sup>G12C</sup> inhibieren können.<sup>155</sup> Insbesondere der Inhibitor AMG510 scheint dabei vielversprechend zu sein. Sowohl in der Zellkultur als auch in Xenograft-Modellen konnte eine antitumoröse Wirkung gezeigt werden, die sich nur bei Vorliegen einer *KRAS*<sup>G12C</sup>-Mutation manifestiert.<sup>156</sup> Dass die antitumoröse Wirkung in der Tat durch die Inhibition von *KRAS* vermittelt ist, wird zudem durch die Beobachtung unterstützt, dass die Quantität von pERK – der aktivierten Form von ERK, einem der nachgeschalteten Effektoren im *KRAS*-Signalweg – bei Behandlung mit AMG510 nur in den Zellen abnimmt, welche die *KRAS*<sup>G12C</sup>-Mutation aufweisen. In der Folge konnte zum ersten Mal eine klinische Studie mit einem spezifischen *KRAS*-Inhibitor durchgeführt werden, in der vier Patienten, die an *KRAS*<sup>G12C</sup> mutiertem Adenokarzinom litten, mit AMG510 behandelt wurden. Bei zwei der Patienten konnte in der CT-Bildgebung ein teilweises Ansprechen mit Rückgang der Tumorumfangs verzeichnet werden, während bei den anderen zwei Patienten jeweils eine stabile Erkrankung vorlag.<sup>156</sup> Auf Grund dieser Erfolge und der Basis weiterer Studien, wird aktuell eine Phase-III-Studie durchgeführt, worin beim fortgeschrittenen, *KRAS*<sup>G12C</sup>-mutierten NSCLC die Behandlung mit AMG510 der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Docetaxel gegenübergestellt wird.<sup>157</sup> Dennoch macht die potentielle

Anwendung von KRAS-Inhibitoren am Patienten in der Zukunft die Entwicklung von anderen KRAS spezifischen Therapien nicht obsolet, sondern unterstreicht vielmehr die hervorgehobene Bedeutung von KRAS-Mutationen. Bisher entwickelte direkte KRAS-Inhibitoren wie AMG510, MRTX 849, JNJ-74699157 oder LY3499446 entfalten ihre Wirkung ausschließlich bei *KRAS*<sup>G12C</sup>-Mutationen.<sup>158</sup> Dies liegt darin begründet, dass der Wirkmechanismus dieser Inhibitoren auf der kovalenten Bindung der kleinen Moleküle an das mutierte Cystein im Kodon 12 beruht, das sich in unmittelbarer Nähe der für die Funktion von RAS entscheidenden Nukleotidbindungstasche und der sogenannten Switch Region befindet.<sup>159</sup> In der Tat ist AMG510 im Xenograftmodell mit Patientenmaterial, das eine *KRAS*<sup>G12V</sup>-Mutation aufweist, unwirksam.<sup>156</sup> Ebenso konnte in MEFs, in denen entweder G12C, G12D, oder G12V Kras ektop exprimiert wurde, gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem kleinen Molekül ARS-1620 nur bei Expression von G12C Kras einen antiproliferativen Effekt zeigt.<sup>160</sup> Aus diesen Gründen gilt die direkte Inhibition beim Vorliegen von Mutationen, die kein angreifbares Cystein bieten – wie bspw. die Substitution von Glycin mit Asparaginsäure bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Kras*<sup>G12D</sup> – als technisch sehr schwer umsetzbar, weshalb sich aktuell keine derartigen Inhibitoren in klinischer Erprobung befinden.<sup>161</sup> Des Weiteren variiert das klinische Ansprechen von *KRAS*<sup>G12C</sup>-mutierten Tumoren auf Behandlung mit AMG510 je nach betroffenem Organsystem. Während für NSCLC teilweise Rückgänge des Tumorwachstums verzeichnet werden können, lässt sich bei kolorektalen Tumoren häufig lediglich eine Stabilisierung der Erkrankung erreichen.<sup>155</sup> Die Behandlung mit direkten KRAS-Inhibitoren bietet daher zwar äußerst vielversprechende therapeutische Möglichkeiten bei *KRAS*<sup>G12C</sup>-mutierten Tumoren, stellt aber keine universelle Therapieoption für sämtliche *KRAS*-Mutationen dar, sondern kann vermutlich nur in einer noch exakt zu definierenden Untergruppe eine therapeutische Option sein.

## **5.1 Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapien**

### **5.1.1. Mechanismen der Resistenzentwicklung**

Eine weitere Limitation der ansonsten naheliegenden Monotherapie mit direktem Angriff am mutierten Ras ist die Entwicklung von Resistenzen. Tatsächlich wird immer wieder diskutiert, ob eine kurative Behandlung von Krebs überhaupt grundsätzlich möglich ist, oder jedwede Therapiealternative zwar bestenfalls das Überleben deutlich verlängern kann, aber dennoch im Verlauf auf Grund von Resistenzentwicklungen ihre Wirksamkeit einbüßt.<sup>162</sup> Ein gut beschriebenes Beispiel für die Entwicklung von Resistenzen ist die Therapie mit TKIs. Zwar zeigt NSCLC mit sensitiver EGFR-Mutation regelhaft ein starkes Ansprechen auf Therapie mit TKIs der ersten Generation wie bspw. Gefitinib.<sup>163</sup> Allerdings entwickeln die Patienten unter Therapie nahezu unweigerlich Resistenzen<sup>164</sup>, sodass das progressionsfreie Überleben nur

circa 9,2 Monate beträgt.<sup>165</sup> Ursächlich für diese Resistenzentwicklung scheint das Auftreten einer zweiten Mutation im Therapieverlauf zu sein. So konnte in Biopsaten von 37 NSCLC Patienten mit Resistenzentwicklung unter Therapie zwar weiterhin die ursprüngliche *EGFR*-Mutation nachgewiesen werden, aber gleichzeitig auch zusätzliche Mutationen wie eine *EGFR*<sup>T790M</sup>-Mutation oder Amplifikation des *MET*-Gens.<sup>166</sup> Diese Art der Resistenzentwicklung ist dabei keineswegs ein spezifisches Phänomen der TKIs der ersten Generation. Vielmehr treten mit jeder neuen Generation wieder zusätzliche Mutationen auf, die dann erneut zu Resistenzen führen.

Zwar ist beispielsweise Osimertinib, ein TKI der dritten Generation, unabhängig vom Vorhandensein einer *EGFR*<sup>T790M</sup>-Mutation wirksam und kann damit auch eingesetzt werden, wenn sich bereits eine Resistenz gegen TKIs der ersten Generation entwickelt hat.<sup>167</sup> Auch ist die Therapie mit Osimertinib hocheffektiv wie in einer doppelt verblindeten Phase-III-Studie gezeigt werden konnte, in der es bei circa 80% der Patienten mit fortgeschrittenem, *EGFR*-mutiertem NSCLC zu einem klinischen Ansprechen kam.<sup>168</sup> Dennoch entwickeln Patienten, die mit Osimertinib therapiert werden, schlussendlich weitere Resistenzen auch gegen diese Therapie. Damit sind TKIs der dritten Generation zwar erfolgsversprechend, sobald bestimmte Resistenzen gegenüber TKIs der ersten oder zweiten Generation auftreten, können aber ihrerseits auch nicht dauerhaft ihre Wirksamkeit aufrechterhalten.<sup>169</sup>

### **5.1.2. Kombinationstherapien als Strategie gegenüber Resistenzen**

Eine Alternative zur fortlaufenden Entwicklung neuer Generationen von bereits etablierten Therapien, die zwar unabhängig von bereits bekannten Resistenzen funktionieren, allerdings unweigerlich neue, bis dahin unbekannte Resistenzen hervorrufen, ist die Kombination von mehreren unterschiedlichen Medikamenten. Bei Kombinationstherapien wird zeitgleich in verschiedene Signalwege eingegriffen. Dadurch ist es der Krebszelle im Gegensatz zur Monotherapie, in der eine einzelne Mutation die Therapie wirkungslos machen kann, nur schwer möglich auf eine Kombinationstherapie zu reagieren. Daher gehen Kombinationstherapien unabhängig vom molekularen Ziel der jeweiligen Therapie mit weniger Resistenzentwicklungen einher und sind somit eher in der Lage, einen kurativen Ansatz darzustellen.<sup>170,171</sup> Entscheidend ist dabei nicht die Art der Therapie – sei es Chemo-, Immun- oder Strahlentherapie – sondern der Eingriff in verschiedene Signalwege.

So gibt es bspw. für Immuntherapien bereits einige vielversprechende Ansätze, wie sie sich in bestimmten Fällen vermutlich wirkungsvoll mit Strahlentherapie, Chemotherapie oder zielgerichteter Therapie kombinieren lassen.<sup>172</sup> Beispielhaft zeigen auch Fortschritte in der Therapie von Brustkrebs, wie pharmakologische Eingriffe in ganz unterschiedliche Signalkaskaden erfolgsversprechend sein können. So werden hier unter anderem die Kombination aus endokriner Therapie durch Inhibition von Hormon-Rezeptoren und Eingriff in

die Zellproliferation durch Inhibition des Proteins „mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)“ oder durch Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6) getestet.<sup>173</sup>

Auch für *RAS*-mutierte Tumoren werden verschiedene Kombinationstherapien bereits in klinischen Studien untersucht.<sup>174</sup> In einer Phase-I-Studie wird zur Zeit die Kombination aus Inhibition von ERK und CDK2 bei *KRAS*-mutierten dukalen Adenokarzinomen des Pankreas evaluiert, nachdem in Zellkulturexperimenten eine synergistische Wirkung gezeigt werden konnte.<sup>175</sup>

Dasselbe Prinzip wird auch durch die geringere Resistenzbildung bei Monotherapien mit Molekülen, die simultan mit verschiedenen Zielen interferieren können, illustriert.<sup>176</sup>

Interessanterweise konnte im Zusammenhang mit dem ATR-Inhibitor AZD6738 bereits das Auftreten von synthetischer Letalität beobachtet werden. In einem Xenograft-Modell der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zeigte sich ein Ansprechen auf die Therapie nur bei CLL-Zellen, die gleichzeitig Mutationen in den Genen *TP53* und *ATM* aufwiesen, die zu Defekten in DNA-Reparaturmechanismen führen.<sup>177</sup>

Auf Grund dieser Überlegungen lässt sich also feststellen, dass die Entwicklung von kleinen Molekülen, die direkt mit dem *RAS*-Protein interagieren, die weitere Erforschung von Kombinationstherapien, die ebenfalls *RAS*-mutierte Tumoren zum Ziel haben, keineswegs obsolet macht. Sowohl die Möglichkeit durch Kombinationstherapien eher einen kurativen Ansatz zu finden als auch die grundsätzlich geringere Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Resistenzen geben der Kombinationstherapie ihren eigenen Stellenwert neben der zielgerichteten Monotherapie. Langfristig ist nur die parallele Erforschung beider Therapiestrategien vielversprechend: die Entdeckung oder Weiterentwicklung von Pharmakologika mit spezifischen molekularen Zielen eröffnen ihrerseits erst die Möglichkeit, im nächsten Schritt neuartige Kombinationen zu entwickeln.

## **5.2 Sicherheit der Kombination aus Inhibition der ATR- und GLUT1-Achse**

Ein entscheidender Aspekt bei der Frage nach einer möglichen Translation der in der Maus gewonnenen Erkenntnisse in den Menschen ist sicherlich die Arzneimittelsicherheit der verwendeten kleinen Moleküle. Auch hier können Kombinationstherapien grundsätzlich Vorteile gegenüber Monotherapien aufweisen. Insbesondere wenn nämlich die verschiedenen Komponenten der Kombinationstherapie nicht nur additiv, sondern synergistisch wirken, ist häufig eine Reduzierung der Dosis gegenüber der Monotherapie mit den jeweiligen Komponenten möglich.<sup>170</sup>

Da in der vorliegenden Arbeit sogar *in vivo* gezeigt werden konnte, dass bei der kombinierten Blockade von Atr und Glut1 von einer synergistischen Wirkung auszugehen ist, kann daher



auch bei der Anwendung im Menschen angenommen werden, dass eine Dosisreduktion möglich ist.

Die beiden verwendeten kleinen Moleküle sind jeweils bereits hinsichtlich ihres Sicherheitsprofil ausführlich begutachtet worden.

### **5.2.1. Daten zum Sicherheitsprofil von VE822**

Der ATR-Inhibitor VE822 ist eine Weiterentwicklung des kleinen Moleküls VE821, das in einem Hochdurchsatz-Screen als selektiver ATR-Inhibitor identifiziert wurde.<sup>178</sup>

Unsere Daten zeigen, dass die *in vivo* Gabe von VE822 als Monotherapie in der Maus keine erkennbaren Nebenwirkungen zeigt. Dies bestätigt Daten aus früheren Studien, die zeigen konnten, dass die Monotherapie mit VE822 in der Maus *in vivo* keine Toxizität auf gesunde Zellen oder Gewebe ausübt, obwohl hier sogar eine höhere Dosis als in unserem Versuch gewählt wurde (60 mg/kg KG im Vergleich zu 40 mg/kg KG).<sup>179</sup>

Seit 2020 werden vier verschiedene ATR-Inhibitoren in klinischen Studien erprobt. Darunter befindet sich auch VE822, das auch als VX-970, M6620 oder Berzosertib bezeichnet wird.<sup>180</sup>

Die Sicherheit der Monotherapie mit M6620 konnte zunächst in einer Phase-I-Studie gezeigt werden, in der alle 17 Studienteilnehmer, welche die Monotherapie erhielten, die Medikation gut tolerierten.<sup>181</sup>

In einer weiteren Phase-I-Studie wurde die Kombinationstherapie aus Berzosertib, Gemcitabine sowie Cisplatin bei fortgeschrittenen soliden Tumoren untersucht.<sup>182</sup> Hier konnte die Sicherheit des Medikaments auch in der Kombination mit Gemcitabine mit oder ohne zusätzlicher Gabe von Cisplatin bestätigt werden. Diese Ergebnisse konnten in einer Phase-II-Studie validiert werden, in der die Kombination aus Gemcitabine und Berzosertib mit einer Gemcitabine Monotherapie in Patienten mit hochgradig serösem Ovarialkarzinom verglichen wurde.<sup>183</sup> In unserem Kontext beachtenswert ist, dass auch bei zusätzlicher Gabe von Berzosertib im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabine keine Zunahme an unerwünschten Arzneimittelwirkungen beobachtet wurde.

Des Weiteren konnte ebenfalls die Verträglichkeit der Kombination aus M6620 und dem selektiven Topoisomerase-1-Inhibitor Topotecan in einer Phase-I-Studie gezeigt werden.<sup>184</sup>

Auch diese Kombinationstherapie wird in einer aktuell laufenden Phase-II-Studie weiter untersucht.<sup>185</sup>

Die Vielzahl dieser Studien demonstriert, dass die Anwendung von ATR-Inhibitoren im Menschen bereits in unterschiedlichen klinischen Szenarien und voneinander unabhängig als sicher erachtet wurde.

Insbesondere scheint nicht nur die Monotherapie den Ansprüchen an Patientensicherheit zu genügen, sondern auch in der Kombination mit weiteren Medikamenten vielversprechend zu sein.

Die vielfältigen Versuche, ATR-Inhibitoren als Teile einer Kombinationstherapie zu verwenden, unterstreichen einerseits unsere Ergebnisse, dass die Monotherapie mit einem ATR-Inhibitor je nach Mutationsstatus keinen Einfluss auf die Krebsprogression hat. Andererseits eröffnet es eine Perspektive für die Anwendbarkeit unserer Kombinationstherapie im Menschen.

### **5.2.2. Daten zum Sicherheitsprofil von WZB117**

Die Verwendung des GLUT1-Inhibitors WZB117 ist bisher weniger gut beschrieben als die oben ausgeführte Applikation von VE822. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene gute Verträglichkeit der *in vivo* Administration von WZB117 in der Maus zeigte sich allerdings ebenfalls in weiteren Mausmodellen. So wurde in einem Xenograft-Modell von menschlichem Lungenkrebs in Nacktmäusen eine geringe Toxizität von WZB117 beschrieben.<sup>146</sup> Zwar war hier die Dosis mit 10 mg/kg KG niedriger als die von uns verwendete Dosis von 50 mg/kg KG, jedoch war der Anwendungszeitraum und damit auch die Beobachtung mit 10 Wochen täglicher intraperitonealer Gabe deutlich länger.

Ein grundsätzliches Bedenken bei der systemischen Anwendung von WZB117 ist die Gefahr des Auftretens von Hyperglykämien durch die verminderte Glukoseaufnahme in die Zellen. Teilweise traten unmittelbar nach der Gabe von WZB117 zwar tatsächlich milde Hyperglykämien auf. Diese waren allerdings selbstlimitierend und nur von kurzer Dauer, sodass in keinem Fall persistierende Hyperglykämien dokumentiert wurden.<sup>146</sup>

In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob die Proliferation von Krebsstammzellen abhängig von der GLUT1-Aktivität ist.<sup>186</sup> Zu diesem Zweck wurde Nacktmäusen nach erfolgter Transplantation von Krebsstammzellen für 10 Tage täglich 20 mg/kg KG WZB117 appliziert. Die Tiere wurden anschließend sogar 5 Monate lang observiert, ohne dass eine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes festgestellt werden konnte.

Auch in Ratten konnte bereits die gute Verträglichkeit der WZB117-Therapie gezeigt werden.<sup>187</sup> In einer Studie, die primär den Zusammenhang zwischen Glukoseaufnahme und Zinksekretion untersucht, wurde Sprague-Dawley-Ratten einmalig 20 mg/kg KG WZB117 verabreicht, wobei keine Beeinträchtigung des Gesundheitszustands beschrieben wurde.

Außerdem gibt es bereits Hinweise, dass die Kombination von WZB117 mit anderen Pharmakologika in der Krebsbekämpfung effektiv sein kann, wenn auch bisher nur *in vitro*.

So verstärkt die Gabe von WZB117 bspw. die antitumoröse Wirkung des TKI Apatinib in den menschlichen Melanom-Zelllinien A375 und SK-MEL-28.<sup>188</sup>

Des Weiteren wird die Kombination aus Biguaniden (wie Metformin) mit WZB117 als potentielle therapeutische Strategie bei humanem Lungenkrebs diskutiert.<sup>189</sup> Hier wurde ein, wenn auch schwacher, synergistischer Effekt in der humanen Lungenkrebszelllinie H460 beschrieben. Dass die nicht-tumoröse Lungenepithelzelllinie Beas-2B deutlich weniger sensitiv auf die Kombination reagiert, ist hierbei besonders beachtenswert.

Diese präklinischen Daten sprechen grundsätzlich dafür, dass auch die systemische Anwendung von WZB117 im Menschen möglich sein könnte. Bislang liegen dazu allerdings keine klinischen Studien vor.

Sollte sich in der Zukunft herausstellen, dass die Anwendung von WZB117 im Menschen auf Grund von unvorhergesehenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen nicht vertretbar ist, könnten stattdessen womöglich andere Inhibitoren von GLUT1 eine Rolle spielen. So ist beispielsweise auch für den GLUT1-Inhibitor SMI277 die gute Verträglichkeit im Mausmodell beschrieben.<sup>190</sup>

### **5.3 Wirkmechanismus der kombinierten Blockade von ATR und GLUT1**

Ein möglichst gutes Verständnis der dieser Kombinationstherapie zu Grunde liegenden biomolekularen Wirkmechanismen ist nicht nur von akademischem Interesse, sondern kann ggf. auch dazu dienen, die Anwendung am Menschen zu optimieren. Möglicherweise ließe sich dann individuell voraussagen, in welchem Fall eine Therapie besonders vielversprechend sein wird oder wie sie bedarfsgerecht angepasst werden kann. Die hier vorgestellten *in vivo* Ergebnisse können diese Fragestellung nicht beantworten. In der mitvorgelegten Publikation sind daher Arbeiten in menschlichen Zelllinien beschrieben, die Hinweise auf die Wirkmechanismen geben können (siehe Seite 79). Mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass *RAS*-mutierte Zelllinien unter der kombinierten Blockade von ATR und GLUT1 vor allem in der S-Phase arretieren und dort genotoxische Schäden anhäufen. Da ATR für das fehlerfreie Fortschreiten durch die S-Phase mitverantwortlich ist und es auf Grund des erhöhten Energiebedarfs in dieser Phase besonders auf die Funktion von GLUT1 ankommt, erscheint es daher plausibel, dass es hier zu Synergien zwischen beiden Signalwegen kommt.

### **5.4 Abschließende Bemerkung**

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die Kombinationstherapie aus dem ATR-Inhibitor VE822 und dem GLUT1-Inhibitor WZB117 zu einer signifikanten Abnahme des Größenwachstum von *Kras*<sup>G12D</sup>-mutierten Weichteilsarkomen in einem autochthonen Mausmodell *in vivo* führt. In Vorarbeiten zu den hier präsentierten Ergebnissen konnte diese Kombinationstherapie in einem Screen verschiedener Pharmakologika identifiziert werden. Besonders bemerkenswert ist hierbei, dass sowohl in diesen Vorarbeiten *in vitro* als auch in den hier präsentierten Experimenten *in vivo* gezeigt werden konnte, dass die Kombinationstherapie synergistisch ist und ihre Wirkung selektiv bei *Kras*-mutierten Tumoren entfaltet. Diese Merkmale machen die Therapie für eine mögliche zukünftige Anwendung im Menschen besonders interessant. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sowie Resultate aus Studien, die Einzelkomponenten der Therapie untersucht haben, liefern außerdem erste Hinweise darauf, dass eine Anwendung im Menschen sicher verträglich sein

könnte. Die Prävalenz und Identifizierbarkeit von *RAS*-Mutationen lässt eine mögliche Etablierung der Therapie außerdem praktikabel erscheinen. Bevor eine Anwendung im Menschen aber überhaupt in Betracht bezogen werden kann, werden weitere *in vitro* und *in vivo* Experimente nötig sein, um insbesondere den molekularen Wirkmechanismus besser zu verstehen und Erkenntnisse über eine Langzeitanwendung der Therapie zu gewinnen. Die hier vorgelegten Daten können aber zumindest als Beleg dafür angesehen werden, dass sich die Kombinationstherapie prinzipiell *in vivo* anwenden lässt und Synergien zwischen den beiden angegriffenen Signalwegen bestehen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 2020; **396**(10258): 1204-22.
2. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 2019; **5**(12): 1749-68.
3. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* 2020; **578**(7793): 82-93.
4. (IHME) IfHMaE. GBD Compare. 2015. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare> (accessed 11.04.2024).
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2020; **70**(1): 7-30.
6. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*: Garland Science; 2014.
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021; **71**(3): 209-49.
8. Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2021; **1876**(1): 188556.
9. Team B. P53 Regulation and Signaling. 2020. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5ed6aee0cc82d300ae328919-p53-regulation-and-signaling>
10. Erber J, Steiner JD, Isensee J, et al. Dual Inhibition of GLUT1 and the ATR/CHK1 Kinase Axis Displays Synergistic Cytotoxicity in *KRAS*-Mutant Cancer Cells. *Cancer Research* 2019; **79**(19): 4855-68.
11. Cooper RS, Osotimehin B, Kaufman JS, Forrester T. Disease burden in sub-Saharan Africa: what should we conclude in the absence of data? *Lancet* 1998; **351**(9097): 208-10.
12. Mathers CD. History of global burden of disease assessment at the World Health Organization. *Archives of Public Health* 2020; **78**(1): 77.
13. Lea RA. World Development Report 1993: 'Investing in Health'. *Forum for Development Studies* 1993; **20**(1): 114-7.
14. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; **349**(9063): 1436-42.
15. Grosse SD, Lollar DJ, Campbell VA, Chamie M. Disability and disability-adjusted life years: not the same. *Public Health Rep* 2009; **124**(2): 197-202.
16. Murray CJ, Lopez AD, Wibulpolprasert S. Monitoring global health: time for new solutions. *Bmj* 2004; **329**(7474): 1096-100.
17. Cash RA, Narasimhan V. Impediments to global surveillance of infectious diseases: consequences of open reporting in a global economy. *Bull World Health Organ* 2000; **78**(11): 1358-67.
18. Almeida C, Braveman P, Gold MR, et al. Methodological concerns and recommendations on policy consequences of the World Health Report 2000. *Lancet* 2001; **357**(9269): 1692-7.
19. Murray CJL, Lopez AD, Black R, et al. Global Burden of Disease 2005: call for collaborators. *The Lancet* 2007; **370**(9582): 109-10.
20. (WHO) WHO. Global Health Estimates (GHE). [https://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/).
21. (IHME) IfHMaE. Global Burden of Disease. Global Burden of Disease Magazine. 2017.
22. Murray CJ, Ezzati M, Flaxman AD, et al. GBD 2010: design, definitions, and metrics. *Lancet* 2012; **380**(9859): 2063-6.
23. Murray CJL, Frenk J, Piot P, Mundel T. GBD 2.0: a continuously updated global resource. *The Lancet* 2013; **382**(9886): 9-11.
24. Cormier Z. Malaria death toll disputed. *Nature* 2012.

25. Alkema L, You D. Child Mortality Estimation: A Comparison of UN IGME and IHME Estimates of Levels and Trends in Under-Five Mortality Rates and Deaths. *PLOS Medicine* 2012; **9**(8): e1001288.
26. Mathers C. Deaths of older children: what do the data tell us? *The Lancet Global Health* 2015; **3**(10): e579-e80.
27. Wang H, Abajobir AA, Abate KH, et al. Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* 2017; **390**(10100): 1084-150.
28. Mattiuzzi C, Lippi G. Cancer statistics: a comparison between World Health Organization (WHO) and Global Burden of Disease (GBD). *Eur J Public Health* 2020; **30**(5): 1026-7.
29. Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, et al. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet* 2020; **395**(10226): 785-94.
30. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut; 2016.
31. Canfell K. Towards the global elimination of cervical cancer. *Papillomavirus Res* 2019; **8**: 100170.
32. Organization WH. WHOdirector-general calls for all countries to take action to help end the suffering caused by cervical cancer. 2018. <https://www.who.int/reproductivehealth/call-to-action-elimination-cervical-cancer/en/>.
33. Tsu V, Jerónimo J. Saving the World's Women from Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2016; **374**(26): 2509-11.
34. Organization WH. Global Action Planfor the Prevention and Control of NCDs 2013-2020. 2013. [http://www.who.int/nmh/events/ncd\\_action\\_plan/en/](http://www.who.int/nmh/events/ncd_action_plan/en/).
35. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; **388**(10053): 1659-724.
36. Quante AS, Ming C, Rottmann M, et al. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Med* 2016; **5**(9): 2649-56.
37. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009; **458**(7239): 719-24.
38. Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR. Cancer and genomics. *Nature* 2001; **409**(6822): 850-2.
39. Wang Z, Jensen MA, Zenklusen JC. A Practical Guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). In: Mathé E, Davis S, eds. Statistical Genomics: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2016: 111-41.
40. Lowy DR, Collins FS. Aiming High--Changing the Trajectory for Cancer. *N Engl J Med* 2016; **374**(20): 1901-4.
41. Organization WH. World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals; 2020.
42. Hajdu SI. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 2011; **117**(5): 1097-102.
43. Lee SH. Chemotherapy for Lung Cancer in the Era of Personalized Medicine. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2019; **82**(3): 179-89.
44. Santos E, Martin-Zanca D, Reddy E, Pierotti M, Della Porta G, Barbacid M. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science (New York, NY)* 1984; **223**(4637): 661-4.
45. Politi K, Herbst RS. Lung Cancer in the Era of Precision Medicine. *Clinical Cancer Research* 2015; **21**(10): 2213-20.
46. Coffman JA. Cell Cycle Development. *Developmental cell* 2004; **6**(3): 321-7.
47. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer. *Cancer Research* 1990; **50**(23): 7415-21.
48. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**(1): 57-70.

49. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**(5): 646-74.
50. Okamoto K, Seimiya H. Revisiting Telomere Shortening in Cancer. *Cells* 2019; **8**(2).
51. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, et al. Bevacizumab (Avastin) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews* 2020; **86**.
52. Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 2014; **123**(17): 2625-35.
53. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2015; **12**(10): 584-96.
54. Jolly K, Cheng KK, Langman MJ. NSAIDs and gastrointestinal cancer prevention. *Drugs* 2002; **62**(6): 945-56.
55. Yiannakopoulou E. Aspirin and NSAIDs for breast cancer chemoprevention. *Eur J Cancer Prev* 2015; **24**(5): 416-21.
56. Jahn JL, Giovannucci EL, Stampfer MJ. The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era. *Int J Cancer* 2015; **137**(12): 2795-802.
57. Tierney RP, Ballantyne GH, Modlin IM. The adenoma to carcinoma sequence. *Surg Gynecol Obstet* 1990; **171**(1): 81-94.
58. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1971; **68**(4): 820-3.
59. Dimaras H, Kimani K, Dimba EAO, et al. Retinoblastoma. *The Lancet* 2012; **379**(9824): 1436-46.
60. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature reviews Cancer* 2008; **8**(9): 671-82.
61. Dimaras H, Khetan V, Halliday W, et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Human Molecular Genetics* 2008; **17**(10): 1363-72.
62. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; **304**(5927): 596-602.
63. Rovinski B, Benchimol S. Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 1988; **2**(5): 445-52.
64. Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, et al. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1990; **1**(12): 571-80.
65. Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984; **312**(5995): 649-51.
66. Friedel RH, Wurst W, Wefers B, Kühn R. Generating Conditional Knockout Mice. In: Hofker MH, van Deursen J, eds. *Transgenic Mouse Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011: 205-31.
67. Kim H, Kim M, Im S-K, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 2018; **34**(4): 147-59.
68. Kwan K-M. Conditional alleles in mice: Practical considerations for tissue-specific knockouts. *genesis* 2002; **32**(2): 49-62.
69. Kirsch DG, Dinulescu DM, Miller JB, et al. A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma. *Nat Med* 2007; **13**(8): 992-7.
70. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; **502**(7471): 333-9.
71. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2018; **18**(2): 89-102.
72. Hino O, Kobayashi T. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci* 2017; **108**(1): 5-11.
73. Chan WM, Siu WY, Lau A, Poon RYC. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol Cell Biol* 2004; **24**(8): 3536-51.

74. Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Biopolymers* 2016; **106**(4): 598-612.
75. Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA, Chan CS. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death & Differentiation* 2018; **25**(1): 154-60.
76. Soussi T, Wiman KG. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death & Differentiation* 2015; **22**(8): 1239-49.
77. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; **356**(6366): 215-21.
78. Jacks T, Remington L, Williams BO, et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology* 1994; **4**(1): 1-7.
79. Valdez JM, Nichols KE, Kesslerwan C. Li-Fraumeni syndrome: a paradigm for the understanding of hereditary cancer predisposition. *British Journal of Haematology* 2017; **176**(4): 539-52.
80. Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007; **445**(7128): 656-60.
81. Leone G, Sears R, Huang E, et al. Myc Requires Distinct E2F Activities to Induce S Phase and Apoptosis. *Molecular cell* 2001; **8**(1): 105-13.
82. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; **69**(1): 119-28.
83. Bates S, Phillips AC, Clark PA, et al. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 1998; **395**(6698): 124-5.
84. Parisi T, Pollice A, Di Cristofano A, Calabrò V, La Mantia G. Transcriptional regulation of the human tumor suppressor p14(ARF) by E2F1, E2F2, E2F3, and Sp1-like factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **291**(5): 1138-45.
85. Honda R, Yasuda H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo j* 1999; **18**(1): 22-7.
86. Zhou Y, Nakajima R, Shirasawa M, et al. Expanding Roles of the E2F-RB-p53 Pathway in Tumor Suppression. *Biology* 2023; **12**(12): 1511.
87. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; **6**(5).
88. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 2010; **108**: 73-112.
89. Wani MA, Zhu Q, El-Mahdy M, Venkatachalam S, Wani AA. Enhanced Sensitivity to anti-Benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA Damage Correlates with Decreased Global Genomic Repair Attributable to Abrogated p53 Function in Human Cells. *Cancer Research* 2000; **60**(8): 2273-80.
90. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Research* 2020; **80**(14): 2969-74.
91. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* 2016; **129**(7): 1287-92.
92. Lu S, Jang H, Nussinov R, Zhang J. The Structural Basis of Oncogenic Mutations G12, G13 and Q61 in Small GTPase K-Ras4B. *Scientific Reports* 2016; **6**(1): 21949.
93. Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem* 2015; **396**(8): 831-48.
94. Yamasaki S, Nishida K, Yoshida Y, Itoh M, Hibi M, Hirano T. Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2. *Oncogene* 2003; **22**(10): 1546-56.
95. Guo Y-J, Pan W-W, Liu S-B, Shen Z-F, Xu Y, Hu L-L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* 2020; **19**(3): 1997-2007.
96. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**(6892): 949-54.
97. Lee SH, Lee JW, Soung YH, et al. Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *Apmis* 2004; **112**(4-5): 233-8.
98. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2011; **2**(3): 261-74.



99. Liu L-Z, Zhou X-D, Qian G, Shi X, Fang J, Jiang B-H. *AKT1* Amplification Regulates Cisplatin Resistance in Human Lung Cancer Cells through the Mammalian Target of Rapamycin/p70S6K1 Pathway. *Cancer Research* 2007; **67**(13): 6325-32.
100. Álvarez-García V, Tawil Y, Wise HM, Leslie NR. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Seminars in Cancer Biology* 2019; **59**: 66-79.
101. Vatansever S, Erman B, Gümüş ZH. Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras. *Scientific Reports* 2019; **9**(1): 11730.
102. Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; **100**(22): 12871-6.
103. Alberts B, Johnson AD, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015.
104. Choi M, Kipps T, Kurzrock R. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 2016; **15**(8): 1781-91.
105. Murga M, Bunting S, Montaña MF, et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet* 2009; **41**(8): 891-8.
106. Sarmiento LM, Póvoa V, Nascimento R, et al. CHK1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene* 2015; **34**(23): 2978-90.
107. Williams RM, Zhang X. Roles of ATM and ATR in DNA double strand breaks and replication stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2021; **161**: 27-38.
108. Brandsma I, van Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integrity* 2012; **3**(1): 9.
109. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology* 2014; **16**(1): 2-9.
110. Boos D, Ferreira P. Origin Firing Regulations to Control Genome Replication Timing. *Genes (Basel)* 2019; **10**(3): 199.
111. Whelan DR, Lee WTC, Marks F, Kong YT, Yin Y, Rothenberg E. Super-resolution visualization of distinct stalled and broken replication fork structures. *PLoS genetics* 2021; **16**(12): e1009256.
112. Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2015; **15**(5): 276-89.
113. Eykelenboom JK, Harte EC, Canavan L, et al. ATR activates the S-M checkpoint during unperturbed growth to ensure sufficient replication prior to mitotic onset. *Cell Rep* 2013; **5**(4): 1095-107.
114. Krajewska M, Fehrmann RS, Schoonen PM, et al. ATR inhibition preferentially targets homologous recombination-deficient tumor cells. *Oncogene* 2015; **34**(26): 3474-81.
115. Lecona E, Fernandez-Capetillo O. Targeting ATR in cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**(9): 586-95.
116. Toledo LI, Murga M, Zur R, et al. A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**(6): 721-7.
117. Gilad O, Nabet BY, Ragland RL, et al. Combining ATR suppression with oncogenic Ras synergistically increases genomic instability, causing synthetic lethality or tumorigenesis in a dosage-dependent manner. *Cancer Res* 2010; **70**(23): 9693-702.
118. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Biochemie*. 3. Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2012.
119. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, NY)* 2009; **324**(5930): 1029-33.
120. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol* 2021; **599**(6): 1745-57.
121. Warburg O, Minami S. Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *Klinische Wochenschrift* 1923; **2**(17): 776-7.
122. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, NY)* 1956; **124**(3215): 269-70.

123. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science (New York, NY)* 1956; **123**(3191): 309-14.
124. Israelsen WJ, Vander Heiden MG. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Seminars in cell & developmental biology* 2015; **43**: 43-51.
125. Zahra K, Dey T, Ashish, Mishra SP, Pandey U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Frontiers in oncology* 2020; **10**: 159-.
126. Israelsen WJ, Dayton TL, Davidson SM, et al. PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell* 2013; **155**(2): 397-409.
127. Lunt SY, Muralidhar V, Hosios AM, et al. Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation. *Molecular cell* 2015; **57**(1): 95-107.
128. Ghashghaieina M, Köberle M, Mrowietz U, Bernhardt I. Proliferating tumor cells mimic glucose metabolism of mature human erythrocytes. *Cell Cycle* 2019; **18**(12): 1316-34.
129. Smith DG, Sturmey RG. Parallels between embryo and cancer cell metabolism. *Biochem Soc Trans* 2013; **41**(2): 664-9.
130. Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology* 2016; **26**(1): 3-17.
131. Singnurkar A, Poon R, Metser U. Comparison of 18F-FDG-PET/CT and 18F-FDG-PET/MR imaging in oncology: a systematic review. *Ann Nucl Med* 2017; **31**(5): 366-78.
132. Chen LQ, Cheung LS, Feng L, Tanner W, Frommer WB. Transport of sugars. *Annual review of biochemistry* 2015; **84**: 865-94.
133. Holman GD. Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflugers Arch* 2020; **472**(9): 1155-75.
134. Brockmann K. The expanding phenotype of GLUT1-deficiency syndrome. *Brain Dev* 2009; **31**(7): 545-52.
135. Wang J, Ye C, Chen C, et al. Glucose transporter GLUT1 expression and clinical outcome in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017; **8**(10): 16875-86.
136. Zeng K, Ju G, Wang H, Huang J. GLUT1/3/4 as novel biomarkers for the prognosis of human breast cancer. *Translational Cancer Research* 2020; **9**(4): 2363-77.
137. Wu Q, Ba-Alawi W, Deblois G, et al. GLUT1 inhibition blocks growth of RB1-positive triple negative breast cancer. *Nat Commun* 2020; **11**(1): 4205.
138. Chan DA, Sutphin PD, Nguyen P, et al. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med* 2011; **3**(94): 94ra70-94ra70.
139. Szybowska A, Regulska-Ilow B. Significance of low-carbohydrate diets and fasting in patients with cancer. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2019; **70**(4): 325-36.
140. Tuominen VJ, Ruotoistenmäki S, Viitanen A, Jumppanen M, Isola J. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res* 2010; **12**(4): R56.
141. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep* 2015; **11**(3): 1566-72.
142. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncology* 2009; **20**(8): 1319-29.
143. Feng W, Dean DC, Hornicek FJ, et al. ATR and p-ATR are emerging prognostic biomarkers and DNA damage response targets in ovarian cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2020; **12**: 1758835920982853-.
144. Bukhari AB, Lewis CW, Pearce JJ, Luong D, Chan GK, Gamper AM. Inhibiting Wee1 and ATR kinases produces tumor-selective synthetic lethality and suppresses metastasis. *The Journal of clinical investigation* 2019; **129**(3): 1329-44.
145. Shriwas P, Roberts D, Li Y, et al. A small-molecule pan-class I glucose transporter inhibitor reduces cancer cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by targeting glucose-based metabolism. *Cancer Metab* 2021; **9**(1): 14-.

146. Liu Y, Cao Y, Zhang W, et al. A Small-Molecule Inhibitor of Glucose Transporter 1 Downregulates Glycolysis, Induces Cell-Cycle Arrest, and Inhibits Cancer Cell Growth *In Vitro* and *In Vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics* 2012; **11**(8): 1672-82.
147. Canzoneri R, Lacunza E, Abba MC. Genomics and bioinformatics as pillars of precision medicine in oncology. *Medicina (B Aires)* 2019; **79**(Spec 6/1): 587-92.
148. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology* 2020; **31**(11): 1491-505.
149. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, 2019. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>
150. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0, 2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL. 2018. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>.
151. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* 2017; **35**(13): 1453-86.
152. Colomer R, Mondejar R, Romero-Laorden N, Alfranca A, Sanchez-Madrid F, Quintela-Fandino M. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer? *EClinicalMedicine* 2020; **25**.
153. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, et al. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology* 2018; **36**(9): 911-9.
154. Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J. EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Adv Clin Chem* 2010; **51**: 71-119.
155. Uprety D, Adjei AA. KRAS: From undruggable to a druggable Cancer Target. *Cancer Treat Rev* 2020; **89**: 102070.
156. Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 2019; **575**(7781): 217-23.
157. A Phase 3 Multicenter, Randomized, Open Label, Active-controlled, Study of AMG 510 Versus Docetaxel for the Treatment of Previously Treated Locally Advanced and Unresectable or Metastatic NSCLC Subjects With Mutated KRAS p.G12C. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04303780?term=nct04303780&draw=2&rank=1>.
158. Nagasaka M, Li Y, Sukari A, Ou SI, Al-Hallak MN, Azmi AS. KRAS G12C Game of Thrones, which direct KRAS inhibitor will claim the iron throne? *Cancer Treat Rev* 2020; **84**: 101974.
159. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013; **503**(7477): 548-51.
160. Janes MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* 2018; **172**(3): 578-89.e17.
161. Dang CV, Reddy EP, Shokat KM, Soucek L. Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**(8): 502-8.
162. Ajmeera D, Ajmeera R. Drug repurposing: A novel strategy to target cancer stem cells and therapeutic resistance. *Genes Dis* 2024; **11**(1): 148-75.
163. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010; **362**(25): 2380-8.
164. Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy. *Cells* 2018; **7**(11).
165. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor

- receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2010; **11**(2): 121-8.
166. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; **3**(75): 75ra26.
167. Jänne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; **372**(18): 1689-99.
168. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018; **378**(2): 113-25.
169. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2019; **121**(9): 725-37.
170. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 2017; **8**(23): 38022-43.
171. Palmer AC, Chidley C, Sorger PK. A curative combination cancer therapy achieves high fractional cell killing through low cross-resistance and drug additivity. *eLife* 2019; **8**.
172. Zhu S, Zhang T, Zheng L, et al. Combination strategies to maximize the benefits of cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology* 2021; **14**(1): 156.
173. Wang Y, Minden A. Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. (accessed).
174. Punekar SR, Velcheti V, Neel BG, Wong KK. The current state of the art and future trends in RAS-targeted cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2022; **19**(10): 637-55.
175. Goodwin CM, Waters AM, Klomp JE, et al. Combination Therapies with CDK4/6 Inhibitors to Treat KRAS-Mutant Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 2023; **83**(1): 141-57.
176. Ye J, Wu J, Liu B. Therapeutic strategies of dual-target small molecules to overcome drug resistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2023; **1878**(3): 188866.
177. Kwok M, Davies N, Agathangelou A, et al. ATR inhibition induces synthetic lethality and overcomes chemoresistance in TP53- or ATM-defective chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2016; **127**(5): 582-95.
178. Botrugno OA, Tonon G. Genomic Instability and Replicative Stress in Multiple Myeloma: The Final Curtain? *Cancers (Basel)* 2021; **14**(1).
179. Fokas E, Prevo R, Pollard JR, et al. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis* 2012; **3**(12): e441.
180. Gorecki L, Andrs M, Rezacova M, Korabecny J. Discovery of ATR kinase inhibitor berzosertib (VX-970, M6620): Clinical candidate for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2020; **210**: 107518.
181. Yap TA, O'Carrigan B, Penney MS, et al. Phase I Trial of First-in-Class ATR Inhibitor M6620 (VX-970) as Monotherapy or in Combination With Carboplatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2020; **38**(27): 3195-204.
182. Middleton MR, Dean E, Evans TRJ, et al. Phase 1 study of the ATR inhibitor berzosertib (formerly M6620, VX-970) combined with gemcitabine ± cisplatin in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer* 2021; **125**(4): 510-9.
183. Konstantinopoulos PA, Cheng S-C, Wahner Hendrickson AE, et al. Berzosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in platinum-resistant high-grade serous ovarian cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2020; **21**(7): 957-68.
184. Thomas A, Redon CE, Sciuto L, et al. Phase I Study of ATR Inhibitor M6620 in Combination With Topotecan in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* 2018; **36**(16): 1594-602.
185. Thomas A. Randomized Trial of Topotecan With M6620, an ATR Kinase Inhibitor, in Small Cell Lung Cancers and Small Cell Cancers Outside of the Lungs. 2023. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03896503?term=NCT03896503&rank=1> (accessed 13.09.2023).
186. Shibuya K, Okada M, Suzuki S, et al. Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* 2014; **6**(2).

187. Parrott D, Suh EH, Khalighinejad P, et al. Investigations into the Signaling Pathways Involving Glucose-Stimulated Zinc Secretion (GSZS) from Prostate Epithelial Cells In Vitro and In Vivo. *Molecular Imaging and Biology* 2023.
188. Zhang RS, Li ZK, Liu J, Deng YT, Jiang Y. WZB117 enhanced the anti-tumor effect of apatinib against melanoma via blocking STAT3/PKM2 axis. *Front Pharmacol* 2022; **13**: 976117.
189. Yakisich JS, Azad N, Kaushik V, Iyer AKV. The Biguanides Metformin and Buformin in Combination with 2-Deoxy-glucose or WZB-117 Inhibit the Viability of Highly Resistant Human Lung Cancer Cells. *Stem Cells Int* 2019; **2019**: 6254269.
190. Chen X, Zhao Y, He C, et al. Identification of a novel GLUT1 inhibitor with in vitro and in vivo anti-tumor activity. *Int J Biol Macromol* 2022; **216**: 768-78.
191. creativecommons. CC BY 4.0. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> (zuletzt abgerufen am 14.10.2024).
192. creativecommons. CC BY-NC-ND 4.0. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/> (zuletzt abgerufen am 14.10.2024).

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Globale Todesursachen 1990 vs. 2019 laut GBD 2019. Modifiziert nach Vos T et al., The Lancet, 2020. <sup>1</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	15
Abbildung 2: Vergleich der Primärlokalisationen von neudiagnostizierten Tumoren im Jahre 2020 in den USA zwischen Männern und Frauen. Modifiziert nach Siegel RL et al., A Cancer Journal for Clinicians, 2020. <sup>5</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	17
Abbildung 3: Vorkommen der häufigsten Krebsarten weltweit bei Männern und Frauen. In Klammern findet sich die Anzahl der Länder, in denen die jeweilige Krebsart führend ist. Modifiziert nach Sung H et al., A Cancer Journal for Clinicians, 2021. <sup>7</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	18
Abbildung 4: Vergleich von organspezifischen Tumorinzidenzen zwischen Ländern mit unterschiedlichen soziodemographischen Indices (SDI) von gering bis hoch. Erstellt mit <a href="https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare">https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare</a> <sup>4</sup> basierend auf Daten des GBD 2019. <sup>1</sup> Lizenziert unter CC BY-NC-ND 4.0. <sup>192</sup> .....	19
Abbildung 5: Vorhersagen über die Entwicklung der Anzahl an Neuerkrankungen im Jahr 2040 relativ zum Jahr 2020 in Abhängigkeit vom human development index (HDI). Modifiziert nach Sung H et al., A Cancer Journal for Clinicians, 2021. <sup>7</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	20
Abbildung 6: Totale prozentuale Veränderungen in der Inzidenzrate von bestimmten Krebserkrankungen sowie die relativen Anteile, die Veränderungen in der Altersspezifischen Inzidenzrate, des Bevölkerungswachstums sowie der Bevölkerungsalterung daran haben. Modifiziert nach Fitzmaurice C et al., JAMA Oncol, 2019. <sup>2</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	21
Abbildung 7: Übersicht über genomische Elemente, die in mindestens 65 Tumoren aus der Kohorte Ziel verschiedener Arten von Mutationen sind. Sowohl somatische als auch Keimbahnmutation sind berücksichtigt. Links: Heatmap, die das Auftreten von Mutationen in verschiedenen Krebsarten zeigt. Modifiziert nach The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium, Nature, 2020. <sup>3</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	23
Abbildung 8: Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen durch p53 in Folge von Schädigungen der DNA (oben) sowie Kontrolle von p53 durch verschiedene Kinasen. Modifiziert nach Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer, 2021 <sup>8</sup> und dem Template „P53 Regulation and Signaling“ von <a href="https://app.biorender.com/biorender-templates">https://app.biorender.com/biorender-templates</a> . <sup>9</sup> Erstellt mit BioRender.com. Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	32
Abbildung 9: Mechanismus der Aktivierung von Ras durch Austausch von gebundenem GDP durch GTP sowie schematische Darstellung des Ablaufs zweier nachgeschalteter Signalkaskaden. Modifiziert nach dem Template „Ras Activation“ von <a href="https://app.biorender.com/biorender-templates">https://app.biorender.com/biorender-templates</a> basierend auf Ausführungen in Weinberg RA, Garland Science, 2014. <sup>6</sup> Erstellt mit BioRender.com. Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	34

Abbildung 10: Kombinierte Inhibierung von Atr und Glut1 zeigt synergistische Toxizität in einem durch Kras <sup>G12D</sup> -getriebenen Sarkommodell in vivo. Modifiziert nach Erber J et al., Cancer Research 2019. <sup>10</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	48
Abbildung 11: Unterschiedliche Behandlungsregime zeigen keine signifikante Auswirkung auf die Entwicklung des Körpergewichts unter Therapie in Kras <sup>LSL.G12D/wt</sup> ;Trp53 <sup>fl/fl</sup> Mäusen. Modifiziert nach Erber J et al., Cancer Research 2019. <sup>10</sup> Lizenziert unter CC BY 4.0. <sup>191</sup> .....	50
Abbildung 12: Tumorwachstum bei einem Kontrolltier zwischen Detektion an Tag 0 und 7 Tage später. Eigene Abbildung. ....	52
Abbildung 13: Tumorwachstum zwischen Detektion an Tag 0 und nach 7-tägiger Behandlung mit dem GLUT1-Inhibitor WZB117. Eigene Abbildung. ....	53
Abbildung 14: Tumorwachstum zwischen Detektion an Tag 0 und nach 7-tägiger Behandlung mit dem ATR-Inhibitor VE822. Eigene Abbildung. ....	54
Abbildung 15: Tumorwachstum zwischen Detektion an Tag 0 und nach 7-tägiger Behandlung mit der Kombination aus dem ATR-Inhibitor VE822 und dem GLUT1-Inhibitor WZB117. Eigene Abbildung. ....	55
Abbildung 16: Immunhistochemische Färbungen zeigen verminderte Zellproliferation in Kras <sup>G12D</sup> -getriebenen Weichteilsarkomen unter Therapie mit VE822 und WZB117. Eigene Abbildung. ....	57

## **8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen**

10. Erber J, Steiner JD, Isensee J, et al. Dual Inhibition of GLUT1 and the ATR/CHK1 Kinase Axis Displays Synergistic Cytotoxicity in *KRAS*-Mutant Cancer Cells. *Cancer Research* 2019; **79**(19): 4855-68.