

**Untersuchung des CDK2, 7 und 9 Inhibitors
SNS-032 in chemosensitiven und
chemoresistenten Neuroblastomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt beim

Fachbereich für Biologie und Chemie (FB 08)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Dipl. Biol. Nadine Löschmann

Gießen, 2014

Erstgutachter:

Prof. Dr. Reinhard Dammann

Institut für Genetik

Justus-Liebig-Universität Gießen

Heinrich-Buff-Ring 58-62

35392 Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Jindrich Cinatl

Institut für medizinische Virologie

Universitätsklinikum Frankfurt / Main

Paul-Ehrlich-Straße 40

60596 Frankfurt / Main

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 01.12.2014

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Virologie des Universitätsklinikums der Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt / Main angefertigt.

Wissenschaftliche Publikationen

Projektrelevante Publikationen:

Nadine Löschmann, Martin Michaelis, Florian Rothweiler, Richard Zehner, Jaroslav Cinatl, Yvonne Voges, Mohsen Sharifi, Kristoffer Riecken, Jochen Meyer, Andreas von Deimling, Iduna Fichtner, Taravat Ghafourian, Frank Westermann, Jindrich Cinatl Jr

“Testing of SNS-032 in a panel of human neuroblastoma cell lines with acquired resistance to a broad range of drugs”

Translational Oncology, 2013, Volume 6, Issue 6

Nadine Löschmann, Martin Michaelis, Florian Rothweiler, Jindrich Cinatl jr.

“High ABCB1 expression as dominant resistance mechanism in cells with acquired SNS-032 resistance”

Manuskript in Vorbereitung

Weitere Publikationen:

Martin Michaelis, Florian Rothweiler, **Nadine Löschmann**, Mohsen Sharifi, Taravat Ghafourian, Jindrich Cinatl jr.

“Enzastaurin inhibits ABCB1-mediated drug efflux independently of effects on protein kinase C signalling and the cellular p53 status”

In Revision bei Oncotarget

Martin Michaelis, Bishr Agha, Florian Rothweiler, **Nadine Löschmann**, Yvonne Voges, Michel Mittelbronn, Tatjana Starzetz, Patrick N. Harter, Behnaz A. Abhari, Simone Fulda, Frank Westermann, Kristoffer Riecken, Silvia Spek, Klaus Langer, Michael Wiese, Wilhelm G. Dirks, Richard Zehner, Jaroslav Cinatl, Mark N. Wass, Jindrich Cinatl jr

“Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen”

In Revision bei Scientific Reports

Martin Michaelis, Florian Selt, Florian Rothweiler, **Nadine Löschmann**, Benedikt Nüsse, Wilhelm G. Dirks, Richard Zehner, Jindrich Cinatl jr

“Aurora kinases as targets in drug-resistant neuroblastoma cells”

PLoS One. 2014 Sep 30;9(9):e108758. doi: 10.1371/journal.pone.0108758

Martin Michaelis, Florian Rothweiler, Bishr Agha, Susanne Barth, Yvonne Voges, **Nadine Löschmann**, Andreas von Deimling, Rainer Breitling, Hans Wilhelm Doerr, Franz Rödel, Daniel Speidel, Jindrich Cinatl jr

”Human neuroblastoma cells with aquired resistance to the p53 activator RITA retain functional p53 and sensitivity to other p53 activating agents”

Cell Death and Disease, 2012, 3, e294; doi:10.1038/cddis.2012.35

Martin Michaelis, Florian Rothweiler, Susanne Barth S, Jaroslav Cinatl, Marijke van Rikxoort, **Nadine Löschmann**, Yvonne Voges, Rainer Breitling, Andreas von Deimling, Franz Rödel, Kristoffer Weber, Boris Fehse, E. Mack, Torsten Stiewe, Hans Wilhelm Doerr, Daniel Speidel, Jindrich Cinatl jr

“Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells”

Cell Death and Disease, 2011, 2, e243; doi:10.1038/cddis.2011.129

Martin Michaelis, Christina Paulus, **Nadine Löschmann**, Stephanie Dauth, Elisabeth Stange, Hans Wilhelm Doerr, Michael Nevels, Jindrich Cinatl Jr

”The multi-targeted kinase inhibitor Sorafenib inhibits human cytomeglovirus replication”

Cellular and molecular life science, 2011 Mar, 68(6):1079-90

Henry Ogbomo, Tsigereda Biru, Martin Michaelis, **Nadine Löschmann**, Hans Wilhelm Doerr, Jindrich Cinatl Jr

“The antitumoral drug enzastaurin inhibits natural killer cell cytotoxicity via activation of glycogen synthase kinase-3 β ”

Biochemical Pharmacology, 2011 Jan 15; 81(2):251-8

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde SNS-032, ein niedermolekularer Inhibitor für die Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDKs) 2, 7 und 9, erstmals im Neuroblastom auf seine antitumorale Wirkung untersucht. Spezifische Inhibitoren für CDKs wurden in präklinischen Untersuchungen bereits für die Behandlung des Neuroblastoms vorgeschlagen. In dieser Arbeit wurde SNS-032 erstmals in einer Auswahl von 113 Neuroblastomzelllinien, bestehend aus 19 parentalen Zelllinien und 94 Sublinien mit einer erworbenen Resistenz gegenüber 14 verschiedenen Zytostatika, untersucht. Bei 73 % der untersuchten Zelllinien und 4 weiteren primären Neuroblastomkulturen lagen die Konzentrationen von SNS-032, welche die Viabilität um 50 % beeinträchtigen, im therapeutisch erreichbaren Bereich von < 754 nM. In 62 % der Zelllinien und zwei primären Neuroblastomkulturen konnte die Viabilität in diesem Bereich sogar um 90 % reduziert werden. Durch Kombination mit konventionellen Zytostatika konnte dieser Effekt in UKF-NB-3 und in den an Melphalan, Topotecan und Cisplatin adaptierten Sublinien noch zusätzlich gesteigert werden. SNS-032 beeinträchtigte ebenfalls das Wachstum der an Cisplatin-adaptierten UKF-NB-3 Sublinie UKF-NB-3^{CDDP}¹⁰⁰⁰ in Mäusen. Da viele an Vinkaalkaloide, Taxane oder Doxorubicin adaptierte Sublinien eine Resistenz gegenüber SNS-032 aufwiesen, wurde erstmals untersucht, inwiefern die Expression der ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 die Wirkung von SNS-032 beeinflusst. Dazu wurden die stark ABCB1- bzw. ABCG2-exprimierenden Zelllinien UKF-NB-3^{ABCB1} und UKF-NB-3^{ABCG2} verwendet, welche durch Transduktion mit einem ABCB1- bzw. ABCG2-kodierenden lentiviralen Vektor erzeugt wurden. Durch pharmakologische Inhibierung von ABCB1 in diesen und weiteren stark ABCB1-exprimierenden chemoresistenten Sublinien konnte eine starke ABCB1-Abhängigkeit von SNS-032 nachgewiesen werden. Dies konnte durch RNAi-vermittelte Verminderung von ABCB1 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen und nachfolgende Resensibilisierung gegenüber SNS-032 bestätigt werden. Des Weiteren konnte in SNS-032-resistenten UKF-NB-3 Zellen (UKF-NB-3^{SNS-032}^{300nM}), welche durch Adaptierung an steigende Konzentrationen von SNS-032 etabliert wurden, die Expressionsinduktion von ABCB1 und eine dadurch bestehende Kreuzresistenz gegenüber verschiedenen ABCB1-Substraten als hauptsächlicher Resistenzmechanismus gegenüber SNS-032 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wird die Wirkung von SNS-032 durch ABCG2 in UKF-NB-3^{ABCG2} Zellen zwar signifikant, jedoch in einem deutlich geringeren Maße beeinflusst. Mit Hilfe der p53-depletierten Zelllinien UKF-NB-3^{pcp53} und IMR-32^{pcp53} sowie diverser an Nutlin-3 adaptierten UKF-NB-3 und -6 Sublinien, welche unterschiedliche Mutationen im *TP53*-Gen

aufwiesen, konnte nachgewiesen werden, dass die Wirkung von SNS-032 in Neuroblastomzellen unabhängig von funktionellem p53 Protein ist. SNS-032 löst in Neuroblastomzellen eine intrinsisch Apoptose aus, was durch den Nachweis des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials, der Aktivierung von Bax, der gesteigerten Aktivität bzw. Spaltung der Caspasen 3, 7 und 9 sowie der Zunahme der Zellen in der SubG₁-Phase gezeigt werden konnte. Durch transiente Hemmung der Expression der einzelnen CDKs mittels siRNA konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von CDK2 und CDK7 keinen wesentlichen Einfluss auf die Viabilität der Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 hat, während eine RNAi-vermittelte Hemmung der Expression von CDK9 oder CDK7 und CDK9 in Kombination die Viabilität der UKF-NB-3 Zellen erheblich negativ beeinflusst. Dieser negative Einfluss auf die Viabilität sowie auf die Aktivität der RNA-Polymerase II ist bei Kombination der siRNAs gegen CDK7 und CDK9 am stärksten. Der negative Effekt auf die Viabilität durch eine RNAi-vermittelte verminderte Expression von CDK9 konnte in an Cisplatin und Vincristin adaptierten chemoresistenten Sublinien von UKF-NB-3 ebenfalls nachgewiesen werden. SNS-032 führt in Neuroblastomzellen laut Western Blot Analyse zu einer deutlich verminderten Phosphorylierung des CDK2 Zielproteins Rb an Serin 807 und 811 sowie des Zielproteins der CDKs 7 und 9, der RNA-Polymerase II an Serin 2 und 5. Diese wird dadurch nachweislich erheblich in ihrer Aktivität beeinträchtigt. Um zu untersuchen, inwiefern die inhibierte Aktivität der RNA-Polymerase II einen Einfluss auf die Expression verschiedener Proteine mit einer hohen Fluktuationsrate hat, wurden in dieser Arbeit erstmals alle bisher mit der Wirkung von SNS-032 im Zusammenhang betrachteten antiapoptotischen Proteine auf ihre Expression in drei Neuroblastomzelllinien untersucht. Die verminderte RNA-Polymerase II Aktivität führt abhängig vom biologischen Kontext der Neuroblastomzelllinie zu einer differenziell verminderten Expression von Mcl-1, Survivin, XIAP, cIAP-1, cIAP-2 und Bcl-2. Während in anderen Arbeiten zu SNS-032 hauptsächlich die verminderte Expression von Mcl-1 als apoptoseauslösend postuliert wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Neuroblastomzellen eine RNAi-vermittelte verminderte Expression von Survivin einen deutlich stärkeren Effekt auf die Viabilität ausübt als Mcl-1. Zusammenfassend stellt SNS-032 eine Therapiemöglichkeit für ABCB1-negative bzw. schwach ABCB1-exprimierende Neuroblastome dar. Der hauptsächlichste Wirkmechanismus wird über die Inhibierung von CDK9 realisiert und führt zu einer verminderten Expression antiapoptotischer Proteine, was nachfolgend eine intrinsische Apoptose auslöst.

Abstract

In the present time, treatment of high-risk neuroblastoma patients, representing about half of all diagnosed cases, leads to a survival rate of less than 50%, despite intensive and sometimes aggressive chemotherapy. Therefore, new treatment options for high-risk patients are urgently needed. Inhibitors of cyclin dependent kinases (CDKs) have been proposed for the treatment of neuroblastoma in preclinical studies before. In the present work, SNS-032, a small molecule inhibitor of the CDK2, 7 and 9, was first investigated in neuroblastoma for its antitumor effect. A panel of 113 neuroblastoma cell lines, consisting of 19 parental cell lines and 94 sublines with acquired resistance to 14 different cytotoxic drugs was investigated. 73% of the analyzed cell lines and four primary neuroblastoma cultures reported concentrations of SNS-032 affecting the viability by 50%, in a therapeutically achievable range (<754 nM). In 62% of the cell lines and two primary neuroblastoma cultures the viability could even be reduced by as much as 90% in this concentration range. In combination with conventional cytotoxic drugs the effect on the viability could be increased in UKF-NB-3 and in melphalan, topotecan and cisplatin adapted sublines. SNS-032 also affected the growth of the cisplatin adapted UKF-NB-3 subline UKF-NB-3^{rCDDP¹⁰⁰⁰} in mice. Since many sublines adapted to vinca alkaloids, taxanes or doxorubicin show resistance towards SNS-032, we investigated for the first time the direct influence of ABCB1 and ABCG2 expression, both ABC transporters, on the effect of SNS-032. Therefore, the ABCB1 or ABCG2-expressing cell lines UKF-NB-3^{ABCB1} and UKF-NB-3^{ABCG2} were used, which were generated by transduction with an ABCB1 or ABCG2-encoding lentiviral vector. Pharmacological inhibition of ABCB1 in this and other high ABCB1-expressing chemoresistant sublines showed a strong ABCB1-dependence of SNS-032 antitumoral activity. This was confirmed by RNAi-mediated depletion of ABCB1 in UKF-NB-3^{ABCB1} cells and subsequent resensitization to SNS-032. Furthermore in SNS-032 resistant UKF-NB-3 cells (UKF-NB-3^{rSNS-032^{300nM}}), which were established by adaptation to increasing concentrations of SNS-032, the induction of ABCB1 expression and cross-resistance to various ABCB1 substrates could be identified as main mechanism of resistance towards SNS-032. In contrast, the effect of SNS-032 by ABCG2 in UKF-NB-3^{ABCG2} is indeed significant, but affects cells to a significantly smaller extent. SNS-032 exerted its effects independently of the presence of functional p53. This was confirmed using the p53-depleted cell lines UKF-NB-3^{pcp53} and IMR-32^{pcp53} and various p53-mutated nutlin-3-resistant UKF-NB-3 and -6 sublines. SNS-032 induces intrinsic apoptosis in neuroblastoma cells, which was confirmed by detection of loss of mitochondrial membrane potential, activation of Bax, increased activity or cleavage of

caspsases 3, 7 and 9 and an increased amount of cells in subG₁ phase. By transient depletion of CDKs using specific siRNAs it could be shown that a decreased expression of CDK2 and CDK7 had no significant impact on the viability of the neuroblastoma cell line UKF-NB-3, but RNAi-mediated depletion of CDK9 or CDK7 and 9 in combination was effective in affecting the viability. The negative impact on cell viability as well as activity of RNA polymerase II was most pronounced by combination of siRNAs against CDK7 and CDK9. The negative effect on cell viability by RNAi-mediated depletion of CDK9 was also demonstrated in cisplatin and vincristine adapted chemoresistant UKF-NB-3 sublines. According to Western blot analysis in neuroblastoma cells SNS-032 treatment leads to a significantly reduced phosphorylation of CDK2 target protein Rb at serine 807 and 811, and the target protein of CDKs 7 and 9, RNA polymerase II at serine 2 and 5, which adversely affects its activity. To investigate the influence of the inhibited RNA polymerase II activity on the expression of various cellular proteins with a high turnover rate all previously with the effect of SNS-032 considered antiapoptotic proteins were investigated in three neuroblastoma cell lines for their expression. The reduced RNA polymerase II activity results in a differential reduced expression of Mcl-1, Survivin, XIAP, cIAP-1, cIAP -2, and Bcl-2, depending on the biological context of the different neuroblastoma cell line. While in other studies about SNS-032 the decreased expression of Mcl-1 has been postulated as the main trigger for apoptosis, in this work it was shown that in the neuroblastoma cell line UKF-NB-3 the RNAi-mediated depletion of survivin had a much stronger effect on the cell viability as Mcl-1.

In summary, SNS-032 is a treatment option for ABCB1-negative or weakly ABCB1-expressing neuroblastoma. The principal mechanism of action is via the inhibition of CDK9 and leads to reduced expression of antiapoptotic proteins, leading to intrinsic apoptosis.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Wissenschaftliche Publikationen	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Vorwort	XII
1. Einleitung	1
1.1 Neuroblastom	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Klassifikation und Pathogenese	1
1.1.3 Molekularbiologische Merkmale des Neuroblastoms	3
1.1.3.1 MYCN-Amplifikation	3
1.1.3.2 Veränderungen der Ploidie	4
1.1.3.3 Chromosomen-Aberrationen	5
1.1.3.4 Veränderungen der Genexpression	7
1.1.3 Symptomatik und Diagnose	7
1.1.4 Therapie und Prognose	8
1.2. Chemoresistenz	9
1.3. Cyclin-abhängige Kinasen	10
1.4. CDK-Inhibitoren in der Tumorthherapie	11
1.4.1. SNS-032	12
1.5. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
2.2 Chemikalien, Stoffe und andere Lösungen	16
2.2.1 Allgemeine Lösungen und Stoffe	16
2.2.2 Zellkultur	17

2.2.3 MTT-Viabilitätsassay	18
2.2.4 Färbung des ABC-Transporters MDR1	18
2.2.5 Western Blot	19
2.3. Verwendete Zelllinien	22
2.4. Zellkultur	29
2.4.1. Kultivierung und Ernten von Zellen	29
2.4.2. Bestimmung der Zellzahl	30
2.5. MTT-Viabilitätsassay	30
2.6. Markierung lebender und toter Zellen durch Fluoreszenzfarbstoffe	32
2.7. Bestimmung der Expression von ABCB1 am Durchflusszytometer	32
2.8. Akkumulation des MDR1-Substrates Rhodamin 123	33
2.9. RNA Interferenz mittels Transfektion von siRNA	34
2.9.1. Transfektionsoptimierung	35
2.9.2. Transfektion	36
2.10. Proteinbiochemische Methoden	36
2.10.1. Proteinextraktion	36
2.10.2. Bestimmung der Proteinkonzentration und Probenvorbereitung	37
2.10.3. Gelelektrophorese	37
2.10.4. Western Blot und spezifischer Nachweis von Proteinen	38
2.11. RNA-Synthese-Assay	40
2.12. Nachweis der BAX-Aktivierung	41
2.13. Analyse des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi$)	42
2.14. Nachweis der Cytochrom C Freisetzung	43
2.15. Caspase 3/7 Aktivitäts-Assay	43
2.16. Bestimmung von Zellen in der Sub-G ₁ -Phase	44
2.17. Xenograft Experimente	44
3. Ergebnisse	46
3.1. Antitumorale Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen	46
3.1.1 Antitumorale Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzelle <i>in vitro</i>	46
3.1.2 Antitumorale Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen <i>in vivo</i>	56
3.2. Einfluss der Expression von ABCB1 und ABCG2 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032	59

3.2.1. Einfluss von ABCB1 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032 in Neuroblastomzelllinien	59
3.2.2 Einfluss von ABCB1 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032 in primären Neuroblastomkulturen	68
3.2.3 Adaptierung von Neuroblastomzellen an SNS-032	71
3.2.4 Einfluss von ABCG2 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032 in Neuroblastomzelllinien	75
3.3 Einfluss von p53 auf die zelluläre Antwort von Neuroblastomzellen zu SNS-032	76
3.4. Einfluss von SNS-032 auf die Proliferation und den Zelltod von Neuroblastomzellen	79
3.5. Wirkung von SNS-032 auf CDK2	88
3.6. Wirkung von SNS-032 auf CDK7 und CDK9	90
4. Diskussion	100
Darstellungsverzeichnis	116
Abkürzungsverzeichnis	119
Literaturverzeichnis	123
Anhang	138
A.1 TP-53 Mutationen der verwendeten Nutlin-3 resistenten Sublinien	138
A.2 Sequenzen der verwendeten siRNAs	139
A.3 ABCB1-Expression in Vincristin- und Doxorubicin-resistenten Neuroblastomzelllinien	140
A.4 IC ₅₀ - und IC ₉₀ -Werte von SNS-032 in An- und Abwesenheit von 10 µM Verapamil	141

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie am Klinikum der Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden in den Laboren des Petra-Joh-Forschungshauses der Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Professor Dr. Reinhard Dammann, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich mich ausdrücklich bei meinem Betreuer Herr Professor Dr. Jindrich Cinatl für die wissenschaftliche Ausarbeitung meines Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Bei Herrn Dr. M. Michaelis möchte ich mich für die Zusammenarbeit zur Realisierung der Veröffentlichung meiner Ergebnisse bedanken.

Ein ebenfalls großer Dank geht an meine Kollegen aus dem Labor und in der Stiftung, durch deren freundschaftliche Atmosphäre die Arbeit im Labor immer sehr viel Spaß gemacht hat. Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. Florian Rothweiler, der mir in der Phase des Zusammenschreibens immer mit einem offenen Ohr und Korrekturstift zu Seite stand.

Dem Verein "Hilfe für krebskranke Kinder, Frankfurt/Main e.V." bzw. der "Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder" gebührt mein Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die auch in schwierigen Zeiten den Glauben an mich bewahrt hat und mich jederzeit mit Worten und Taten bei der Beendigung dieser Arbeit unterstützt haben.

- Die Suche nach einem Weg zur Ausmerzung dieser Geißel ... (Krebs) ist einstweilen ein Fischen im Trüben, ein Forschen aufs Geratewohl. -

The Washington Post, 1946

1. Einleitung

1.1 Neuroblastom

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Neuroblastom ist eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems und gehört zu der Gruppe der embryonalen Tumore. Es entsteht aus den Zellen der Neuralleiste, welche auch der Ursprung der Ganglien des Sympathikus und des Nebennierenmarkes ist und kann überall entlang des sympathischen Grenzstranges entstehen (Maris et al, 2007). Lokalisierte Tumore findet man dementsprechend insbesondere im Nebennierenmark (51%), Abdomen (25 %), Thorax (16 %), Becken (2,9 %) und im Halsbereich (2,9 %) (Studie NB97, Berthold et al., 2002). Das Neuroblastom zeichnet sich durch seine biologische und klinische Heterogenität aus und umfasst Verlaufsformen von spontaner Regression, langsamer Progression und extrem aggressiver und schneller Progression (Ambros et al., 1995).

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor und nach der Leukämie und Glioblastom die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Es ist verantwortlich für 8 % (Inzidenz 1,3 auf 100 000 Kinder unter 15 Jahre) aller maligner Tumore in Patienten unter 15 Jahren und für circa 15 % aller pädiatrischen Todesfälle (Maris et al., 2007; Kaatsch, 2004). Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei circa 18 Monate und 90 % aller Neuroblastome werden vor Vollendung des 6. Lebensjahres diagnostiziert (Brodeur, 2003; Hero und Christiansen, 2010; Woods et al., 2002). Circa 40 % der Neuroblastome werden sogar schon im 1. Lebensjahr diagnostiziert (Brodeur et al, 2002). Mit zunehmendem Alter sinkt die Inzidenz deutlich von 7,7 von 100 000 bei Säuglingen über 2,1 auf 100 000 bei Kleinkindern (1 bis 4 Jahre) auf 0,1 / 100 000 bei 10 bis 14-Jährigen (Kaatsch, 2004).

1.1.2 Klassifikation und Pathogenese

Histopathologisch wird das Neuroblastom entweder nach Hughes et al. (1974) oder nach der internationalen INPC-Klassifizierung eingeteilt (Shimada et al., 1999). In Deutschland wird häufig die Einteilung nach Hughes verwendet. Nach Hughes liegen in circa 50 % der diagnostizierten Fälle Grad 3 vor (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1.1: Einteilung der histologischen Einstufung nach Hughes (1974). (Modifiziert nach Harms et al. 1979)

Malignitätsgrad	Befund
Grad 1a	Diffuses Ganglioneuroblastom: diffuse Mischung von unreifen, ausreifenden und reifen Zellelementen
Grad 1b	Ganglioneuroblastom vom Kompositionstyp: Ganglioneurom mit wechselnd großen Arealen undifferenzierten Neuroblastomgewebes (abrunder Übergang zwischen beiden Tumorkomponenten)
Grad 2	Mischbild aus undifferenzierten Zellen und mindestens einigen Zellen mit partieller Differenzierung in Ganglienzellen (vesikuläre Kerne mit erkennbarem Nukleolus, Zytoplasma-Kern-Relation angestiegen, zytoplasmatische Fortsätze)
Grad 3	Undifferenziertes, klein- und rundzelliges Tumorgewebe
Anaplasie	Nebeneinanderbestehen von typischem Neuroblastomgewebe (Grad 1, 2, 3) und Tumoranteilen ohne histologische Neuroblastom-kriterien, die aber große und polymorphe Zellkerne mit sehr vielen und häufig atypischen Mitosen enthalten

(aus Hero und Christiansen, 2010, Neuroblastom. Hiddemann et al., 2010, Die Onkologie, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York)

Klinisch kann das Neuroblastom nach den INSS-Kriterien (International Neuroblastoma Staging System) in 4 beziehungsweise 5 verschiedene Stadien eingeteilt werden (Evans et al., 1970; Brodeur et al., 1993). Dabei ist zu beachten, dass diese Einteilung postoperativ vorgenommen wird.

Tabelle 1.2: Klinische Einteilung des Neuroblastomes in verschiedene Stadien nach den INSS-Kriterien

Stadium	Befund	Häufigkeit
Stadium I	Lokalisierter Tumor Der Tumor ist auf das Ursprungsorgan begrenzt	~ 25 %
Stadium II	Der Tumor infiltrierte die Umgebung, aber überschreitet die Mittellinie nicht, Lymphknotenbefall möglich	~ 20 %
Stadium III	Der Tumor überschreitet die Mittellinie	~ 15 %
Stadium IV	Der Tumor ist in andere Organe metastasiert	~ 40 %
Stadium IV-S	Neuroblastom im Säuglingsalter mit Metastasen in Leber, Haut oder Knochenmark. Keine Skelettmastasen (günstigere Prognose als Stadium IV)	~ 10 %

Für eine prätherapeutische Risiko-Klassifikation wird seit 1997 auch die Einteilung der Patienten in die *International Neuroblastom Risk Groups* (INRG) angestrebt (Castleberry et al., 1997). Die neueste Variante von 2009 beinhaltet neben histologischer Einstufung und Alter des Patienten auch molekulare Merkmale wie MYCN-Amplifikation, Chromosomen-Aberration an 11q und Chromosomen-Ploidie (Cohn et al., 2009). Die Risiko-Klassifikation erfolgt in 4 Gruppen: sehr niedrig (28,2 % der Patienten), niedrig (26,8 %), intermediär (9 %) und hoch (36,1 %). Die 5-Jahres-Prognose ohne Rückfall ist dabei für die erste Gruppe mit über 85 % am höchsten und sinkt bis zur Hoch-Risiko-Gruppe auf unter 50 %.

1.1.3 Molekularbiologische Merkmale des Neuroblastoms

1.1.3.1 MYCN-Amplifikation

Einige Neuroblastome sind zytogenetisch durch double-minute chromatin bodies (DMs) oder homogene staining regions (HSRs) charakterisiert, welche auf Genamplifikationen hinweisen (Cox et al., 1965; Biedler et al., 1976). Bis 1983 war die Identität des amplifizierten Gens unbekannt und wurde dann als ein neues Homolog des Protoonkogens c-myc identifiziert (Schwab et al., 1983). MYCN stellt heute den

wichtigsten molekularen prognostischen Marker beim Neuroblastom dar (Brodeur et al., 2003, Bown, 2001; Maris und Matthay, 1999; Maris, 2007). Das n-myc Protein ist im Zellkern lokalisiert und ist als Transkriptionsfaktor in vielen zellulären Prozessen involviert.

Eine Amplifikation des *MYCN* Gens und damit verbunden die hohe Expression von *MYCN* kann ausgehend von Untersuchungen von über 3000 Patienten in circa 22 % der Neuroblastome festgestellt werden (Brodeur et al., 1997; Brodeur und Maris, 2002). Dabei ist die Häufigkeit in fortgeschrittenen klinischen Stadien (3 und 4) nach INSS mit 31 % deutlich höher als bei den Stadien 1 und 2 (4 %) und 4S (8 %) (Brodeur et al., 2003). Die *MYCN*-Amplifikation steht auch in enger Korrelation mit dem Verlust der Heterozygotie an 1p (*loss of heterozygoty*; LOH) (Fong et al., 1989). Fast alle Neuroblastome mit *MYCN*-Amplifikation zeigen auch 1p LOH, aber nicht alle Neuroblastome mit einem 1p LOH sind *MYCN* amplifiziert (Brodeur, 2003). Bei einer bestehenden Amplifikation können pro Zelle circa 50 bis 400 Kopien von *MYCN* nachgewiesen werden (Seeger et al., 1988). Eine Amplifikation von *MYCN* ist vorherrschend mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien (3 bzw. 4 nach INSS) und schlechtem Therapieausgang assoziiert (Brodeur et al., 1984) und korreliert gleichsam mit rascher Tumorprogression und einer schlechten Prognose bei Patienten mit niedrigeren Krankheitsstadien (1 bzw. 2) (Seeger et al., 1985). Damit stellt die Amplifikation von *MYCN* bei einer Kopienanzahl über 10 einen starken prognostischen Faktor über alle klinischen Stadien hinweg dar (Maris und Matthay, 2003) und wird daher in Europa, Japan und den USA bei der Diagnose routinemäßig bestimmt, um die Behandlung zu stratifizieren (Brodeur, 2003).

1.1.3.2 Veränderungen der Ploidie

Eine Veränderung des Chromosomensatzes ist im Neuroblastom nicht ungewöhnlich. Hyperdiploidie oder Nahezu-Triploidie kommt in circa 65 % aller Neuroblastomfälle vor (Look et al., 1991) und ist in jüngeren Patienten (< 2 Jahre) mit einer günstigeren Prognose des Patienten assoziiert als ein normaler diploider Chromosomensatz (Look et al., 1984). Ein hyperdiploider Chromosomensatz ist auch häufiger in jüngeren Patienten mit Neuroblastomen im klinischen Stadium 1 und 2 zu finden (Look et al., 1991). Jedoch verliert die Untersuchung der Ploidie bei Patienten über 1 – 2 Jahren seine prognostische Aussage, da in älteren Patienten neben einer eventuellen Hyperploidie auch oft strukturelle Chromosomen-Aberrationen auftreten (Brodeur et al.,

2003). Ein normaler diploider DNA-Gehalt korreliert dagegen mit einem ungünstigen klinischen Krankheitsverlauf und einer signifikant reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit (Bown, 2001). Die Mehrheit der Tumorabgeleiteten Neuroblastomzelllinien und fortgeschrittenen primären Tumore weisen einen nahezu-diploiden oder nahezu-tetraploiden Chromosomensatz auf (Maris und Matthay, 1999). Der Unterschied zwischen beiden genetischen Phänomenen wird im Modell dadurch erklärt, dass weniger aggressive Tumore eher einen grundsätzlichen Defekt in der Mitose aufweisen, welcher zum Verlust beziehungsweise Zugewinn ganzer Chromosomen führt, während aggressive Tumore wohl einen fundamentalen Defekt in der Stabilität des Genoms inne haben, was nachfolgend häufiger zu strukturellen Chromosomen-Aberrationen führt, aber den diploiden Chromosomensatz erhält (Brodeur et al., 1997; Maris et al., 2007).

1.1.3.3 Chromosomen-Aberrationen

Der Verlust oder Zugewinn von Chromosomenabschnitten ist ein häufiges Phänomen im Neuroblastom. Die drei häufigsten sind Deletionen an Chromosom 1p und 11q und der Zugewinn von 17q.

Deletionen an Chromosom 1p in primären Neuroblastomen wurden erstmals 1977 beschrieben (Brodeur et al., 1977; 1981). Der dadurch entstehende Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygoty*; LOH) an 1p kann in 19 – 36 % der primären Tumore nachgewiesen werden (Fong et al., 1989; 1992; White et al., 1995; Maris et al., 1995; Gehring et al., 1995; Caron et al., 1996). Der 1p LOH weist eine enge Korrelation mit Hoch-Risiko-Faktoren im Neuroblastom auf, wie beispielsweise Alter des Patienten (>1 Jahr) bei Diagnosestellung, Metastasen und Amplifikation des *MYCN* Gens (Maris et al., 1995; Gehring et al., 1995; Caron et al., 1996). Schon früh wurde daraus geschlossen, dass in diesem Abschnitt wahrscheinlich ein Tumorsuppressorgen zu finden ist. Neuroblastome mit großen Deletionen an 1p sind häufig auch *MYCN* amplifiziert und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert, während Neuroblastome, in denen nur kleine Abschnitte an 1p deletiert sind, mit höherer Wahrscheinlichkeit nur eine Kopie des *MYCN* Gens aufweisen und mit einem günstigen klinischen Ausgang korrelieren. Dies deutet hingegen auf zwei Tumorsuppressorgene auf dem Chromosomenabschnitt 1p hin (Takeda et al., 1994; Caron et al., 1993). Die Frage, ob der Verlust von 1p durch seine enge Korrelation zur *MYCN*-Amplifikation auch einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, ist

noch umstritten. Zwar reduziert 1p LOH signifikant das ereignisfreie Überleben, hat jedoch keinen Einfluss auf die totale Überlebenswahrscheinlichkeit (Maris et al., 2001). Eher könnten durch Analyse Patienten identifiziert werden, die dadurch in niedrigeren oder intermediären Risikogruppen eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen Rückfall aufweisen.

Eine Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 11 (11q) kann in 43 % der primären Tumore nachgewiesen werden und korreliert invers mit dem Status der *MYCN*-Amplifikation (Maris et al., 2001; Guo et al., 1999). Damit ist der Verlust von 11q die häufigste Deletion im Neuroblastom (Brodeur et al., 2003). Bei einer bestehenden Deletion von 11q konnte eine signifikante Reduktion der totalen Überlebenswahrscheinlichkeit bei *MYCN* nicht-amplifizierten Neuroblastomen festgestellt werden (Maris et al., 2001; Guo et al., 1999). Dadurch könnte diese genetische Aberration ein Marker für einen ungünstigen Phänotyp unabhängig von der Amplifikation von *MYCN* darstellen.

Eine weitere häufige Deletion im Neuroblastom ist der Verlust von 14q. Sie kann in circa 23 – 27 % aller Fälle detektiert werden (Thompson et al., 2001; Takita et al., 1995; Srivatsan et al., 1993; Takayama et al., 1992). Sie korreliert eng mit der Deletion von 11q, jedoch invers mit der Deletion an 1p und der Amplifikation von *MYCN* (Brodeur et al., 2003). Bisher konnte noch keine prognostische Korrelation festgestellt werden (Maris und Matthay, 1999).

Ein weiteres häufiges Phänomen im Neuroblastom ist der Zugewinn des Chromosomenabschnittes 17q. Es kann in 50 – 75 % aller primären Tumore nachgewiesen werden und ist somit die häufigste genetische Aberration im Neuroblastom (Gilbert et al., 1984; Brinkschmidt et al., 1997; Lastowska et al., 1997; Plantaz et al., 1997; Altura et al. 1997). Der Zugewinn des Abschnittes 17q21-qter korreliert signifikant mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit und geschieht häufig durch unbalancierte Translokation zu 1p oder 11q, wodurch 1p und 11q LOH ebenfalls mit dem Zugewinn von 17q korrelieren (Bown et al., 1999; Caron et al., 1995; Lastowska et al., 1997; Bown et al., 2001).

1.1.3.4 Veränderungen der Genexpression

Die differentielle Expression der Neurotrophinrezeptoren Tyrosinkinase A (TrkA), B und C korreliert mit unterschiedlichen Krankheitsstadien des Neuroblastoms (Maris und Matthay, 1999). Eine hohe Expression von TrkA ist beispielsweise mit niedrigen klinischen Stadien und einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Nakagawara et al., 1993; Kogner et al., 1993; Svensson et al., 1997; Combaret et al., 1997), während eine hohe Expression von TrkB mit eher ungünstigen klinischen Stadien und einer bestehenden *MYCN*-Amplifikation korreliert (Nakagawara et al., 1994).

Eine Überexpression des ABC-Transporters ABCC1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) kann bei circa 12 % der unbehandelten Neuroblastompatienten und bei 30 % der Patienten nach erfolgter Chemotherapie nachgewiesen werden und korreliert aufgrund der damit in Zusammenhang stehenden Resistenz der Tumore gegenüber diversen Zytostatika mit einer schlechten Prognose (Haber et al., 2006; Oue et al., 2009)

Eine sehr niedrige oder fehlende Expression des Oberflächenglykoproteins CD44 korreliert mit bestehenden Fernmetastasen bei der Diagnose, während eine CD44 Expression mit signifikant besseren Überlebenswahrscheinlichkeiten assoziiert werden (Favrot et al., 1993; Kramer et al., 1997; Christiansen et al., 1995). Jedoch korreliert die Expression von CD44 invers mit einer *MYCN*-Amplifikation und könnte dadurch ein unabhängiger prognostischer Marker für eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit sein (Favrot et al., 1993; Combaret et al., 1996).

1.1.3 Symptomatik und Diagnose

Aufgrund der bereits oben genannten Entstehungsorte der Primärtumore des Neuroblastoms können die unterschiedlichsten Symptome beobachtet werden. Sie reichen von pulmonalen Symptomen bei thorakalen Neuroblastomen über das relativ häufige Horner-Syndrom (19%) bei zervikalen Tumoren bis hin zur Querschnittlähmung durch intraspinal vorwachsende Sanduhrumore (Maris et al., 2007; Hero und Christensen, 2010). Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust, Fieber, Schlappeit und Schmerzen treten meist erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf auf. Die Diagnose des Neuroblastoms erfolgt durch die Bestimmung von Tumormarkern

(Katecholaminmetabolite und Enolase) im Urin oder Serum, bildgebende Verfahren wie Sonographie, Kernspintomographie und szintigraphische Darstellung der Anreicherung von Metajodbenzylguanidin (mIBG) und Knochenmarksdiagnostik (NB97, Berthold et al., 2002).

1.1.4 Therapie und Prognose

Die Therapiestrategie für das Neuroblastom richtet sich hauptsächlich nach dem histologischen Befund, dem klinischen Stadium, dem Alter und dem MYCN-Status des Patienten. Die folgenden Therapiestrategien sind der letzten abgeschlossenen deutschen Neuroblastomstudie (NB97) entnommen. Bei Primärtumoren ohne Fernmetastasen (Stadium I) genügt meist eine operative Entfernung des Tumorgewebes und weitere Beobachtung bzw. zunächst nur Beobachtung bei Säuglingen mit lokalisiertem Tumor oder diagnostiziertem Stadium 4S. Bei den Stadien II und III entscheiden das Alter des Patienten und die gezeigte Symptomatik ob nach der totalen Resektion des Primärtumors noch 4 Blöcke Chemotherapie angeschlossen werden müssen. Diese bestehen aus jeweils 2 Blöcken N5 (Cisplatin, Dacarbazin, Etoposid und Vindesin) und N6 (Adriamycin und Isosfamid) ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren für Granulozyten (C-GSF) (NB97, Berthold et al., 2002). Die 5-Jahresüberlebensrate für Patienten mit lokalisiertem Tumor (Stadien I-III) ist mit 97 % bei <1 Jahr und 88 % bei >1 Jahr zum Diagnosezeitpunkt relativ hoch. Jedoch spielt die Amplifikation von *MYCN* bei der Prognoseeinschätzung wie bereits erwähnt eine bedeutende Rolle. Patienten mit einem Neuroblastom im Stadium IV und alle mit einer *MYCN*-Amplifikation werden der Gruppe der Hochrisikopatienten zugeordnet und erhalten nach Biopsie oder potentieller totaler Resektion des Primärtumors zunächst je drei Blöcke Chemotherapie (N5 und N6) mit Zugabe von C-GFS und eventueller Zweitoperation. Im Anschluss daran erfolgt eine sogenannte Megatherapie mit Hochdosisbehandlung (Carboplatin, Etoposid und Melphalan) und anschließender autologer Stammzelltransplantation (autologous stem cell transplantation, ASCT) (Matthay et al., 1999). Sollte nach dieser Behandlung noch Residualtumorgewebe vorhanden sein, erfolgt eine gezielte Radiotherapie mit insgesamt 36 - 40 Gy mit täglichen Dosen von 2 Gy. Trotz dieser aggressiven Behandlungsstrategie liegt die 5-Jahresüberlebensrate für Hochrisikopatienten derzeit nur bei 44 % (± 3 %) (NB97, Berthold et al., 2002).

1.2. Chemoresistenz

Einer der hauptsächlichen Gründe für das Versagen einer erfolgreichen chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren ist die Chemoresistenz (Nobili et al., 2006, Wilson et al., 2006). Dabei ist zu unterscheiden, ob der zu behandelnde Tumor bereits zu Beginn der Therapie eine Resistenz gegenüber den eingesetzten Zytostatika aufweist (intrinsische Chemoresistenz) oder diese erst im Verlauf der Therapie auftritt (erworbene Chemoresistenz). Dabei ist die letztere die schwerwiegendere von beiden, da Tumore mit einer erworbenen Chemoresistenz oft nicht nur gegenüber den bisher eingesetzten Zytostatika resistent reagieren, sondern oft auch eine Kreuzresistenz gegen einer Reihe weitere Zytostatika aufweisen, welche sich sowohl in ihrer chemischen Struktur als auch in ihrem Wirkmechanismen unterscheiden können (Wilson et al., 2006). Diese auch als *multi drug resistance* (MDR) bezeichnete Form der Chemoresistenz führt letztendlich bei circa 90 % aller Patienten mit metastasierender Tumorerkrankung zu einem Therapieversagen (Longley und Johnston, 2005).

Die Mechanismen, welche bei der Entstehung und Ursache einer Chemoresistenz eine Rolle spielen sind sehr komplex, da viele Faktoren wie Pharmakokinetik oder Veränderungen bzw. Mutationen in den Tumorzellen die Sensitivität gegenüber Zytostatika beeinflussen können (Gottesman et al., 2002; Wilson et al. 2006). Pharmakokinetische Veränderungen, welche zu einem geringeren Plasmalevel führen, können durch eine verringerte Aufnahme, einem erhöhten Metabolismus oder einer gesteigerten Ausscheidung verursacht werden und erschweren nachfolgend die Diffusion der Zytostatika in das Tumorgewebe (Gottesman et al, 2002). Doch auch intrazelluläre Veränderungen der Tumorzellen durch den auftretenden Selektionsdruck bei einer chemotherapeutischen Behandlung können zu einer verringerten Effizienz der eingesetzten Zytostatika führen. Beispiele dafür sind Mutationen an den zellulären Zielstrukturen der jeweiligen Zytostatika, welche nachfolgend eine erfolgreiche Bindung/Inhibierung verhindern, oder auch solche, welche den Metabolismus der Zelle beeinflussen und eine beschleunigte Inaktivierung oder verlangsamte Aktivierung des Zytostatikums verursachen. Eine weitere Ursache für eine Resistenz gegenüber Zytostatika kann eine gesteigerte Expression intrazellulärer Reparaturmechanismen oder die Ausschaltung von zur Apoptose der Zelle führenden Mechanismen durch beispielsweise gesteigerte Expression von antiapoptotischen Proteinen sein.

Den am häufigsten auftretenden zellulären Resistenzmechanismus gegenüber Zytostatika stellt der erhöhte Austransport (Efflux) des jeweiligen Zytostatikums aus der Zelle dar. Dieser wird häufig durch eine induzierte Expression bzw. Überexpression diverser ATP-abhängiger Transporter bewirkt, welche in der Lage sind verschiedene Substanzen unter ATP-Verbrauch aus der Zelle zu schleusen. Zu den bekannten Substraten gehören Aminosäuren, Lipide, anorganische Ionen, Peptide, Saccharide, Proteine und diverse Arzneimittel (Zhou et al., 2008). Aufgrund ihrer gemeinsamen ATP-Bindungsdomäne werden die Mitglieder dieser Superfamilie auch als ABC-Transporter (ATP-binding cassette (ABC)-Transporter) bezeichnet (Gottesman et al., 2002; Nobili et al., 2006). Sie werden in fast allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert und haben eine zentrale Funktion in der physiologischen Detoxifikation der Zellen inne (Zhou et al., 2008). Im humanen Genom sind bisher 49 verschiedene ABC-Transporter entdeckt worden, welche sich 7 Subfamilien (*ABCA-ABCG*) zuordnen lassen (Szakács et al., 2006). Der am besten charakterisierte ABC-Transporter ist das ABCB1 Protein (multi drug resistance protein 1, MDR1, P-Glykoprotein), welcher erstmals 1973 in Zusammenhang mit dem aktiven Austransport von Daunomycin beschrieben (Dano et al., 1973) und nachfolgend als membranständiges Glykoprotein identifiziert wurde (Juliano und Ling, 1976). ABCB1 wird im gesunden Gewebe hauptsächlich in Leber, Niere, Plazenta, im Intestinum und in der Blut-Hirn-Schranke exprimiert (Gottesman et al, 2002; Szakács et al, 2006). Zu seinen Substraten gehören vor allem hydrophobe Substanzen wie zum Beispiel diverse Zytostatika (Docetaxel, Paclitaxel, Etoposid, Vincristin, Vinblastin), Antibiotika (Erythromycin, Sparfloxacin) oder Cyclosporin und Morphin (leiri, 2012)

Weitere in Zusammenhang mit einer MDR gegenüber einer großen Bandbreite an Zytostatika bekannte ABC-Transporter sind ABCC1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) und ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) (Szakács et al., 2006). ABCB1, ABCC1 und ABCG2 repräsentieren ebenfalls die häufig mit einer MDR assoziierten ABC-Transporter im Neuroblastom (Gottesmann et al, 2002; Szakács et al, 2006; Oue et al., 2009; Pituch-Noworolska et al., 2009)

1.3. Cyclin-abhängige Kinasen

Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDKs) sind Serin/Threonin Kinasen, deren Aktivität von der Bindung bzw. Aktivierung durch ein spezifisches Partnercyclin abhängig ist. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Kontrolle der

Zellzyklusprogression, Apoptose und Transkription (Malumbres et al, 2008). Innerhalb der Kontrolle des Zellzyklus sind vor allem die CDKs 1, 2, 4 und 6 von Bedeutung. Durch Phosphorylierung aktivieren sie ihre zugehörigen Zielproteine und lösen damit verschiedene Zellzyklusvorgänge aus. Dabei wird ihre Aktivität hauptsächlich durch das zelluläre Expressionslevel der unterschiedlichen Cycline bestimmt. Die CDKs 7, 8 und 9 dagegen spielen bei der zellulären Transkription eine wichtige Rolle. Durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II an verschiedenen spezifischen Stellen der Carboxy-terminalen Domäne (*c-terminal domain*, CTD) regulieren diese CDKs die Aktivität der RNA-Polymerase II in den unterschiedlichen Phasen des Transkriptionsprozesses. Die Cyclin-abhängige Kinase 7 ist eine Komponente des Transkriptionsfaktorkomplexes II (TFIIH), welcher mit 6 weiteren Komponenten den Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase II bildet. Sie phosphoryliert die Serine an 5. Stelle der heptad Wiederholungen der CTD der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II (Harper und Elledge, 1998; Wang und Fischer, 2008). CDK9 ist Teil des basalen Transkriptionsfaktorkomplexes P-TEFb, ein Elongationsfaktor der zellulären Transkription, und phosphoryliert die CTD der RNA-Polymerase II zusätzlich am Serin 2, was die Aktivität der RNA-Polymerase II positiv reguliert und die Elongation vorantreibt (Wang und Fischer, 2008).

1.4. CDK-Inhibitoren in der Tumorthherapie

Aufgrund der Tatsache, dass Cyclin-abhängige Kinasen eine essentielle Rolle für den Zellzyklus und die Transkription der Zelle spielen und in diversen proliferativen Krankheiten wie beispielsweise Krebs in ihrer Regulation verändert sind (Collins und Garrett, 2005), sind sie seit fast 20 Jahren ein intensiv erforschtes Ziel für die antitumorale Therapie (Meijer; 1996; Bruyère und Meijer, 2013). Alvocidib (Flavoperidol) und Seliciclib (Roscovitine) waren die ersten CDK-Inhibitoren (Senderowicz et al, 1998; Mgbonyebi et al, 1999), welche in klinischen Phase I Studien untersucht wurden und befinden sich bis zum heutigen Zeitpunkt in verschiedenen präklinischen Untersuchungen und klinischen Phase I – III Studien als potentielle Monotherapie oder in Kombination mit traditionellen Zytostatika in diversen Tumorentitäten wie beispielsweise chronische lymphatische Leukämie (CLL), B-Zelllymphoma einschließlich multiplem Myelom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom und Neuroblastom (König et al., 1997; Hahntow et al., 2004; Lacrima et al., 2005; 2007; Zhang et al., 2008; Ribas et al., 2006; Puppo et al., 2004; N'gompaza-Diarra et

al., 2012; Bruyère und Meijer, 2013). Seliciclib ist ein Inhibitor für die CDKs 1, 2, 5, 7 und 9, während Alvocidib zunächst als Inhibitor für die CDKs 1, 2, 4 und 7 publiziert wurde (Senderowicz et al., 1999; Diaz-Moralli et al., 2013), jedoch nach späteren Erkenntnissen ebenfalls in der Lage ist die CDKs 6 und 9 in ihrer Aktivität zu inhibieren (Chao et al., 2001; Diaz-Moralli et al., 2013). Obgleich die meisten CDK-Inhibitoren zunächst zur selektiven Inhibierung spezifischer Cyclin-abhängiger Kinasen entwickelt wurden zeigen im weiteren Verlauf ihrer Untersuchung viele dieser Wirkstoffe gegenüber mehreren zusätzlichen CDKs eine inhibierende Wirkung (Bruyère und Meijer, 2013). Weitere Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren in klinischen Phasen sind zum Beispiel AZD5438 (CDK1, 2, 4 und 6), PD0332991 (CDK4 und 6), Dinaciclib (CDK1, 2, 5 und 9), Bryostatin-1 (CDK2) und SNS-032 (CDK2, 7 und 9) (Schwartz und Shah, 2005; Collins und Garrett; 2005; Blachly und Byrd, 2013; Bruyère und Meijer, 2013).

1.4.1. SNS-032

SNS-032 oder BMS-387032 gehört zu den N-(Cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazolen und wurde ursprünglich von Bristol-Myers Squibb (BMS) aus einer Auswahl von 27 ähnlichen Strukturen als selektiver und spezifischer Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 2 entwickelt und beschrieben (Misra et al., 2004). Durch Bindung an die ATP-Bindungsstelle von CDK2 verhindert SNS-032 die Phosphorylierung selbiger, welche sonst zur Aktivierung der Kinaseaktivität führt. Die chemische Struktur von SNS-032 ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

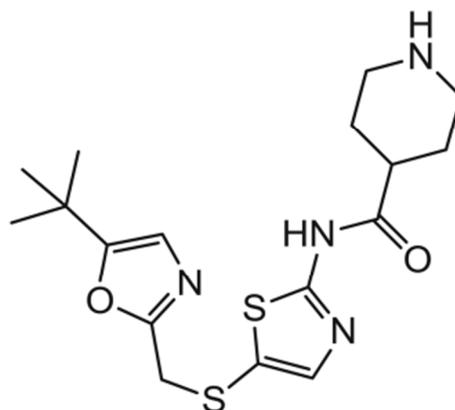


Abbildung 1.1: Chemische Struktur von SNS-032 (Stellrecht und Chen, 2011)

Später konnte gezeigt werden, dass SNS-032 durch wahrscheinlich denselben Mechanismus auch die Aktivität der CDKs 7 und 9 selektiv inhibiert (Nuwayhid et al., 2006). In einem Kinaseaktivitätsassay konnte nachgewiesen werden, dass Konzentrationen von 38 nM, 62 nM bzw. 4 nM die Aktivität der CDKs 2, 7 bzw. 9 um 50 % inhibiert (Fan et al., 2008; Heath et al., 2008).

Antitumorale Effekte von SNS-032 konnten bereits in verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise der chronischen lymphatischen Leukämie, der akuten myeloischen Leukämie, multiple Myeloma, Glioblastom, Mantelzelllymphom, Lungenkarzinom, Osteosarkom und Ovarialkarzinom innerhalb präklinischer Studien nachgewiesen werden (Misra et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2006; Scrace et al., 2008; Ali et al., 2007; Chen et al., 2009; Conroy et al., 2009; Chen et al., 2010; Kruse et al., 2011; Walsby et al., 2011; Wu et al., 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SNS-032 in der Lage ist die zelluläre Radiosensitivität von ruhenden bzw. hypoxischen Zellen des Nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms, welche eine hohe Resistenz gegenüber Strahlentherapie aufweisen, deutlich zu erhöhen (Kodym et al., 2009). Auch eine durch Glioblastomzellen hervorgerufene Angiogenese konnte durch Zugabe von SNS-032 in vitro inhibiert werden (Ali et al., 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass SNS-032 als Chemoprävention die Tumorgenese von Colonkarzinoma im Mausmodell reduzieren konnte (Boquoi et al., 2009).

Erste in vivo Untersuchungen wurden bereits 2001 im Rahmen präklinischer Studien der Firma Bristol-Myers Squibb für diverse Tumorentitäten wie Leukämie, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Colonkarzinom durchgeführt. Eine nachfolgende klinische Phase I Studie mit SNS-032 wurden in Patienten mit metastasierenden soliden Tumoren oder nicht auf eine Therapie ansprechenden Lymphomen durchgeführt (Heath et al., 2008). Die aufgetretenen körperlichen Nebenwirkungen umfassten Erschöpfung, Übelkeit, abdominale Schmerzen und Krämpfe, Darmträgheit, Diarrhö, Appetitlosigkeit, Husten und sensorische Neuropathie. Zu den körperlichen Beschwerden durch SNS-032 kamen teilweise auftretende Anämie, erhöhte Bilirubinwerte und Grad 3 PT und PTT (Heath et al., 2008). Weitere klinische Phase I und II Studien wurden in Patienten mit Chronischer lymphatischer Leukämie und multiplen Myelomen durchgeführt (Tong et al., 2010).

Der molekulare Wirkmechanismus von SNS-032 wurde in präklinischen Untersuchungen zum einen durch eine Inhibierung der Aktivität von CDK2 und dem nachfolgendem Zellzyklusarrest beschrieben (Misra et al., 2004; Nuwayhid et al., 2006). Des Weiteren führt die Inhibierung der Aktivität der CDKs 7 und 9 durch

SNS-032 zu einer Hemmung der RNA-Polymerase II und nachfolgender reduzierter Expression von antiapoptotischen Proteinen, was zur Auslösung der zellulären Apoptose führt (Scrace et al., 2008; Ali et al., 2007; Chen et al., 2009; Conroy et al., 2009; Chen et al., 2010; Tong et al., 2010; Walsby et al., 2011; Wu et al., 2012, Meng et al., 2013). Das am häufigsten davon betroffene antiapoptotische Protein ist dabei Mcl-1 (Scrace et al., 2008; Conroy et al., 2009; Chen et al., 2009; Chen et al., 2010; Tong et al., 2010; Wu et al., 2012).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Behandlung des Neuroblastoms bei Hoch-Risiko-Patienten führt zum derzeitigen Zeitpunkt trotz intensiver und aggressiver Chemotherapie zu einer Überlebensrate von weniger als 50%. Daher werden neue Behandlungsmöglichkeiten für diese Patientengruppe dringend benötigt. Spezifische Inhibitoren für CDKs wurden in präklinischen Untersuchungen bereits für die Behandlung des Neuroblastoms vorgeschlagen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die antitumorale Wirkung von SNS-032 *in vitro* und *in vivo* an einer großen Auswahl chemosensitiver und chemoresistenter Neuroblastomzelllinien untersucht um das Potenzial von SNS-032 zur Behandlung von Neuroblastompatienten evaluieren zu können. Bisher liegen zur Wirkung von SNS-032 im Neuroblastom noch keine Daten vor. Bei dieser Untersuchung sollte zunächst die Frage nach eventuellen Kreuzresistenzen zu SNS-032 in Sublinien, welche bereits erworbene Resistenzen zu diversen Chemotherapeutika besitzen, beantwortet werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob bekannte Resistenzmechanismen im Neuroblastom die Wirkung von SNS-032 beeinflussen. Dabei wurden neben chemoresistenten Sublinien auch transduzierte Zelllinien verwendet. Die Abhängigkeit der antitumoralen Wirkung von SNS-032 von der Expression von funktionellem p53 Protein sollte ebenfalls untersucht werden. Zur Erweiterung des Verständnisses der Wirkung von SNS-032 sollte der Einfluss auf CDK2, CDK7 und CDK9 und seine Zielproteine untersucht werden und näher charakterisiert werden. Durch RNAi-vermittelte Depletion der einzelnen Zielproteine von SNS-032 sollte abschließend der Einfluss der CDKs 2, 7 und 9 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von SNS-032 untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Fa. Mettler-Toledo, Gießen
Brutschränke	ohne CO ₂
	mit CO ₂ (MCO-20AIC)
Combitips	Fa. Eppendorf, Hamburg
Durchflussszytometer FACSCanto II	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierröhrchen	Fa. Nunc, Wiesbaden
Eismaschine	Fa. Wessamat, Kaiserslautern
Filterpapier (für Western Blot)	Fa. neoLab, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop IX 71	Fa. Olympus, Hamburg
Gefrierschrank	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank UF 80 – 450 S	Fa. Heraeus, Hanau
Glasflaschen	Fa. Schott, Mainz
Handschuhe	Fa. Kimberly-Clark, Dallas, USA
Kühlschränke	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	Fa. Velp scientifica, Usmate, Italien
Mikroskope (CKX41)	Fa. Olympus, Hamburg
Millipore Wasserfilteranlage	Fa. Millipore, Eschborn
Mini-PROTEAN II Elektrophoresekammer	Fa. Bio-Rad GmbH, München
Mini Trans-Blot Transferkammer	Fa. Bio-Rad GmbH, München
NEON Transfektionssystem	Fa. Invitrogen,
Nitrocellulosemembran	Fa. Thermo Fisher, Dreieich
pH-Messgerät	Fa. WTW, Weilheim
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Fa. Starlab, Ahrensburg
Pipettierhilfen	Fa. Integra Biosciences, Fernwald
Plattenphotometer Tecan	Fa. Tecan, Crailsheim
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf, Hamburg
	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenkassette	Fa. X-ray GmbH, Augsburg
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Fa. Amersham GmbH, Freiburg
Rotierer	Fa. Labortechnik Fröbel, Lindau
Rundbodenröhrchen 5ml	Fa. Falcon, Heidelberg

Schüttler	Fa. Labortechnik Fröbel, Lindau
Serologische Pipetten	Fa. Greiner, Frickenhausen Fa. Corning Inc, Amsterdam, Niederlande
Spannungsquelle	Fa. Bio-Rad GmbH, München
Sterilfilter	Fa. Millipore, Eschborn Fa. Sartorius GmbH, Göttingen
Sterilwerkbänke	Fa. Flow Laboratories, Meckenheim Fa. Heraeus, Hanau Fa. Thermo Electron, Karlsruhe
Thermomixer	Fa. Eppendorf, Hamburg
Vortex	Fa. Velp scientifica, Usmate, Italien
Waage	Fa. Mettler-Toledo, Gießen
Zellkulturflaschen	Fa. Falcon, Heidelberg Fa. Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Loch)	Fa. Falcon, Heidelberg Fa. Greiner, Frickenhausen Fa. Nunc, Wiesbaden
Zellzählgerät	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifugen	Fa. Hettich, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen (15 ml/ 50 ml)	Fa. Greiner, Frickenhausen

2.2 Chemikalien, Stoffe und andere Lösungen

2.2.1 Allgemeine Lösungen und Stoffe

Actinomycin D	Fa. Lundbeck Pharmaceuticals Ireland Limited, Dublin, Irland
Aqua ad iniectabilia	Fa. Braun, Melsungen
Bovines Serumalbumin	Fa. Roth, Karlsruhe
Carboplatin	Fa. TEVA GmbH, Radebeul
Cisplatin	Fa. TEVA GmbH, Radebeul
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich, München
Docetaxel	Fa. Sanofi Aventis, Frankfurt am Main
Doxorubicin	Fa. Cell pharm, Bad Vilbel

Etoposid	Fa. TEVA GmbH, Radebeul
Fumitremorgin C	Fa. Merck Millipore, Darmstadt
Gemcitabin	Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg
Melphalan	Fa. GlaxoSmithKline GmbH, München
Nutlin-3	Fa. Selleck Chemicals, via Absource Diagnostics GmbH, München
Oxaliplatin	Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg
Paclitaxel	Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg
SNS-032	Fa. Selleck Chemicals, via Absource Diagnostics GmbH, München
Saponin	Fa. Merck, Darmstadt
Topotecan	Fa. GlaxoSmithKline GmbH, München
Verapamil	Fa. Sigma-Aldrich, München
Vinblastin	Fa. TEVA GmbH, Radebeul
Vincristin	Fa. TEVA GmbH, Radebeul
Vinorelbin	Fa. Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Wedel

2.2.2 Zellkultur

Supplementiertes IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium):

1 % Penicillin/Streptomycin	1 Flasche 10 Mega Penicillin und 10 g Streptomycinsulfat mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern	Penicillin: Fa. Grünenthal, Stolberg Streptomycin: Fa. Sigma-Aldrich, München
2 % L-Glutamin	29,2 g L-Glutamin mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern	Fa. Sigma-Aldrich, München
10 % Fötales Kälberserum (FKS)	Gebrauchsfertig erworben, bei -20 °C lagern	Fa. Sigma-Aldrich, München
IMDM, 15mg/ml Phenolrot, NaHCO ₃ ⁻ , w/o L-Glutamin	Gebrauchsfertig erworben, bei 4 °C lagern	Fa. Biochrom AG, Berlin

Die einzelnen Lösungen wurden in einer sterilen Glasflasche vorgelegt und mit IMDM bis zum gewünschten Volumen aufgefüllt.

Weitere Lösungen für die Zellkultur

10x Phosphate buffered Saline (PBS)	95,5 g PBS mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren, bei RT lagern.	Fa. Sigma-Aldrich, München
1x PBS	50 ml 10x PBS mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen, bei RT lagern.	
Trypsin	2 g Trypsin und 0,6 g Titriplex III mit 1x PBS auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern.	Trypsin: Fa. Sigma-Aldrich, München Titriplex III (Ethylendinitrioltetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat, EDTA-Na): Fa. Merck Serono, Darmstadt

2.2.3 MTT-Viabilitätsassay

MTT-Lösung (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid)	1 g MTT-Reagenz auf 500 ml PBS, steril filtrieren, bei 4 °C lagern	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
20 % SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat)	400 g SDS auf 2 Liter (1:1 dH ₂ O / Dimethylformamid), pH 4,7; bei RT lagern	SDS: Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt Dimethylformamid: Fa. Roth

2.2.4 Färbung des ABC-Transporters MDR1

Anti-humanes MDR1 (Klon MRK16, Maus Isotyp IgG _{2a})	Fa. Alexis Biochemicals via AXXORA Deutschland, Lörrach
Sekundärer Antikörper anti-Maus IgG markiert mit Phycoerythrin (PE)	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
Isotypenkontrolle Maus IgG _{2a} markiert mit Phycoerythrin (PE)	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
Fixierungspuffer / Permeabilisierungspuffer	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

2.2.5 Western Blot

β-Mercaptoethanol	Fa. Sigma-Aldrich, München
Laemmlipuffer	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DC Protein Assay	Fa. Bio-Rad GmbH, München
Chemolumineszenzsubstrat	Fa. Pierce via Thermo Fisher, Karlsruhe
Isopropanol	Fa. Roth, Karlsruhe
Methanol	Fa. Roth, Karlsruhe
Größenstandard für Proteine	Fa. New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
Protease-Inhibitor	Fa. Roche, Mannheim

Triton X-100 Lysispuffer

20 mM Tris/HCl pH 7,5	Fa. Roth, Karlsruhe
150 mM NaCl (Natriumchlorid)	Fa. Sigma-Aldrich, München
10 mM NaPPi (tetra-Natriumdiphosphat-decahydrat)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
20 mM NaF (Natriumfluorid)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
1 % Triton X-100	Fa. Roth, Karlsruhe

Für Polyacrylamid-Gele:

30 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Fa. Roth, Karlsruhe
1 M Tris/HCl (pH 6,8/pH 8,8)	Fa. Roth, Karlsruhe
10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Sigma-Aldrich, München
10 % AMPS (Ammoniumperoxidisulfat)	Fa. Serva Feinbiochemika, Heidelberg
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Fa. Roth, Karlsruhe

10x Laufpuffer (für SDS-PAGE) auf 1 l

10x Tris / Glycin / SDS	Fa. Bio-Rad GmbH, München
-------------------------	---------------------------

10x Transferpuffer (für Western Blot) auf 1 l

25 mM Tris-Base	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
190 mM Glycin	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt

Bei 10x Konzentrat wurde der pH-Wert nicht eingestellt.

Bei 1x Transferpuffer wurde 20 % Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe) hinzugefügt und der pH-Wert auf 8,3 eingestellt.

Blockierungspuffer auf 1 l

50 mM Tris/HCl (pH-Wert 7,5)	Fa. Roth, Karlsruhe
200 mM NaCl (Natriumchlorid)	Fa. Sigma-Aldrich, München
0,05 % Tween-20	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
3 % BSA (bovines Serumalbumin)	Fa. Roth, Karlsruhe

Primäre Antikörper

Primärantikörper	Größe [kDa]	Verdünnung	Firma
Anti-β-Aktin (Maus)	44	1:2000	Fa. BioVision via BioCat GmbH, Heidelberg
Anti-Bcl-2 (Kaninchen)	26	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-Caspase 3 (Kaninchen)	17, 19, 35	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main

Anti-Caspase 9 (Kaninchen)	17, 35, 37, 47	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-CDK2 (Kaninchen)	33	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-CDK7 (Kaninchen)	40	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-CDK9 (Kaninchen)	42, 55	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-clAP-1 (Maus)	62	1:500	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
Anti-clAP-2 (Kaninchen)	72	1:1000	Fa. Epitomics via Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Mcl-1 (Kaninchen)	35, 40	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-p21 (Kaninchen)	21	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-p53 (Maus)	53	1:1000	Fa. Alexis Biochemicals via AXXORA Deutschland, Lörrach
PARP-Spaltprodukt (Maus)	89	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
anti-Rb (Maus)	110	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
anti-phospho-Thr807/811-Rb (Kaninchen)	110	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main
anti-RNA-Polymerase II (Maus)	200	1:1000	Fa. Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-phospho-Ser2-RNA-Polymerase II (Maus)	200	1:1000	Fa. Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-phospho-Ser5-RNA-Polymerase II (Maus)	220 - 240	1:1000	Fa. Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-Survivin (Kaninchen)	19	1:1000	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
Anti-XIAP (Kaninchen)	53	1:1000	Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main

Alle primären Antikörper wurden je nach Herstellerangaben in Blockierungslösung oder einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver und PBS verdünnt.

Sekundäre Antikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma
Ziege-anti-Maus Antikörper konjugiert mit Meerrettichperoxidase	1:10.000 - 20.000	Fa. Calbiochem via Merck KGaA, Darmstadt
Ziege-anti-Kaninchen Antikörper konjugiert mit Meerrettichperoxidase	1:10.000 - 20.000	Fa. Calbiochem via Merck KGaA, Darmstadt

Alle sekundären Antikörper wurden in der Blockierungslösung verdünnt.

2.3. Verwendete Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl an verschiedenen chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzelllinien aus der *Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection* (www.kent.ac.uk/stms/cmp/RCCL/RCCLabout.html) verwendet. Die chemoresistenten Sublinien wurden durch eine schrittweise Adaptierung der chemosensitiven Zelllinie an das jeweilige Zytostatikum etabliert. Die Schreibweise der resistenten Sublinie ergibt sich wie folgt: Nach dem Zellnamen zeigt ein hochgestelltes „r“, dass es sich um eine resistente Sublinie handelt. Daran schließt sich die Abkürzung des verwendeten Zytostatikums an. Die Konzentration des Zytostatikums, an welche die jeweilige Zelle adaptiert wurde, wird in ng/ml angegeben und ist ebenfalls hochgestellt. So ist beispielsweise die Schreibweise für die Zelllinie UKF-NB-3, welche an

1000 ng/ml Cisplatin adaptiert wurde, UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰. In Tabelle 2.1 sind alle verwendeten Zytostatika und ihre jeweiligen Wirkmechanismen aufgeführt.

Tabelle 2.1: Zur Adaptierung verwendete Zytostatika und ihre jeweiligen Wirkmechanismen

Zytostatikum	Wirkmechanismus
Carboplatin (CARBO)	Platin-Derivat; hemmt Replikation durch Quervernetzung der DNA-Stränge
Cisplatin (CDDP)	Platin-Derivat; hemmt Replikation durch Quervernetzung der DNA-Stränge
Docetaxel (DOCE)	Taxan, bindet an Mikrotubuli und hemmt deren Abbau, blockiert die Mitose
Doxorubicin (DOX)	Anthracyclin, interkaliert in die DNA, hemmt das Enzym Topoisomerase II
Etoposid (ETO)	hemmt das Enzym Topoisomerase II
Gemcitabin (GEMCI)	Nukleosid-Analogon des Cytidin, Hemmung der DNA-Synthese
Melphalan (MEL)	alkylierende Substanz, führt durch Alkylierung von Guanin zur Verknüpfung zweier DNA-Stränge
Nutlin-3 (NUTLIN)	cis-Imidazolin; aktiviert p53 und Apoptose durch Bindung an MDM2
Oxaliplatin (OXALI)	Platin-Derivat, hemmt Replikation durch Quervernetzung der DNA-Stränge
Paclitaxel (PACLI)	Taxan, bindet an Mikrotubuli und deren Abbau, blockiert die Mitose
Vinblastin (VINB)	Vinkaalkaloid, interferiert mit Mikrotubuli; hemmt Aufbau des Spindelapparates
Vincristin (VCR)	Vinkaalkaloid; interferiert mit Mikrotubuli; hemmt Aufbau des Spindelapparates
Vinorelbin (VINOR)	Vinkaalkaloid; interferiert mit Mikrotubuli; hemmt Aufbau des Spindelapparates

Die verwendeten chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzelllinien werden im Folgenden einzeln beschrieben.

Die *NMYC*-amplifizierte parentale chemosensitive humane Neuroblastomzelllinie UKF-NB-2 wurde aus Knochenmarksmetastasen eines Patienten mit Neuroblastom im Stadium 4 nach INSS isoliert (Cinatl et al., 1996; Kotchektov et al, 2003). In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an diverse Zytostatika etablierte chemoresistente Sublinien verwendet:

UKF-NB-2^rCARBO²⁰⁰⁰ (resistent gegen 2000 ng/ml Carboplatin)

UKF-NB-2^rCDDP¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Cisplatin)

UKF-NB-2^rDOCE¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Docetaxel)

UKF-NB-2^rDOX²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Doxorubicin)

UKF-NB-2^rMEL⁶⁰⁰ (resistent gegen 600 ng/ml Melphalan)

UKF-NB-2^rOXALI⁶⁰⁰ (resistent gegen 600 ng/ml Oxaliplatin)

UKF-NB-2^rTOPO¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Topotecan)

UKF-NB-2^rVCR¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vincristin)

UKF-NB-2^rVINB¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vinblastin)

UKF-NB-2^rVINOR¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vinorelbin)

Die *NMYC*-amplifizierte parentale chemosensitive humane Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 wurde aus Knochenmarksmetastasen eines Patienten mit Neuroblastom im Stadium 4 nach INSS isoliert (Cinatl et al., 1993; Kotchektov et al, 2005). In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an diverse Zytostatika etablierte chemoresistente Sublinien verwendet:

UKF-NB-3^rCARBO²⁰⁰⁰ (resistent gegen 2000 ng/ml Carboplatin)

UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Cisplatin)

UKF-NB-3^rDOCE²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Docetaxel)

UKF-NB-3^rDOX²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Doxorubicin)

UKF-NB-3^rETO²⁰⁰ (resistent gegen 200 ng/ml Etoposid)

UKF-NB-3^rGEMCI¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Gemcitabin)

UKF-NB-3^rMEL⁴⁰⁰ (resistent gegen 400 ng/ml Melphalan)

UKF-NB-3^rNutlin^{10 μ M} (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3^rOXALI²⁰⁰⁰ (resistent gegen 2000 ng/ml Oxaliplatin)

UKF-NB-3^rPCL²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Paclitaxel)

UKF-NB-3^rTOPO¹⁵ (resistent gegen 15 ng/ml Topotecan)

UKF-NB-3^rVCR¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vincristin)

UKF-NB-3^rVINB¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vinblastin)

Zusätzlich wurden aus der parentalen Zelllinie UKF-NB-3 10 weitere an Nutlin-3 adaptierte Sublinien etabliert (I-X). Je zwei Sublinien mit einem Wildtyp *TP53*-Gen und zwei, welche eine Mutation im *TP53*-Gen aufweisen, wurden in dieser Arbeit verwendet (Michaelis et al, 2011). Die jeweiligen Mutationen sind in der Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt.

UKF-NB-3^rNutlin^{10 μ M} II (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3^rNutlin^{10 μ M} III (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3^rNutlin^{10 μ M} VI (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3^rNutlin^{10 μ M} VIII (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

Des Weiteren wurde von der parentalen Zelllinie UKF-NB-3 100 Einzelzellklone etabliert und nachfolgend ausgewählte Klone in jeweils 10 Ansätzen (I-X) an Nutlin-3 adaptiert (Michaelis et al, 2011). In dieser Arbeit wurden die chemosensitiven Klone 1 und 3 und diejenigen an Nutlin-3 adaptierten Sublinien verwendet, welche eine Mutation im *TP53*-Gen aufweisen. Die jeweiligen Mutationen sind ebenfalls in der Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt.

UKF-NB-3Klon1

UKF-NB-3Klon1^rNutlin^{10 μ M}II (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon1^rNutlin^{10 μ M}III (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon1^rNutlin^{10 μ M}IV (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon1^rNutlin^{10 μ M}VI (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon1^rNutlin^{10 μ M}VIII (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon1^rNutlin^{10 μ M}X (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon3

UKF-NB-3Klon3^rNutlin^{10 μ M}I (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon3^rNutlin^{10 μ M}IV (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon3^rNutlin^{10 μ M}VII (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon3^rNutlin^{10 μ M}VIII (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-3Klon3^rNutlin^{10 μ M}X (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

Die *NMYC*-amplifizierte parentale chemosensitive humane Neuroblastomzelllinie UKF-NB-4 wurde aus Knochenmarksmetastasen eines Patienten mit Neuroblastom im Stadium 4 nach INSS isoliert (Cinatl et al., 1996).

Die *NMYC*-amplifizierte parentale chemosensitive humane Neuroblastomzelllinie UKF-NB-6 wurde aus Knochenmarksmetastasen eines Patienten mit Neuroblastom im Stadium 4 nach INSS isoliert (Blaheta et al, 2006). In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an diverse Zytostatika etablierte chemoresistente Sublinien verwendet:

UKF-NB-6^rCARBO²⁰⁰⁰ (resistent gegen 2000 ng/ml Carboplatin)

UKF-NB-6^rCDDP¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Cisplatin)

UKF-NB-6^rDOCE²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Docetaxel)

UKF-NB-6^rETO²⁰⁰ (resistent gegen 200 ng/ml Etoposid)

UKF-NB-6^rMEL¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Melphalan)

UKF-NB-6^rNutlin^{10 μ M} (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-6^rOXALI⁴⁰⁰⁰ (resistent gegen 4000 ng/ml Oxaliplatin)

UKF-NB-6^rPCL²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Paclitaxel)

UKF-NB-6^rTOPO²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Topotecan)

UKF-NB-6^rVCR¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vincristin)

UKF-NB-6^rVINOR⁴⁰ (resistent gegen 40 ng/ml Vinorelbin)

Zusätzlich wurden von der parentalen Zelllinie UKF-NB-6 10 weitere an Nutlin-3 adaptierte Sublinien etabliert (I-X). In dieser Arbeit wurden Sublinien verwendet, welche unterschiedliche Mutationen im *TP53*-Gen aufweisen (Michaelis et al., 2011). Die jeweiligen Mutationen sind in der Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt.

UKF-NB-6^rNutlin^{10 μ M}I (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-6^rNutlin^{10 μ M}IV (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-6^rNutlin^{10 μ M}VIII (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

UKF-NB-6^rNutlin^{10 μ M}X (resistent gegen 10 μ M Nutlin-3)

Die *NMYC*-amplifizierte chemosensitive humane Neuroblastomzelllinie IMR-32 wurde von ATCC (Manassas, USA) bezogen und weisen ein Wildtyp *TP53*-Gen auf. In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an diverse Zytostatika etablierte chemoresistente Sublinien verwendet:

IMR-32^fCARBO⁴⁰⁰⁰ (resistent gegen 4000 ng/ml Carboplatin)

IMR-32^fCDDP¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Cisplatin)

IMR-32^fDOX²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Doxorubicin)

IMR-32^fETO¹⁰⁰ (resistent gegen 100 ng/ml Etoposid)

IMR-32^fGEMCI²⁵ (resistent gegen 25 ng/ml Gemcitabin)

IMR-32^fMEL⁵⁰⁰ (resistent gegen 500 ng/ml Melphalan)

IMR-32^fOXALI⁴⁰⁰⁰ (resistent gegen 4000 ng/ml Oxaliplatin)

IMR-32^fTOPO⁸ (resistent gegen 8 ng/ml Topotecan)

IMR-32^fVCR¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vincristin)

IMR-32^fVINOR⁵ (resistent gegen 5 ng/ml Vinorelbin)

Die chemosensitive *NMYC*-amplifizierte Neuroblastomzelllinie IMR-5 wurde freundlicherweise von Dr. Angelika Eggert (Universität Essen) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an diverse Zytostatika etablierte chemoresistente Sublinien verwendet:

IMR-5^fCARBO⁵⁰⁰⁰ (resistent gegen 5000 ng/ml Carboplatin)

IMR-5^fCDDP¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Cisplatin)

IMR-5^fDOCE²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Docetaxel)

IMR-5^fDOX²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Doxorubicin)

IMR-5^fETO¹⁰⁰ (resistent gegen 100 ng/ml Etoposid)

IMR-5^fGEMCI²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Gemcitabin)

IMR-5^fMEL³⁰⁰⁰ (resistent gegen 3000 ng/ml Melphalan)

IMR-5^fOXALI⁴⁰⁰⁰ (resistent gegen 4000 ng/ml Oxaliplatin)

IMR-5^fPCL²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Paclitaxel)

IMR-5^fTOPO²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Topotecan)

IMR-5^fVCR¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vincristin)

IMR-5^fVINOR²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Vinorelbin)

Die chemosensitive *NMYC*-amplifizierte Neuroblastomzelllinie NLF wurde freundlicherweise von Dr. Angelika Eggert (Universität Essen) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an diverse Zytostatika etablierte chemoresistente Sublinien verwendet:

NLF^rCARBO⁵⁰⁰⁰ (resistent gegen 5000 ng/ml Carboplatin)

NLF^rCDDP¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Cisplatin)

NLF^rDOCE²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Docetaxel)

NLF^rDOX⁴⁰ (resistent gegen 40 ng/ml Doxorubicin)

NLF^rETO¹⁰⁰ (resistent gegen 100 ng/ml Etoposid)

NLF^rGEMCI²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Gemcitabin)

NLF^rMEL³⁰⁰⁰ (resistent gegen 3000 ng/ml Melphalan)

NLF^rOXALI⁴⁰⁰⁰ (resistent gegen 4000 ng/ml Oxaliplatin)

NLF^rPCL²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Paclitaxel)

NLF^rTOPO²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Topotecan)

NLF^rVCR⁵ (resistent gegen 5 ng/ml Vincristin)

NLF^rVINB¹⁰ (resistent gegen 10 ng/ml Vinblastin)

Bei der humanen Neuroblastomzelllinie SHEP handelt es sich um einen Subklon der Zelllinie SK-N-SH und wurde freundlicherweise von Dr. Angelika Eggert (Universität Essen) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an diverse Zytostatika etablierte chemoresistente Sublinien verwendet:

SHEP^rCDDP¹⁰⁰⁰ (resistent gegen 1000 ng/ml Cisplatin)

SHEP^rETO¹⁰⁰ (resistent gegen 100 ng/ml Etoposid)

SHEP^rVCR¹ (resistent gegen 1 ng/ml Vincristin)

Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ist ebenfalls ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH und wurde über ATCC bezogen. In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an Cisplatin etablierte chemoresistente Sublinie verwendet:

SH-SY5Y^rCDDP²⁰⁰ (resistent gegen 200 ng/ml Cisplatin)

Die *NMYC*-amplifizierte humane Neuroblastomzelllinie NGP wurde über DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen. In dieser Arbeit wurden die parentale Zelllinie und folgende durch Adaptierung an Gemcitabin etablierte chemoresistente Sublinie verwendet:

NGP^fGEMCI²⁰ (resistent gegen 20 ng/ml Gemcitabin)

Die parentalen humanen Neuroblastomzelllinien BE(2)-C (*NMYC*-amplifiziert), SK-N-AS und SK-N-SH wurden über ATCC, die Zelllinien CHP-134 (*NMYC*-amplifiziert), Kelly (*NMYC*-amplifiziert), LAN2 (*NMYC*-amplifiziert) und NMB (*NMYC*-amplifiziert) über DMSZ und GI-ME-N und LAN5 über ICLC (Genua, Italien) bezogen.

Alle Zelllinien wurden in IMDM, supplementiert mit 100 IU/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO₂, kultiviert.

2.4. Zellkultur

Die Kulturzellen wurden mit dem entsprechenden Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ (v/v) in feuchter Atmosphäre gehalten. Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärenz Zellen. Die am Boden der Zellkulturflasche anhaftenden Zellen wurden im Abstand von sechs bis sieben Tagen durch Trypsinbehandlung abgelöst und geeignete Verdünnungen wurden in neuen Zellkulturflaschen mit frischem Medium eingesät.

2.4.1. Kultivierung und Ernten von Zellen

Nach Kultivierung der adhärenz Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 – 100 % wurde das alte Medium abgenommen und der noch adhärenz Zellrasen mit PBS gewaschen, um noch vorhandene Reste von Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für circa 5 min bei Raumtemperatur (RT) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Das im supplementiertem Medium enthaltene fötale Kälberserum stoppt die Trypsinreaktion. Die durch Suspension vereinzelt Zellen können nun in frische Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten in einer geeigneten Verdünnung je nach nachfolgender Nutzung der Zellen ausgesät werden oder nach vorheriger Behandlung untersucht werden.

2.4.2. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl in einer kultivierten Zellpopulation bestimmen zu können wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, geerntet und in frischem Medium resuspendiert.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des automatisierten Zellzählgerätes Countess (Fa. Invitrogen, Darmstadt) bestimmt. Dazu wurde ein Teil der Zellsuspension 1:1 mit einer 4%igen Trypanblau-Lösung verdünnt. Auf eine zugehörige Einweg-Zählkammer wurden je 10 µl der Lösung aufgetragen und die Zellzahl pro ml durch das Gerät bestimmt. Bei toten Zellen ist die Integrität der Zellmembran im Gegensatz zu lebenden Zellen zerstört und können durch Trypanblau angefärbt werden. Das Zellzählgerät kann dann zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden und auch die Prozentzahl der vitalen Zellen bestimmen.

2.5. MTT-Viabilitätsassay

Mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassays kann der Anteil der lebenden Zellen in einer Kultur bestimmt werden (Mosmann, 1983). Das Prinzip beruht auf der kolorimetrischen Reduktion des gelben wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) zu unlöslichen violetten Formazankristallen durch zelluläre Succinat-Dehydrogenasen (siehe Abbildung 2.1). Diese Reaktion kann nur in lebenden, proliferierenden Zellen stattfinden, da diese Dehydrogenasen nur dann aktiv sind.

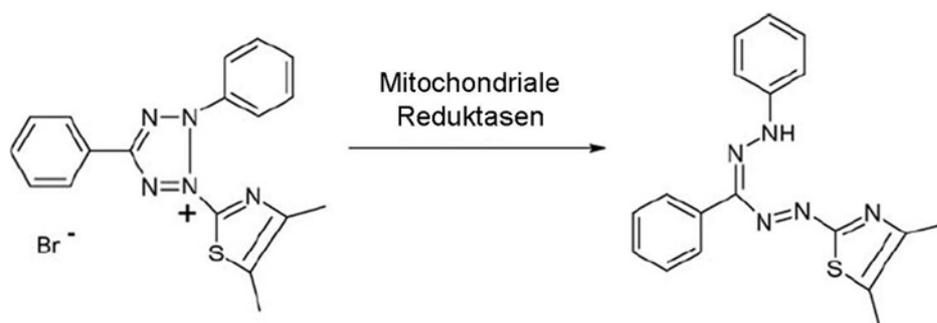


Abbildung 2.1: Umsetzung des gelben MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid) zu dem wasserunlöslichen violetten Formazan (Scudiero et al, 1988)

Die zu testende Substanz wird in 8 Verdünnungsstufen (jeweils 1 zu 2 verdünnt) auf eine 96-Lochplatte aufgetragen und die daran zu testenden Zellen in Suspension dazugegeben. Als Zellkontrolle wird in die beiden letzten Reihen die Zellsuspension ohne Stoffzusatz aufgetragen und die ersten beiden Reihen dienen als Mediumkontrolle. Bei Kombinationsansätzen wird auf der unteren Hälfte der Platte zusätzlich zu der zu testenden Substanz der entsprechende Inhibitor in einer festen Konzentration hinzugegeben. Insgesamt hat jeder Ansatz ein Endvolumen von 100 μ l.

Die Zellen wurden in den Platten mit der Substanz für 120 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde pro Loch 25 μ l MTT-Lösung (2 mg/ml in PBS) hinzugegeben und für nochmals 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 μ l einer 20 %igen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS, 1:1 in doppelt destilliertem Wasser und Dimethylformamid gelöst) dazu pipettiert. SDS dient hierbei als Detergenz zur Auflösung der ausgefallenen Formazankristalle über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂. Danach wurden die 96-Lochplatten mithilfe eines Plattenphotometers bei den Wellenlängen 560 nm und 620 nm ausgelesen und die optische Dichte (OD) durch die Ermittlung der Differenz bestimmt. Die OD ist umso höher, je mehr Formazankristalle umgesetzt wurden, das heißt je höher der Anteil lebender, proliferierender Zellen in der Kultur war. Zur Berechnung des prozentualen Anteils lebender beziehungsweise toter Zellen aus den gemessenen optischen Dichten bei einzelnen Konzentrationen der zu testenden Substanz wurde der Mittelwert der Zellkontrolle nach Abzug der OD der Mediumkontrolle als 100 % lebende Zellen gesetzt. Die Mittelwerte der anderen Proben wurden nachfolgend im Verhältnis dazu in Prozentwerte umgerechnet. Bei Kombinationsansätzen von Substanz und beispielweise Inhibitor wurde die Zellkontrolle mit zugegebenem Inhibitor ebenfalls mit in der Auswertung berücksichtigt.

Die Bestimmung des IC₅₀- und IC₉₀-Wertes (*inhibitory concentration 50 und 90*) wurde mit Hilfe des Programmes CalcuSyn durchgeführt. Der IC₅₀-Wert gibt an, bei welcher Konzentration der untersuchten Substanz 50 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Der IC₉₀-Wert gibt die Konzentration der untersuchten Substanz an, bei welcher 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind.

2.6. Markierung lebender und toter Zellen durch Fluoreszenzfarbstoffe

Lebende und tote Zellen besitzen jeweils einzigartige Eigenschaften, welche zur Visualisierung mittels fluoreszierender Farbstoffe genutzt werden können. Lebende Zellen sind durch die Anwesenheit einer universellen intrazellulären Esteraseaktivität charakterisiert, welche in der Lage sind das Zellmembran-permeable nicht-fluoreszierende Calcein AM zu spalten, wobei das durch Calciumbindung im grünen Bereich fluoreszierende Calcein entsteht. Diese Esterasen sind in toten Zellen nicht mehr aktiv und weisen daher keine grüne Fluoreszenz auf. Dagegen kann in diese Zellen aufgrund ihrer nicht mehr intakten Zellmembran der Farbstoff Ethidiumbromid eindringen, welcher sich in die DNA interkaliert und dann mit 40facher Intensität im Vergleich zu nicht gebundenem Ethidiumbromid im roten Bereich fluoresziert. Durch die Verwendung beider Farbstoffe in Kombination können in einer Kultur somit lebende und tote Zellen nebeneinander sichtbar gemacht werden. In Vorversuchen wurde die Konzentration beider Farbstoffe an das Zellmodell angepasst, um ein optimales Färberegebnis zu erhalten. Die endgültig im Versuch eingesetzte Konzentration von Calcein AM betrug 50 nM (Stammlösung 4 mM) und für Ethidiumbromid 500 nM (Stammlösung 2 mM). Die zuvor behandelten Tumorsphären wurden im Anschluss an die Inkubationszeit mit der entsprechend vorverdünnten Calcein AM- und Ethidiumbromidlösung als Doppelfärbung für 30 - 45 min behandelt und nachfolgend am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.7. Bestimmung der Expression von ABCB1 am Durchflusszytometer

Für die Bestimmung der Expression von ABCB1 (auch als P-Glykoprotein oder MDR1 bezeichnet) am Durchflusszytometer wurden fluoreszierende Antikörper verwendet. Für jede mit Antikörpern markierte Probe im Dreifachansatz wurden eine unbehandelte Kontrolle und eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Die unbehandelte Kontrolle dient zur Einstellung am Durchflusszytometer für die jeweilige Zelllinie und zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zellen. Die Isotypenkontrolle wird mit einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper markiert, welcher der gleichen Immunglobulinklasse des Erstantikörpers entspricht und stellt die unspezifische Bindung des Erstantikörpers nach. Der Wert der gemessenen Fluoreszenz wird im Anschluss von der markierten

Probe subtrahiert. Dafür wurden die zu untersuchenden Zellen bei einer Konfluenz von circa 80 % durch Trypsinierung geerntet, in PBS mit 10 % FKS resuspendiert und jeweils 1×10^6 Zellen pro Ansatz in Rundbodenröhrchen verteilt. Da der Antikörper gegen MDR1 ein extrazelluläres Epitop bindet, ist eine Permeabilisierung der Zellmembran nicht notwendig. Daher wurde der gegen MDR1 gerichtete Maus-Erstantikörper nach der Zentrifugation in einer Verdünnung von 1:20 direkt auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurde der Phycoerythrin (PE)-markierte anti-Maus-Sekundär-antikörper unverdünnt hinzugefügt und nochmals für 30 min bei 4°C inkubiert. Gleichzeitig wurden die Kontrollproben mit der PE-markierten Isotypenkontrolle inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen nochmalig mit PBS gewaschen und nach der Zentrifugation in PBS aufgenommen. Direkt im Anschluss wurden die Proben am Durchflusszytometer FACSCanto II analysiert.

2.8. Akkumulation des MDR1-Substrates Rhodamin 123

Rhodamin 123 ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, welcher im PE-Kanal des FACS Canto II detektiert werden kann. Eine besondere Eigenschaft von Rhodamin 123 ist, dass er durch den ABC-Transporter MDR1 aus der Zelle transportiert werden kann. Dies kann bei Untersuchungen von MDR1 genutzt werden, da es in Zellen, welche kein MDR1 exprimieren, akkumuliert, während es aus MDR1-exprimierenden Zellen hinaus transportiert wird. Auch kann es genutzt werden, potentielle Inhibitoren für MDR1 zu untersuchen.

Dazu wurde die stark MDR1-exprimierende UKF-NB-3^rVCR¹⁰ Zelle zunächst in 12-Lochplatten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz von circa 60-80 % wurden die Zellen für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von SNS-032 und als Positivkontrolle mit 10 µM Verapamil bei 37 °C und 5 % CO₂ vorbehandelt. Als Negativkontrolle dient eine unbehandelte Probe. Im Anschluss wurde 1 µM Rhodamin 123 hinzugefügt und die Zellen für nochmals 30 min inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und wieder mit Medium und SNS-032 bzw. Verapamil versetzt. Nach weiteren 30 min (Effluxphase) wurden die Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und im FACS Canto II Durchflusszytometer auf ihre Fluoreszenz analysiert.

2.9. RNA Interferenz mittels Transfektion von siRNA

Das Einschleusen fremder DNA oder RNA in lebende Zellen kann zur Aufklärung der Funktionen einzelner Proteine genutzt werden. Zum einen kann die Expression eines Proteins durch das Einbringen eines Expressionsvektors, welcher das Gen für das zu untersuchende Protein enthält, stark gesteigert werden. Bei der RNA-Interferenz dagegen kann die intrazelluläre Expression eines Proteins durch Einbringen einer synthetischen RNA, welche komplementär zur mRNA des zu untersuchenden Proteins ist und auch *short interfering RNA* (siRNA) genannt wird, unterdrückt werden. Für das Einschleusen fremder DNA oder RNA existieren verschiedene Methoden, welche sich in Effizienz, Material- und Arbeitsaufwand unterscheiden. Eine der am häufigsten angewendeten Methoden ist die Transfektion, bei welcher Expressionsplasmide oder siRNA direkt von der Zelle aufgenommen werden. Die siRNA wurde mittels Elektroporation in die Neuroblastomzellen eingebracht. Dazu wurde das Elektroporationsgerät NEON (Fa. Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Dabei werden die Zellen in Suspension zusammen mit der siRNA einer elektrischen Spannung ausgesetzt, was eine Permeabilisierung der Zellmembran für die Dauer des Pulses zur Folge hat und die siRNA in das Zellinnere diffundieren kann. Um ein optimales Transfektionsergebnis zu erhalten muss jede Zelllinie im Voraus mit Hilfe von 24 unterschiedlichen Elektroporationsprogrammen mit variabler Spannung, Pulslänge und Anzahl der Pulse behandelt werden. Dabei sollte die Transfektionseffizienz möglichst hoch und die Mortalität der Zellen niedrig sein um sie für nachfolgende Untersuchungen verwenden zu können. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion nochmalig passagiert, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von circa 60 – 80 % aufwiesen und sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Vor jeder Transfektion wurden die Gewebekulturplatten mit 100 µg/ml Fibronectin für 45 min bei RT beschichtet um eine bessere Anhaftung der Zellen an den Plattenboden nach der Transfektion zu erreichen.

Zur RNAi-vermittelten Unterdrückung der Proteinexpression von ABCB1, CDK2, CDK7, CDK9, Mcl-1 (*MCL1*) und Survivin (*BIRC5*) wurden je 4 verschiedene siRNAs verwendet, welche als Mischung im *ON-TARGETplus SMARTpool* (Fa. Dharmacon / Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) enthalten waren. Die einzelnen siRNA-Sequenzen sind im Anhang in Tabelle A.2 aufgeführt.

2.9.1. Transfektionsoptimierung

Bei der Optimierung der Transfektion wurde eine fluoreszierende Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-markierte siRNA (Fa. Invitrogen, Darmstadt) verwendet, welche gegen kein konkretes Zielgen des humanen Genoms gerichtet ist und mit dessen Hilfe die Transfektionseffizienz am Durchflusszytometer untersucht werden kann.

Die verwendeten UKF-NB-3 Zellen wurden wie zuvor beschrieben 24 h vor der Transfektion mit einer Verdünnung von 1:3 passagiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für einen vollständigen Optimierungsansatz wurde eine 24-Lochplatte zunächst wie zuvor beschrieben mit Fibronectin beschichtet und dann mit je 500 µl Medium pro Loch versetzt und bei 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben geerntet und die Zellzahl bestimmt. Pro Ansatz und Elektroporationsprogramm wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen verwendet und für einen vollständigen Optimierungsansatz wurde mit 30 Einzelansätzen gerechnet, sodass insgesamt $4,5 \times 10^6$ Zellen benötigt wurden. Die gewünschte Anzahl der Zellen wurde für 5 min bei 150 g zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen, um die Zellen für die Elektroporation vorzubereiten. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Zellpellet in 297 µl Resuspensionspuffer R (Fa. Invitrogen, Darmstadt) aufgenommen und mit 500 nM FITC-markierter siRNA versetzt. Dann wurden je $1,5 \times 10^5$ Zellen mit einem der 24 im Elektroporationsgerät voreingestellten Programmen in einer 10 µl Elektroporationsspitze behandelt und in die vorgewärmte 24-Lochplatte überführt und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Analyse der Transfektionseffizienz und Viabilität erfolgte am FACS Canto II Durchflusszytometer. Für die Bestimmung der Viabilität wurden die geernteten Zellen direkt vor der Durchflusszytometrie mit 1 µg/ml Propidiumjodid (PI) versetzt, welches im roten Wellenlängenbereich fluoresziert und sich in die DNA interkalieren kann. Lebende Zellen werden von PI infolge der intakten Zellmembran nicht gefärbt, während beschädigte oder tote Zellen durch PI markiert werden. Die Transfektionseffizienz wurde über den Nachweis FITC-positiver Zellen und deren prozentualen Anteil gegenüber nicht fluoreszierenden Zellen bestimmt. Die Signalstärke wurde als Ausdruck der Anzahl an aufgenommenen siRNA-Molekülen pro Zelle ebenfalls bei der Auswahl des optimalen Transfektionsprogrammes berücksichtigt.

2.9.2. Transfektion

Das durch die Transfektionsoptimierung ermittelte erfolgreichste Elektroporationsprogramm wurde für alle Transfektionen der UKF-NB-3 Zellen verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte entsprechen weitestgehend der Optimierung. Dazu wurden 6-Lochplatten mit 100 µg/ml Fibronectin beschichtet und im Anschluss mit 2 ml Medium versehen und bei 37 °C vorgewärmt. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Bei der Transfektion wurden alle Kontrollen und Zielgene im Doppelansatz durchgeführt. Daraus ergibt sich bei der Transfektion von einer gegen ein Zielgen gerichteten siRNA eine benötigte Zellzahl von 6×10^6 Zellen, da eine Kontrolle nur mit siRNA Puffer und eine mit einer *scrambled* siRNA transfiziert wurde. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 600 µl Resuspensionspuffer R aufgenommen und je 200 µl zu der entsprechenden siRNA mit einer Endkonzentration von 2,5 µM pipettiert. Nach erfolgter Transfektion der Zellen in einer 100 µl Elektroporationsspitze wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss in unterschiedlichen Assays, wie beispielsweise dem RNA-Synthese-Assay, der Sub-G₁-Analyse oder Western Blot Analyse untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist der Effekt der Hemmung des Zielgenes am stärksten.

2.10. Proteinbiochemische Methoden

2.10.1. Proteinextraktion

Zur Untersuchung einzelner Proteine müssen die Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers aufgebrochen und die Proteine in Lösung gebracht werden. Die Zelllyse fand kontinuierlich auf Eis statt. Zu je 10 ml Triton X-100-Lysepuffer wurde je eine Tablette mit Proteaseinhibitoren (cOmplete Mini, Roche, Mannheim) frisch hinzugegeben. Die zu untersuchenden Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Triton X-100-Lysepuffer für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Zelllysate in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Der entstandene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bei -20 °C gelagert werden.

2.10.2. Bestimmung der Proteinkonzentration und Probenvorbereitung

Die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate wurde mit Hilfe des „DC (Detergent Compatible) Protein Assay“-Kits bestimmt, welcher die Reagenzien A, B und S beinhaltet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al, 1951). Dabei erfolgt die Quantifizierung der Proteinkonzentration in zwei Schritten. Zunächst bildet sich im alkalischen Milieu ein Komplex aus zweiwertigen Kupfer-Ionen und den Peptidbindungen der Proteine. Im zweiten Schritt wird das Kupfer-Ion zu einem einwertigen Kupfer-Ion reduziert, welches dann das zugegebene gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (B) kolorimetrisch zu Molybdänblau reduziert. Die so entstandene Blaufärbung kann nun am Photometer bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen von bovines Serumalbumin (BSA) hergestellt (0,5; 1; 1,5; 2 und 2,5 mg/ml). Auf einer 96-Lochplatte wurden von jedem Lysat und Standardlösung je 5 µl im Dreifachansatz aufgetragen. Danach wurden je 25 µl einer Mischung aus Reagenz A und S (50:1) zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde zu jeder Probe 200 µl Reagenz B zugegeben und nochmal für 10 min inkubiert, bevor die optische Dichte (OD) mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt wurde. Aus den Mittelwerten der Standardlösungen wurde eine Eichkurve erstellt und mit Hilfe der Formel für die Trendlinie die Konzentration der Proteinlysate errechnet. Zusammengehörige Proben aus einer Behandlung wurden entweder auf 2 mg/ml oder die niedrigste vorhandene Proteinkonzentration durch Zufügen von Triton X-100-Lysepuffer eingestellt. Zum Abschluss wurden die Proben 1:1 mit Laemmli-Puffer (mit 5 % β-Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die fertig eingestellten Proben können bei -20 °C gelagert werden.

2.10.3. Gelelektrophorese

Proteine und Proteingemische können mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schagger und Jagow (1987) zur weiteren Analyse ihrer molekularen Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Polyacrylamidgele enthalten ein Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid (Mischverhältnis 37,5:1), welches durch Polymerisation eine netzartige Struktur ausbildet. Bei niederprozentigen Acrylamidgelen ist das ausgebildete Netzwerk

großmaschiger und setzt größeren Molekülen einen geringeren Widerstand entgegen. Zur Auftrennung kleinerer Proteine dagegen werden höherprozentige Gele verwendet.

Trenngel:	8-15 %	Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) (v/v)
	1 M	Tris/HCl; pH 8,8
	0,1 %	10% SDS (w/v)
	0,5 %	10% APS (v/v)
	0,05 %	TEMED (v/v)
Sammelgel:	5 %	Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) (v/v)
	1 M	Tris/HCl; pH 6,8
	0,075 %	10% SDS (w/v)
	1 %	10% APS (v/v)
	0,1 %	TEMED (v/v)

Zunächst wurde in einer horizontalen Gelkammer ein 8 - 15 %iges Trenngel, je nach der molekularen Größe des untersuchten Proteins, gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation ist nach circa 20 min abgeschlossen und nach Abgießen des Isopropanols wurde das 5 %ige Sammelgel über das Trenngel gegossen und die Geltaschen durch Einführen eines Gelkammes geformt. Das Sammelgel enthält immer einen niedrigeren Anteil an Acrylamid als das Trenngel und dient dem Sammeln der Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zur schärferen Auftrennung der einzelnen Proteinbanden. Nach weiteren 20 min ist das Sammelgel ebenfalls auspolymerisiert und die Gele können über Nacht bei 4 °C aufbewahrt werden. Für die Gelelektrophorese wurden die Gele in die Halterung eingespannt und in die zugehörige Kammer gesetzt. Diese wurde mit 1x Laufpuffer aufgefüllt und die Geltaschen mit einer Kanüle gespült. Pro Geltasche wurden im Anschluss 15 µl Probe aufgetragen und in die erste Geltasche 5 µl Größenstandard. Die Elektrophorese erfolgte für 2 - 2,5 h bei einer Spannung von 120 V.

2.10.4. Western Blot und spezifischer Nachweis von Proteinen

Mit dem Verfahren des Western Blots werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine geeignete Trägermembran überführt und somit immobilisiert. Anschließend erfolgt unter Verwendung spezifischer Antikörper der Nachweis der zu untersuchenden Proteine. Dabei werden spezifische Primärantikörper

gegen das entsprechende Protein mit nachfolgender Bindung von Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern gegen die Spezies des entsprechenden ersten Antikörpers eingesetzt. Der Nachweis erfolgt im Anschluss durch die Umsetzung eines Substrates durch die Meerrettich-Peroxidase.

Der Transfer erfolgte durch Nassblotverfahren mit einem Ein-Puffer-System. Das Gel wurde zusammen mit einer in Transferpuffer äquilibrierten Nitrozellulosemembran (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) zwischen zwei ebenfalls in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere und zwei Schwämme in eine Transferkammer gespannt und in die Transferapparatur eingesetzt. Die Transferkammer wurde dann mit Puffer aufgefüllt und die Proteine mit einer elektrischen Stromstärke von 500 mA für 1 h übertragen. Zur Prüfung der Effizienz und des gleichmäßigen Transfers der Proteine aus dem Gel auf die Membran kann diese nach dem Transfer reversibel mit PonceauS-Lösung angefärbt werden. Dabei werden die Proteine auf der Membran zusätzlich fixiert. Der Farbstoff kann mit PBS mit 0,3 % Tween-20 wieder von der Membran entfernt werden.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran für 40 min bei RT mit Blockierungspuffer oder PBS mit 0,5 % Magermilchpulver inkubiert. Der primäre Antikörper wird je nach Herstellerangaben (1:500 bis 1:2000) in 10 ml Blockierungspuffer oder PBS mit 0,5 % Magermilchpulver verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C darin inkubiert. Alternativ kann die Membran auch für 2 h bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert werden. Bei primären Antikörpern mit schwacher Bindungseffizienz kann das Signal durch Verdünnung des Antikörpers in der Lösung 1 des „*Signal BoostTM Immunoreaction Enhancer Kit*“ (Fa. Calbiochem, Darmstadt) verstärkt werden. Nach erfolgter Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran dreimal für je 10 min mit Waschpuffer gewaschen um überschüssige Antikörpermoleküle zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran nochmals für 40 min mit Blockierungspuffer bei RT inkubiert, bevor der sekundäre Antikörper in einer 1:20.000 Verdünnung in PBS für 1 h bei RT auf die Membran gegeben wurde. An den sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche im späteren Verlauf die Chemolumineszenzreaktion katalysiert. Im Falle der Nutzung des „*Signal BoostTM Immunoreaction Enhancer Kits*“ wurde der sekundäre Antikörper in der Lösung 2 verdünnt.

Anschließend wurde die Membran nochmals dreimal für je 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgt die Visualisierung der Proteinbanden mit Hilfe des „*ECL (enhanced chemoluminescence) Western Blotting Analyses Systems*“. Bei diesem wird

Luminol durch die an den Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase oxidiert und emittiert Photonen. Dafür wurde die Membran für circa 1 min in der ECL-Lösung inkubiert und anschließend in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Im Dunkeln wurde dann ein ECL-Film für unterschiedlich lange Zeitpunkte aufgelegt. Die Belichtungszeit ist dabei abhängig von der Spezifität des Antikörpers und der Expression des nachzuweisenden Proteins. Der belichtete Röntgenfilm wurde dann mittels Standardmethoden entwickelt, getrocknet und digitalisiert.

2.11. RNA-Synthese-Assay

Um die globale Neusynthese von mRNA in Zellen zu untersuchen, wurde der Click-iT RNA Alexa Fluor 488 HCS Assay (Fa. Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Bei diesem wird den zu untersuchenden Zellen ein Alkyl-modifiziertes Nukleosid, das 5-Ethynyluridin (EU), zugegeben, welches dann bei der Neusynthese von RNA anstelle von Uridin in die naszente RNA eingebaut wird. Die Detektion erfolgt anschließend durch Zugabe eines Azid-modifizierten fluoreszenten Farbstoffes (Alexa Fluor 488), welcher durch eine chemoselektive Ligation oder „click“ Reaktion zwischen einem Azid und einem Alkyl an das eingebaute EU bindet (siehe Abbildung 2.2).

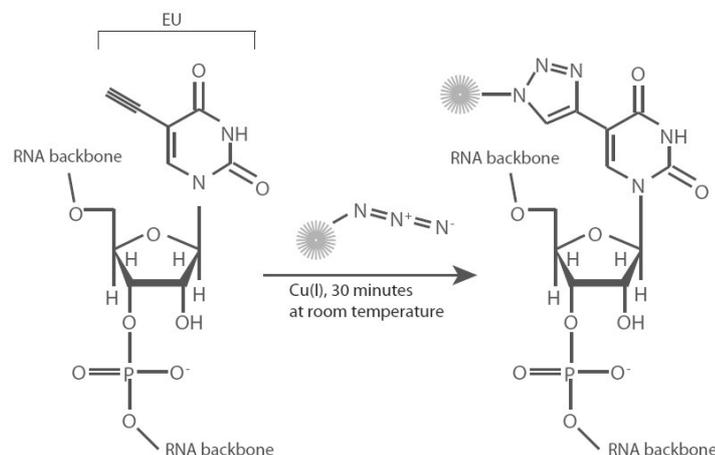


Abbildung 2.2: Reaktion zur Markierung neu synthetisierter RNA

Das Nukleosid-Analogon 5-Ethynyluridin (EU) wird anstelle von Uridin in die mRNA eingebaut und dann anschließend durch eine Reaktion mit einem Fluoreszenzmolekül markiert.

Aus einer 80 – 90 % konfluenten Zellkultur von UKF-NB-3 und IMR-32 wurden je 1×10^5 Zellen pro Loch in 24-Lochplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Anhaftung an den Plattenboden zu erlauben. Dann wurden die

Zellen im Dreifachansatz mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNS-032 und als Positivkontrolle mit 100 ng/ml Actinomycin D für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ vorbehandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Alternativ wurden UKF-NB-3 Zellen mit siRNA gegen CDK7 und CDK9 transfiziert und nach 48 h Inkubationszeit weiter behandelt. Im Anschluss wurde den behandelten und unbehandelten Zellen 1 mM EU hinzugefügt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die nun markierten Zellen wurden in Rundbodenröhrchen überführt, mit 4 % Formaldehyd für 15 min bei RT fixiert und mit 0,1 % Triton X-100 für weitere 15 min bei RT permeabilisiert. Für die Detektion der eingebauten EU Moleküle wurden die Zellen anschließend mit dem Alexa Fluor-Azid enthaltenden Click-iT Reaktionspuffer für 30 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Nach erfolgtem Waschschriff mit dem Click-iT Reaktionswaschpuffer, welcher die Reaktion zwischen Azid und Alkyl stoppt, wurde die markierte RNA in den Zellen mittels Durchflusszytometrie im FITC-Kanal quantifiziert.

2.12. Nachweis der BAX-Aktivierung

Bei der Aktivierung des Proteins BAX während der Apoptose erfolgt eine Änderung der Konformation innerhalb des BAX Moleküls in der mitochondrialen Membran, wodurch ein Epitop frei wird, welches im nicht-aktiven Zustand verdeckt wird und dann im aktivierten Zustand durch einen primären anti-BAX-Antikörper (clone 6A7, BD Pharmingen, Heidelberg) erkannt werden kann.

UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Anhaftung an den Plattenboden zu erlauben. Die Zellen wurden dann für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNS-032 behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen in Rundbodenröhrchen überführt, mit 4 % Formaldehyd für 15 min bei RT fixiert und mit dem Permeabilisierungspuffer „Cytoperm“ (BD Biosciences, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers für weitere 15 min bei RT permeabilisiert. Dann wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C mit in Permeabilisierungspuffer verdünnten anti-BAX-Antikörper inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit einem PE-markierten Sekundärantikörper für weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Prozentsatz an Zellen, welche aktiviertes BAX aufweisen, wurde am Durchflusszytometer quantifiziert.

2.13. Analyse des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi$)

Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi$) wurde mit Hilfe des „BD MitoScreen / Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit“ (BD Biosciences, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers untersucht. Dieser Assay nutzt die Eigenschaft des membran-permeablen lipophilen 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbo-cyanin-Iodid JC-1 (*1st J-aggregate-forming cationic dye found to be sensitive to the $\Delta\psi$*) aus, in zwei verschiedenen Zuständen abhängig vom mitochondrialen Membranpotential existieren zu können, welche entsprechend im FITC- oder PE-Kanal eines Durchflusszytometers nachgewiesen werden können. Bei niedrigen JC-1 Konzentrationen liegen die Moleküle als Monomere vor und fluoreszieren im grünen Wellenlängenbereich, während sie in höheren Konzentrationen Aggregate ausbilden, welche im Vergleich zu Monomeren eine rote Spektralverschiebung und ein höheres Niveau an roter Fluoreszenz aufweisen. Die Aufnahme der JC-1-Moleküle in die Mitochondrien ist vom $\Delta\psi$ abhängig. Das mitochondriale Membranpotential gesunder Zellen ist polarisiert und JC-1 diffundiert schnell in die Mitochondrien und fördert die Ausbildung von JC-1 zu Aggregaten. In Mitochondrien mit depolarisiertem $\Delta\psi$ verbleiben die JC-1-Moleküle im Zytoplasma als Monomere vorliegen. Auf diese Weise können Zellen mit unterschiedlichem $\Delta\psi$ im Durchflusszytometer differenziert werden.

Aus einer 80 – 90 % konfluenten Zellkultur von UKF-NB-3 und IMR-32 wurden je 5×10^5 Zellen pro Loch in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Anhaftung an den Plattenboden zu erlauben. Die Zellen wurden dann für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNS-032 behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach erfolgter Behandlung wurden je 1×10^6 Zellen in Rundbodenröhrchen überführt und für 15 min bei 37 °C mit JC-1 in Assaypuffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Assaypuffer wurde das mitochondriale Membranpotential im Durchflusszytometer untersucht.

2.14. Nachweis der Cytochrom C Freisetzung

Aus einer 80 – 90 % konfluenten Zellkultur von UKF-NB-3 und IMR-32 wurden je 5×10^5 Zellen pro Loch in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert, um eine Anhaftung an den Plattenboden zu erlauben. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNS-032 behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach erfolgter Inkubation wurden je 1 x 10⁶ Zellen in Rundbodenröhrchen überführt, mit kaltem PBS gewaschen und mit 10 ng/ml Digitonin in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert, damit freigesetztes Cytochrom C aus den Zellen ausgewaschen werden kann. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd für weitere 15 min bei RT fixiert und für 1 h bei RT auf einem Schüttler mit Blockierungspuffer (0,05 % Saponin und 3 % BSA in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 1:1000 Verdünnung des primären Maus anti-Cytochrom C-Antikörper (6H2.B4, BD Pharmingen, Heidelberg) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde der PE-markierte sekundäre anti-Maus-Antikörper für 40 min bei 4 °C hinzugefügt und anschließend mit PBS gewaschen. Der Gehalt an Cytochrom C innerhalb der Zellen wurde im Anschluss am Durchflusszytometer bestimmt.

2.15. Caspase 3/7 Aktivitäts-Assay

Für die Bestimmung der Aktivität von Caspase 3 und 7 wurde das „Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Systems“ Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses beruht auf der Spaltung eines prolumineszenten Caspase 3/7 DEVD-Aminoluciferinsubstrates durch aktivierte Caspase 3/7 und die nachfolgende Umsetzung des Substrates durch Luciferase, welche in einem chemolumineszenten Signal resultiert und photometrisch bestimmt werden kann.

Dazu wurden aus einer 80 – 90 % konfluenten Zellkultur von UKF-NB-3 und IMR-32 je 2,5 x 10⁴ Zellen pro Loch in 96-Lochplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Anhaftung an den Plattenboden zu erlauben. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNS-032 für 6 und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einem Endvolumen von 100µl pro Loch behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Zur Detektion der Caspase 3/7 Aktivität wurden je 100 µl pro Loch des „Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Systems“ Substrates hinzugefügt und die Gewebekulturplatte für 10 min bei RT auf einem Schüttler bei 300 rpm geschüttelt. Das Substrat wurde zuvor frisch in dem zugehörigen Assaypuffer aufgelöst. Anschließend wurde die Chemolumineszenz mit Hilfe des Photometers bestimmt.

2.16. Bestimmung von Zellen in der Sub-G₁-Phase

Für die Bestimmung von Zellen innerhalb einer Zellpopulation, welche sich in der Sub-G₁-Phase befinden, wurde die DNA der Zellen mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher in die DNA interkaliert. Dadurch ist der DNA-Gehalt der Zelle im Durchflusszytometer nachweisbar.

Aus einer 80 – 90 % konfluenten Zellkultur von UKF-NB-3 und IMR-32 wurden je 5×10^5 Zellen pro Loch in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Anhaftung an den Plattenboden zu erlauben. Die Zellen wurden dann für 24 und 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNS-032 inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach erfolgter Inkubation wurden je 1×10^6 Zellen in Rundbodenröhrchen überführt, mit PBS gewaschen und das Zellpellet mit einem eiskaltem Ethanol-PBS-Gemisch (90 % (70%iger) Ethanol / 10 % PBS) tropfenweise auf dem Vortexer resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen und der DNA wurden die Proben mindestens 24 h bei – 20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 2000 g zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und dann für 20 min bei RT im Dunkeln mit der PI-Arbeitslösung (20 µg/ml PI und 0,001 % Triton X-100 in PBS) behandelt. Die Detektion des DNA-Gehaltes erfolgte im Anschluss am Durchflusszytometer im PE-Kanal.

2.17. Xenograft Experimente

Die Xenograftexperimente im Mausmodell wurden in Kooperation mit EPO Berlin durchgeführt. Als Mausmodell wurden männliche NMRI:nu/nu Mäuse verwendet. Die Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Je 1×10^7 UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ Zellen wurden den Mäusen zusammen mit 50 % Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg) subkutan in die rechte Flanke injiziert. Bei einer tastbaren Größe der wachsenden Tumore an Tag 21 wurden die Tiere in zwei Gruppen von je 6 Mäusen unterteilt. Die Behandlung von SNS-032 wurde in Form von 30 mg/kg, gelöst in einer wässrigen 2,1 mmolaren Weinsäure-Lösung, intraperitoneal an Tag 21, 24 und 27 durchgeführt. Tiere in der Kontrollgruppe wurden nur mit der Weinsäure-Lösung an den gleichen Tagen behandelt. Die Größe der Tumore wurde zweimal pro Woche mit einem Messschieber bestimmt. Das Tumolvolumen wurde mit Hilfe der Formel: $\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Breite}^2/2$ berechnet.

Die Experimente wurden beendet, als die Tumore der Kontrollgruppe eine Größe von über 1 cm³ aufwiesen.

3. Ergebnisse

3.1. Antitumorale Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen

3.1.1 Antitumorale Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen *in vitro*

Die antitumorale Wirkung von SNS-032 wurde zunächst mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassays in einer Auswahl von 113 Neuroblastomzelllinien aus der *Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection* (www.kent.ac.uk/stms/cmp/RCCL/RCCLabout.html) untersucht. Diese Auswahl bestand aus 19 parental chemosensitiven Neuroblastomzelllinien und 94 adaptierten Sublinien mit einer erworbenen Resistenz zu 14 verschiedenen antitumoralen Medikamenten. Anhand der im MTT-Viabilitätsassay bestimmten Daten wurden die Konzentrationen von SNS-032 berechnet, welche die Zellviabilität um 50 % (IC_{50} , *inhibitory concentration*) beziehungsweise 90 % (IC_{90}) nach einer Behandlungsphase von 120 h vermindern. Die IC_{50} - und IC_{90} -Werte für SNS-032 der in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastomzelllinien sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die bestehende Resistenz der einzelnen Sublinien wurde zuvor mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassays mit den entsprechenden Zytostatika nachgewiesen (Löschmann et al., 2013, Ergänzungstabelle 1).

Tabelle 3.1: Konzentrationen von SNS-032, welche die Zellviabilität von Neuroblastomzellen um 50 % (IC_{50}) beziehungsweise 90 % (IC_{90}) im MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h vermindern. ¹ Verhältnis der IC_{50} - bzw. IC_{90} -Werte der chemoresistenten Sublinie im Vergleich zu der entsprechenden parental Neuroblastomzelllinie

Zelllinie	Wirkung von SNS-032	
	IC_{50} (nM)	IC_{90} (nM)
Be(2)C	508,9 ± 43,3	1230,3 ± 69,5
CHP-134	104,5 ± 3,7	226,7 ± 10,2
GI-ME-N	188,2 ± 4,3	259,0 ± 9,0
IMR-5	126,2 ± 6,6	181,4 ± 3,3
IMR-5 ^r CARBO ⁵⁰⁰⁰	114,5 ± 5,7 (0,91) ¹	160,4 ± 4,2 (0,88)
IMR-5 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	158,4 ± 14,5 (1,26)	332,8 ± 16,7 (1,83)
IMR-5 ^r DOCE ²⁰	14615 ± 361 (115,81)	> 20000 (110,25)
IMR-5 ^r DOX ²⁰	1161 ± 66 (9,20)	2141 ± 63 (11,80)

IMR-5 ^r ETO ¹⁰⁰	101,9 ± 5,2 (0,81)	158,6 ± 7,0 (0,87)
IMR-5 ^r GEMCI ²⁰	130,3 ± 8,6 (1,03)	188,2 ± 6,4 (1,04)
IMR-5 ^r MEL ³⁰⁰⁰	102,7 ± 11,2 (0,81)	169,2 ± 6,1 (0,93)
IMR-5 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	162,8 ± 7,0 (1,29)	251,2 ± 9,7 (1,38)
IMR-5 ^r PCL ²⁰	3367 ± 114 (26,68)	6629 ± 73 (36,54)
IMR-5 ^r TOPO ²⁰	64,2 ± 6,4 (0,51)	114,3 ± 2,2 (0,63)
IMR-5 ^r VCR ¹⁰	2355 ± 148 (18,66)	4401 ± 154 (24,26)
IMR-5 ^r VINOR ²⁰	5989 ± 81 (47,46)	11660 ± 73 (64,28)
IMR-32	104,9 ± 12,8	159,9 ± 15,4
IMR-32 ^r CARBO ⁴⁰⁰⁰	980,0 ± 71,5 (9,34)	2585 ± 120 (16,17)
IMR-32 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	309,0 ± 14,8 (2,95)	478,1 ± 47,8 (2,99)
IMR-32 ^r DOX ²⁰	2403 ± 344 (22,91)	5123 ± 1242 (32,04)
IMR-32 ^r ETO ¹⁰⁰	104,8 ± 14,8 (1,00)	164,1 ± 6,2 (1,03)
IMR-32 ^r GEMCI ²⁵	96,2 ± 3,6 (0,92)	156,9 ± 8,3 (0,98)
IMR-32 ^r MEL ⁵⁰⁰	151,5 ± 32,7 (1,44)	217,5 ± 33,3 (1,36)
IMR-32 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	65,9 ± 2,2 (0,63)	128,0 ± 7,3 (0,80)
IMR-32 ^r TOPO ^{7.5}	104,4 ± 29,9 (1,00)	227,5 ± 42,7 (1,42)
IMR-32 ^r VCR ¹⁰	1201 ± 419 (11,45)	2958 ± 726 (18,50)
IMR-32 ^r VINOR ⁵	834,4 ± 56,3 (7,95)	1564 ± 12 (9,78)
Kelly	124,2 ± 25,7	171,0 ± 8,7
LAN2	114,2 ± 9,5	289,6 ± 18,4
LAN5	190,1 ± 17,4	244,0 ± 15,0
NGP	95,7 ± 7,3	239,2 ± 5,3
NGP ^r GEMCI ²⁰	108,1 ± 2,7 (1,13)	212,5 ± 22,6 (0,89)
NLF	97,0 ± 3,5	152,4 ± 11,4
NLF ^r CARBO ⁵⁰⁰⁰	124,6 ± 4,6 (1,28)	180,0 ± 3,8 (1,18)
NLF ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	119,5 ± 2,4 (1,23)	169,7 ± 9,2 (1,11)
NLF ^r DOCE ²⁰	132,6 ± 7,7 (1,37)	710,2 ± 55,9 (4,66)
NLF ^r DOX ⁴⁰	96,9 ± 3,9 (1,00)	159,4 ± 11,9 (1,05)
NLF ^r ETO ¹⁰⁰	115,1 ± 6,5 (1,19)	218,0 ± 4,4 (1,43)
NLF ^r GEMCI ²⁰	111,9 ± 7,7 (1,15)	256,6 ± 13,4 (1,68)
NLF ^r MEL ³⁰⁰⁰	125,3 ± 3,3 (1,29)	217,8 ± 9,5 (1,43)
NLF ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	167,4 ± 10,0 (1,73)	199,8 ± 36,8 (1,31)

NLF ^r PCL ²⁰	58,3 ± 12,4 (0,60)	106,4 ± 22,6 (0,70)
NLF ^r VCR ⁵	155,4 ± 22,3 (1,60)	170,2 ± 5,0 (1,12)
NLF ^r VINB ¹⁰	109,6 ± 7,8 (1,13)	215,7 ± 8,7 (1,42)
NMB	259,8 ± 18,5	821,1 ± 22,4
SHEP	600,2 ± 35,2	1163 ± 40
SHEP ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	2402 ± 494 (4,00)	3209 ± 77 (2,76)
SHEP ^r ETO ¹⁰⁰	1781 ± 78 (2,97)	3167 ± 107 (2,72)
SHEP ^r VCR ¹	10852 ± 764 (18,08)	> 20000 (> 17,20)
SH-SY5Y	406,6 ± 95,6	1250 ± 288
SH-SY5Y ^r CDDP ²⁰⁰	463,7 ± 105,7 (1,14)	1277 ± 355 (1,02)
SK-N-AS	256,8 ± 22,7	686,3 ± 57,4
SK-N-SH	1029 ± 128	2227 ± 79
UKF-NB-2	251,3 ± 39,5	514,2 ± 51,2
UKF-NB-2 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	171,1 ± 25,9 (0,68)	2051 ± 36 (3,99)
UKF-NB-2 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	195,8 ± 24,0 (0,78)	337,9 ± 98,6 (0,66)
UKF-NB-2 ^r DOCE ¹⁰	4010 ± 1177 (15,96)	16702 ± 3808 (32,48)
UKF-NB-2 ^r DOX ²⁰	2172 ± 23 (8,64)	5019 ± 872 (9,76)
UKF-NB-2 ^r MEL ⁶⁰⁰	2403 ± 50 (9,56)	7484 ± 618 (14,55)
UKF-NB-2 ^r OXALI ⁶⁰⁰	196,2 ± 11,9 (0,78)	2455 ± 386 (4,77)
UKF-NB-2 ^r TOPO ¹⁰	3079 ± 150 (12,25)	5631 ± 612 (10,95)
UKF-NB-2 ^r VCR ¹⁰	7957 ± 1100 (31,66)	11254 ± 1277 (21,89)
UKF-NB-2 ^r VINB ¹⁰	3559 ± 265 (14,16)	9266 ± 738 (18,02)
UKF-NB-2 ^r VINOR ¹⁰	4590 ± 491 (18,27)	6917 ± 227 (13,45)
UKF-NB-3	148,9 ± 20,8	272,5 ± 36,6
UKF-NB-3 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	869,3 ± 23,5 (5,84)	2862 ± 104 (10,50)
UKF-NB-3 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	126,7 ± 28,0 (0,85)	197,7 ± 54,6 (0,73)
UKF-NB-3 ^r DOCE ²⁰	3704 ± 372 (24,88)	6160 ± 427 (22,60)
UKF-NB-3 ^r DOX ²⁰	4284 ± 302 (28,77)	8530 ± 2211 (31,30)
UKF-NB-3 ^r ETO ¹⁰⁰	182,0 ± 40,1 (1,22)	324,2 ± 40,6 (1,19)
UKF-NB-3 ^r GEMCI ¹⁰	132,6 ± 5,0 (0,89)	205,4 ± 10,8 (0,75)
UKF-NB-3 ^r MEL ⁴⁰⁰	587,4 ± 148,1 (3,94)	855,4 ± 164,5 (3,14)
UKF-NB-3 ^r Nutlin ^{10μM}	155,8 ± 2,5 (1,05)	299,9 ± 3,0 (1,10)
UKF-NB-3 ^r Nutlin ^{10μM} II	165,2 ± 11,0 (1,11)	358,8 ± 16,9 (1,32)

UKF-NB-3 ^r Nutlin ^{10μM} III	149,8 ± 19,2 (1,01)	273,0 ± 13,4 (1,00)
UKF-NB-3 ^r Nutlin ^{10μM} VI	170,3 ± 4,9 (1,14)	354,3 ± 15,2 (1,30)
UKF-NB-3 ^r Nutlin ^{10μM} VIII	129,5 ± 11,3 (0,9)	217,1 ± 11,7 (0,80)
UKF-NB-3 ^r OXALI ²⁰⁰⁰	113,6 ± 10,2 (0,76)	250,6 ± 15,2 (0,92)
UKF-NB-3 ^r PCL ²⁰	4700 ± 196 (31,56)	9250 ± 1855 (33,94)
UKF-NB-3 ^r TOPO ¹⁵	119,2 ± 13,3 (0,80)	219,0 ± 8,6 (0,80)
UKF-NB-3 ^r VCR ¹⁰	727,5 ± 191,1 (4,89)	1747 ± 481 (6,41)
UKF-NB-3 ^r VINB ¹⁰	3189 ± 132 (21,42)	4844 ± 136 (17,78)
UKF-NB-3Klon1	140,1 ± 31,4	285,9 ± 50,7
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} II	181,2 ± 3,3 (1,29)	329,7 ± 26,2 (1,15)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} III	204,1 ± 8,1 (1,46)	331,8 ± 4,4 (1,16)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} IV	173,5 ± 11,9 (1,24)	293,9 ± 5,2 (1,03)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} VI	178,8 ± 4,8 (1,28)	291,1 ± 17,5 (1,02)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} VIII	177,7 ± 6,8 (1,27)	335,5 ± 6,7 (1,17)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} X	222,0 ± 7,9 (1,58)	373,4 ± 13,7 (1,31)
UKF-NB-3Klon3	167,2 ± 38,4	301,3 ± 65,5
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} I	111,9 ± 18,3 (0,67)	254,0 ± 12,2 (0,84)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} IV	222,2 ± 1,9 (1,33)	405,1 ± 33,4 (1,34)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} VII	240,2 ± 7,4 (1,44)	481,8 ± 20,0 (1,60)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} VIII	204,7 ± 12,6 (1,22)	342,1 ± 20,0 (1,14)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} X	182,2 ± 28,2 (1,09)	293,1 ± 10,6 (0,97)
UKF-NB-4	1671 ± 259	2611 ± 358
UKF-NB-6	109,5 ± 18,2	310,4 ± 77,8
UKF-NB-6 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	296,3 ± 31,9 (2,71)	754,0 ± 41,3 (2,43)
UKF-NB-6 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	308,9 ± 26,2 (2,82)	799,4 ± 98,0 (2,58)
UKF-NB-6 ^r DOX ²⁰	452,6 ± 81,0 (4,13)	1178 ± 332 (3,80)
UKF-NB-6 ^r ETO ²⁰⁰	306,0 ± 82,1 (2,79)	949,3 ± 325,5 (3,06)
UKF-NB-6 ^r GEMCI ¹⁰	160,1 ± 10,0 (1,46)	525,3 ± 11,3 (1,69)
UKF-NB-6 ^r MEL ¹⁰⁰⁰	132,2 ± 19,7 (1,21)	210,7 ± 12,6 (0,68)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM}	197,5 ± 2,7 (1,80)	384,1 ± 19,6 (1,24)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM} I	138,8 ± 8,8 (1,27)	233,3 ± 7,9 (0,75)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM} IV	239,1 ± 7,4 (2,18)	459,3 ± 2,3 (1,48)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM} VIII	128,4 ± 22,4 (1,17)	520,3 ± 5,5 (1,68)

UKF-NB-6 ^r Nutlin ¹⁰ μ M ^X	119,0 \pm 2,0 (1,09)	388,0 \pm 36,2 (1,25)
UKF-NB-6 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	172,9 \pm 15,2 (1,58)	655,1 \pm 150,0 (2,11)
UKF-NB-6 ^r PCL ²⁰	1290 \pm 187 (11,78)	3335 \pm 494 (10,74)
UKF-NB-6 ^r TOPO ²⁰	435,6 \pm 55,3 (3,98)	1231 \pm 239 (3,97)
UKF-NB-6 ^r VCR ¹⁰	1896 \pm 222 (17,32)	3792 \pm 616 (12,22)
UKF-NB-6 ^r VINOR ⁴⁰	6268 \pm 64 (57,24)	15135 \pm 4493 (48,76)

Die in den Neuroblastomzelllinien bestimmten IC₅₀-Werte für SNS-032 reichten von 58,3 nM in NLF^rPCL²⁰ bis 14615 nM in IMR-5^rDOCE²⁰. Im Bereich des IC₉₀-Wertes für SNS-032 erstreckten sich die bestimmten Werte von 106,4 nM ebenfalls in NLF^rPCL²⁰ bis über 20.000 nM in IMR-5^rDOCE²⁰ und SHEP^rVCR¹. In den chemosensitiven parentalen Zelllinien lag der IC₅₀-Wert zwischen 95,7 nM in NGP und 1671 nM in UKF-NB-4. Der IC₉₀-Wert reichte von 152,4 nM in NLF bis 2611 nM in UKF-NB-4. Zur Untersuchung, ob die Sensitivität gegenüber SNS-032 durch die erworbene Resistenz der adaptierten Neuroblastomzelllinien im Vergleich zu der zugehörigen parentalen Zelllinie beeinflusst wird, wurden die relativen Verhältnisse der IC₅₀- beziehungsweise IC₉₀-Werte von den adaptierten Sublinien im Vergleich zu den parentalen Zelllinien berechnet. Das relative Verhältnis berechnet sich dabei aus dem IC₅₀- bzw. IC₉₀-Wert für SNS-032 der adaptierten Sublinie dividiert durch den jeweiligen bestimmten Wert für SNS-032 der chemosensitiven parentalen Zelllinie (siehe Werte in Klammern in Tabelle 3.1). Für eine bestehende Resistenz gegenüber SNS-032 wurde ein relatives Verhältnis von > 2,0 definiert. In den chemoresistenten Neuroblastomzelllinien zeigte sich im Allgemeinen eine deutliche Korrelation zwischen den relativen Verhältnissen für die IC₅₀-Werte (IC₅₀ adaptierte Zelle / IC₅₀ parentale Zelle) für SNS-032 und den IC₉₀-Werten (IC₉₀ adaptierte Zelle / IC₉₀ parentale Zelle) für SNS-032 zwischen den parentalen und den zugehörigen chemoresistenten Neuroblastomzelllinien. Dies bedeutet, dass wenn eine Zelllinie bei dem IC₅₀-Wert ein relatives Verhältnis >2 aufwies, dies auch bei dem IC₉₀-Wert galt und umgekehrt. Nur in wenigen Zelllinien zeigte sich eine beträchtliche Differenz in dem Verhältnis zwischen IC₅₀- und IC₉₀-Wert. Beispielsweise betrug in der Zelllinie NLF^rDOCE²⁰ das relative Verhältnis im Vergleich zur parentalen Zelllinie NLF beim IC₅₀-Wert 1,37; während sie beim IC₉₀-Wert ein relatives Verhältnis von 4,66 aufwies. In den chemoresistenten Zelllinien UKF-NB-2^rCARBO²⁰⁰⁰ und UKF-NB-2^rOXALI⁶⁰⁰ wies das relative Verhältnis im Vergleich zu den parentalen UKF-NB-2 bei dem IC₉₀-Wert ebenfalls einen deutlich höheren Wert (IC₉₀ UKF-NB-2^rCARBO²⁰⁰⁰ / IC₉₀ UKF-NB-2 = 3,99 und IC₉₀

UKF-NB-2^{rOXALI}⁶⁰⁰ / IC_{90} UKF-NB-2 = 4,77) als beim IC_{50} -Wert (IC_{50} UKF-NB-2^{rCARBO}²⁰⁰⁰ / IC_{50} UKF-NB-2 = 0,68 und IC_{50} UKF-NB-2^{rOXALI}⁶⁰⁰ / IC_{50} UKF-NB-2 = 0,78) auf. Zur besseren Übersicht der antitumoralen Wirkung von SNS-032 gegenüber den untersuchten Neuroblastomzelllinien wurden die parentalen und Zytostatika-adaptierten Zelllinien nach den zugehörigen Wirkstoffklassen geordnet, an welche sie adaptiert wurden, und die im MTT-Viabilitätsassay bestimmten IC_{50} - und IC_{90} -Werte in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3.1, vgl. Tabelle 3.1).

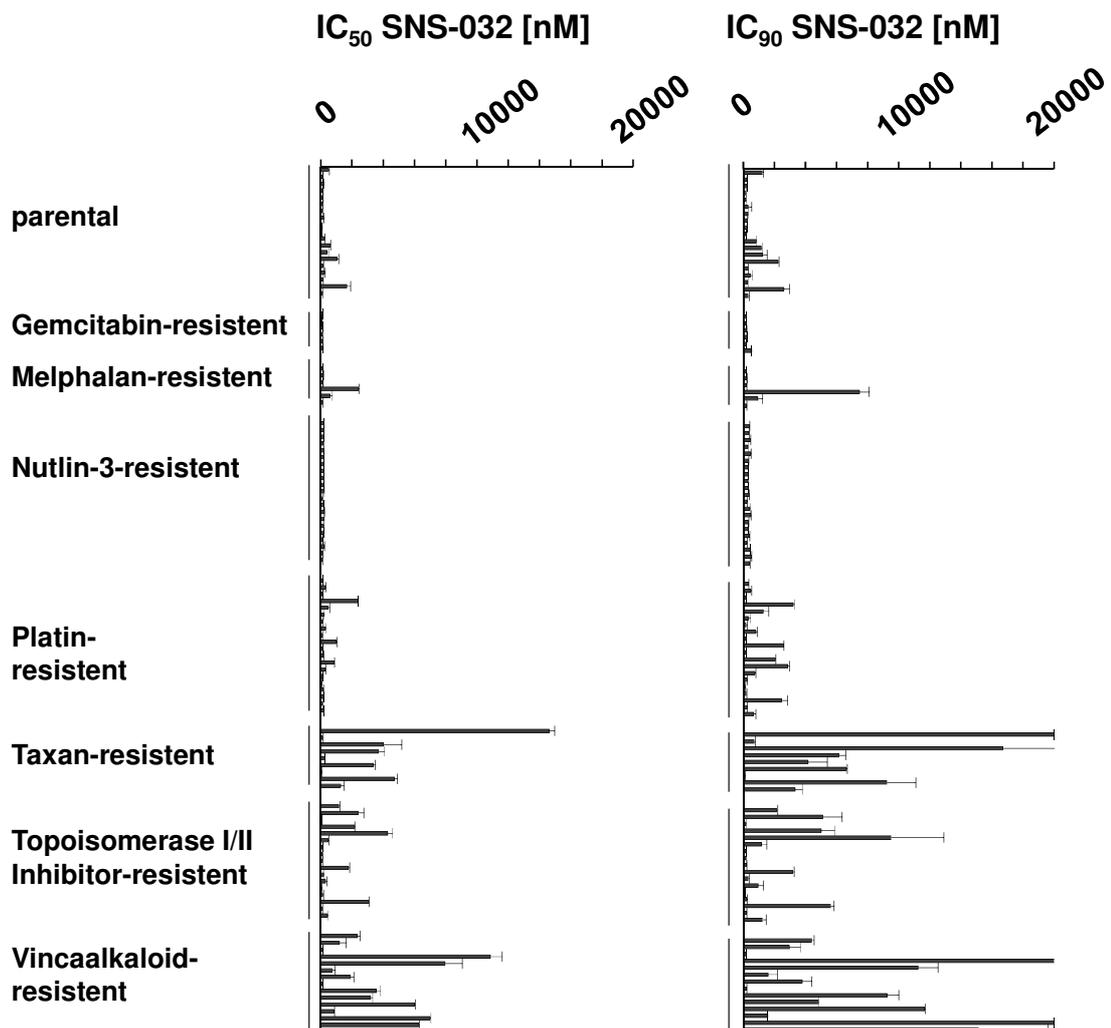


Abbildung 3.1: Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen

Konzentrationen von SNS-032, welche die Viabilität von parentalen chemosensitiven Neuroblastomzelllinien und ihren zugehörigen Sublinien mit einer erworbenen Resistenz gegen eine breite Auswahl von Chemotherapeutika unterschiedlicher Stoffklassen um 50 % (IC_{50}) beziehungsweise 90 % (IC_{90}) reduziert, wie im MTT-Viabilitätsassay nach einer Behandlungsperiode von 120 h bestimmt.

Zu den Platinderivaten gehören neben Cisplatin auch Carboplatin und Oxaliplatin, welche aus dem ursprünglichen Cisplatin durch zusätzliche Modifikationen entwickelt wurden. Zu der Stoffklasse der Taxane gehören die in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel, während die Stoffklasse der Topoisomerase I/II Inhibitoren die Zytostatika Doxorubicin, Etoposid und Topotecan umfasst. Vinblastin, Vincristin und Vinorelbin werden der Stoffklasse der Vinkaalkaloide zugeordnet.

Eine signifikante Fraktion der Chemotherapeutika-adaptierten Neuroblastomzelllinien zeigte eine ähnliche Sensitivität zu SNS-032 wie ihre zugehörigen chemosensitiven parentalen Zelllinien. 57 der 93 Chemotherapeutika-adaptierten Sublinien (61 %) wiesen relative Verhältnisse im IC_{50} - und IC_{90} -Wert der adaptierten Sublinie zu dem IC_{50} - beziehungsweise IC_{90} -Wert der parentalen Zelllinie zwischen 0,5 und 2,0 auf. Eine erworbene Resistenz an Tubulin-bindende Agenzien und Doxorubicin resultierte jedoch signifikant häufig in einer Kreuzresistenz zu SNS-032 in den adaptierten Sublinien. 7 von 8 an Taxane adaptierte Zelllinien, 12 von 14 an Vinkaalkaloide adaptierte Zelllinien und 4 von 5 an Doxorubicin adaptierte Zelllinien wiesen relative Verhältnisse >2 im Bereich des IC_{90} -Wertes (IC_{90} resistente Sublinie / IC_{90} parentale Zelllinie) auf (Tabelle 3.1, Abbildung 3.1). Bei den IC_{50} -Werten zeigt sich bis auf eine Ausnahme bei NLF^rDOCE²⁰ (1,37) das gleiche Muster einer Kreuzresistenz zu SNS-032. Im Gegensatz dazu verblieben alle 6 Gemcitabin-resistenten Sublinien sensitiv gegenüber SNS-032, was sich in einem Verhältnis $< 2,0$ (zw. 0,89 bei UKF-NB-3 und 1,46 bei UKF-NB-6) zwischen IC_{50} -Wert der adaptierten Sublinie zum IC_{50} -Wert der parentalen Zelle widerspiegelt. Die zugehörigen IC_{90} -Werte für SNS-032 und das daraus resultierende Verhältnis (zw. 0,75 bei UKF-NB-3 und 1,69 bei UKF-NB-6) zwischen IC_{90} -Wert der adaptierten Zelle zum IC_{90} -Wert der parentalen Zelle bestätigt die bestehende Sensitivität der Gemcitabin-resistenten Zelllinien gegenüber SNS-032 ebenfalls. Bei den Chemotherapeutika-adaptierten Sublinien, welche eine erworbene Resistenz gegenüber Platinderivaten aufweisen, zeigte sich bei 9 von 20 Zelllinien eine Kreuzresistenz gegenüber SNS-032. 2 von 6 Etoposid-resistenten (SHEP^rETO¹⁰⁰ und UKF-NB-6^rETO²⁰⁰), 2 von 6 Melphalan-resistenten (UKF-NB-2^rMEL⁶⁰⁰ und UKF-NB-3^rMEL⁴⁰⁰) und 2 von 5 Topotecan-resistenten (UKF-NB-2^rTOPO¹⁰ und UKF-NB-6^rTOPO²⁰) Zelllinien wiesen ebenfalls eine verminderte Sensitivität gegenüber SNS-032 im IC_{50} - und IC_{90} -Wert auf.

Die antitumorale Wirkung von SNS-032 wurde des Weiteren in vier primären Neuroblastomkulturen untersucht (Tabelle 3.2). Diese wurden aus dem Knochenmark von vier Patienten mit metastatierendem Stadium 4 nach INSS isoliert.

Tabelle 3.2: Konzentrationen von SNS-032, welche die Viabilität von primären Neuroblastomkulturen um 50 % (IC_{50}) beziehungsweise 90 % (IC_{90}) nach einer Inkubationszeit von 120 h im MTT-Viabilitätsassay vermindern.

primäre Zellkulturen	Wirkung von SNS-032	
	IC_{50} (nM)	IC_{90} (nM)
Probe 1	926,1 ± 49,0	4239,3 ± 896,2
Probe 2	588,3 ± 19,1	1247,5 ± 127,5
Probe 3	110,3 ± 22,7	258,4 ± 51,6
Probe 4	138,4 ± 1,4	299,7 ± 8,2

Die für SNS-032 erreichten IC_{50} -Werte reichten von 110,3 nM in Probe 3 bis 926,1 nM in Probe 1, die IC_{90} -Werte von 258,4 nM in Probe 3 bis 4239,3 nM ebenfalls in Probe 1. Somit liegen die effektiven Konzentrationen von SNS-032 in den primären Neuroblastomkulturen im gleichen Konzentrationsbereich, welcher auch in etablierten Neuroblastomzelllinien detektiert werden konnte.

Des Weiteren wurde untersucht, welchen Effekt die Zugabe von SNS-032 auf die Wirkung von konventionellen zytotoxischen Chemotherapeutika auf chemosensitive parentale und chemoresistente adaptierte Neuroblastomzellen hat. Dafür wurde zunächst die parentale Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 im MTT-Viabilitätsassay mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin, Melphalan und Topotecan und konstanten Konzentrationen von SNS-032 behandelt (Abbildung 3.2). Ebenfalls sollte untersucht werden, inwiefern die Zugabe von SNS-032 die Resistenz von an diverse Zytostatika adaptierten Neuroblastomzellen aufheben kann. Dafür wurden die Zelllinien UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰, UKF-NB-3^rMEL⁴⁰⁰ und UKF-NB-3^rTOPO¹⁵ ebenfalls im MTT-Viabilitätsassay mit steigenden Konzentrationen der Zytostatika, an welche sie adaptiert wurden, und konstanten Konzentrationen von SNS-032 behandelt (Abbildung 3.3).

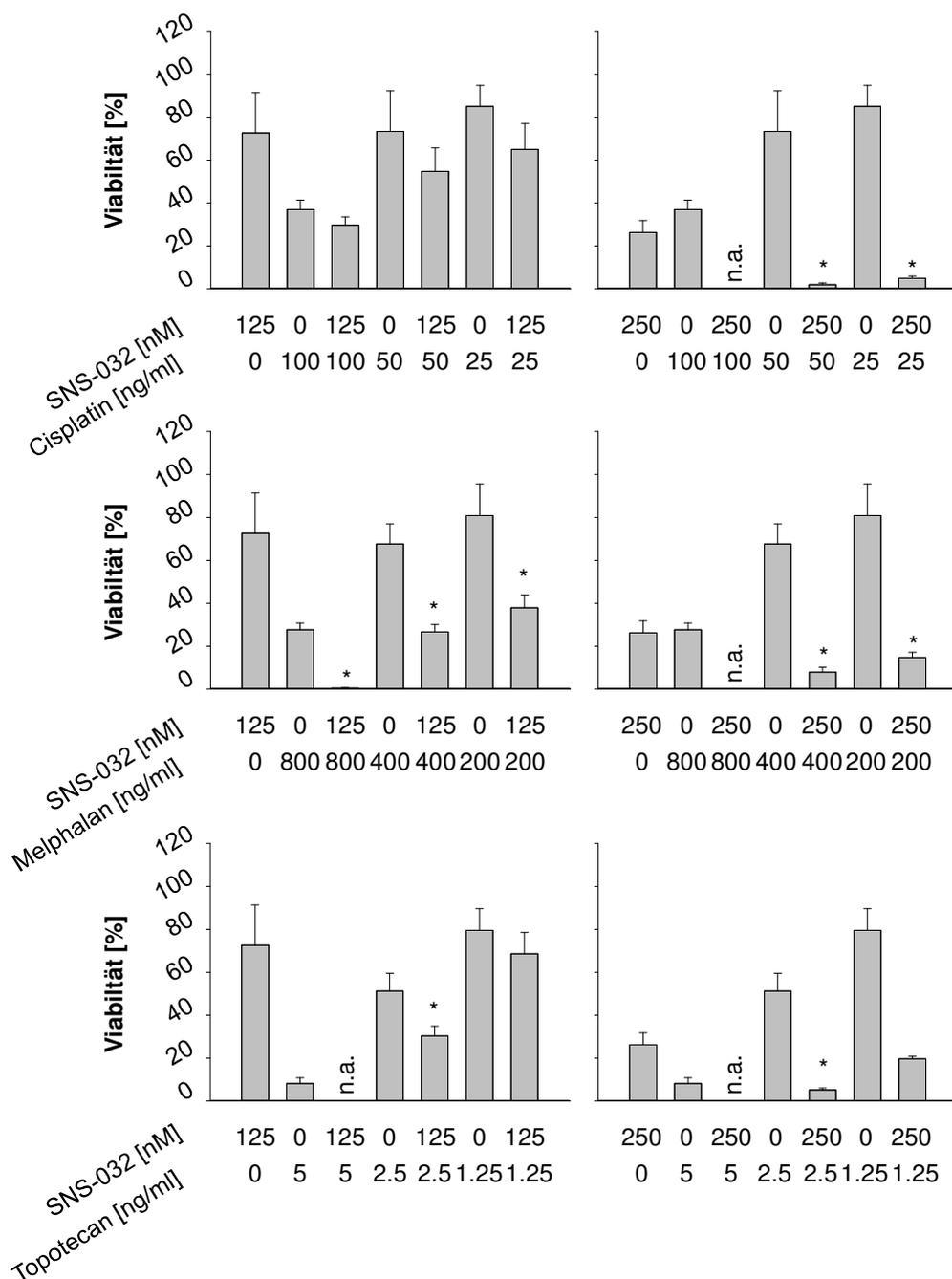


Abbildung 3.2: Effekt von SNS-032 in Kombination mit zytotoxischen Chemotherapeutika in parentalen UKF-NB-3 Zellen

Die Zellviabilität wurde relativ zu unbehandelten Zellen nach einer Inkubationszeit von 120 h im MTT-Viabilitätsassay bestimmt. * P < 0.05 relativ zu SNS-032 und Zytostatikum allein; n.a. nicht auswertbar / keine detektierbare Zellviabilität

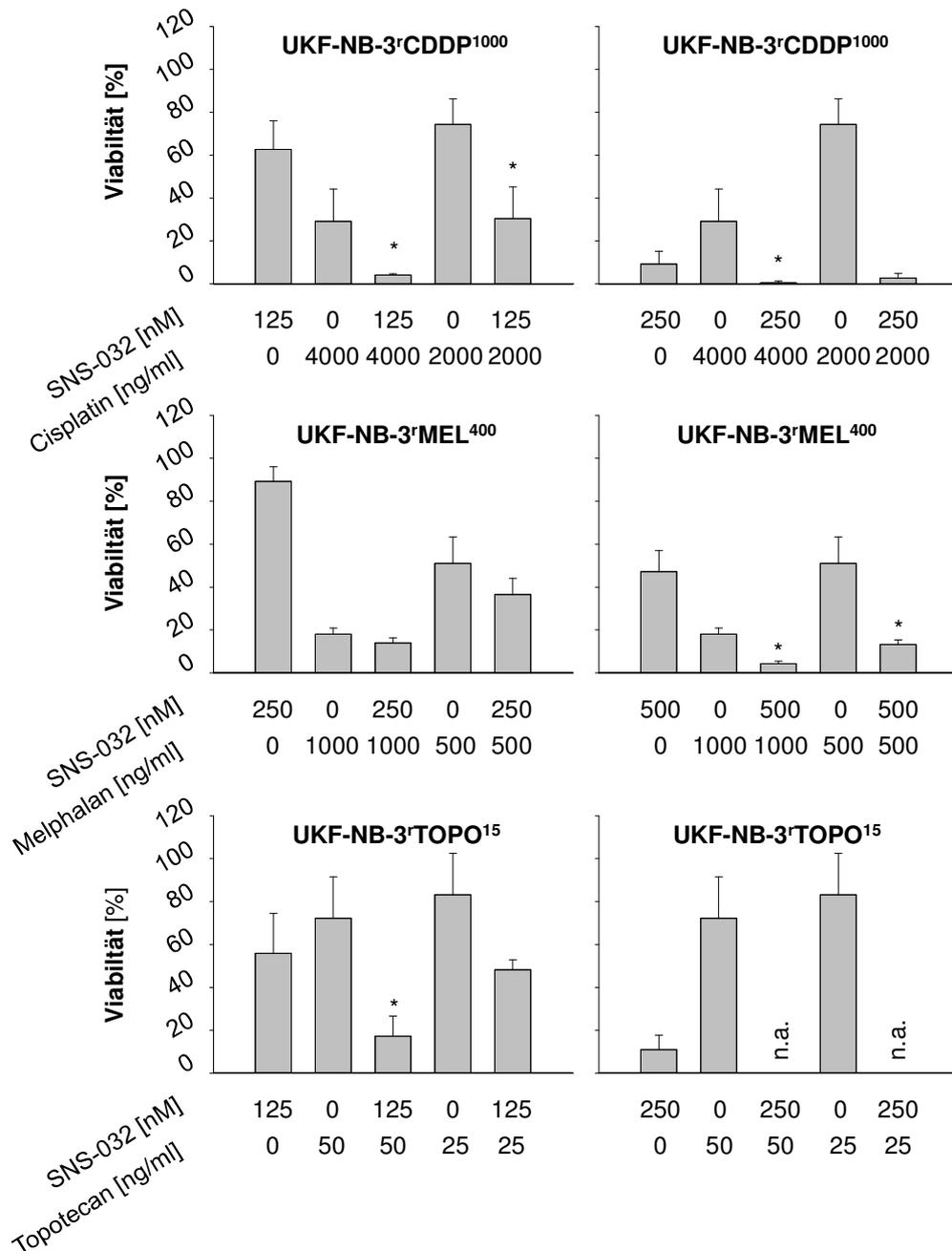


Abbildung 3.3: Effekt von SNS-032 in Kombination mit zytotoxischen Chemotherapeutika in UKF-NB-3 Zellen resistent zu Cisplatin (UKF-NB-3'CDDP¹⁰⁰⁰), Melphalan (UKF-NB-3'MEL⁴⁰⁰) oder Topotecan (UKF-NB-3'TOPO¹⁵)

Die Zellviabilität wurde relativ zu unbehandelten Zellen nach einer Inkubationszeit von 120 h im MTT-Viabilitätsassay bestimmt. * P < 0.05 relativ zu SNS-032 und Zytostatikum allein; n.a. nicht auswertbar / keine detektierbare Zellviabilität

Die Wirkung der einzelnen Zytostatika Cisplatin, Melphalan und Topotecan auf die Viabilität konnte in parentalen UKF-NB-3 Zellen durch die Kombination mit SNS-032

signifikant gesteigert werden. Jedoch ist der einzelne Effekt von 250 nM SNS-032 auf die Viabilität allein schon relativ hoch, so dass in Kombination mit dem Zytostatikum in höheren Konzentrationen keine Viabilität mehr festgestellt werden konnte. In den an Cisplatin, Melphalan und Topotecan adaptierten UKF-NB-3 Sublinien konnte die Resistenz gegenüber den Zytostatika, an welche sie adaptiert wurden, zum Teil durch die Kombination mit SNS-032 ebenfalls signifikant aufgehoben werden.

3.1.2 Antitumorale Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen *in vivo*

Um die antitumorale Wirkung von SNS-032 unter *in vivo* Bedingungen zu untersuchen, wurde ein Xenotransplantatmodell in Mäusen durchgeführt. Für das Tumormodell wurde die an Cisplatin adaptierte UKF-NB-3 Sublinie UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ verwendet. Diese Zelllinie weist eine Kreuzresistenz (IC_{90} UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ / IC_{90} UKF-NB-3) gegenüber Doxorubicin (5,2fach), Melphalan (13,9fach) und Topotecan (2,4fach) und eine gemäßigte Kreuzresistenz zu Vincristin (1,9fach) auf. Gegenüber SNS-032 wies UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ jedoch keine Kreuzresistenz (0,7fach) auf (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Kreuzresistenz von UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ Zellen zu diversen antitumoralen Arzneimitteln im Vergleich zur chemosensitiven parentalen UKF-NB-3 Zelle. Gezeigt sind Konzentrationen von Arzneimitteln welche die Viabilität der Neuroblastomzellen um 50 % (IC_{50}) bzw. 90 % (IC_{90}) vermindern. Die IC_{50} - und IC_{90} -Werte wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt. ¹ Verhältnis der IC_{50} - bzw. IC_{90} -Werte von UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ im Vergleich zur parentalen UKF-NB-3 (SNS-032 [nM], Cisplatin, Vincristin, Doxorubicin, Topotecan und Melphalan [ng/ml])

	IC_{50}		IC_{90}	
	UKF-NB-3	UKF-NB-3 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	UKF-NB-3	UKF-NB-3 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰
SNS-032	148,9 ± 20,8	126,7 ± 28,0 (0,8) ¹	272,5 ± 36,6	197,7 ± 54,6 (0,7)
Cisplatin	104,6 ± 5,8	3474 ± 261 (33,2)	209,2 ± 7,8	4593 ± 117 (22,0)
Vincristin	0,23 ± 0,01	0,75 ± 0,01 (3,3)	0,67 ± 0,03	1,3 ± 0,03 (1,9)
Doxorubicin	7,2 ± 0,1	42,4 ± 9,7 (5,9)	13,4 ± 0,9	69,4 ± 19,9 (5,2)
Topotecan	2,7 ± 0,1	5,0 ± 0,5 (1,9)	4,2 ± 0,1	10,0 ± 2,4 (2,4)
Melphalan	149,0 ± 15,4	1178 ± 68,3 (7,9)	247,5 ± 50,3	1883 ± 135 (13,9)

Beim Xenotransplantatmodell werden die Tumorzellen 1:1 mit Matrigel subkutan in die Flanke des Versuchstiers eingebracht und zunächst solange beobachtet, bis der Tumor eine tastbare Größe erreicht hat (in diesem Versuch Tag 21). Dann wird mit der Behandlung der Tiere mit dem zu testenden Wirkstoff begonnen. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen unterteilt und entweder mit 30mg/kg SNS-032 in 2,1 mmolarer wässriger Weinsäure oder mit dem Lösungsmittel intraperitoneal an Tag 21, 24 und 27 behandelt. Die mittleren relativen Tumorumfänge sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Dabei wurde jeweils das mittlere Tumorumfang zu Beginn der Behandlungsphase für beide Versuchsgruppen gleich 100 % gesetzt.

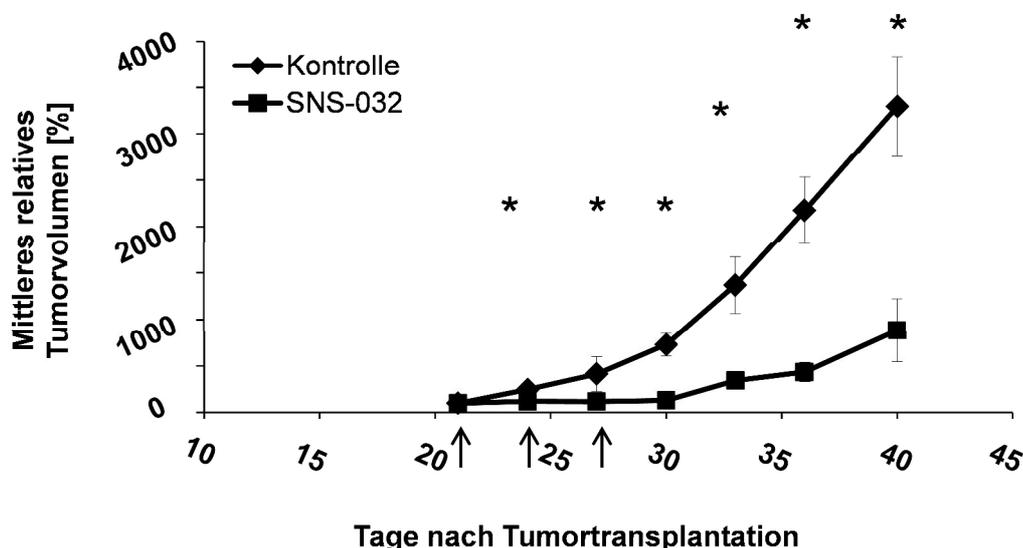


Abbildung 3.4: Wirkung von SNS-032 *in vivo*

Wirkung von SNS-032 auf das Wachstum von subkutanen Xenotransplantaten der Zelllinie UKF-NB-3'CDDP¹⁰⁰⁰ (UKF-NB-3 Zellen mit erworbener Resistenz gegenüber Cisplatin) im Vergleich zu den mit der Kontrolllösung behandelten Xenotransplantaten. SNS-032 wurde mit einer Konzentration von 30 mg/kg an Tag 21, 24 und 27 intraperitoneal appliziert. An den gleichen Tagen wurden die Kontrolltiere mit dem Lösungsmittel behandelt. Vor dem 21. Tag waren keine Tumore tastbar. * P < 0,05 verglichen zur Kontrollgruppe

Die individuellen Tumorstadiumskurven und die Körpergewichte der Versuchstiere sind des Weiteren in Abbildung 3.5 dargestellt.

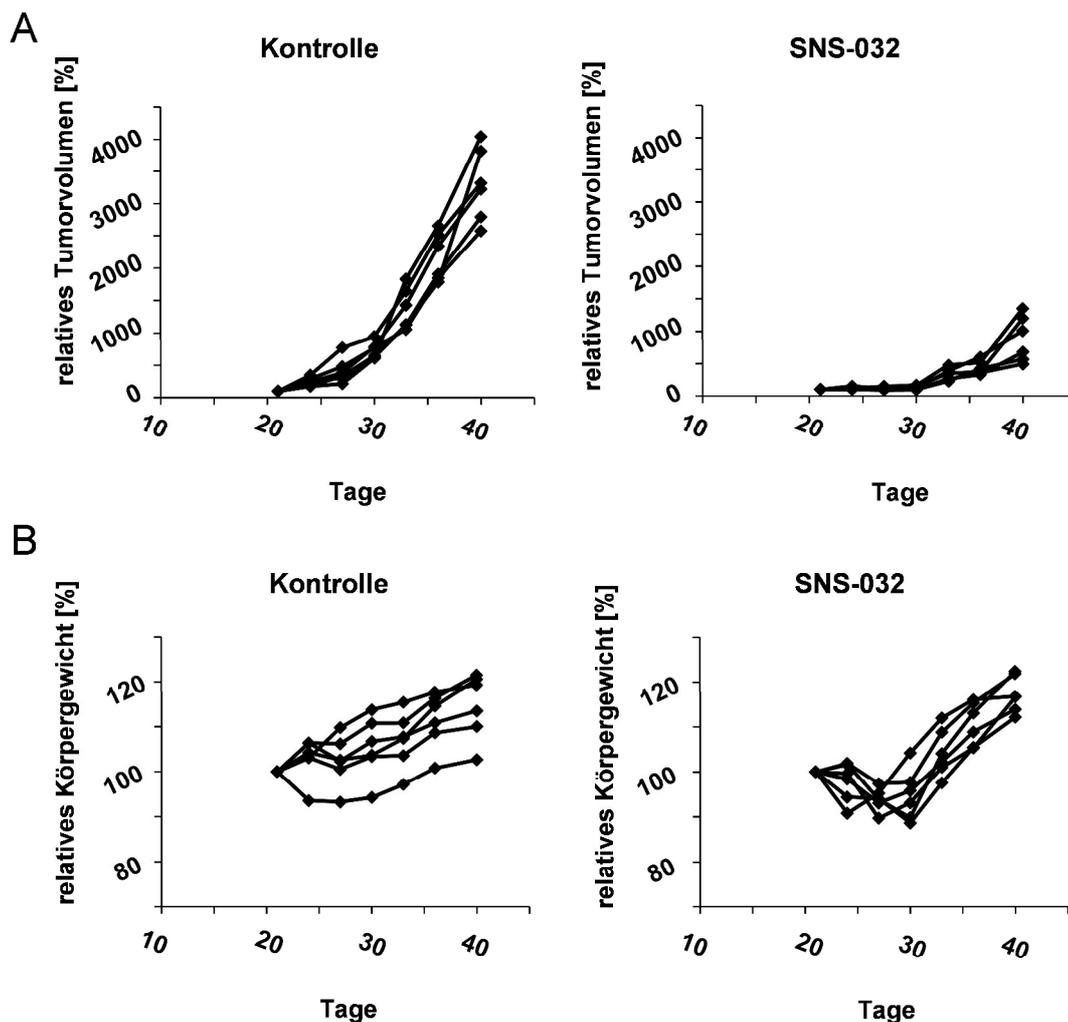


Abbildung 3.5: Wirkung von SNS-032 in vivo

(A) Individuelle Wirkung von SNS-032 auf das Wachstum von subkutanen Xenotransplantaten der Zelllinie UKF-NB-3'CDDP¹⁰⁰⁰ (UKF-NB-3 Zellen mit erworbener Resistenz gegenüber Cisplatin) im Vergleich zu den mit der Kontrolllösung behandelten Xenotransplantaten. SNS-032 wurde mit einer Konzentration von 30 mg/kg an Tag 21, 24 und 27 intraperitoneal appliziert. An den gleichen Tagen wurden die Kontrolltiere mit dem Lösungsmittel behandelt. (B) Einfluss der Behandlung mit SNS-032 auf das Körpergewicht der Versuchstiere im Vergleich zu dem Körpergewicht zu Beginn der Behandlung

SNS-032 inhibierte signifikant das Wachstum der von UKF-NB-3'CDDP¹⁰⁰⁰ Zellen induzierten Tumore ohne wesentlichen Einfluss auf das Körpergewicht der Versuchstiere. Auch nach Beendigung der Behandlung mit SNS-032 stieg das Wachstum der behandelten Tumore nur langsam an.

3.2. Einfluss der Expression von ABCB1 und ABCG2 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032

ABCB1 (P-Glykoprotein, MDR1 (multidrug resistance protein 1)) und ABCG2 (BCRP (breast cancer resistance protein)) gehören zu den ABC-Transportern. Diese sind Transmembranproteine in der Zellmembran, welche die Fähigkeit haben, spezifische Substrate unter ATP-Verbrauch aus Zellen zu transportieren (Gottesmann et al, 2002; Szakács et al, 2006; Wilson et al, 2006). Sie tragen entscheidend zur physiologischen Detoxifikation der Zelle bei und werden in vielen humanen Geweben exprimiert (Zhou et al, 2008). Bei vielen Kinaseinhibitoren wurde bereits gezeigt, dass sie mit ABC-Transportern inklusive ABCB1 und ABCG2 interferieren (Shi et al, 2007).

3.2.1. Einfluss von ABCB1 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032 in Neuroblastomzelllinien

Der ABC-Transporter ABCB1 zeichnet sich durch seine große Anzahl an hydrophoben Substraten unterschiedlicher Struktur und Wirkstoffklassen aus. Zu den Substraten innerhalb der in der Krebstherapie häufig eingesetzten Chemotherapeutika gehören Anthrazykline (z.B. Doxorubicin), Vinkaalkaloide (z.B. Vinblastin, Vincristin), Taxane (z.B. Docetaxel, Paclitaxel), Epipodophyllotoxine (z.B. Etoposid) und ebenfalls Mitoxantron und auch neu entwickelte antitumorale Substanzen (Gottesmann et al, 2002; Nobili et al, 2006). Der CDK2, 7 und 9 Inhibitor SNS-032 wurde ebenfalls bereits zuvor als Substrat von ABCB1 in einer Studie über die orale Absorption von SNS-032 in Ratten vorgeschlagen (Kamath et al, 2005).

In Neuroblastomzellen, welche eine hohe Expression von ABCB1 aufweisen, konnten deutlich höhere IC_{50} - und IC_{90} -Werte für SNS-032 festgestellt werden als in Neuroblastomzellen, welche sich durch keine oder eine niedrige Expression von ABCB1 auszeichnen (Tabelle 3.4). Um den Einfluss von ABCB1 auf die antitumorale Wirkung von SNS-032 in diesen Zellen näher zu untersuchen, wurde der ABCB1-Inhibitor Verapamil in Kombination mit SNS-032 im MTT-Viabilitätsassay eingesetzt. In Tabelle 3.4 sind die in den untersuchten Neuroblastomzellen bestimmten IC_{50} - und IC_{90} -Werte für SNS-032 nach einem Behandlungszeitraum von 120 h allein und in Kombination mit 10 μ M Verapamil dargestellt. Die angegebene Zahl in Klammern entspricht dem Faktor, um welchen die Sensitivität gegenüber SNS-032 durch

gleichzeitige Zugabe von Verapamil verstärkt wird. Ebenfalls in der Tabelle aufgeführt ist der Status der ABCB1-Expression in den Zelllinien. Die Expression von ABCB1 wurde im Durchflusszytometer mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ABCB1 nachgewiesen und ist in Tabelle A.3 im Anhang aufgeführt. Die IC_{50} - und IC_{90} -Werte aller in Kombination mit 10 μ M Verapamil untersuchten Zelllinien sind ebenfalls im Anhang in Tabelle A.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Wirkung des ABCB1-Inhibitors Verapamil (10 μ M) auf die Sensitivität von SNS-032 in ABCB1-positiven oder -negativen Neuroblastomzellen. Die Konzentrationen, welche die Viabilität der Zellen um 50 % (IC_{50}) bzw. 90 % (IC_{90}) vermindern, wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt.

Zelllinie	ABCB1-Expression	Wirkung von SNS-032			
		IC_{50} [nM]		IC_{90} [nM]	
		-Verapamil	+ Verapamil	-Verapamil	+ Verapamil
Be(2)C	+	508,9 \pm 43,3	75,4 \pm 18,2 (6,7) ¹	1230 \pm 70	156,4 \pm 25,5 (7,9) ²
IMR-5	-	126,2 \pm 6,6	78,2 \pm 2,9 (1,6)	181,4 \pm 3,3	114,3 \pm 2,9 (1,6)
IMR-5 ^r VCR ¹⁰	+	2355 \pm 148	108,9 \pm 6,3 (21,6)	4400 \pm 154	179,0 \pm 4,0 (24,8)
IMR-5 ^r DOX ²⁰	+	1161 \pm 66	148,7 \pm 8,1 (7,8)	2141 \pm 63	180,4 \pm 16,7 (11,9)
IMR-32	-	104,9 \pm 12,8	78,8 \pm 16,7 (1,3)	159,9 \pm 15,4	136,9 \pm 25,6 (1,2)
IMR-32 ^r VCR ¹⁰	+	1201 \pm 419	129,7 \pm 47,9 (9,3)	2958 \pm 726	209,7 \pm 36,1 (14,1)
IMR-32 ^r DOX ²⁰	+	2403 \pm 344	105,2 \pm 12,6 (22,8)	5123 \pm 1242	169,4 \pm 27,3 (30,2)
NLF	-	97,0 \pm 3,5	115,8 \pm 2,6 (0,8)	152,4 \pm 1,1	159,7 \pm 5,0 (1,0)
NLF ^r VCR ¹⁰	-	155,4 \pm 0,2	136,0 \pm 6,4 (1,1)	170,2 \pm 5,0	200,4 \pm 7,4 (0,8)
NLF ^r DOX ⁴⁰	-	96,9 \pm 3,9	99,0 \pm 8,3 (1,0)	159,4 \pm 11,9	150,3 \pm 4,1 (1,1)

SHEP	+	600,2 ± 35,2	118,2 ± 6,2 (5,1)	1163 ± 39,8	217,0 ± 19,9 (5,4)
SHEP¹VCR¹	+	10851 ± 764	356,2 ± 1,8 (30,5)	> 20000	651,3 ± 25,3 (>30,7)
SH-SY5Y	+	406,6 ± 95,6	75,9 ± 15,0 (5,4)	1250 ± 288	140,3 ± 27,4 (8,9)
UKF-NB-2	-	251,3 ± 39,5	207,2 ± 26,7 (1,2)	514,2 ± 51,2	319,1 ± 108,6 (1,6)
UKF-NB-2¹VCR¹⁰	+	7957 ± 1100	240,4 ± 88,9 (33,1)	11254 ± 1277	455,3 ± 175,7 (24,7)
UKF-NB-2¹DOX²⁰	+	2172 ± 23	162,0 ± 2,9 (13,4)	5019 ± 872	230,9 ± 65,3 (21,7)
UKF-NB-3	-	148,9 ± 20,8	133,7 ± 22,9 (1,1)	272,5 ± 36,6	235,7 ± 29,3 (1,2)
UKF-NB-3¹VCR¹⁰	+	727,5 ± 191,1	140,1 ± 10,5 (5,2)	1747 ± 481	261,0 ± 40,4 (6,7)
UKF-NB-3¹DOX²⁰	+	4284 ± 302	242,2 ± 39,4 (17,7)	9518 ± 3396	361,8 ± 40,6 (26,3)
UKF-NB-4	+	1671 ± 259	155,7 ± 27,0 (10,7)	2611 ± 358	250,5 ± 48,0 (10,4)
UKF-NB-6	-	109,5 ± 18,2	76,6 ± 12,0 (1,4)	310,4 ± 77,8	156,3 ± 34,5 (2,0)
UKF-NB-6¹VCR¹⁰	+	1896 ± 222	115,6 ± 22,2 (16,4)	3792 ± 616	202,0 ± 22,0 (18,8)
UKF-NB-6¹DOX²⁰	+	452,6 ± 81,0	68,2 ± 10,5 (6,6)	1178 ± 332	118,6 ± 24,7 (9,9)

¹ IC₅₀ ohne Verapamil / IC₅₀ mit Verapamil

² IC₉₀ ohne Verapamil / IC₉₀ mit Verapamil

In Neuroblastomzelllinien mit einer hohen Expression von ABCB1 konnte der IC₅₀-Wert von SNS-032 durch Zugabe von 10 µM Verapamil um einen Faktor von 5,1 in SHEP (von IC₅₀ 600,2 ± 35,2 nM auf IC₅₀ 118,2 ± 6,2 nM) bis zu einem Faktor von 33,1 in UKF-NB-2¹VCR¹⁰ (von IC₅₀ 7957 ± 1100 nM auf IC₅₀ 240,4 ± 88,9 nM) reduziert werden. Im Vergleich dazu wurde der IC₅₀-Wert von SNS-032 in Zelllinien mit niedriger ABCB1-Expression durch Zugabe von 10 µM Verapamil nur um den Faktor 0,8 in NLF (von IC₅₀ 97,0 ± 3,5 nM auf IC₅₀ 115,8 ± 2,6 nM) bis 1,6 in IMR-5 (von IC₅₀ 126,2 ± 6,6 nM auf IC₅₀ 78,2 ± 2,9 nM) vermindert. Beim IC₉₀-Wert zeigten sich

ähnliche Ergebnisse. In ABCB1-exprimierenden Zellen verminderte sich der IC_{90} -Wert von SNS-032 durch die Zugabe von Verapamil um den Faktor 5,4 in SHEP (von IC_{90} $1163 \pm 39,8$ nM auf IC_{90} $217,0 \pm 19,9$ nM) bis zu $> 30,7$ in SHEP'VCR¹ (von IC_{90} > 20000 nM auf IC_{90} $651,3 \pm 25,3$ nM). In Zelllinien, welche nur wenig ABCB1 exprimieren, reduzierte sich der IC_{90} -Wert von SNS-032 in Kombination mit $10 \mu\text{M}$ Verapamil im Gegensatz dazu nur um den Faktor 0,8 in NLF'VCR¹⁰ (von IC_{90} $170,2 \pm 5,0$ nM auf IC_{90} $200,4 \pm 7,4$ nM) bis zu einem Faktor von 2,0 in UKF-NB-6 (von IC_{90} $310,4 \pm 77,8$ nM auf IC_{90} $156,3 \pm 34,5$ nM). Besonders deutlich wird der sensibilisierende Effekt von Verapamil auf die Wirkung von SNS-032 in Neuroblastomzellen mit hoher Expression von ABCB1 in Abbildung 3.6.

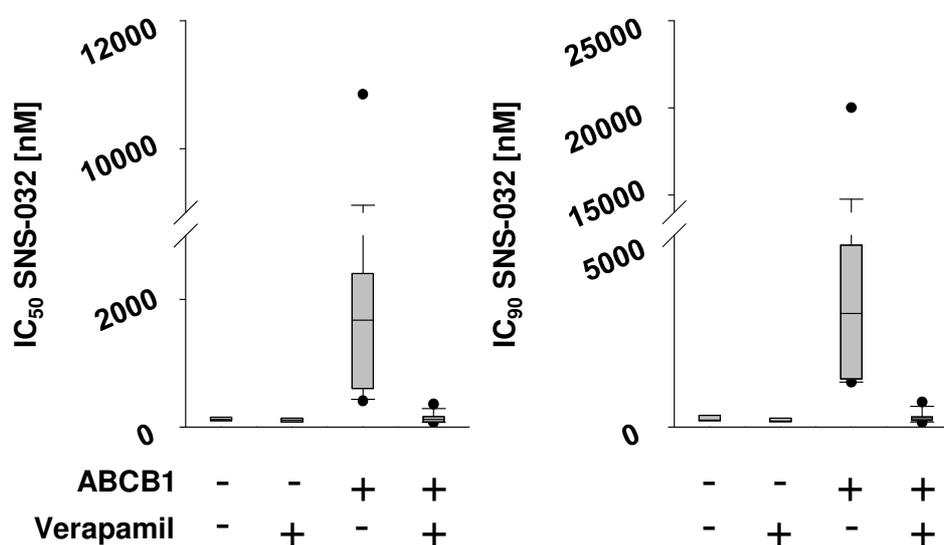


Abbildung 3.6: Wirkung von Verapamil auf die Sensitivität gegenüber SNS-032

Wirkung des ABCB1-Inhibitors Verapamil ($10 \mu\text{M}$) auf die Sensitivität von SNS-032 in stark ABCB1-exprimierenden bzw. niedrig ABCB1-exprimierenden Neuroblastomzellen. Die Box Plots zeigen die Konzentration von SNS-032, welche die Zellen in Ab- bzw. Anwesenheit von Verapamil ($10 \mu\text{M}$) um 50% (IC_{50}) oder 90% (IC_{90}) inhibieren. Die IC_{50} - und IC_{90} -Werte wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt.

In Abbildung 3.6 sind die in Kombination mit Verapamil untersuchten Neuroblastomzellen nach niedriger und hoher Expression von ABCB1 sortiert und die IC_{50} - und IC_{90} -Werte für SNS-032 in Form eines Box Plots dargestellt. In diesem ist zu erkennen, dass Zellen, welche eine hohe Expression von ABCB1 aufweisen, in Kombination mit Verapamil fast bis auf die IC_{50} - und IC_{90} -Werte für SNS-032

sensibilisiert wurden, welche ihre zugehörigen parentalen Zellen mit niedrigen ABCB1-Leveln zeigten. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen mit einer niedrigen Expression von ABCB1 in ihrer Sensitivität durch die Kombination von SNS-032 und Verapamil kaum beeinflusst.

Um den Einfluss von ABCB1 auf die antitumorale Wirkung von SNS-032 spezifisch nachzuweisen, wurde die mit einem lentiviralen Vektor kodierend für *ABCB1* transduzierte parentale Zelllinie UKF-NB-3 (UKF-NB-3^{ABCB1}) verwendet (Rothweiler et al., 2010). Diese und die zugehörige Kontrollzelllinie, welche mit einem Leervektor (UKF-NB-3^{piCer2}) transduziert worden war, wurden zunächst im MTT-Viabilitätsassay auf die Sensitivität gegenüber SNS-032 in Ab- bzw. Anwesenheit von 10 µM Verapamil untersucht. Die dabei bestimmten IC₅₀- und IC₉₀-Werte sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Wirkung des ABCB1-Inhibitors Verapamil (10 µM) auf die Sensitivität gegenüber SNS-032 in parentalen chemosensitiven, Leervektor-exprimierende (UKF-NB-3^{piCer2}) und ABCB1-überexprimierenden (UKF-NB-3^{ABCB1}) UKF-NB-3 Zellen. Die Konzentrationen, welche die Viabilität der Zellen um 50 % (IC₅₀) bzw. 90 % (IC₉₀) vermindern, wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt.

Zelllinie	SNS-032			
	IC ₅₀ (nM)		IC ₉₀ (nM)	
	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	148,9 ± 20,8	133,7 ± 22,9 (88,9 ± 5,3 %; 1,1) ¹	272,5 ± 36,6	235,7 ± 29,3 (1,2) ²
UKF-NB-3^{piCer2}	184,1 ± 41,3 (1,2) ³	156,5 ± 4,8 (90,3 ± 1,4 %; 1,2)	350,6 ± 275,4 (1,3)	254,5 ± 132,4 (1,4)
UKF-NB-3^{ABCB1}	5353 ± 1454 (35,9)	166,5 ± 8,7 (77,8 ± 7,0 %; 32,2)	12991 ± 3106 (47,7)	312,7 ± 117,9 (41,5)

¹ Viabilität der Zellen nach Behandlung mit 10 µM Verapamil allein (% relativ zur unbehandelten Kontrolle); IC₅₀ ohne Verapamil / IC₅₀ mit Verapamil

² IC₉₀ ohne Verapamil / IC₉₀ mit Verapamil / ³ Verhältnisse relativ zu UKF-NB-3

Der IC_{50} -Wert für SNS-032 erhöhte sich in den ABCB1-transduzierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen (IC_{50} 5353 ± 1454 nM) im Vergleich zu den parentalen UKF-NB-3 Zellen (IC_{50} 148,9 ± 20,8 nM) um das 36fache und konnte durch die Zugabe von 10 µM Verapamil um den Faktor 32,2 (IC_{50} 166,5 ± 8,7 nM) reduziert werden. Bei dem IC_{90} -Wert konnte bei den ABCB1-überexprimierenden UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen (IC_{90} 12991 ± 3106 nM) eine Steigerung um das 48fache gegenüber der Zelllinie UKF-NB-3 (IC_{90} 272,5 ± 36,6 nM) bestimmt werden. In Kombination mit Verapamil (10 µM) war der IC_{90} -Wert bei UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen um den Faktor 41,5 (IC_{90} 312,7 ± 117,9 nM) vermindert. Bei den Leervektor-transduzierten UKF-NB-3^{piCer2} Zellen konnte im Vergleich zu den parentalen UKF-NB-3 Zellen keine deutliche Veränderung des IC_{50} - und IC_{90} -Wertes festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob die Steigerung des IC_{50} - und IC_{90} -Wertes gegenüber SNS-032 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen im Vergleich zur parentalen UKF-NB-3 Zelllinie durch die stabile Expression von ABCB1 verursacht wurde, wurde die Expression von ABCB1 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen durch die Einführung von spezifischen siRNAs gegen ABCB1 transient gehemmt. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation nach einem optimierten Transfektionsprotokoll. Die RNAi-vermittelte Hemmung der Expression von ABCB1 in den UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen wurde 48 h nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie nach Markierung von ABCB1 mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3.7 A). Die funktionelle Kontrolle der Expressionshemmung von ABCB1 durch die Transfektion von ABCB1-spezifischen siRNAs erfolgte ebenfalls am Durchflusszytometer über die Bestimmung der Akkumulation des fluoreszierenden ABCB1-Substrates Rhodamin 123 (Abbildung 3.7 B).

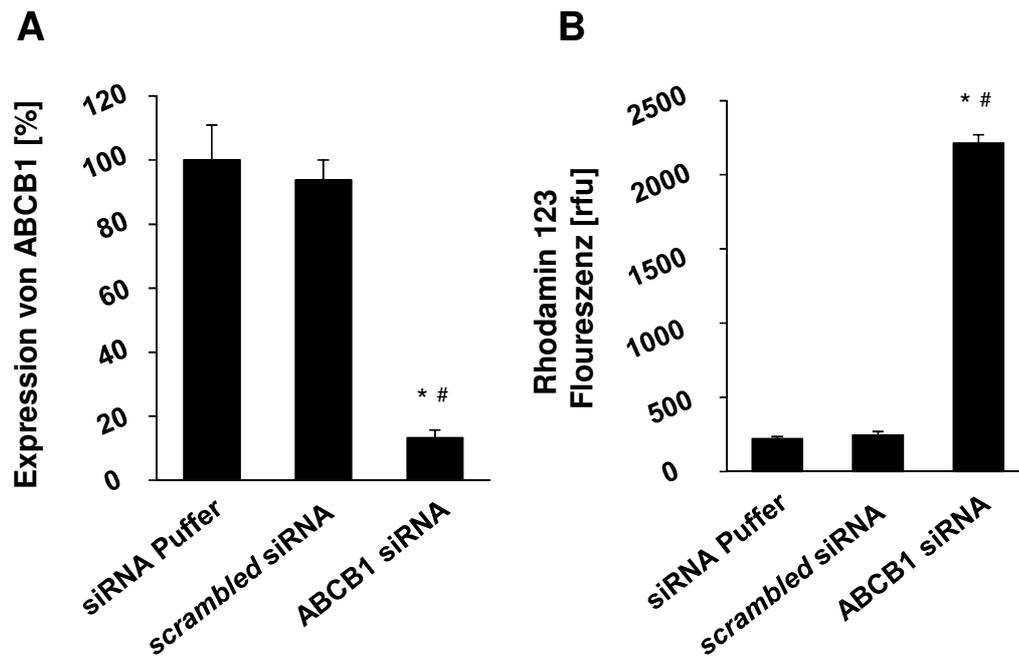


Abbildung 3.7: siRNA-vermittelte Hemmung von ABCB1 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen.

Die Expression von ABCB1 und Akkumulation des fluoreszierenden ABCB1-Substrates Rhodamin 123 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen 48 h nach der Transfektion mit spezifischen siRNAs gegen ABCB1. A) Die Expression wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ABCB1 am Durchflusszytometer bestimmt. B) Die transfizierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen wurden für 1 h mit 1 μ M Rhodamin 123 inkubiert und das Fluoreszenzsignal am Durchflusszytometer bestimmt. * $p < 0.05$ relativ zu mit siRNA Puffer transfizierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen; # $P < 0.05$ relativ zu mit *scrambled* siRNA transfizierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen

Durch die Transfektion mit spezifisch gegen ABCB1 gerichteten siRNAs wurde die Expression von ABCB1 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen signifikant auf $14,1 \pm 2,5$ % im Vergleich zu mit *scrambled* siRNAs transfizierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen (auf $13,2 \pm 2,4$ % im Vergleich zu den mit siRNA Puffer) vermindert und das fluoreszierende ABCB1-Substrat Rhodamin 123 wurde in mit ABCB1 siRNAs transfizierten Zellen ebenfalls signifikant um das 10fache stärker akkumuliert. Die transfizierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen wurden nachfolgend im MTT-Viabilitätsassay auf ihre Sensitivität gegenüber SNS-032 untersucht und die dabei bestimmten IC₅₀- und IC₉₀-Werte sind in Abbildung 3.8 A dargestellt. Zur Kontrolle wurden die transfizierten Zellen auch auf ihre Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum und bekannten ABCB1-Substrat Vincristin untersucht (Abbildung 3.8 B).

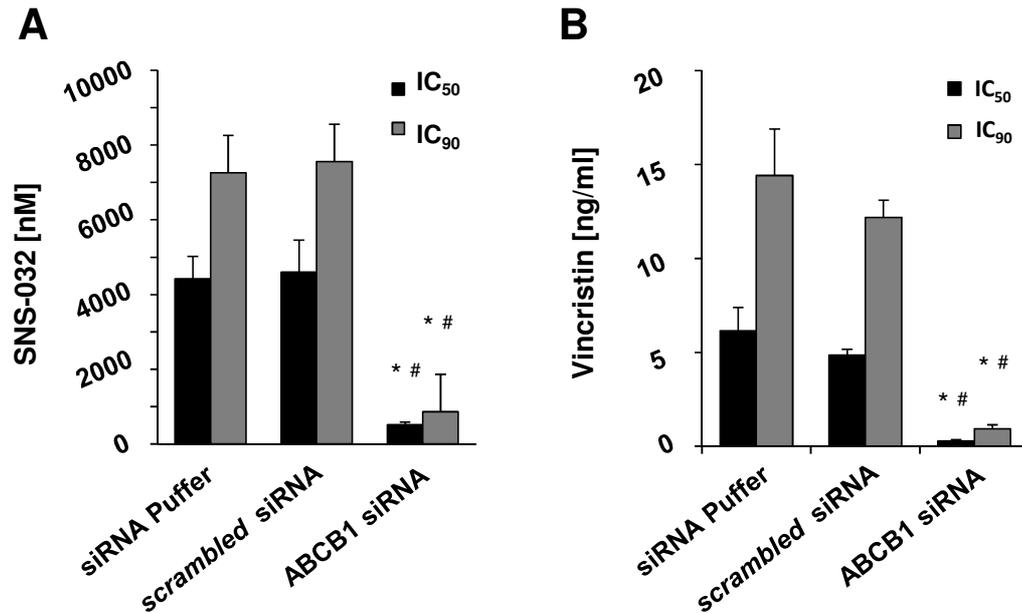


Abbildung 3.8: Wirkung der siRNA-vermitteltem Expressionshemmung von ABCB1 auf die Sensitivität gegenüber SNS-032 und Vincristin in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen

Die Konzentrationen von SNS-032 und Vincristin, welche die Viabilität von UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen um 50% (IC₅₀) oder 90% (IC₉₀) reduzieren, wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt. Der MTT-Viabilitätsassay wurde 48 h nach der Transfektion durchgeführt. * p < 0.05 relativ zu mit siRNA Puffer transfizierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen; # p < 0.05 relativ zu mit *scrambled* siRNA transfizierten UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen

Der IC₅₀-Wert für SNS-032 wurde in den UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen durch die Transfektion mit siRNAs gegen ABCB1 signifikant um das 8,9fache (ABCB1 siRNA IC₅₀ 0,51 ± 0,07 nM) im Vergleich zu den mit einer *scrambled* siRNA transfizierten Zellen (IC₅₀ 4,60 ± 0,9 nM) vermindert. Auch der IC₉₀-Wert war durch die Transfektion um das 8,8fache (*scrambled* siRNA IC₉₀ 7,56 ± 1,3 nM; ABCB1 siRNA IC₉₀ 0,86 ± 0,2 nM) signifikant reduziert. Bei dem Zytostatikum Vincristin wurde der IC₅₀-Wert durch die Transfektion von siRNAs gegen ABCB1 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen sogar um das 17,1fache (ABCB1 siRNA IC₅₀ 0,28 ± 0,1 nM) im Vergleich zu den mit einer *scrambled* siRNA transfizierten Zellen (*scrambled* siRNA IC₅₀ 4,85 ± 0,3 ng/ml) signifikant vermindert. Dies entspricht einer Verminderung auf den IC₅₀-Wert, welcher auch in parentalen UKF-NB-3 Zellen für Vincristin erreicht wird. Der IC₉₀-Wert konnte ebenfalls um das 13,1fache (*scrambled* siRNA IC₉₀ 12,19 ± 0,9 ng/ml; ABCB1 siRNA IC₉₀ 0,93 ± 0,2 ng/ml) signifikant reduziert werden.

Darüber hinaus wurde die stark ABCB1-exprimierende UKF-NB-3^fVCR¹⁰ Zelllinie genutzt, um die Akkumulation des fluoreszierenden ABCB1-Substrates Rhodamin 123 in den Zellen bei Zugabe von SNS-032 zu untersuchen. Dadurch kann analysiert werden, ob SNS-032 direkt mit dem Transporter interagiert und seine Funktion beeinflusst. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNS-032 und 10 μ M Verapamil als Positivkontrolle behandelt und die Akkumulation von Rhodamin 123 über die Fluoreszenzmessung am Durchflusszytometer detektiert (Abbildung 3.9).

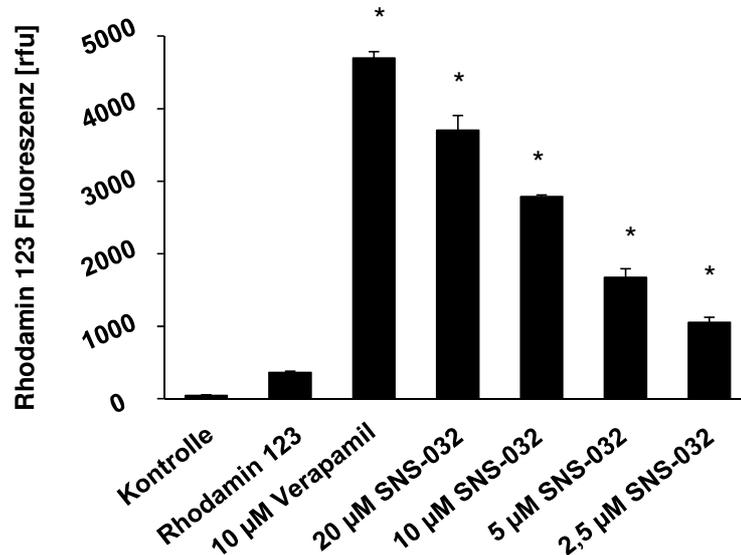


Abbildung 3.9: Wirkung von SNS-032 auf die Akkumulation von Rhodamin 123

Einfluss von SNS-032 bzw. dem ABCB1-Inhibitor Verapamil auf die Akkumulation des fluoreszierenden ABCB1-Substrates Rhodamin 123 in den stark ABCB1-exprimierenden UKF-NB-3^fVCR¹⁰ Zellen. * $P < 0,05$ verglichen zur Behandlung mit Rhodamin 123 allein

SNS-032 erhöhte konzentrationsabhängig und signifikant die Akkumulation von Rhodamin 123 in UKF-NB-3^fVCR¹⁰ Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auch die niedrigste eingesetzte Konzentration von 2,5 μ M SNS-032 führte noch zu einer signifikanten Akkumulation von Rhodamin 123.

Zusammenfassend bestätigen diese Daten, dass die Aktivität von SNS-032 in Neuroblastomzelllinien durch die Expression von ABCB1 beeinträchtigt wird und SNS-032 in hohen Konzentrationen die Funktion von ABCB1 beeinflussen kann.

3.2.2 Einfluss von ABCB1 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032 in primären Neuroblastomkulturen

Auch die primären Neuroblastomkulturen wurden im MTT-Viabilitätsassay in Kombination mit 10 μ M Verapamil auf ihre Sensitivität gegenüber SNS-032 und auf die Expression von ABCB1 untersucht (Abbildung 3.10).

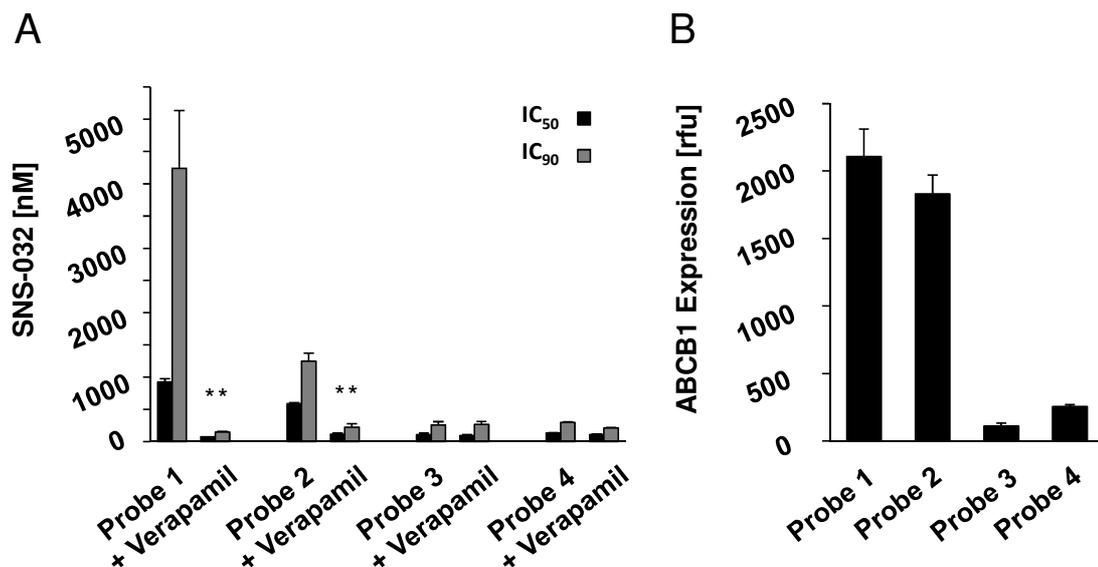


Abbildung 3.10: Wirkung von SNS-032 auf primäre Neuroblastomkulturen

(A) Wirkung von SNS-032 auf die Viabilität von primären Neuroblastomkulturen in Ab- und Anwesenheit des ABCB1-Inhibitors Verapamil (10 μ M). Die Konzentrationen, welche die Viabilität der Zellen um 50 % (IC₅₀) bzw. 90 % (IC₉₀) vermindern, wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt. * $p < 0,05$ verglichen zu SNS-032-Behandlung allein (B) Expression von ABCB1 in primären Neuroblastomkulturen. Die Expression wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ABCB1 am Durchflusszytometer bestimmt.

Die im MTT-Viabilitätsassay bestimmten IC₅₀- und IC₉₀-Werte der primären Neuroblastomkulturen 1 und 2 konnten durch die Zugabe von 10 μ M Verapamil deutlich vermindert werden, während die IC₅₀- und IC₉₀-Werte bei den Proben 3 und 4 nur wenig durch die Zugabe von Verapamil beeinflusst wurden (Abbildung 3.10 A). Wie ebenfalls in Abbildung 3.10 B zu erkennen ist, weisen die primären Neuroblastomkulturen 1 und 2 im Vergleich zu den Proben 3 und 4 eine starke Expression von ABCB1 auf.

Primäre Zellkulturen solider Tumore besitzen oft die Eigenschaft in sogenannten Tumorsphären zu wachsen. Diese zeichnen sich im Vergleich zu konventionellen adhärennten Zellkulturen, welche hauptsächlich zu einem konfluenten Einzelzellrasen wachsen, durch ihre mehrere Zellschichten umfassende dreidimensionale Struktur aus. Dies kann beispielsweise dazu genutzt werden um den antitumoralen Einfluss von Wirkstoffen auf Mikrotumore zu untersuchen, welcher durch seine strukturellen Eigenschaften einem Tumor im Patienten physiologisch ähnlicher ist. Für die Untersuchung der Wirkung von SNS-032 auf das Wachstumsvermögen primärer Neuroblastomkulturen wurde die Tumorprobe 1 verwendet, welche, wie bereits beschrieben, durch eine hohe Expression an ABCB1 charakterisiert ist (Abbildung 3.10 B). Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Tumorsphären wurden die fluoreszierenden Farbstoffe Ethidiumbromid und Calcein AM verwendet. Ethidiumbromid ist ein roter Farbstoff, welcher in regelmäßigen Abständen in die zelluläre DNA und RNA interkaliert und bei geeigneter Anregung Licht im roten Wellenlängenbereich emittiert. Da Ethidiumbromid die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht überwinden kann, werden bei nativer Behandlung der Zellen bei der Färbung nur tote Zellen markiert. Im Gegensatz dazu kann das Calcein AM-Molekül nur in lebenden Zellen durch zelluläre Esterasen zu Calcein gespalten werden, welches anschließend durch Bindung von Calciumionen ein starkes im grünen Wellenlängenbereich liegendes Fluoreszenzsignal ausstrahlt. Um den Einfluss von SNS-032 auf das Wachstum und die Viabilität von Tumorsphären zu untersuchen wurden die Zellen der primären Neuroblastomkultur zunächst vereinzelt und für 120 h mit 1 ng/ml Vincristin (VCR) oder 150 nM SNS-032 in Ab- bzw. Anwesenheit von 10 µM Verapamil in Zellkulturflaschen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde den Zellen die für eine Doppelfärbung geeignete Konzentration von Ethidiumbromid (500nM) und Calcein AM (50 nM) zugegeben und für 30 min inkubiert, bevor die Tumorsphären am Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden (Abbildung 3.11). Dabei wurden die Fluoreszenzsignale von Ethidiumbromid und Calcein zunächst einzeln aufgenommen und im Anschluss beide Aufnahmen mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes überlagert.

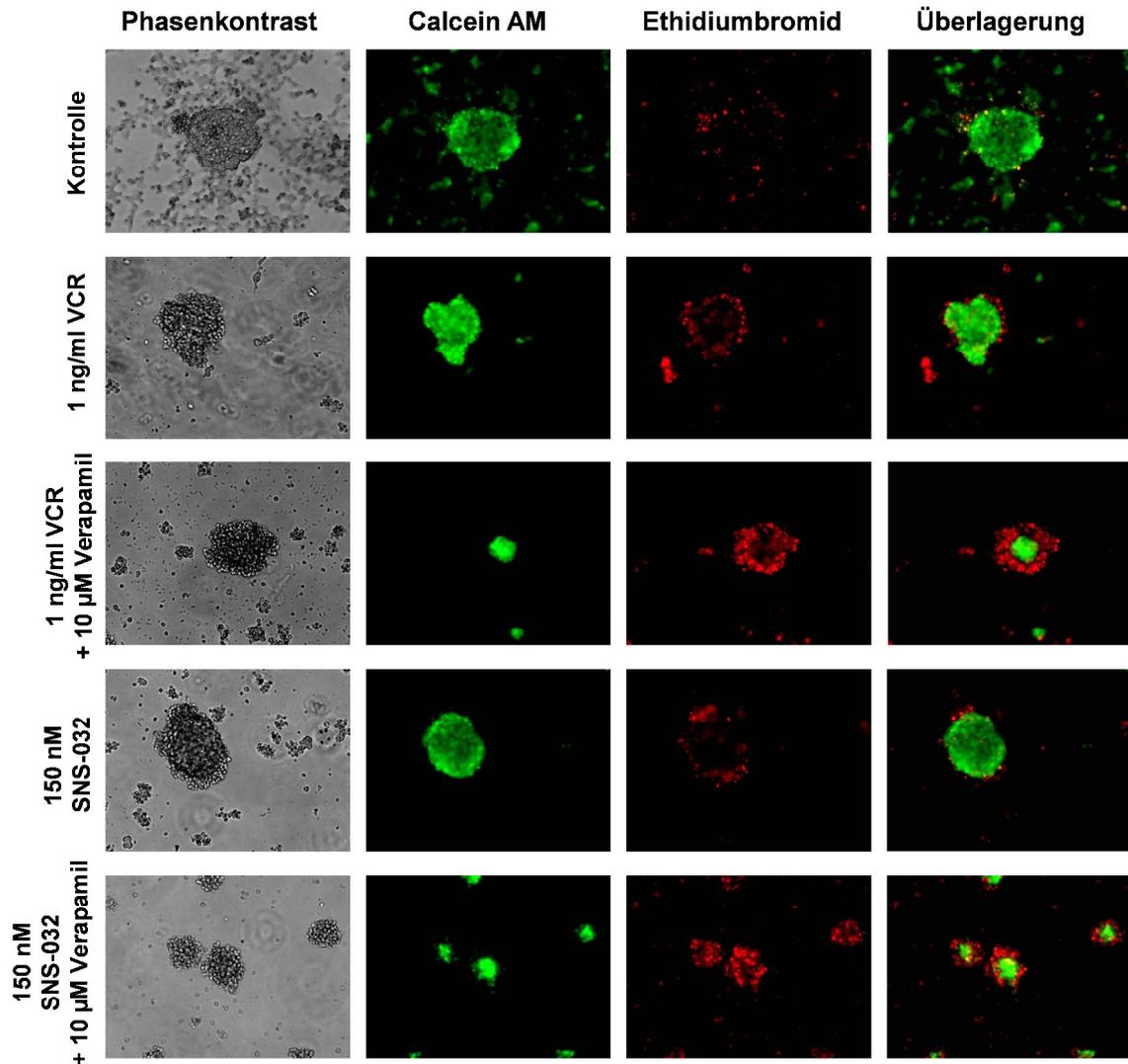


Abbildung 3.11: Wirkung von SNS-032 auf sphäroidisch wachsende Neuroblastomzellen

Dazu wurden die primären Neuroblastomzellen der Probe 1 vereinzelt und für 120 h mit 1 ng/ml Vincristin (VCR) oder 150 nM SNS-032 in Ab- bzw. Anwesenheit von 10 µM Verapamil behandelt. Nach der Inkubation wurden die Tumorsphären mit den fluoreszierenden Farbstoffen Calcein AM und Ethidiumbromid behandelt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

In der unbehandelten Kontrolle sind die Tumorsphären von runder Morphologie und es sind nur wenige tote Zellen angefärbt. Die Sphäroide, welche in Anwesenheit von 1 ng/ml Vincristin beziehungsweise 150 nM SNS-032 innerhalb von 5 Tagen gewachsen sind, zeigen einen sehr schmalen Ring toter Zellen (rot), welche die lebenden Zellen (grün) umgeben. In Kombination mit 10 µM Verapamil sind die Tumorsphären bei Vincristin und SNS-032 deutlich kleiner und es ist ein großer Ring toter Zellen (rot) um einen kleinen inneren Kern lebender Zellen (grün) zu erkennen.

3.2.3 Adaptierung von Neuroblastomzellen an SNS-032

Der Erwerb einer Resistenz gegen Zytostatika in Tumorzellen während oder nach einer Therapie stellt eines der Hauptprobleme bei der erfolgreichen Behandlung von Krebserkrankungen dar. Die Sammlung von resistenten Neuroblastomzelllinien in der *Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection*, welche durch schrittweise Adaptierung an diverse Zytostatika etabliert wurden, repräsentieren ein wichtiges Modell zur Untersuchung neuer potentieller Medikamente gegen chemoresistente Tumorzellen. Zur Erweiterung dieser Zellsammlung wurde die parentale Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3, welche in dieser Arbeit als Modell zur Untersuchung der antitumoralen Wirkung von SNS-032 verwendet wurde, schrittweise an steigende Konzentrationen von SNS-032 adaptiert. Zum Ende dieser Arbeit konnten die UKF-NB-3 Zellen ohne wesentlichen Einfluss auf die Zellteilungsrate mit einer Konzentration von 300 nM SNS-032 (UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM}) kultiviert werden. Die IC₅₀- und IC₉₀-Werte für SNS-032 in den chemosensitiven parentalen UKF-NB-3 Zellen und der an SNS-032 adaptierte Sublinie sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: Wirkung von SNS-032 in Ab- und Anwesenheit des ABCB1-Inhibitors Verapamil (10 µM) auf parentale und an SNS-032 adaptierte (UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM}) UKF-NB-3 Zellen. Die Konzentrationen, welche Viabilität der Zellen um 50 % (IC₅₀) bzw. 90 % (IC₉₀) vermindern, wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt.

Zelllinie	SNS-032 IC ₅₀ (nM)		SNS-032 IC ₉₀ (nM)	
	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	148,9 ± 20,8	133,7 ± 22,9 (1,1) ²	272,5 ± 36,6	235,7 ± 29,3 (1,2)
UKF-NB-3 ^r SNS-032 ^{300nM}	606,6 ± 16,4 (4,1) ³	162,4 ± 1,7 (3,7)	975,7 ± 112,8 (3,6)	222,4 ± 1,2 (4,4)

¹ Viabilität von UKF-NB-3 durch Behandlung von 10 µM Verapamil allein: 86,7 ± 1,3 % relativ zur unbehandelten Kontrolle / Viabilität von UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} durch Behandlung von 10 µM Verapamil allein: 92 ± 2,6 % relativ zur unbehandelten Kontrolle

² Verhältnisse relativ zu nicht mit Verapamil behandelten Zellen

³ Verhältnisse relativ zu UKF-NB-3 Zellen

Der IC₅₀-Wert für SNS-032 war in den an 300 nM SNS-032 adaptierten UKF-NB-3 Zellen (IC₅₀ 606,6 ± 16,4 nM) um den Faktor 4,1 im Vergleich zu den parentalen

UKF-NB-3 Zellen (IC_{50} $148,9 \pm 20,8$ nM) erhöht und konnte durch gleichzeitige Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Verapamil um den Faktor 3,7 (IC_{50} $162,4 \pm 1,7$ nM) vermindert werden, was dem ungefähren Wert für die parentalen UKF-NB-3 für SNS-032 entspricht. Der IC_{90} -Wert für SNS-032 war in den UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} Zellen (IC_{90} $975,7 \pm 112,8$ nM) im Vergleich zu den parentalen UKF-NB-3 Zellen ebenfalls deutlich um einen Faktor von 3,6 erhöht. Dieser konnte ebenfalls durch Zugabe von Verapamil wieder auf den parentalen Wert reduziert werden. Aufgrund dessen, dass die Zugabe des ABCB1 Inhibitors Verapamil die Sensitivität der UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} Zellen gegenüber SNS-032 so stark beeinflussen konnte, wurden die an SNS-032 adaptierten UKF-NB-3 Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie auf die Expression von ABCB1 untersucht (Abbildung 3.12). Als ABCB1-positive Kontrolle wurde die ABCB1-überexprimierende Zelllinie UKF-NB-3^rVCR¹⁰ verwendet.

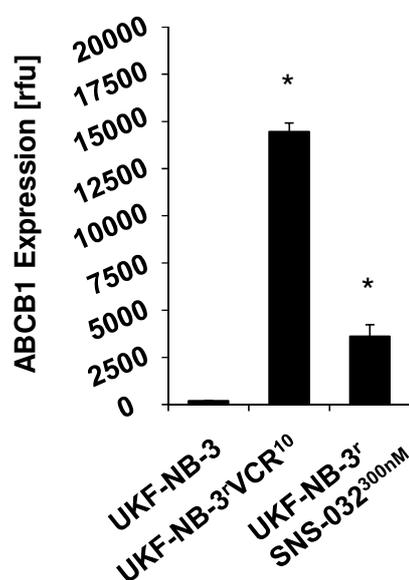


Abbildung 3.12: Expression von ABCB1 in UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} Zellen

Die Expression von ABCB1 in den Neuroblastomzelllinien wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ABCB1 am Durchflusszytometer bestimmt. * $p < 0,05$ verglichen zu UKF-NB-3 Zellen

Wie in Abbildung 3.12 zu erkennen ist, war die zelluläre Expression von ABCB1 in UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie signifikant um das 17,5fache erhöht. Die an SNS-032 adaptierten UKF-NB-3 Zellen wurden nachfolgend auch auf eine eventuelle Kreuzresistenz gegenüber anderen Zytostatika, insbesondere gegenüber bekannten ABCB1-Substraten, wie Docetaxel, Etoposid und Doxorubicin, untersucht. Die bestimmten IC_{50} - und IC_{90} -Werte sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8: Kreuzresistenz von an SNS-032 adaptierten (UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM}) UKF-NB-3 Zellen gegenüber diversen Zytostatika im Vergleich zu parentalen UKF-NB-3 Zellen. Die Konzentrationen, welche Viabilität der Zellen um 50 % (IC₅₀) bzw. 90 % (IC₉₀) vermindern, wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt.

	Cisplatin IC₅₀ (ng/mL)		Cisplatin IC₉₀ (ng/mL)	
Zelllinie	- Verapamil	+ Verapamil ¹	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	116,87 ± 8,6	120,62 ± 6,97 (1,0) ²	305,36 ± 25,65	233,31 ± 0,19 (1,3)
UKF-NB-3^r SNS-032^{300nM}	112,14 ± 17,37 (1,0) ³	119,51 ± 27,45 (0,9)	295,34 ± 53,48 (1,0)	227,42 ± 35,02 (1,3)
	Docetaxel IC₅₀ (ng/mL)		Docetaxel IC₉₀ (ng/mL)	
Zelllinie	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	1,09 ± 0,09	1,02 ± 0,12 (1,1)	2,23 ± 0,42	2,20 ± 0,45 (1,3)
UKF-NB-3^r SNS-032^{300nM}	4,55 ± 0,60 (4,2)	1,19 ± 0,11 (3,8)	> 40 (> 17,9)	2,77 ± 0,23 (> 14,4)
	Doxorubicin IC₅₀ (ng/mL)		Doxorubicin IC₉₀ (ng/mL)	
Zelllinie	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	4,79 ± 0,22	4,19 ± 0,18 (1,1)	9,13 ± 0,16	6,18 ± 0,03 (1,3)
UKF-NB-3^r SNS-032^{300nM}	11,57 ± 3,09 (2,4)	3,22 ± 0,94 (3,6)	24,45 ± 1,96 (2,7)	7,31 ± 0,98 (3,3)
	Etoposid IC₅₀ (ng/mL)		Etoposid IC₉₀ (ng/mL)	
Zelllinie	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	43,08 ± 2,62	38,83 ± 2,25 (1,1)	95,89 ± 10,88	61,90 ± 3,83 (1,5)
UKF-NB-3^r SNS-032^{300nM}	84,30 ± 9,10 (2,0)	38,58 ± 13,30 (2,2)	238,94 ± 26,6 (2,5)	68,92 ± 4,80 (3,5)
	Gemcitabin IC₅₀ (ng/mL)		Gemcitabin IC₉₀ (ng/mL)	
Zelllinie	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	1,51 ± 0,09	1,31 ± 0,25 (1,2)	2,22 ± 0,04	2,48 ± 0,04 (0,9)
UKF-NB3r SNS-032^{300nM}	0,90 ± 0,04 (0,6)	0,87 ± 0,16 (1,0)	1,37 ± 0,12 (0,6)	1,80 ± 0,41 (0,8)

Zelllinie	Topotecan IC ₅₀ (ng/mL)		Topotecan IC ₉₀ (ng/mL)	
	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
UKF-NB-3	2,33 ± 0,10	2,47 ± 0,25 (1,2)	3,80 ± 0,10	4,13 ± 0,15 (0,9)
UKF-NB-3r SNS-032^{300nM}	2,08 ± 0,11 (0,9)	2,33 ± 0,16 (0,9)	4,60 ± 0,49 (0,9)	5,51 ± 0,97 (0,8)

¹ Viabilität von UKF-NB-3 Zellen durch Behandlung von 10 µM Verapamil allein: 84,7 ± 3,7 % relativ zur unbehandelten Kontrolle

Viabilität von UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} Zellen durch Behandlung von 10 µM Verapamil allein: 90,7 ± 4,3 % relativ zur unbehandelten Kontrolle

² Verhältnisse relativ zu nicht mit Verapamil behandelten Zellen

³ Verhältnisse relativ zu UKF-NB-3 Zellen

Die an 300 nM SNS-032 adaptierte UKF-NB-3 Sublinie weist eine deutliche Kreuzresistenz (IC₅₀ und IC₉₀ UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} / IC₅₀ und IC₉₀ UKF-NB-3) gegenüber den eingesetzten ABCB1-Substraten auf. Die stärkste Kreuzresistenz konnte gegenüber dem Taxan Docetaxel (IC₅₀ 4,2fach / IC₉₀ > 40fach) festgestellt werden. Bei Doxorubicin konnte eine Erhöhung des IC₅₀-Wertes um das 2,4fache und bei dem IC₉₀-Wert eine Erhöhung um das 2,7fache detektiert werden. Gegenüber Etoposid, ebenfalls ein Substrat für ABCB1, konnte ebenso eine Kreuzresistenz in UKF-NB-3^rSNS-032^{300nM} (IC₅₀ 2,0fach / IC₉₀ 2,5fach) festgestellt werden. Alle Kreuzresistenzen konnten durch die Zugabe von 10 µM Verapamil aufgehoben werden. Gegenüber den Zytostatika Cisplatin, Gemcitabin und Topotecan konnte im Gegensatz dazu in den an SNS-032 adaptierten Zellen dagegen keine Kreuzresistenz festgestellt werden.

3.2.4 Einfluss von ABCG2 auf die zelluläre Sensitivität gegenüber SNS-032 in Neuroblastomzelllinien

Der ABC-Transporter ABCG2 liegt als halber Transporter vor und bildet durch Homodimerisierung eine funktionelle Einheit. Zu seinen Substraten innerhalb der in der Krebstherapie häufig eingesetzten Chemotherapeutika gehören Anthrazykline (z.B. Doxorubicin), Mitoxantron, Topotecan und das funktionelle Metabolit von Irinotecan (SN-38) (Gottesmann et al, 2002; Nobili et al, 2006). In normalen humanen Geweben wird ABCG2 in der Plazenta, Leber, Darm und Brustgewebe exprimiert (Gottesmann et

al, 2002). Um den Einfluss von ABCG2 auf die antitumorale Wirkung von SNS-032 zu untersuchen, wurde die ABCG2-überexprimierende Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3^{ABCG2}, welche mit einem Vektor codierend für das Transmembranprotein ABCG2 transduziert wurde, und die mit dem Leervektor transduzierte UKF-NB-3 Zelllinie (UKF-NB-3^{piG2}, Rothweiler et al, 2010) im MTT-Viabilitätsassay auf die Sensitivität gegenüber SNS-032 untersucht. Als Positivkontrolle wurde das bekannte ABCG2-Substrat und Zytostatikum Mitoxantron verwendet. Das aus dem Pilz Aspergillus gewonnene Fumitremorgin C wurde als spezifischer Inhibitor des ABC-Transporters ABCG2 genutzt. Die im MTT-Viabilitätsassay bestimmten IC₅₀- und IC₉₀-Werte sind in der Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: Einfluss der Expression von ABCG2 auf die antitumorale Wirkung von SNS-032 verglichen mit dem zytotoxischen ABCG2-Substrat Mitoxantron. Die Konzentrationen von SNS-032 und Mitoxantron, welche die Viabilität der ABCG2-exprimierenden und der Leervektor-exprimierenden Zellen (in Ab- bzw. Anwesenheit des ABCG2-Inhibitors Fumitremorgin C) um 50 % (IC₅₀) oder 90 % (IC₉₀) reduzieren, wurden durch den MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt.

	SNS-032 IC ₅₀ (nM)		SNS-032 IC ₉₀ (nM)	
Zelllinie	- Fumitremorgin C	+ Fumitremorgin C ¹	- Fumitremorgin C	+ Fumitremorgin C
UKF-NB-3 ^{piG2}	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01 (1,1) ²	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01 (1,0)
UKF-NB-3 ^{ABCG2}	0,34 ± 0,05 (2,4) ³	0,15 ± 0,02 (2,3)	0,69 ± 0,12 (2,8)	0,34 ± 0,04 (2,0)
	Mitoxantron IC ₅₀ (ng/ml)		Mitoxantron IC ₉₀ (ng/ml)	
Zelllinie	- Fumitremorgin C	+ Fumitremorgin C	- Fumitremorgin C	+ Fumitremorgin C
UKF-NB-3 ^{piG2}	0,21 ± 0,06	0,18 ± 0,05 (1,17)	0,34 ± 0,15	0,30 ± 0,13 (1,13)
UKF-NB-3 ^{ABCG2}	45,16 ± 8,39 (215,1)	0,14 ± 0,05 (322,6)	82,72 ± 21,45 (243,3)	0,48 ± 0,19 (172,3)

¹ Viabilität von UKF-NB-3^{piG2} Zellen durch Behandlung von 10 µM Fumitremorgin C allein: 91 ± 10% relativ zur unbehandelten Kontrolle / Viabilität von UKF-NB-3^{piG2} Zellen durch Behandlung von 10 µM Fumitremorgin C allein: 86 ± 12% relativ zur unbehandelten Kontrolle

² Verhältnis relativ zu nicht mit Fumitremorgin C behandelten Zellen

³ Verhältnis relativ zu UKF-NB-3^{piG2} Zellen

Die ABCG2-exprimierenden UKF-NB-3^{ABCG2} Zellen (IC_{50} $0,34 \pm 0,05$ nM) wiesen einen 2,4fach höheren IC_{50} -Wert für SNS-032 auf als die Zellen, welche mit dem Leervektor transduziert wurden (IC_{50} $0,15 \pm 0,02$ nM) und konnte durch die Zugabe des ABCG2-Inhibitors Fumitremorgin C wieder auf den IC_{50} -Wert von UKF-NB-3^{piG2} Zellen resensibilisiert (IC_{50} $0,15 \pm 0,02$ nM) werden. Der IC_{90} -Wert war in den ABCG2-überexprimierenden Zellen (IC_{90} $0,25 \pm 0,01$ nM) ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollzellen (IC_{90} $0,69 \pm 0,12$ nM) um einen Faktor von 2,8 erhöht und konnte durch Fumitremorgin C deutlich reduziert werden. Im Gegensatz dazu wies der IC_{50} - und IC_{90} -Wert von dem ABCG2-Substrat Mitoxantron in den UKF-NB-3^{ABCG2} eine vielfach stärkere Steigerung im Vergleich zu den mit Leervektor transduzierten Zellen auf. Der IC_{50} -Wert war um das 215fache (UKF-NB-3^{ABCG2} IC_{50} $45,16 \pm 8,39$ ng/ml / UKF-NB-3^{piG2} IC_{50} $0,21 \pm 0,06$ ng/ml) und der IC_{90} -Wert um das 243fache (UKF-NB-3^{ABCG2} IC_{90} $82,72 \pm 21,45$ ng/ml / UKF-NB-3^{piG2} IC_{90} $0,34 \pm 0,15$ ng/ml) erhöht, welcher wiederum durch die Zugabe von 10 μ M Fumitremorgin C beinahe auf das Niveau der UKF-NB-3^{piG2} Zellen vermindert werden konnte.

3.3 Einfluss von p53 auf die zelluläre Antwort von Neuroblastomzellen zu SNS-032

Der Transkriptionsfaktor p53 gehört zu den Tumorsuppressorproteinen und wird bei fehlerhafter DNA-Replikation oder induzierten Schäden an der DNA aktiviert und reguliert die Expression verschiedener Gene. Dies führt zur Regulation diverser zellulärer Prozesse wie beispielsweise Apoptose und Differenzierung. Da p53 in vielen Tumorentitäten zu einem hohen Prozentsatz mutiert oder in seiner Funktion gestört ist (Meek, 2009), ist es bei der Untersuchung neuer potentieller antitumorale Wirkstoffe von besonderem Interesse die Abhängigkeit der Wirkung vom Vorhandensein von funktionalem p53 zu überprüfen. Zunächst wurde mittels Western Blot Analyse die Expression von p53 und eines im p53-Signalweges nachfolgenden Zielprotein, in diesem Fall der CDK-Inhibitor 1 (p21), nach der Behandlung mit 300 nM SNS-032 in den parentalen, chemosensitiven Zelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 untersucht (Abbildung 3.13).

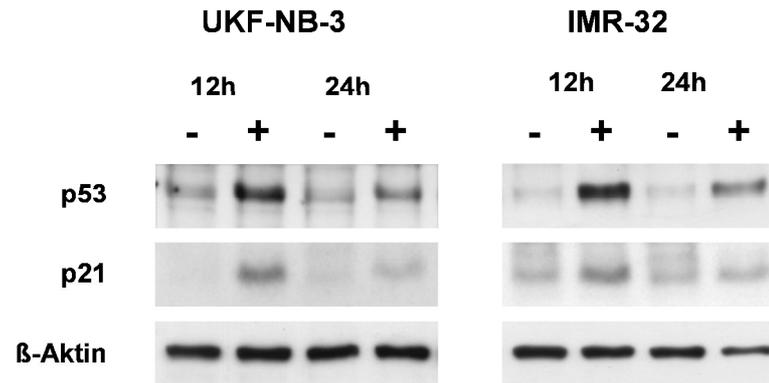


Abbildung 3.13: SNS-032-bedingte Induktion der Expression von p53 und p21 in Neuroblastomzellen.

UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen wurden für 24 h mit 300 nM SNS-032 behandelt und p53 und p21 mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Die Detektion von β -Aktin diene als Ladekontrolle für den Western Blot.

Die Behandlung mit 300 nM SNS-032 induzierte in den parentalen UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen eine deutliche Akkumulation von p53 und dem im Signalweg nachfolgendem p21 nach 12 und 24 h.

Um zu untersuchen, inwiefern das Vorhandensein des Tumorsuppressorproteins p53 innerhalb der zellulären Antwort auf SNS-032 eine Rolle spielt, wurde die Expression von p53 in den p53-Wildtyp Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 (UKF-NB-3^{p53-shRNA}) und IMR-32 (IMR-32^{p53-shRNA}) mit Hilfe eines lentiviralen Vektors codierend für eine spezifische shRNA gegen p53 in seiner Expression stabil gehemmt (Rothweiler, 2010). Für die Negativkontrolle wurden beide Zelllinien mit einem lentiviralen Vektor transduziert, welcher eine *scrambled* shRNA Sequenz enthält (UKF-NB-3^{scr-shRNA} und IMR-32^{scr-shRNA}). Um die funktionale Hemmung von p53 zu analysieren, wurden die parentalen, p53-shRNA und scr-shRNA transduzierten UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen neben SNS-032 auch auf ihre Sensitivität gegenüber Nutlin-3 mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassays untersucht und die IC₅₀- und IC₉₀-Werte bestimmt (Abbildung 3.14). Nutlin-3 ist ein MDM2 (murine double minute 2)-Inhibitor und induziert durch die Bindung an MDM2 die Freisetzung von p53, welches nachfolgend die Apoptose der Zellen auslöst (Michaelis et al., 2009). Dieser Vorgang ist vom Vorhandensein von funktionalem p53 abhängig (Michaelis et al., 2011).

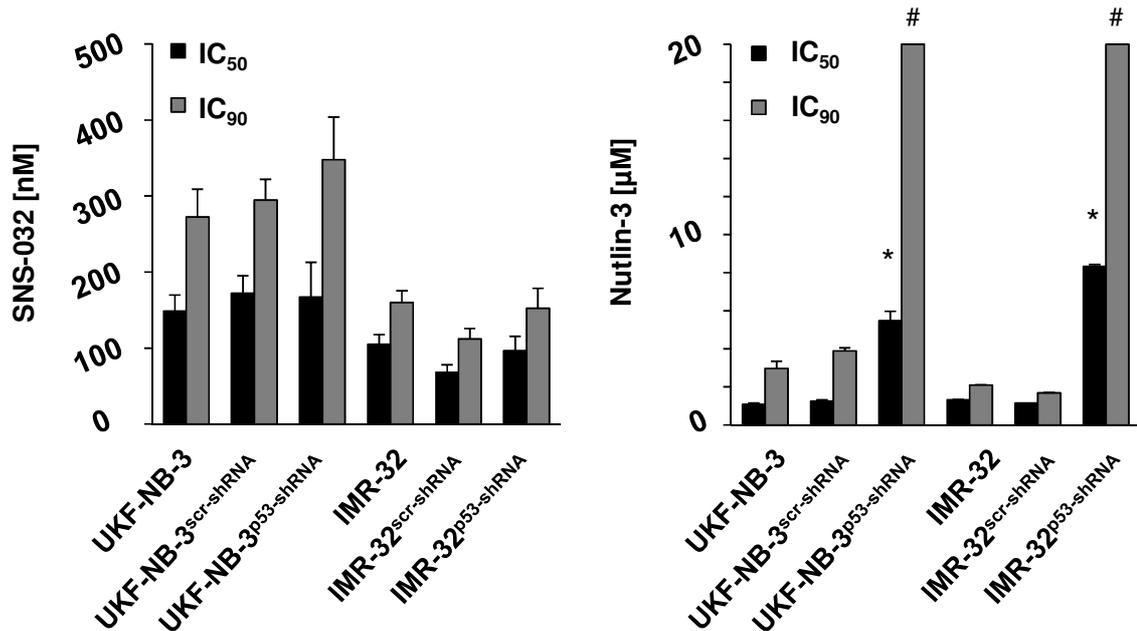


Abbildung 3.14: Antitumorale Wirkung von SNS-032 in p53 depletierten Neuroblastomzellen

Gezeigt sind Konzentrationen, welche die Viabilität von UKF-NB-3 und IMR-32 um 50 % (IC₅₀) oder 90 % (IC₉₀) in An- bzw. Abwesenheit von funktionalem p53 inhibieren. Die Expression des p53 Proteins wurde in den Zelllinien UKF-NB-3^{p53-shRNA} und IMR-32^{p53-shRNA} über einen lentiviralen Vektor gehemmt. UKF-NB-3^{scr-shRNA} und IMR-32^{scr-shRNA} wurden mit einem Kontrollvektor codierend für eine nicht-gerichtete zufällige shRNA transduziert. Als Kontrolle wurde das von funktionellem p53 abhängige Nutlin-3 verwendet. Die Konzentrationen wurden durch den MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h bestimmt. * p < 0,05 verglichen zur *scrambled* shRNA Kontrolle, # IC₉₀ > 20µM

Die im MTT-Viabilitätsassay bestimmten IC₅₀- und IC₉₀-Werte zeigten, dass die Sensitivität gegenüber Nutlin-3 in den p53-gehemmten UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen im Vergleich zu den parentalen und den mit einer *scrambled* shRNA transduzierten Zellen signifikant reduziert war. Der IC₅₀-Wert für Nutlin-3 war in den UKF-NB-3^{p53-shRNA} Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen um den Faktor 5,1 (UKF-NB-3^{p53-shRNA} IC₅₀ 5,47 ± 0,50 µM / UKF-NB-3 IC₅₀ 1,08 ± 0,06 µM) erhöht, während der IC₉₀ um über das 6,8fache (UKF-NB-3^{p53-shRNA} IC₉₀ > 20 µM / UKF-NB-3 IC₉₀ 2,96 ± 0,39 µM) höher war. In den IMR-32^{p53-shRNA} Zellen war die Sensitivität gegenüber Nutlin-3 im Vergleich zu parentalen IMR-32 Zellen um das 6,3fache (IMR-32^{p53-shRNA} IC₅₀ 8,33 ± 0,10 µM / IMR-32 IC₅₀ 1,31 ± 0,01 µM) bzw. sogar um den Faktor > 9,6 (IMR-32^{p53-shRNA} IC₉₀ 8,33 ± 0,10 µM / IMR-32 IC₉₀ 1,31 ± 0,01 µM) reduziert. Im Gegensatz dazu wurde die Sensitivität beider Neuroblastomzelllinien gegenüber SNS-032 durch die shRNA-vermittelte Hemmung von p53 kaum beeinflusst. Das Verhältnis der p53-depletierten

im Vergleich zur parentalen UKF-NB-3 lag bei dem IC_{50} -Wert bei 1,12 und bei dem IC_{90} -Wert bei 1,28. In den untersuchten IMR-32 Zellen war das Verhältnis sogar noch näher zur parentalen Zelllinie (IC_{50} 0,92 / IC_{90} 0,95). Des Weiteren wiesen auch die 19 untersuchten an 10 μ M Nutlin-3 adaptierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Sublinien (siehe Tabelle 3.1), welche verschiedene *loss of function* Mutationen des p53-Gens aufweisen, eine ähnliche Sensitivität zu SNS-032 im Vergleich zu ihren parentalen Zelllinien auf. Die Verhältnisse zwischen parentaler und an Nutlin-3 adaptierter Sublinie (IC_{50} UKF-NB-3 bzw. UKF-NB-6 / IC_{50} UKF-NB-3^{rNutlin^{10 μ M}} bzw. UKF-NB-6^{rNutlin^{10 μ M}}) lagen bei dem IC_{50} -Wert für SNS-032 zwischen 0,67 bei UKF-NB-3Klon3^{rNutlin^{10 μ M}} (IC_{50} 111,9 \pm 18,3 nM) und UKF-NB-3Klon3 (IC_{50} 167,2 \pm 38,4 nM) und 1,8 bei UKF-NB-6^{rNutlin^{10 μ M}} (IC_{50} 197,5 \pm 2,7 nM) und UKF-NB-6 (IC_{50} 109,5 \pm 18,2 nM). Die einzige Ausnahme stellte die Sublinie UKF-NB-6^{rNutlin^{10 μ M}}IV (IC_{50} 239,1 \pm 7,4 nM) dar, welche eine etwas verminderte Sensitivität gegenüber SNS-032 um den Faktor 2,18 im Vergleich zur parentalen UKF-NB-6 Zelllinie aufwies.

3.4. Einfluss von SNS-032 auf die Proliferation und den Zelltod von Neuroblastomzellen

Um den Einfluss von SNS-032 auf die Zellviabilität, welcher zuvor schon in MTT-Viabilitätsassay mit einer Inkubationszeit von 120 h nachgewiesen wurde, im zeitlichen Verlauf für die nachfolgenden Untersuchungen definierter einordnen zu können, wurden die parentalen Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 zunächst für 24 bis 72 h mit 300 nM SNS-032 behandelt und die Viabilität jeweils mit dem MTT-Viabilitätsassay bestimmt (Abbildung 3.15).

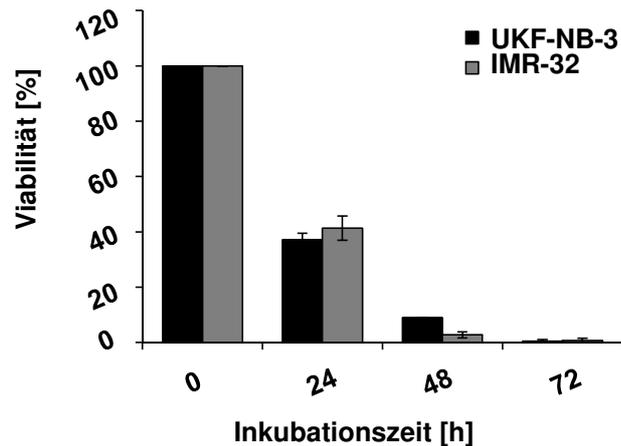


Abbildung 3.15: Einfluss von 300 nM SNS-032 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen im kinetischen Verlauf

Die Zellviabilität wurde relativ zu unbehandelten Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 bis 72 h im MTT-Viabilitätsassay bestimmt.

Die Zeitkinetik zeigt deutlich, dass schon nach 24 h die Viabilität durch 300 nM SNS-032 in den Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 um über 50 % reduziert wurde und nach 72 h konnte keine wesentliche Viabilität der Zellen mehr festgestellt werden. Nachfolgend diesen Ergebnissen wurden die Untersuchungen zur SNS-032-induzierten Apoptose mit 100 und 300 nM SNS-032 durchgeführt.

Um zu bestimmen, auf welche Weise SNS-032 die Proliferation in Neuroblastomzellen beeinflusst und letztendlich den Zelltod auslöst, wurden verschiedene Schritte des intrinsischen Apoptoseweges näher untersucht. Löst ein intrazellulärer Stimulus die Apoptosekaskade aus, wird zunächst das zur Bcl-Familie gehörende cytosolische BAX Protein aktiviert. Dies führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des Proteins und BAX integriert sich nachfolgend in die mitochondriale Membran ein. Diese Konformationsänderung kann zum Nachweis der BAX-Aktivierung genutzt werden, da für einen spezifischen anti-BAX-Antikörper (Klon 6A7) ein zuvor verborgenes Epitop erst dann frei liegt und aktivierte BAX-Proteine fluoreszenzmarkiert und im Durchflusszytometer detektiert werden können. Um zu bestimmen, ob die Behandlung von Neuroblastomzellen mit SNS-032 zu einer Aktivierung von BAX führt, wurden die parentalen UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen für 24 h mit 100 und 300 nM SNS-032 inkubiert und anschließend auf aktivierte BAX-Proteine im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.16).

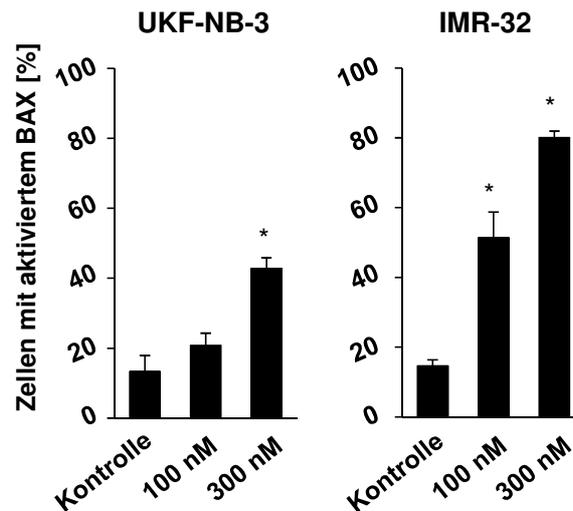


Abbildung 3.16: Aktivierung von BAX durch SNS-032 in Neuroblastomzellen

Prozentualer Anteil von aktiviertem BAX in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 für 24 h. Als Kontrolle dienten unbehandelte UKF-NB-3 bzw. IMR-32 Zellen. * $p < 0,05$ verglichen zu unbehandelten Zellen

In beiden parentalen Neuroblastomzelllinien konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Zellen mit aktiviertem BAX nach 24 stündiger Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 nachgewiesen werden. In IMR-32 Zellen erreicht die Steigerung bei 100 nM SNS-032 auf $51,3 \pm 7,3$ % im Vergleich zu $14,6 \pm 1,8$ % in der unbehandelten Kontrolle nach 24 h schon ein signifikantes Niveau, während in UKF-NB-3 Zellen erst bei 300 nM SNS-032 eine signifikante Steigerung der positiv auf aktiviertes BAX markierten Zellen erreicht wurde.

Der nächste Schritt im Ablauf des intrinsischen Apoptoseweges ist die Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials (ψ). In gesunden Zellen wird das Membranpotential durch den negativ geladenen Innenraum der Mitochondrien aufrechterhalten. Bei der Apoptose wird dieses durch Porenbildung, an der das BAX-Protein wahrscheinlich selbst beteiligt ist, destabilisiert. Das unterschiedliche Membranpotential der Mitochondrien von gesunden und in Apoptose befindlichen Zellen kann durch den lipophilen, positiv geladenen Fluoreszenzfarbstoff JC-1 mit Hilfe des Durchflusszytometers nachgewiesen werden, da JC-1 sich aufgrund seiner Ladung in den gesunden, negativ geladenen Mitochondrien anreichert und rot (bei 590 nm) fluoreszierende Aggregate bildet. Ist das Membranpotential der Mitochondrien jedoch wie in apoptotischen Zellen destabilisiert, verbleiben die JC-1-Moleküle als Monomere im Cytosol und fluoreszieren im weniger im roten und eventuell mehr im

grünen (maximal bei 527 nm) Bereich. Im Durchflusszytometer können auf diese Weise prozentual die Zellen mit degradiertem mitochondrialen Membranpotential bestimmt werden. Dazu wurden die parentalen UKF-NB-3 und IMR-32 Zelllinien für 24h mit 100 und 300 nM SNS-032 behandelt, anschließend mit JC-1 inkubiert und der prozentuale Anteil der Zellen mit degradiertem Membranpotential im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.17).

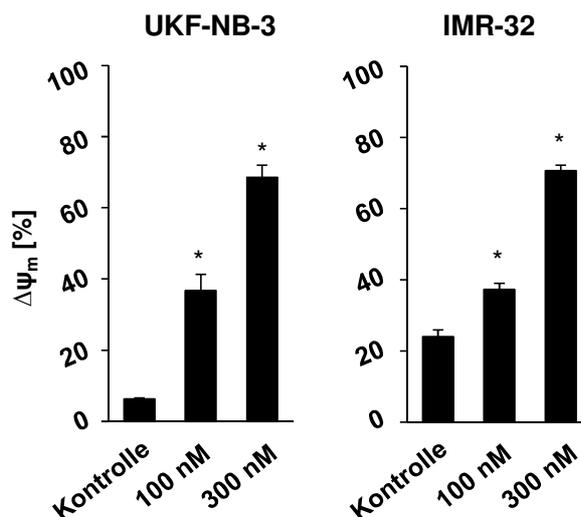


Abbildung 3.17: Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (ψ) durch SNS-032 in Neuroblastomzellen

Prozentualer Anteil von Zellen mit degradiertem mitochondrialen Membranpotential in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 für 24 h. Als Kontrolle dienen unbehandelte UKF-NB-3 bzw. IMR-32 Zellen. * $p < 0,05$ verglichen zu unbehandelten Zellen

In UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen konnte bereits nach der Behandlung mit 100 nM SNS-032 für 24 h ein signifikanter prozentualer Anstieg an Zellen mit degradiertem mitochondrialem Membranpotential detektiert werden. In UKF-NB-3 Zellen konnte eine Steigerung auf $36,7 \pm 4,6$ % bei 100 nM SNS-032 und $68,6 \pm 3,4$ % bei 300 nM im Vergleich zu $6,25 \pm 0,3$ % in unbehandelten Zellen festgestellt werden. In IMR-32 Zellen erreichte der prozentuale Anteil von Zellen mit degradiertem mitochondrialen Membranpotenzial nach Behandlung mit SNS-032 ähnliche Werte wie in UKF-NB-3 Zellen, jedoch war der Grundzustand der unbehandelten Zellen mit $24,0 \pm 2,0$ % deutlich höher.

Nach dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ist auch die Integrität der Mitochondrienmembran selbst destabilisiert und Bestandteile aus dem Inneren der Mitochondrien können ins Cytosol gelangen. So auch das wasserlösliche Cytochrom C, welches zur Elektronentransportkette im Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran gehört und im intrinsischen Apoptoseweg für den weiteren Verlauf eine wichtige Rolle spielt. Durch die Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin kann ins Cytosol freigesetztes Cytochrom C aus den Zellen gewaschen werden und im Anschluss können die Zellen auf ihren Anteil an noch vorhandenem Cytochrom C untersucht werden. Für 24 h mit je 100 und 300 nM SNS-032 behandelte UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen wurden permeabilisiert, mit einem spezifischen anti-Cytochrom C-Antikörper inkubiert und im Durchflusszytometer auf den prozentualen Anteil an Zellen ohne nachweisbarem Cytochrom C analysiert (Abbildung 3.18).

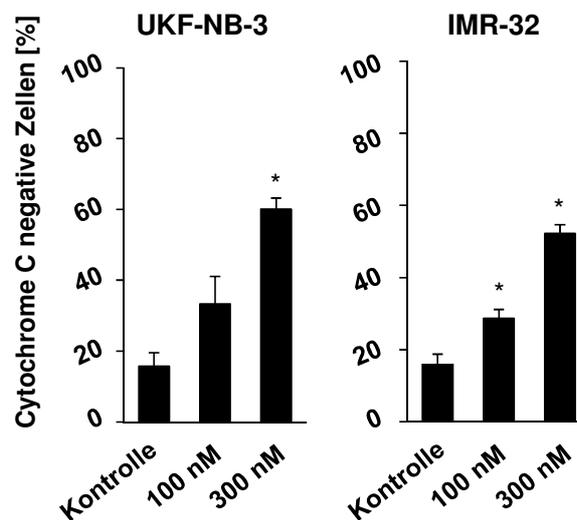


Abbildung 3.18: Freisetzung von Cytochrom C durch SNS-032 in Neuroblastomzellen

Prozentualer Anteil an Zellen mit freigesetztem Cytochrom C in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 für 24 h. Als Kontrolle dienten unbehandelte UKF-NB-3 bzw. IMR-32 Zellen. * $p < 0,05$ verglichen zu unbehandelten Zellen

In beiden Neuroblastomzelllinien konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg an Cytochrom C-negativen Zellen nach der Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 für 24 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. In UKF-NB-3 Zellen stieg der prozentuale Anteil an Zellen ohne nachweisbarem Cytochrom C auf $33,3 \pm 7,7$ % bei 100 nM SNS-032 und $60,1 \pm 3,2$ % bei 300 nM im Vergleich zu

15,7 ± 3,8 % in unbehandelten Zellen. In IMR-32 Zellen wurden ähnliche Werte nach der Behandlung festgestellt.

Aus Mitochondrien freigesetztes Cytochrom C bindet im weiteren Verlauf der intrinsischen Apoptose im Cytosol an Apaf1 (*apoptotic protease activating factor 1*), welches anschließend zu einem radartigem Heptamer, dem sogenannten Apoptosom, aggregiert. Das Apoptosom rekrutiert im Anschluss mehrere Moleküle der Initiatorprocaspase 9 und fördert somit eine autokatalytische Spaltung in ihre aktive Form. Die aktivierte Caspase 9 spaltet und aktiviert innerhalb der Caspasekaskade wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7. Mittels eines chemolumineszenten Caspase 3/7 spezifischen Substrat-Assays kann die Aktivität dieser beiden Caspasen detektiert werden. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit SNS-032 in Neuroblastomzellen zu einer Aktivierung von Caspase 3 und 7 führt, wurden UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen für 6 und 24 h mit 100 und 300 nM SNS-032 in einer 96-Lochplatte inkubiert und anschließend das Chemolumineszenzsignal im Photometer bestimmt. Das Signal der unbehandelten Kontrollen wurde anschließend auf 100 % gesetzt und die bestimmten Signale der mit SNS-032 behandelten Zellen im Verhältnis dazu umgerechnet (Abbildung 3.19).

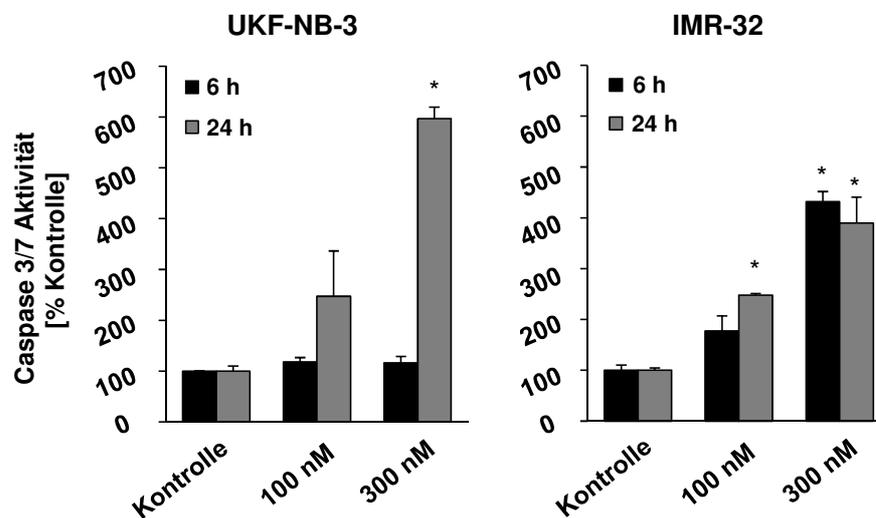


Abbildung 3.19: Aktivierung der Caspase 3 und 7 durch SNS-032 in Neuroblastom-zellen

Enzymatische Aktivität der Caspase 3 und 7 in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 für 6 und 24 h im Vergleich zur Kontrolle. Als Kontrolle dienen unbehandelte UKF-NB-3 bzw. IMR-32 Zellen. Nach erfolgter Inkubationszeit wurde den Zellen das Substrat zugegeben und die Chemilumineszenz im Photometer bestimmt. * p < 0,05 verglichen zu unbehandelten Zellen

In IMR-32 Zellen konnte bereits nach 6 h Behandlungszeit mit SNS-32 eine konzentrationsabhängige Steigerung der Aktivität von Caspase 3 und 7 detektiert werden, während in UKF-NB-3 Zellen erst nach 24 h die Aktivität der Caspasen 3 und 7 konzentrationsabhängig durch SNS-032 induziert wurde.

Die Spaltung der einzelnen Caspasen kann auch im Western Blot mittels spezifischer Antikörper, welche einerseits das ungespaltene Protein (Procaspase) und andererseits auch die Spaltprodukte (aktivierte Caspase) binden kann, nachgewiesen werden. Die durch die aktivierte Caspase 9 gespaltene Caspase 3 bindet seinerseits das Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP) Protein, welches in der Lage ist Einzelstrangbrüche der DNA zu erkennen und die DNA-Reparatur einzuleiten. Die Spaltung des PARP Proteins durch Caspase 3 in ein 89 kDa und 24 kDa großes Spaltprodukt (gespaltenes PARP) kann ebenfalls im Western Blot nachgewiesen werden. Die Expression und Spaltung der Proteine Caspase 3, 9 und PARP wurde im Western Blot in den Neuroblastomzellen UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 nach Inkubation mit 300 nM SNS-032 für 12 und 24 h analysiert (Abbildung 3.20).

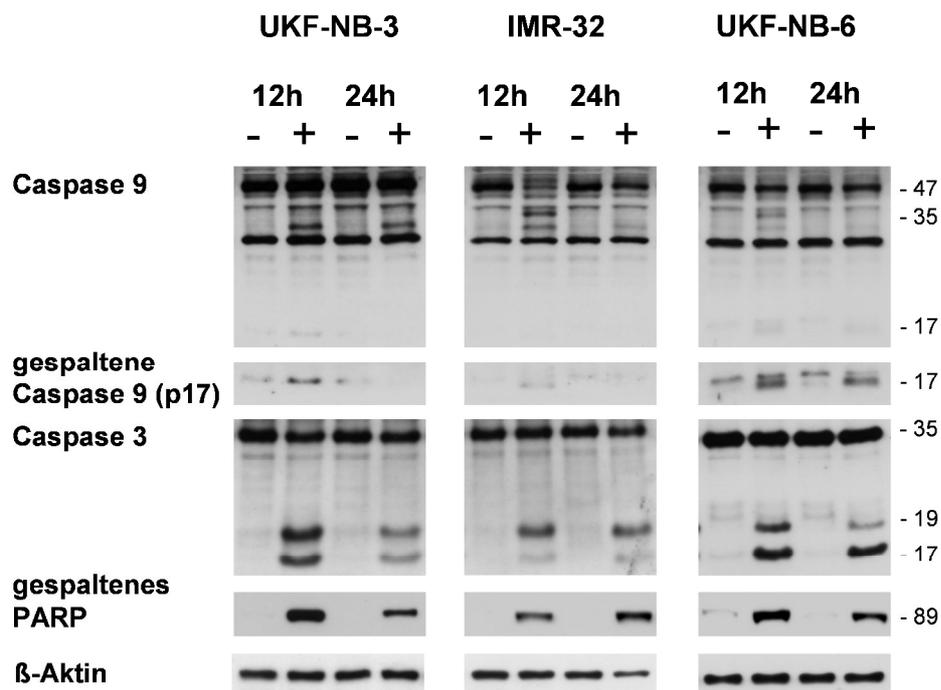


Abbildung 3.20: Spaltung von Caspase 9, Caspase 3 und PARP durch SNS-032 in Neuroblastomzellen

Nachweis der Spaltung von Caspase 9 und 3 und PARP in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen nach Behandlung mit 300 nM SNS-032 für 12 und 24 h mittels Western Blot Analyse. Als Kontrolle dienten unbehandelte UKF-NB-3, IMR-32 bzw. UKF-NB-6 Zellen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

In allen drei parentalen Zelllinien konnten nach 12 und 24 h die Spaltprodukte der Caspase 9 (35 und 17 kDa) detektiert werden. Die Spaltprodukte der Caspase 3 (17 und 19 kDa) und PARP (89 kDa) konnten ebenfalls zu beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden.

Ein weiteres Merkmal apoptotischer Zellen ist die Fragmentierung der DNA in der späten Phase der Apoptose. In der Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer, bei welcher die DNA mit fluoreszierenden, sich in die DNA interkalierenden Farbstoffen, markiert wird, sind Zellen mit fragmentierter DNA in der Sub-G₁-Phase zu finden. Diese Phase ist durch einen geringeren Anteil an DNA pro Zelle als in der G₁-Phase charakterisiert. Die Zellzyklusverteilung ist in Abbildung 3.21 für die parentalen Zelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 für zunächst unbehandelte und jeweils mit 100 und 300 nM SNS-032 inkubierte Zellen nach 48 h exemplarisch dargestellt.

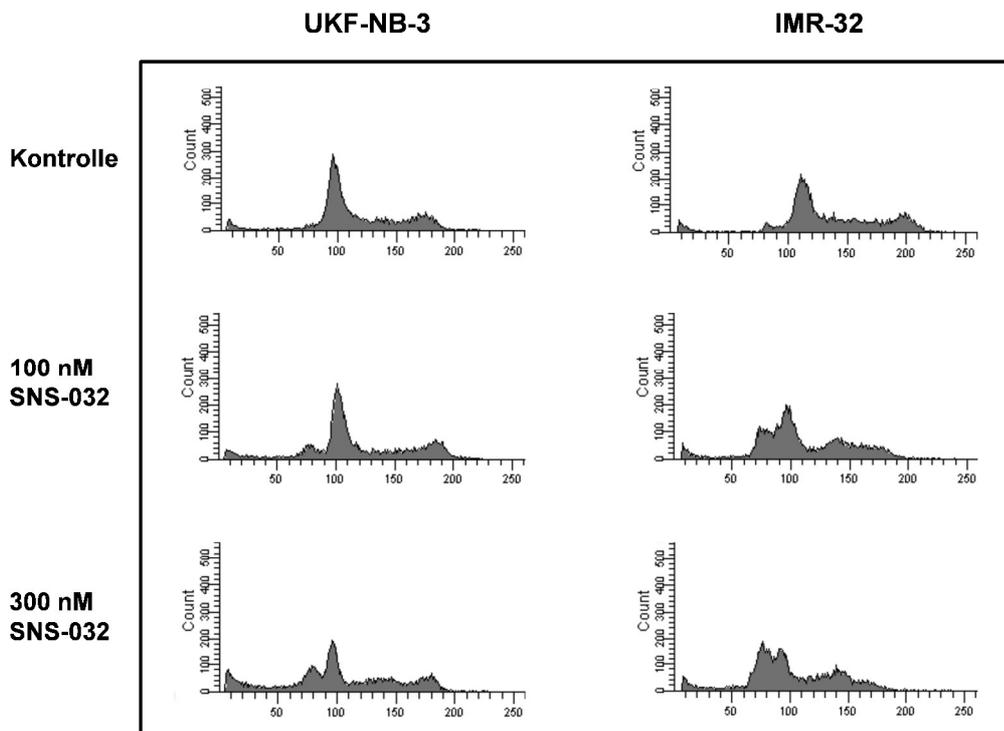


Abbildung 3.21: Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit SNS-032

Exemplarische Zellzyklusverteilung in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 für 48 h mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle dienen unbehandelte UKF-NB-3 bzw. IMR-32 Zellen.

In unbehandelten Zellen ist der Zellzyklus durch eine klare Verteilung der G₁/G₀-, S- und G₂/M-Phase charakterisiert. Nach der Behandlung mit SNS-032 ist eine deutliche Verschiebung der Zellzyklusverteilung zur Sub-G₁-Phase in IMR-32 Zellen nach

Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 und in UKF-NB-3 Zellen nach Inkubation mit 300 nM SNS-032 zu erkennen. Bei 100 nM ist bei UKF-NB-3 Zellen nur ein geringer Anteil der Zellen in der Sub-G₁-Phase detektierbar. Die statistische Auswertung der Zellzyklusanalyse nach 24 und 48 stündiger Behandlung der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 mit 100 und 300 nM SNS-032 ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

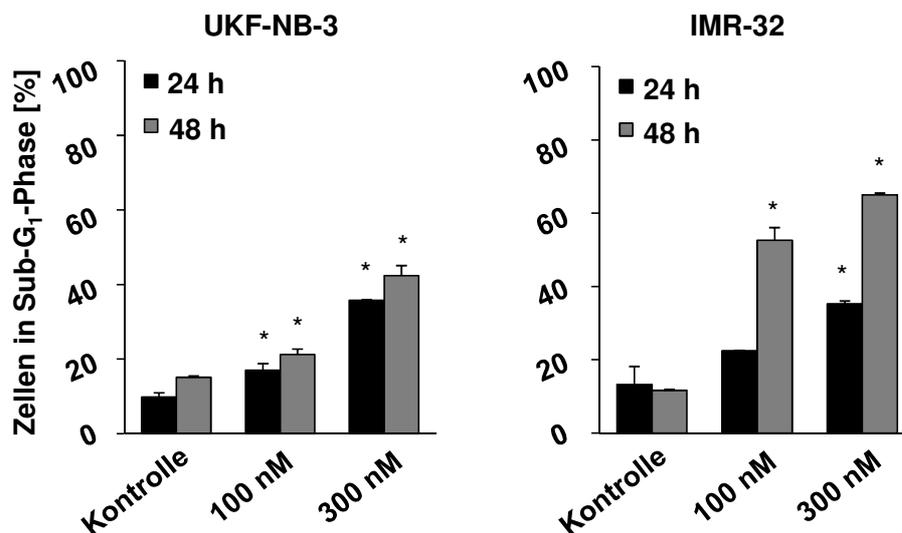


Abbildung 3.22: Induktion von Zellen in der Sub-G₁-Phase durch SNS-032 in Neuroblastomzellen

Prozentualer Anteil von UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen in der Sub-G₁-Phase nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 für 24 und 48 h. Als Kontrolle dienten unbehandelte UKF-NB-3 bzw. IMR-32 Zellen. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase im Durchflusszytometer bestimmt. * $p < 0,05$ verglichen zu unbehandelten Zellen

In den beiden Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Zellen in der Sub-G₁-Phase nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 nach 24 und 48 stündiger Inkubation nachgewiesen werden. In IMR-32 Zellen konnte nach 48 h eine nochmalige Steigerung im Vergleich zur 24 stündigen Behandlungszeit festgestellt werden, während in UKF-NB-3 keine wesentliche Steigerung nach 48 h mehr detektiert werden konnte.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der Wirkung von SNS-032 auf die einzelnen Schritte der Apoptose in Neuroblastomzellen, dass die Behandlung der Zellen mit SNS-032 den intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg einleitet.

3.5. Wirkung von SNS-032 auf CDK2

Die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2) ist in der G₁-Phase des Zellzykluses involviert und ist wichtig für den Übergang von der G₁- in die S-Phase. Als Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert CDK2 das Retinoblastom-Protein (Rb) und inaktiviert es dadurch. Um den Einfluss der Inhibierung von CDK2 durch SNS-032 zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen in den Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 nach der Behandlung mit 300 nM SNS-032 nach 12 und 24 h durchgeführt (Abbildung 3.23).

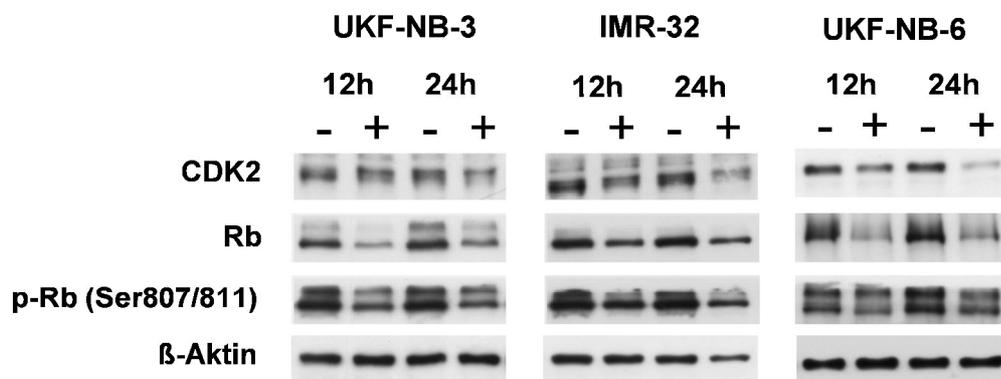


Abbildung 3.23: Einfluss von SNS-032 auf die Expression von CDK2 und Zielproteinen in Neuroblastomzellen

UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 Zellen wurden für 12 und 24 h mit 300 nM SNS-032 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte UKF-NB-3, IMR-32 bzw. UKF-NB-6 Zellen. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden CDK2, Rb, p-Rb mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

In allen drei Zelllinien konnte bereits nach 12 h Behandlungszeit mit SNS-032 eine Reduzierung der Expression von CDK2 detektiert werden. Das Rb Protein und seine an den Phosphorylierungsstellen Serin807 und 811 durch CDK2 phosphorylierte Form wurde ebenfalls durch die Behandlung mit SNS-032 in seiner Expression vermindert.

Um zu bestimmen, ob die Inhibierung von CDK2 durch SNS-032 einen direkten Einfluss auf die Zellviabilität ausübt, wurde die parentale Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 mit spezifischen siRNAs gegen CDK2 mittels Elektroporation transfiziert und nach 48 h auf den prozentualen Anteil von Zellen in der Sub-G₁-Phase untersucht (Abbildung 3.24 A). Die Effizienz der Transfektion wurde anhand der Expression von

CDK2 mit Hilfe der Western Blot Analyse kontrolliert (Abbildung 3.24 B). Die Zellzyklusanalyse der transfizierten Zellen bestätigte, dass die im Western Blot bestätigte deutliche Hemmung der Expression von CDK2 keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität in der untersuchten Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 hat.

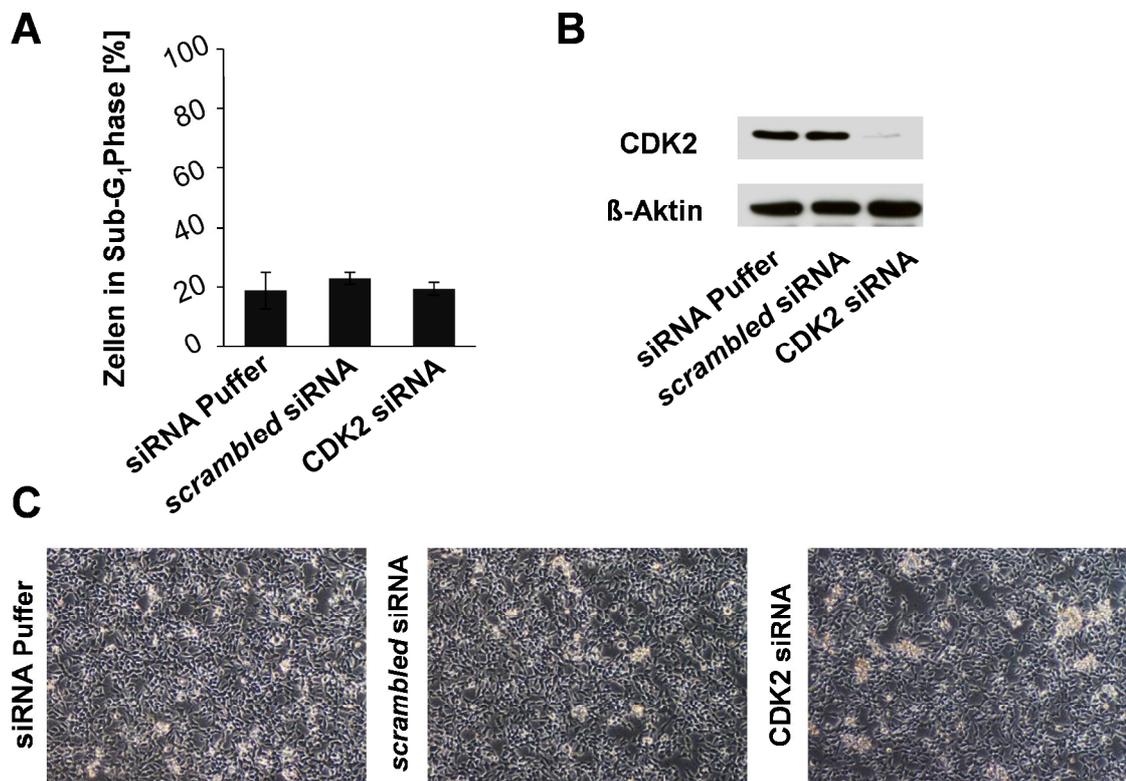


Abbildung 3.24: Einfluss der RNAi-vermittelten Hemmung von CDK2 auf die Viabilität und die Expression von CDK2 in Neuroblastomzellen

Parentale UKF-NB-3 Zellen wurden mittels Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen CDK2 transfiziert. Als Kontrolle dienten mit siRNA Puffer und mit *scrambled* siRNA transfizierten Zellen. A) 48 h nach der Transfektion wurde die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase im Durchflusszytometer bestimmt. B) Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde CDK2 mittels Western Blot Analyse detektiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. C) Nach einer Inkubationszeit von 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Die optische Betrachtung der UKF-NB-3 Zellen 48 h nach der Transfektion mit CDK2 spezifischen siRNAs (Abbildung 3.24 C) zeigt ebenfalls kaum eine Veränderung in der morphologischen Beschaffenheit der Zellen oder der Konfluenz des Zellrasens im Vergleich zu den mit siRNA Puffer beziehungsweise *scrambled* siRNA transfizierten Zellen.

3.6 Wirkung von SNS-032 auf CDK7 und CDK9

Die Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDK) 7 und 9 sind im Gegensatz vieler anderer CDKs nicht im Zellzyklus, sondern an der zellulären Transkription der mRNA involviert. CDK7 gehört zum Transkriptionsfaktorkomplex TFIIH und fördert durch die Phosphorylierung der Carboxy-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II an Serin 5 die Initiation der Transkription. CDK9 ist ein Mitglied des Elongationsfaktor-komplexes P-TEFb und fördert durch die Phosphorylierung der CDTs der RNA-Polymerase II an Serin 2 die Elongation der Transkription. Um den Einfluss von SNS-032 auf die Expression beider CDKs und den nachgeschalteten Signalweg zu untersuchen, wurden die Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 für 12 und 24 h mit 300 nM SNS-032 behandelt und die einzelnen Proteine im Western Blot analysiert (Abbildung 3.25).

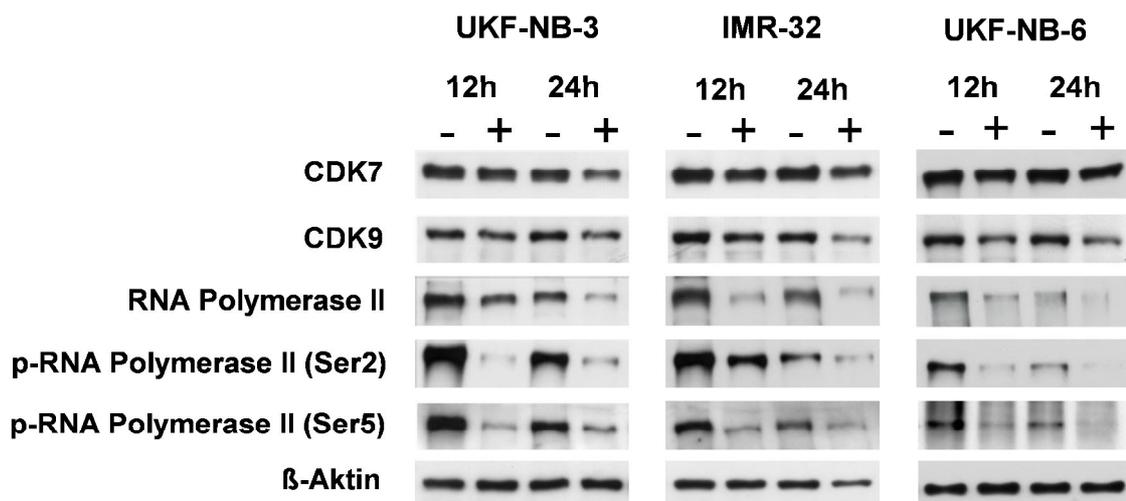


Abbildung 3.25: Einfluss von SNS-032 auf die Expression von CDK7, CDK9 und ihre Zielproteine in Neuroblastomzellen

UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 Zellen wurden für 12 und 24 h mit 300 nM SNS-032 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte UKF-NB-3, IMR-32 bzw. UKF-NB-6 Zellen. Nach erfolgter Inkubationszeit wurde CDK7, CDK9, RNA-Polymerase II und seine an Serin 2 und 5 phosphorylierten Formen mittels Western Blot Analyse detektiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 3.25 zu erkennen ist, reduzierte die Behandlung mit 300 nM SNS-032 die Expression von CDK7 und CDK9 in geringem Maße bereits nach 12 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die phosphorylierten Formen der Polymerase II an Serin 2 und 5 waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auch bereits nach 12 h Inkubation mit 300 nM SNS-032 in deutlich geringerem Maße nachweisbar. Die Expression der Polymerase II selbst war ebenfalls nach 12 und 24 h Behandlung mit 300 nM SNS-032 deutlich vermindert.

Um nachzuweisen, ob die Effekte von SNS-032 auf die Viabilität und RNA-Synthese von Neuroblastomzellen durch die Inhibierung von CDK7 und 9 verursacht wird, wurde die parentale Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 mit spezifischen siRNAs gegen CDK7 oder 9 einzeln beziehungsweise mit siRNAs gegen CDK7 und 9 in Kombination transfiziert und im Anschluss nach einer Inkubationszeit von 48 h auf die Aktivität der RNA-Polymerase II und auf die Viabilität anhand der Zellen in der Sub-G₁-Phase untersucht (Abbildung 3.27). Mittels Western Blot Analyse wurde die Effizienz der RNAi-vermittelten Expressionshemmung von CDK7 und 9 48 h nach der Transfektion nachgewiesen (Abbildung 3.26).

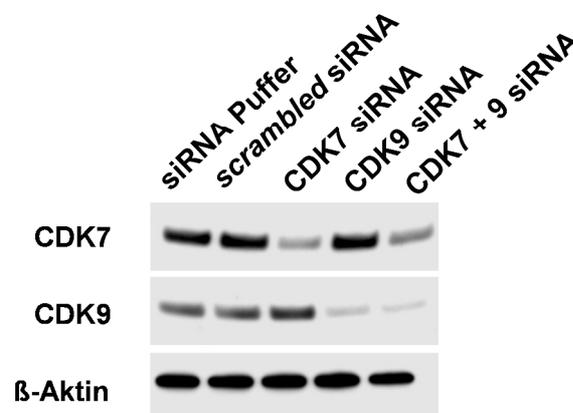


Abbildung 3.26: Nachweis der RNAi-vermittelten Expressionshemmung von CDK7 und CDK9 in Neuroblastomzellen

Parentale UKF-NB-3 Zellen wurden mittels Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen CDK7, CDK9 oder beide in Kombination transfiziert. Als Kontrolle dienten mit siRNA Puffer und mit *scrambled* siRNA transfizierte Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden CDK7 und CDK9 mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 3.26 zu erkennen ist, war die Expression von CDK7 und 9 in den Zellen 48 h nach der Transfektion mit siRNAs gegen CDK7 und 9 beziehungsweise beiden siRNAs in Kombination im Vergleich zu den mit siRNA Puffer oder *scrambled* siRNA transfizierten Zellen deutlich vermindert, was für eine effiziente Transfektion spricht. Bereits bei der optischen Betrachtung der transfizierten UKF-NB-3 Zellen 48 h nach der Transfektion (Abbildung 2.27 C) war ein deutlicher Einfluss der RNAi-vermittelten Hemmung von CDK9 einzeln und in Kombination mit siRNAs gegen CDK7 zu erkennen. Während durch die Transfektion mit siRNAs gegen CDK7 im Vergleich zu mit siRNA Puffer oder *scrambled* siRNA kaum Veränderungen in der Zellmorphologie zu erkennen waren, konnten bei den mit siRNA gegen CDK9 und CDK7 und 9 in Kombination transfizierten Zellen deutliche Lücken im Zellrasen und viele abgerundete und vom Untergrund abgelöste Zellen detektiert werden. Bei der Transfektion mit beiden siRNAs in Kombination war dieser Effekt am stärksten zu erkennen. Um die Effekte der Hemmung von CDK7 und 9 durch die Transfektion mit den spezifischen siRNAs zu quantifizieren, wurden die Zellen geerntet und auf den Prozentanteil an Zellen in der Sub-G₁-Phase (Abbildung 3.27 A) und die Aktivität der RNA-Polymerase II untersucht (Abbildung 2.27 B). Der signifikante negative Einfluss auf die Viabilität der Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 insbesondere durch die Hemmung von CDK9 einzeln und CDK7 und 9 in Kombination durch die Transfektion mit spezifischen siRNAs konnte auch quantitativ nachgewiesen werden. Die RNAi-vermittelte Hemmung von CDK9 führte zu einer Steigerung der Zellen in der Sub-G₁-Phase um 52 % ($34,8 \pm 2,1$ % Zellen in Sub-G₁) im Vergleich zu mit *scrambled* siRNA transfizierten UKF-NB-3 Zellen ($22,9 \pm 2,0$ % Zellen in Sub-G₁; 84 % bei siRNA Puffer transfizierten Zellen ($18,9 \pm 4,5$ % Zellen in Sub-G₁), während die kombinierte Transfektion von CDK7 und 9 ($58,9 \pm 0,1$ % Zellen in Sub-G₁) sogar zu einer Steigerung um 157 % (bei mit siRNA Puffer transfizierten Zellen 211 %) führte. Die Transfektion von siRNA gegen CDK7 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Viabilität der UKF-NB-3 Zellen. Auch die RNA-Synthese war bei den Zellen, welche mit siRNA gegen CDK7 transfiziert wurden, kaum beeinflusst, während in den mit siRNAs gegen CDK9 oder CDK7 und 9 in Kombination transfizierten UKF-NB-3 Zellen eine signifikante Verminderung der RNA-Syntheseaktivität detektiert werden konnte. In den Zellen, welche mit beiden siRNAs (CDK7 und 9) transfiziert wurden, war dieser Effekt am stärksten. In diesen Zellen war die RNA-Syntheseaktivität auf 36 % im Vergleich zu den mit *scrambled* siRNA transfizierten Zellen vermindert.

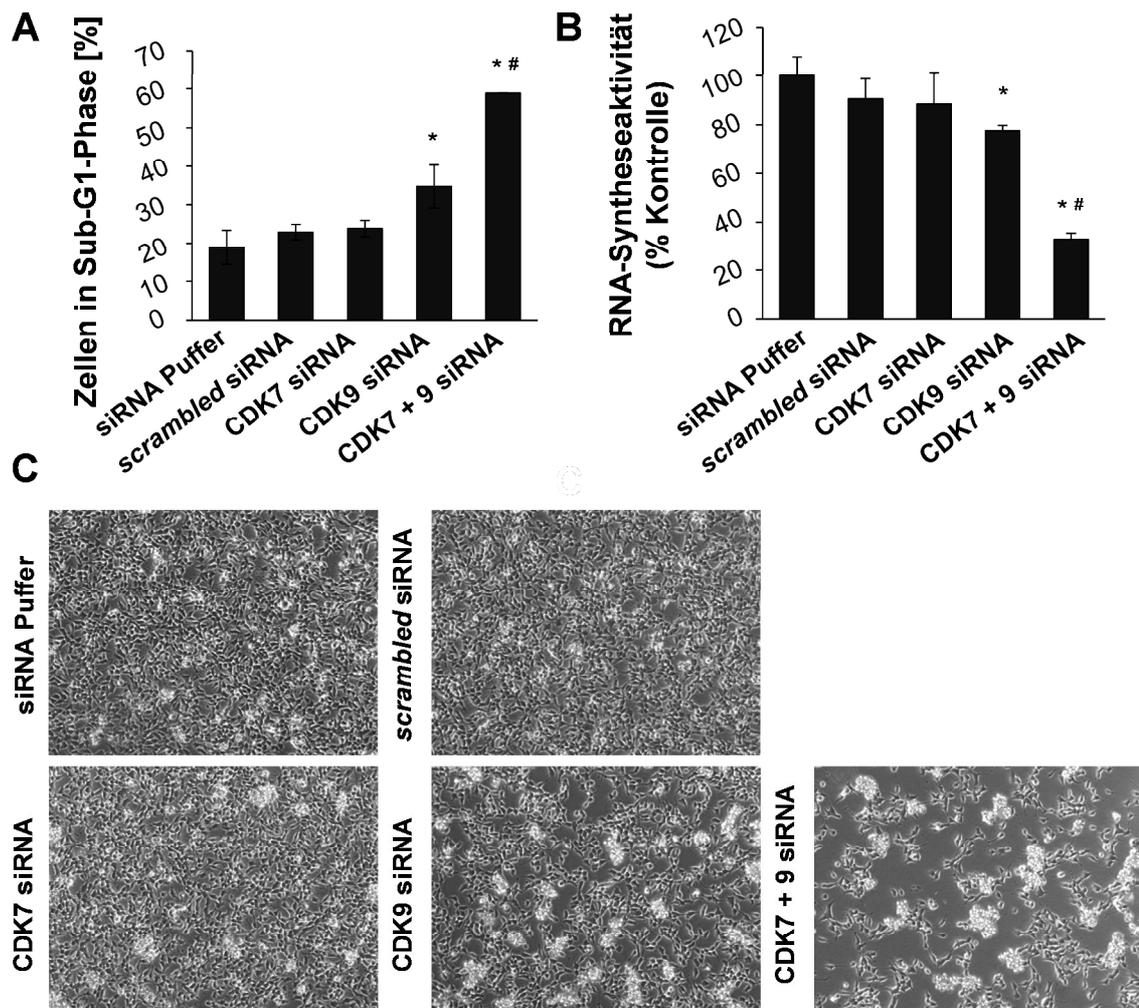


Abbildung 2.27: Einfluss der Hemmung von CDK7 und CDK9 auf die Viabilität und RNA-Syntheseaktivität von Neuroblastomzellen

Parentale UKF-NB-3 Zellen wurden mittels Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen CDK7, 9 oder beide in Kombination transfiziert. Als Kontrolle dienten mit siRNA Puffer und mit *scrambled* siRNA transfizierten Zellen. A) 48 h nach der Transfektion wurde die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase im Durchflusszytometer bestimmt. B) 48 h nach der Transfektion wurde die RNA-Syntheseaktivität mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die gemessene Fluoreszenz der unbehandelten Kontrolle wurde einer 100 %igen RNA-Syntheseaktivität gleichgesetzt und die behandelten Proben ins Verhältnis gesetzt. * $p < 0,05$ verglichen zu mit *scrambled* siRNA transfizierten Zellen, # $p < 0,05$ verglichen zu mit CDK9 siRNAs transfizierten Zellen. C) Nach erfolgter Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Um zu überprüfen, ob der negative Effekt auf die Viabilität durch eine Hemmung von CDK9 auch in resistenten Neuroblastomzellen auftritt, wurden die an Cisplatin und Vincristin adaptierten UKF-NB-3 Zellen (UKF-NB-3^{rCDDP}¹⁰⁰⁰ und UKF-NB-3^{rVCR}¹⁰) mit spezifischen siRNAs gegen CDK9 transfiziert und die Viabilität nach 48 h über die quantitative Bestimmung der Zellen in der Sub-G₁-Phase untersucht (Abbildung 3.28

A). Die optische Betrachtung der chemoresistenten adaptierten Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ und UKF-NB-3^rVCR¹⁰ 48 h nach der Transfektion mit spezifischen siRNAs gegenüber CDK9 zeigte, dass die Unterdrückung von CDK9 einen sichtbaren negativen Einfluss auf die Viabilität von beiden Neuroblastomzelllinien hatte (Abbildung 3.28 B).

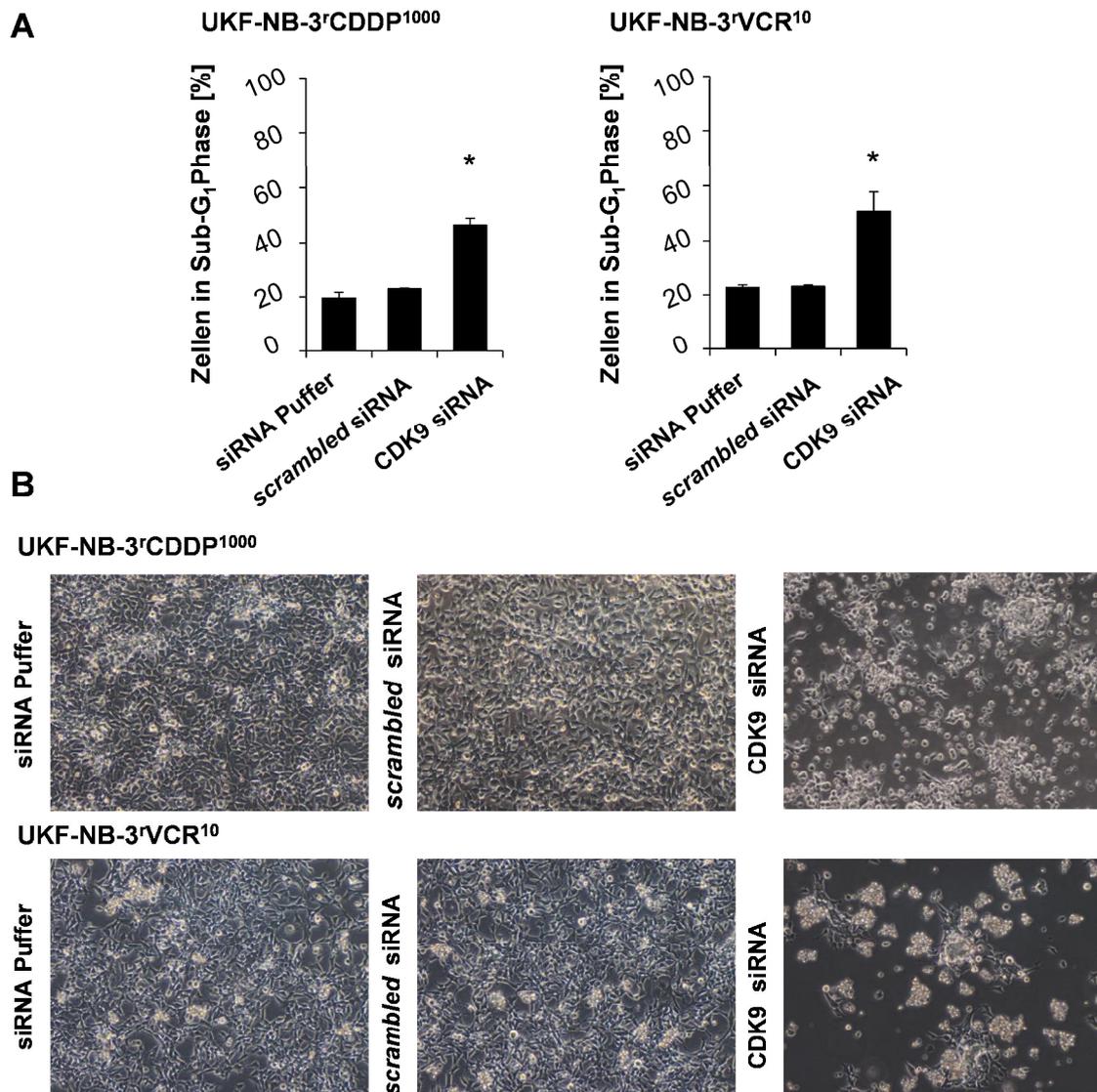


Abbildung 3.28: Einfluss der Hemmung von CDK9 auf die Viabilität von resistenten Neuroblastomzellen

UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ und UKF-NB-3^rVCR¹⁰ Zellen wurden mittels Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen CDK9 transfiziert. Als Kontrolle dienten mit siRNA Puffer und mit *scrambled* siRNA transfizierte Zellen. 48 h nach der Transfektion wurde die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase im Durchflusszytometer bestimmt. * $p < 0,05$ verglichen zu mit *scrambled* siRNA transfizierten Zellen. B) Nach erfolgter Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Expression von CDK9 führte in UKF-NB-3^{rCDDP}¹⁰⁰⁰ Zellen zu einer Steigerung des Anteiles der Zellen in der Sub-G1-Phase um 102 % im Vergleich zu den mit einer *scrambled* siRNA transfizierten UKF-NB-3^{rCDDP}¹⁰⁰⁰ Zellen (von $23,0 \pm 0,2$ % auf $46,5 \pm 2,5$ % Zellen in Sub-G₁). In UKF-NB-3^{rVCR}¹⁰ Zellen wurde der Anteil der Zellen in der Sub-G₁-Phase von $23,1 \pm 0,5$ % in mit einer *scrambled* siRNA transfizierten Zellen auf $50,7 \pm 7,1$ % in Zellen, welche mit siRNAs gegen CDK9 transfiziert wurden, gesteigert, was einer Erhöhung um 119 % entspricht. Dies ist mit der Wirkung der RNAi-vermittelten Hemmung von CDK9 auf die Viabilität der parentalen UKF-NB-3 Zellen vergleichbar.

Ob die stark verminderte Phosphorylierung der Polymerase II an den Phosphorylierungsstellen Serin 2 und 5 durch die Behandlung mit SNS-032 einen Einfluss auf die zelluläre Transkription ausübt, wurde mit Hilfe des Nukleosidanalogs 5-Ethynylunridin (EU) nachfolgend untersucht. EU kann mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend am Durchflusszytometer detektiert werden. Dafür wurden die zwei Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 für 6 h mit 100 und 300 nM SNS-032 inkubiert. Zur positiven Kontrolle der Transkriptionshemmung wurden die Zellen mit 100 ng/ml Actinomycin D (ActD) ebenfalls für 6 h behandelt. Actinomycin D bindet an die DNA und verhindert die Öffnung des DNA-Doppelstranges und nachfolgend die Transkription (Abbildung 3.29).

Die Synthese naszenter RNA wurde in den Zelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 durch die Behandlung mit SNS-032 signifikant und konzentrationsabhängig beeinträchtigt. Durch die Behandlung der Zellen mit 300 nM SNS-032 wurde die RNA-Syntheseaktivität fast bis auf das Niveau der Positivkontrolle mit Actinomycin D reduziert. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die RNA-Polymerase II durch die Inhibierung der CDKs 7 und 9 durch SNS-032 stark in seiner Aktivität inhibiert wird.

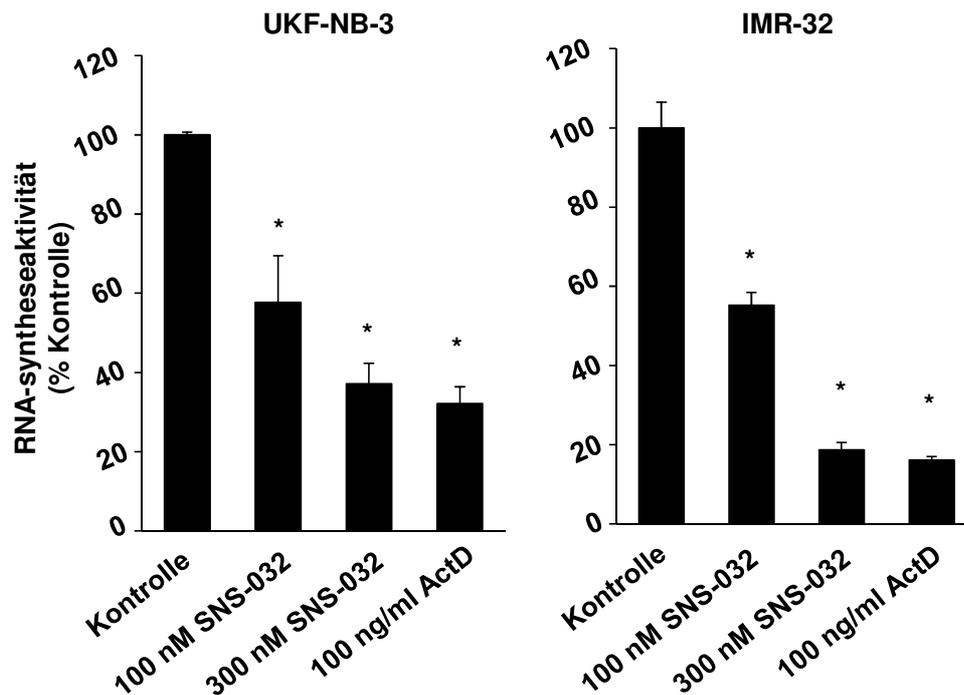


Abbildung 3.29: Einfluss von SNS-032 auf die RNA-Synthese in Neuroblastomzellen

Neusynthese von RNA in für 6 h mit 100 und 300 nM SNS-032 behandelten UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Als Positivkontrolle dienten mit 100 ng/ml Actinomycin D behandelte Zellen. Die gemessene Fluoreszenz der unbehandelten Kontrolle am Durchflusszytometer wurde 100 % RNA-Syntheseaktivität gleichgesetzt und die behandelten Proben ins Verhältnis gesetzt. * $p < 0,05$ verglichen zu unbehandelten Zellen

Zelluläre Proteine unterliegen einem ständigen Zyklus von Abbau und Neusynthese. Die Neusynthese von Proteinen ist zum Beispiel abhängig von der Aktivität der RNA-Polymerase II, da diese für die Transkription von DNA zu RNA verantwortlich ist. Bei einer Aktivitätsinhibierung kann keine neue mRNA und somit auch keine Proteine mehr in der Zelle neu synthetisiert werden. Dies betrifft als erstes Proteine, welche sich in relativ kurzer Zeit ständig erneuern. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise auch die pro- und antiapoptotischen Proteine, da ihre korrekte Funktion essentiell für das Überleben der Zelle ist. Mittels Western Blot Analyse wurde der Einfluss von 300 nM SNS-032 auf die Expression von verschiedenen antiapoptotischen Proteinen in den Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 untersucht (Abbildung 3.30).

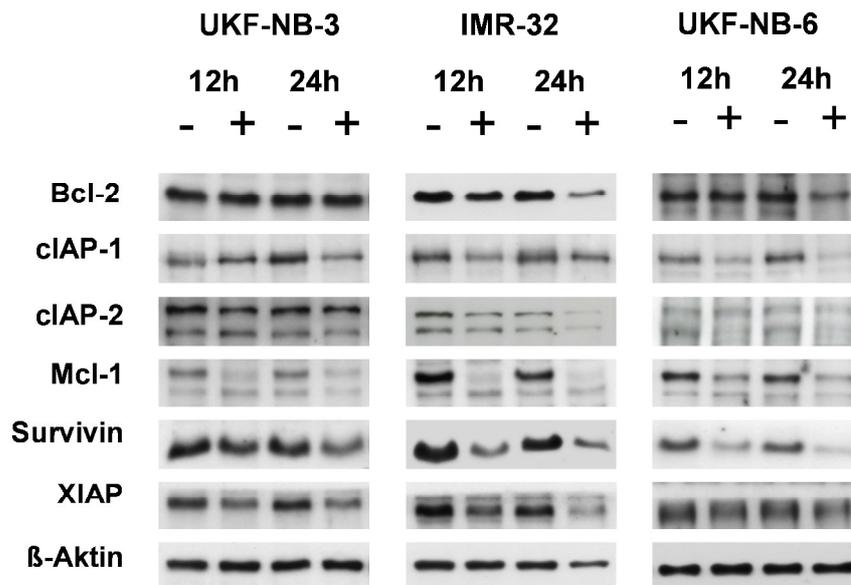


Abbildung 3.30: Einfluss von SNS-032 auf die Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen in Neuroblastomzellen

UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 Zellen wurden für 12 und 24 h mit 300 nM SNS-032 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte UKF-NB-3, IMR-32 bzw. UKF-NB-6 Zellen. Nach erfolgter Inkubationszeit wurde Bcl-2, cIAP-1, cIAP-2, Mcl-1, Survivin und XIAP mittels Western Blot Analyse detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

In den Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 wurde die Expression der antiapoptotischen Proteine Mcl-1, XIAP, Survivin und cIAP-1 durch Behandlung mit 300 nM SNS-032 vermindert, jedoch in den einzelnen Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß. Während die Expression von XIAP in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen nach Behandlung mit 300 nM SNS-032 nach 12 und 24 h deutlich reduziert war, konnte eine Reduktion der Expression von XIAP in den UKF-NB-6 Zellen nur mäßig nachgewiesen werden. Die Proteine Mcl-1, Survivin und cIAP-1 waren nach Behandlung mit 300 nM in allen drei Zelllinien in ihrer Expression deutlich vermindert. Für cIAP-2 konnte nur in IMR-32 Zellen eine leichte Reduktion der Expression durch SNS-032 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Und nur in den Zelllinien IMR-32 und UKF-NB-6 konnte eine mäßige Verminderung der Expression von Bcl-2 nach Behandlung mit 300 nM SNS-032 nachgewiesen werden, jedoch erst nach 24 h. Wie in der Western Blot Analyse nach Behandlung mit 300 nM SNS-032 in Neuroblastomzellen zu erkennen war (Abbildung 3.30), wurden neben der RNA-Polymerase II oder Rb auch diverse antiapoptotische Proteine wie zum Beispiel Mcl-1 und Survivin in ihrer Expression unterdrückt. Um zu untersuchen, ob die Unterdrückung der antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und Survivin einen direkten Einfluss auf die Viabilität in Neuroblastomzellen hat, wurden die parentalen UKF-NB-3 Zellen mit spezifischen

siRNAs gegen Mcl-1 und Survivin transfiziert und die Viabilität nach 48 h untersucht. Um die Wirkung der Unterdrückung von Mcl-1 und Survivin auf die Zellviabilität quantitativ zu bestimmen, wurden die Zellen geerntet und auf den prozentualen Anteil von Zellen in der Sub-G₁-Phase untersucht (Abbildung 3.31 A). Zum Nachweis der RNAi-vermittelten Inhibierung der Expression von Mcl-1 und Survivin wurden Western Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 3.31 B).

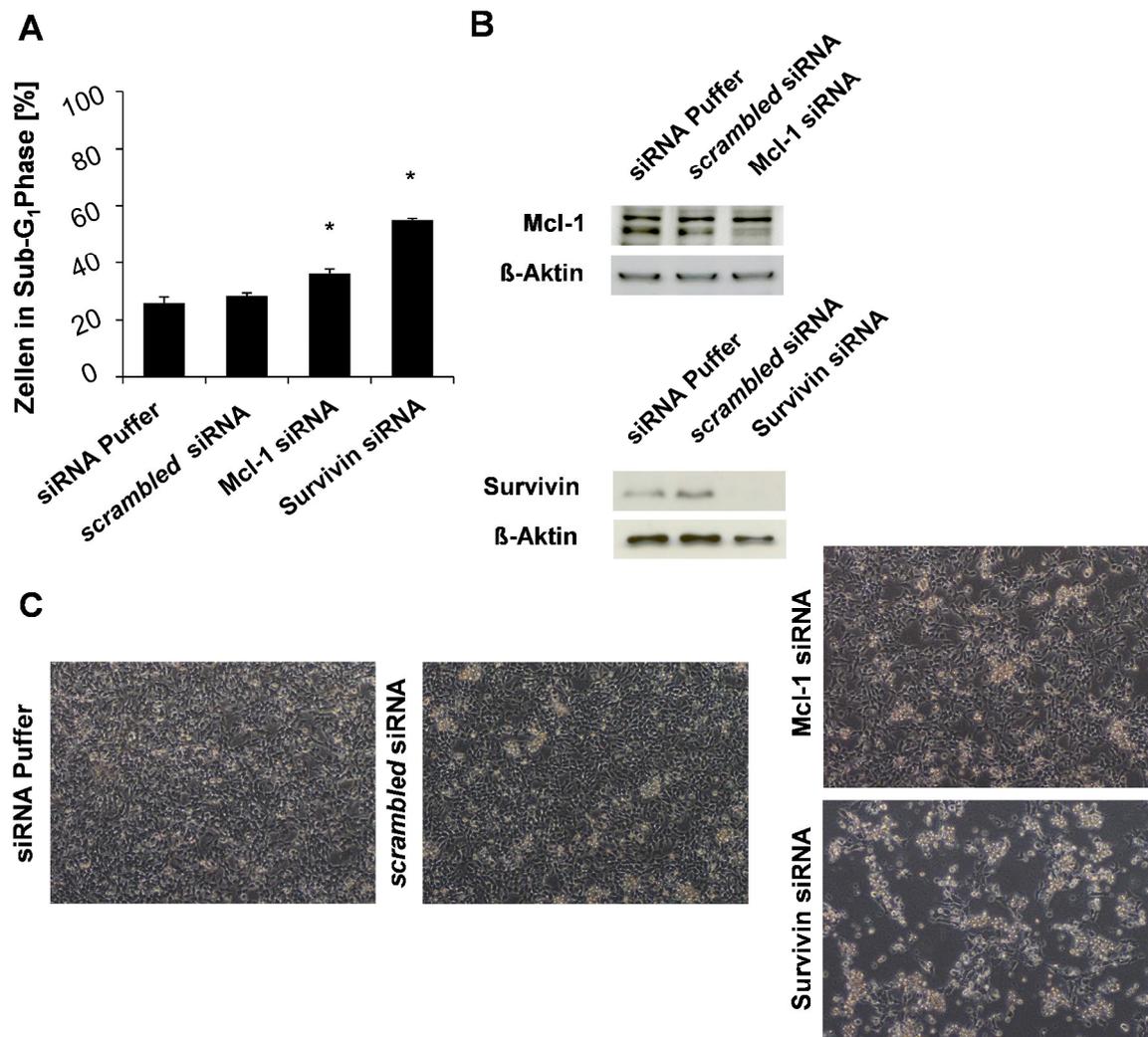


Abbildung 3.31: Einfluss der Hemmung von Mcl-1 und Survivin auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

Parentale UKF-NB-3 Zellen wurden mittels Elektroporation mit spezifischer siRNA gegen Mcl-1 und Survivin transfiziert. Als Kontrolle dienten mit siRNA Puffer und mit einer *scrambled* siRNA transfizierte Zellen. A) 48 h nach der Transfektion wurde die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase im Durchflusszytometer bestimmt. * $p < 0,05$ verglichen zu mit *scrambled* siRNA transfizierten Zellen B) Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden Mcl-1 und Survivin mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. C) 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Abbildung 3.31 zeigt, dass die Effizienz der siRNA Transfektion ausreichend war, die Expression der Proteine Mcl-1 und Survivin zu hemmen, wobei der unterdrückende Effekt bei Survivin deutlich stärker ausfiel. Die Ladekontrolle β -Aktin zeigt jedoch auch, dass in der Probe mit siRNA gegen Survivin behandelten Zellen eine geringere Menge Protein enthalten war. Bei der optischen Betrachtung der transfizierten UKF-NB-3 Zellen ist zu erkennen, dass die RNAi-vermittelte Hemmung von Mcl-1 im Vergleich zu den mit siRNA Puffer oder den mit einer *scrambled* siRNA transfizierten Zellen nur einen mäßigen Einfluss auf die Morphologie und Viabilität der Zellen hatte (Abbildung 3.31 C). Bei der Hemmung von Survivin mittels spezifischen siRNAs war jedoch ein deutlicher negativer Effekt auf die Viabilität der Zellen in der Zellkultur zu erkennen. Die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Expression von Mcl-1 in UKF-NB-3 Zellen führte zu einer Steigerung der Zellen in der Sub-G₁-Phase von 27 % im Vergleich zu mit einer *scrambled* siRNA transfizierten UKF-NB-3 Zellen (von $28,4 \pm 1,0$ % auf $36,2 \pm 1,5$ % Zellen in Sub-G₁). Die Untersuchung des Zellzyklus der Zellen nach Transfektion mit einer spezifischen siRNA gegen Survivin ergab eine Steigerung der Zellen in der Sub-G₁-Phase um 93 % im Vergleich zu mit einer *scrambled* siRNA transfizierten UKF-NB-3 Zellen (von $28,4 \pm 1,0$ % auf $55 \pm 0,6$ % Zellen in Sub-G₁).

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die antitumorale Wirkung von SNS-032, eines Inhibitors der Cyclin-abhängigen Kinasen 2, 7 und 9 (cyclin dependent kinases, CDK), auf parentale Neuroblastomzelllinien und deren chemoresistenten Sublinien untersucht. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf die Interaktion von SNS-032 mit relevanten ABC-Transportern und den CDKs 2, 7 und 9, sowie den Einfluss des Tumorsuppressorproteins p53 auf die Wirkung von SNS-032 gelegt. Des Weiteren wurde die Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen im Mausxenotransplantat-Modell untersucht.

Erworbene oder bereits vor der Behandlung bestehende intrinsische Resistenzen gegenüber antitumoralen Arzneimitteln sind eines der Hauptprobleme in der erfolgreichen Behandlung verschiedener Tumore inklusive des Neuroblastoms. Die erworbene Resistenz tritt zumeist bei rezidivierenden Tumoren bei zuvor erfolgter Chemotherapie, hauptsächlich bei Hoch-Risiko-Patienten, auf und macht eine erfolgreiche Behandlung der Patienten schwierig (Maris et al., 2010; Brodeur et al., 2011). Daher ist die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten zur Verbesserung des Therapieausganges für Hoch-Risiko-Patienten notwendig, welche zum gegebenen Zeitpunkt nicht optimal durch das gegenwärtig bestehende multimodale und teils aggressive Therapieschema behandelt werden können. SNS-032 wurde und wird in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien untersucht. Beispiele hierfür sind eine Phase I Studie an Patienten mit fortgeschrittener chronischer lymphozytischer Leukämie und multiplen Myelomen (Tong et al., 2010) oder auch eine ebenfalls Phase I Studie an Patienten mit metastatischen refraktären soliden Tumoren (Heath et al., 2008). Zusätzlich zeigte SNS-032 im Vergleich zu ähnlich wirkenden CDK-Inhibitoren wie Roscovitin (Seliciclib) und Flavoperidol (Alvocidib) in anderen Tumorentitäten eine höhere Effizienz oder Selektivität (Conroy et al., 2009).

Insgesamt wurden 113 Neuroblastomzelllinien, bestehend aus 19 parental chemosensitiven Neuroblastomzelllinien und 94 Sublinien, welche eine erworbene Resistenz gegenüber 14 verschiedenen Chemotherapeutika aufweisen, in dieser Arbeit auf ihre Sensitivität gegenüber SNS-032 untersucht. Diese Zusammenstellung repräsentiert einen Großteil der in der *Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection* (www.kent.ac.uk/stms/cmp/RCCL/RCCLabout.html) enthaltenen Neuroblastomzell-

linien. Studien von Neve et al. an primären Brustkrebszellen und Zelllinien haben gezeigt, dass in Zelllinien trotz langer Kultivierung die genetischen Eigenschaften bemerkenswert konserviert sein können (Neve et al., 2006). Aufgrund der beobachteten großen intra- und inter-Tumor-Heterogenität ist es jedoch offensichtlich, dass Untersuchungen großer Zelllinienpanels notwendig sind, um diese Heterogenität (zumindest zum Teil) abzubilden (Sharma et al., 2010). Untersuchungen in Neuroblastomzelllinien, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten entweder bei Diagnose, während dem ersten Behandlungszyklus oder bei Rückfall nach intensiver Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation etabliert wurden, zeigten eine Resistenzentwicklung nicht nur gegenüber den verwendeten, sondern auch ausgeprägte Kreuzresistenzen gegenüber anderen Medikamenten auf (Keshelava et al., 1998). Im Einklang hiermit weisen an Zytostatika adaptierte Neuroblastomsublinien ebenfalls ausgeprägte Kreuzresistenzen gegenüber anderen Zytostatika auf (Michaelis et al., 2010) und repräsentieren somit ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung neuer potentieller antitumorale Wirkstoffe. Neu entwickelte Wirkstoffe können somit darauf getestet werden, ob sie in der Lage sind trotz bereits vorhandener Resistenzen eine effektive antitumorale Wirkung ausüben zu können.

In Krebspatienten wurden nach einer 1-stündigen intravenösen SNS-032-Infusion mit einer Dosis von 4 bis 16 mg/m² Wirkstoffplasmaspiegel zwischen 0,067 µg/ml (176 nM) bis 0,287 µg/ml (754 nM) erreicht (Heath et al. 2008). Die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Neuroblastomzelllinien auf ihre Sensitivität gegenüber SNS-032 in Hinblick auf die im Patienten zu erreichenden Plasmakonzentrationen ergab, dass ein Großteil der Zelllinien in diesem Konzentrationsbereich in ihrer Viabilität drastisch beeinträchtigt wurde. 47 % (53 von 113) der untersuchten Zelllinien wiesen für SNS-032 einen niedrigeren IC₅₀-Wert als 176 nM auf und 14 Zelllinien (12 %) wiesen sogar einen niedrigeren IC₉₀-Wert als 176 nM auf. Insgesamt 84 von 113 Zelllinien (74 %) wiesen IC₅₀-Werte kleiner als 754 nM auf und 72 der 113 Zelllinien (64 %) wiesen ebenfalls IC₉₀-Werte kleiner als 754 nM auf. Von den parentalen Neuroblastomzelllinien wiesen 9 von 19 Zelllinien (47 %) einen IC₅₀-Wert 176 nM auf. Drei parentale Zelllinien (16 %) zeigten auch einen IC₉₀-Wert unter 176 nM. 89,5 % (17 von 19) der parentalen Neuroblastomzelllinien wiesen IC₅₀-Werte unter 754 nM und knapp 70 % (13 von 19 Zelllinien) IC₉₀-Werte kleiner als 754 nM auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Großteil der hier untersuchten Neuroblastomzelllinien durch im Patienten erreichbare Plasmalevel von SNS-032 wesentlich in ihrer Viabilität beeinträchtigt werden konnten.

Die nähere Untersuchung der Wirkung von SNS-032 auf die an diverse Zytostatika adaptierten Neuroblastomsublinien im Vergleich zu ihren chemosensitiven parentalen Zelllinien und eine genauere Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse nach den einzelnen Wirkstoffklassen der einzelnen Zytostatika deuten jedoch darauf hin, dass die Ausbildung einer Resistenz gegenüber gewissen Zytostatika bzw. Stoffklassen bei Neuroblastomzellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer Kreuzresistenz gegenüber SNS-032 führt als die Resistenzausbildung gegenüber anderen Zytostatika. Zum Beispiel scheint eine erworbene Resistenz gegenüber Taxanen, Vinkaalkaloiden und Doxorubicin generell, aber nicht ausschließlich, mit einer verminderten Sensitivität gegenüber SNS-032 verbunden zu sein. Nur 4 von insgesamt 27 Sublinien, welche eine erworbene Resistenz gegenüber den oben genannten Medikamenten aufweisen, waren gegenüber SNS-032 ähnlich sensitiv wie ihre chemosensitiven parentalen Zelllinien. Auch bei einer Resistenz gegenüber Etoposid, Melphalan, Topotecan oder Platinderivaten wiesen circa 50 % der untersuchten Sublinien eine Kreuzresistenz gegenüber SNS-032 auf. Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten Sublinien mit einer erworbenen Resistenz gegenüber Gemcitabin eine vergleichbare SNS-032-Sensitivität wie ihre zugehörigen parentalen Zelllinien. Diese Heterogenität der antitumoralen Wirkung von SNS-032 auf die verschiedenen Neuroblastomzelllinien bekräftigt vorangegangene Annahmen, dass bei der Entwicklung und Evaluierung neuer antitumoraler Wirkstoffe eine Vielzahl von Zelllinien einer Tumorentität untersucht werden müssen, um eine Vorhersage über das mögliche therapeutische Potential eines Wirkstoffes treffen zu können (Sharma et al., 2010). Dies wird insbesondere auch dadurch deutlich, dass SNS-032 bereits in den untersuchten parentalen Neuroblastomzelllinien die IC_{50} -Werte einen Bereich von $95,72 \pm 3,46$ nM (NGP) bis 1029 ± 128 nM (SK-NS-H) umfassten. Andere Untersuchungen über die antitumorale Wirkung von SNS-032, welche in vier Zelllinien des Mantelzellymphoms durchgeführt wurden, deuten ebenfalls darauf hin, dass die zelluläre Reaktion auf die Behandlung mit SNS-032 vom biologischen Kontext der individuellen Zelllinie abhängig ist (Chen et al., 2010). Lang andauernde Kultivierung und die damit verbundene eventuelle Anpassung der Zelllinien an vorhandene Kulturbedingungen können ebenfalls einen Beitrag zu unterschiedlichen Reaktionen gegenüber antitumoralen Wirkstoffen leisten.

Primäre Neuroblastomkulturen aus Patienten eignen sich aufgrund ihrer zellulären Eigenschaften neben etablierten Zelllinien besonders, neue potentielle Wirkstoffe auf ihre antitumorale Wirkung zu untersuchen. Primäre Zellkulturen werden gewonnen, indem Tumorproben aus Patienten direkt durch mechanische Zerkleinerung und

Enzymbehandlung in Einzelzellsuspension gebracht und in Kulturmedium überführt werden (Coulon et al., 2011). Diese werden nachfolgend direkt in Versuchen eingesetzt, um die oft bald nach der Probenentnahme einsetzende Wachstumsinhibierung und die durch Adaptierung an die *in vitro*-Kultivierung auftretenden Veränderungen zu minimieren. Im Vergleich zu immortalisierten Tumorzelllinien spiegeln primäre Zellen eventuell stärker die Konditionen im Tumor dar (Zhang et al., 2009). Alle vier im Rahmen dieser Arbeit untersuchten primären Neuroblastomkulturen aus dem Knochenmark von Patienten mit metastasiertem nach INSS eingeteiltem Stadium 4 Neuroblastomen wiesen IC_{50} -Werte für SNS-032 unter der maximal erreichten Plasmakonzentration von 754 nM auf und zwei von ihnen auch IC_{90} -Werte unter diesem Wert. Zusammengenommen zeigen die hier präsentierten Ergebnisse über die Wirkung von SNS-032 in chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzelllinien sowie primären Neuroblastomkulturen, dass SNS-032 eine Behandlungsoption für einen Teil der Neuroblastompatienten darstellen könnte.

Dies wird ebenfalls durch die Ergebnisse aus dem durchgeführten Tierversuch gestützt. SNS-032 inhibierte das Tumorstadium in vivo in einem Mausxenotransplantatmodell. Die für diese Versuche verwendete Cisplatin-resistente Zelllinie UKF-NB-3^{rCDDP}¹⁰⁰⁰ weist Kreuzresistenzen zu einer Reihe von Zytostatika auf, beispielsweise zu Doxorubicin (5,9fach), Melphalan (7,9fach) und Vincristin (3,3fach), war jedoch vergleichbar sensitiv zu SNS-032 wie die zugehörige parentale Zelllinie UKF-NB-3. Die chemoresistenten UKF-NB-3^{rCDDP}¹⁰⁰⁰ Zellen wurden schon in früheren Studien im Mausmodell verwendet und zeichnen sich durch eine hohe Tumorigenität im Versuchstier aus (Michaelis et al., 2006). Die intraperitoneale Behandlung der Versuchstiere mit 30 mg/kg SNS-032, welche schon in früheren Studien als Dosierung zur Behandlung von Mäusen verwendet wurde (Boquoi et al., 2009), inhibierte das Wachstum der Cisplatin-resistenten Sublinie UKF-NB-3^{rCDDP}¹⁰⁰⁰ im subkutanen Xenotransplantatmodell ohne wesentlichen Einfluss auf das Körpergewicht der Versuchstiere. Auch nach Beendigung der Behandlung mit SNS-032 wuchsen die Tumore nur sehr langsam weiter. Durch eine Optimierung des Applikationsschemas könnte die Effizienz von SNS-032 in dem verwendeten Modell vermutlich noch weiter gesteigert werden.

Neu entwickelte potentielle Wirkstoffe zur Behandlung von rezidivierenden Neuroblastomen werden gewöhnlich in Kombination mit bereits bestehenden Therapien in klinischen Studien getestet (Morgenstern et al., 2013; Wagner et al., 2013; Morgenstern et al., 2014; Modak und Cheung, 2010). Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung von parentalen UKF-NB-3 Zellen mit SNS-032 und

konventionellen zytotoxischen Chemotherapeutika einschließlich Cisplatin, Melphalan und Topotecan deuten ebenfalls an, dass durch SNS-032 die Wirkung der einzelnen Zytostatika im Vergleich zur Einzelbehandlung zum Teil deutlich gesteigert werden können. In den chemoresistenten UKF-NB-3 Sublinien, welche gegenüber Cisplatin, Melphalan und Topotecan adaptiert wurden, konnten ebenfalls gesteigerte Effekte bei kombinierter Behandlung von SNS-032 und den jeweiligen Zytostatika festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien. Beispielsweise konnte unter Verwendung von primären akuten myeloiden Leukämie (AML)-Zellen eine synergistische Wirkung durch Kombination von SNS-032 und Cytarabin (Ara-C) nachgewiesen werden (Walsby et al., 2011). In einer weiteren Studie konnten durch Kombination von SNS-032 mit dem Wirkstoff TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) zu TRAIL resistente Zellen verschiedener Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* zu sehr geringen Konzentrationen von TRAIL sensibilisiert werden konnten (Lemke et al., 2013).

Durch die zum Teil deutliche Resistenz der meisten an Vinkaalkaloide, Taxane und Doxorubicin adaptierten Neuroblastomzelllinien gegenüber SNS-032 konnte darauf geschlossen werden, dass diese Sublinien einen gemeinsamen Resistenzmechanismus aufweisen, welcher die nachgewiesene Kreuzresistenz zu SNS-032 verursacht. Frühere Studien an den in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzellen haben gezeigt, dass die Adaptierung chemosensitiver parentaler Zelllinien an Vincristin und Doxorubicin häufig zu einer gesteigerten Expression des ABC-Transporters ABCB1 (auch MDR1, P-Glycoprotein) führt (Kotchetkov et al, 2003; Kotchetkov et al., 2005, Rothweiler et al., 2010), was ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit mit Ausnahme einer Zelllinie (NLF) bestätigt werden konnte. Weder NLF^{VCR}¹⁰ noch NLF^{DOXO}⁴⁰ Zellen wiesen trotz bestehender Resistenz gegenüber Vincristin bzw. Doxorubicin eine erhöhte Expression von ABCB1 im Vergleich zur parentalen NLF Zelllinie auf. Pharmakokinetische Studien zur oralen Adsorption von SNS-032 in Ratten hatten darauf hingewiesen, dass es sich bei SNS-032 um ein ABCB1-Substrat handeln könnte (Kamath et al., 2005). In den in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastomzelllinien und Primärkulturen konnte die Expression von ABCB1 ebenfalls mit einer verminderten Sensitivität gegenüber SNS-032 korreliert werden. Durch die pharmakologische Inhibierung von ABCB1 durch Zugabe des ABCB1 Inhibitors Verapamil konnten die IC₅₀-Werte aller 30 Neuroblastomzelllinien, welche in Einzelbehandlung mit SNS-032 einen IC₅₀-Wert über 754 nM aufwiesen, auf IC₅₀-Werte unter 754 nM reduziert werden. Darüber hinaus wurden auch die IC₉₀-Werte von 39 der 41 Neuroblastomzelllinien (95 %), welche einen IC₉₀-Wert über 754 nM

aufwiesen, in Anwesenheit von Verapamil auf IC_{90} -Werte unter 754 nM vermindert. Die mit einem Expressionsvektor für ABCB1 transduzierte UKF-NB-3 Zelllinie (UKF-NB-3^{ABCB1}) wies im MTT-Viabilitätsassay ebenfalls deutlich höhere IC_{50} - und IC_{90} -Werte (35,9fach bzw. 47,7fach) für SNS-032 im Vergleich zur parentalen UKF-NB-3 Zelllinie auf und konnte durch Zugabe von Verapamil auf das Niveau der parentalen Zellen resensibilisiert werden. Der Vorteil dieses isogenen Zellmodells im Vergleich zu beispielweise anderen stark ABCB1-überrexpriemierenden UKF-NB-3 Zelllinien wie UKF-NB-3^{VCR}¹⁰ oder UKF-NB-3^{DOX}²⁰ ist der gleiche genetische Hintergrund der parentalen UKF-NB-3 Zelllinie zu den beiden Zelllinien, welche durch Transduktion mit einem lentiviralen Vektor codierend für ABCB1 beziehungsweise einem Leervektor generiert wurden. Die Resistenz gegenüber SNS-032 in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen konnte durch eine transiente Hemmung der Expression von ABCB1 mittels spezifischen siRNAs gegen ABCB1 ebenfalls um das 10fache reduziert werden.

Bei den zwei untersuchten primären Neuroblastomkulturen, welche eine geringe Sensitivität gegenüber SNS-032 aufwiesen, konnte eine hohe ABCB1-Expression nachgewiesen werden. Der ABCB1-Inhibitor Verapamil reduzierte im MTT-Viabilitätsassay die IC_{50} - bzw. IC_{90} -Werte von SNS-032 in diesen primären Kulturen auf Werte unter 754 nM. Eine dieser Primärkulturen mit starker ABCB1-Expression wurde genutzt, um die Wirkung von SNS-032 im dreidimensionalen Zellmodell zu untersuchen, da primäre Zellen nicht selten in sogenannten Tumorsphären wachsen und nicht als Einzelzellen wie die meisten in etablierten Zellkulturen ohne besondere Vorbehandlung. Um lebende und tote Zellen unterscheiden zu können wurden dem Zellkulturmedium Ethidiumbromid und Calcein AM zugegeben. Während Calcein AM nur von lebenden Zellen in seine fluoreszierende Form umgewandelt werden kann, interkaliert Ethidiumbromid ausschließlich in toten Zellen in Nukleinsäuren, da intakte Zellmembranen nicht überwunden werden können. Auch in diesem Modell konnte festgestellt werden, dass bei Behandlung mit SNS-032 allein ein deutlich schmalerer Ring an toten Zellen um einen Kern von lebenden Zellen als bei der Kombinationsbehandlung von SNS-032 mit Verapamil, wo nach 5 Tagen Behandlung nur noch ein kleiner innerer Kern an lebenden Zellen vorhanden war.

Die Versuche an der Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3^{VCR}¹⁰ zur direkten Interaktion von SNS-032 und ABCB1 mit Hilfe des fluoreszierendem ABCB1-Substrates Rhodamin 123 geben einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei SNS-032 um ein Substrat für den ABC-Transporter handeln könnte, wie bereits von Kamath et al. vorgeschlagen (Kamath et al., 2005). Diese Annahme wird durch in silico-Dockingstudien, die unter

Verwendung eines Homologiemodells von humanem ABCB1 und drei Röntgenstrukturen des murinen ABCB1, eine direkte Interaktion von SNS-032 mit ABCB1 zeigten (Löschmann et al., 2013). Alle im Versuch eingesetzten Konzentrationen von SNS-032 (2,5 – 20 μM) führten zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Akkumulation von Rhodamin 123 in UKF-NB-3^{rVCR}¹⁰ Zellen. Aufgrund der für eine signifikante Akkumulation benötigten Konzentrationen, welche den IC₅₀-Wert in dieser Zelllinie um das mindestens 3fache übersteigt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Effekt um eine kompetitive Hemmung des ABCB1 Transporters handelt, welche den Transport von Rhodamin 123 aus der Zelle behindert und zur Akkumulation führt.

Im Gegensatz dazu wurde die Sensitivität der ABCG2 überexprimierenden UKF-NB-3 Zelllinie UKF-NB-3^{ABCG2} gegenüber SNS-032 im Vergleich zur parentalen UKF-NB-3 Zelllinie in Anbetracht der beachtlichen Resistenz der UKF-NB-3^{ABCG2} Zellen gegenüber dem bekannten ABCG2-Substrat Mitoxantron zwar signifikant, jedoch in deutlich geringerem Maße beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von ABCB1 einer der Hauptresistenzmechanismen für SNS-032 im Neuroblastom zu sein scheint. Die prognostische Relevanz der ABCB1 Expression im Neuroblastom ist zum derzeitigen Zeitpunkt noch unklar. Frühere Studien in Neuroblastompatienten haben gezeigt, dass hohe ABCB1-Level eventuell in älteren Patienten (Alter > 1 Jahr bei Diagnose) unabhängig von der *MYCN*-Amplifikation einen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg haben, jedoch nicht in jüngeren Patienten (Haber et al., 1997). Andere Studien konnten keine Korrelation zwischen hoher ABCB1-Expression und Therapieerfolg feststellen (Corrias et al., 1990; Favrot et al., 1991). Bei der Diagnose scheinen nur wenige Neuroblastomzellen ABCB1 zu exprimieren (de Cremoux et al., 2007; Pituch-Noworolska et al., 2009), jedoch wurden schon mehrfach gesteigerte Level an ABCB1 in Rezidiven und metastasierenden Neuroblastomen festgestellt (Bourhis et al., 1989; Goldstein et al., 1990; Pituch-Noworolska et al., 2009). Ebenfalls konnte eine gesteigerte beziehungsweise induzierte Expression von ABCB1 durch Langzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien bei der Adaptierung an diverse cytotoxische Chemotherapeutika festgestellt werden (Kotchetkov et al., 2003). Daher könnte die Expression von ABCB1 einen erworbenen Resistenz-mechanismus im Neuroblastom darstellen (Dhooge et al., 1997).

Einen weiteren Hinweis dafür stellen die Untersuchungen an den an 300 nM SNS-032 adaptierten Neuroblastomzellen (UKF-NB-3^{rSNS-032}^{300nM}) dar. Diese Zellen weisen

deutlich erhöhte IC_{50} - und IC_{90} -Werte gegenüber SNS-032 im Vergleich zur parentalen UKF-NB-3 Zelllinie auf, welche sich durch Zugabe des ABCB1-Inhibitors Verapamil wiederum auf die parentalen IC_{50} - und IC_{90} -Werte senken lassen. Die durchflusszytometrische Messung der Expression von ABCB1 in diesen Zellen bestätigt, dass durch Langzeitexposition von SNS-032 in steigenden Konzentrationen die Expression von ABCB1 als hauptsächlicher Resistenzmechanismus induziert wird. In UKF-NB-3^{SNS-032^{300nM}} Zellen konnte ebenfalls eine Kreuzresistenz gegenüber anderen ABCB1-Substraten wie Vincristin, Doxorubicin und Etoposid festgestellt werden, während mit Zytostatika, welche nicht durch die Expression von ABCB1 beeinflusst werden (Gemcitabin, Topotecan und Cisplatin) in beiden Zelllinien gleiche IC_{50} - und IC_{90} -Werte erreicht werden konnten. Die an SNS-032 adaptierte Zelllinie erwies sich gegen Gemcitabin sogar signifikant sensitiver als ihre parentale Zelllinie UKF-NB-3.

Darüber hinaus wurde die Wirkung von SNS-032 in Abhängigkeit von der Funktionalität des Tumorsuppressorproteins p53 untersucht. Nach Aktivierung, z.B. in Folge von DNA-Schäden oder zellulärem Stress, fungiert p53 als Transkriptionsfaktor und induziert die Expression einer Vielzahl von Zielgenen, was entweder zur Hemmung des Zellzyklus und zur DNA-Reparatur oder zur Einleitung von programmiertem Zelltod führt (Chen und Tweddle, 2012). Durch diese zentrale Rolle im Rahmen der Aufrechterhaltung der Genomintegrität ist p53 eines der wichtigsten Tumorsuppressorproteine. Die Häufigkeit von Mutationen im *TP53*-Gen variieren von 10 -70% in den verschiedenen Tumorentitäten und treten häufiger in soliden Tumoren auf (Calin et al., 1999). Im Neuroblastom ist die Entstehung von *TP53*-Mutationen als erworbener Resistenzmechanismus beschrieben (Chen und Tweddle, 2012). Generell wurden p53-Mutationen nur selten im Neuroblastom beschrieben. Allerdings, während nur circa 3 % der Neuroblastomfälle bei der Diagnose eine *TP53*-Mutation aufweisen, ist bei circa 15 % der Neuroblastome bei einem Rezidiv das *TP53*-Gen mutiert (Chen und Tweddle, 2012; Carr-Wilkinson et al., 2010; Tweddle et al., 2003). Darüber hinaus repräsentieren Mutationen im *TP53*-Gen einen unabhängigen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben beim Neuroblastom (Chen und Tweddle, 2012; Carr-Wilkinson et al., 2010). In Übereinstimmung dazu konnte eine Studie, in welcher zwei Neuroblastomzelllinien aus einem Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose und nachfolgend nach der zytotoxischen Behandlung etabliert wurden, zeigen, dass die Zellen vor Beginn der Therapie ein Wildtyp *TP53*-Gen beherbergten, während nach erfolgter Chemotherapie das *TP53*-Gen mutiert war (Tweddle et al., 2001). Diese Befunde sind auch vereinbar mit weiteren Studien an präklinischen Neuroblastommodellen, welche den Verlust von

funktionalem p53 mit einer Resistenz gegenüber vielen antitumoralen Arzneimitteln und der Strahlentherapie assoziieren und dass die Resistenzausbildung zu antitumoralen Arzneimitteln mit einer Mutation von p53 korrelieren könnte (Chen und Tweddle, 2012; Kotchetkov et al., 2005; Michaelis et al., 2011; 2012; Keshelava et al., 2000 und 2001; Goldschneider et al., 2006; Xue et al., 2007). Zusätzlich dazu wurden Abnormalitäten im p53/MDM2/p14ARF Signalweg in 35 % der Neuroblastomproben nach Behandlung mit zytotoxischen Chemotherapeutika nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass in circa 50 % der Neuroblastomfälle die p53 Signalübertragung durch variierende Mechanismen gehemmt wird (Chen und Tweddle, 2012; Carr-Wilkinson et al., 2001). Daher sind neue potentielle antitumorale Wirkstoffe, welche ihre Wirkung gegenüber dem Neuroblastom unabhängig von der Anwesenheit von funktionalem p53 zur Geltung bringen, höchst erstrebenswert.

Die Western Blot Analyse zur Untersuchung des p53 Proteins und dem Zielgen p21 zeigt zwar, dass nach Behandlung mit 300 nM SNS-032 in UKF-NB-3 und IMR-32 Neuroblastomzellen eine deutliche Akkumulation von p53 und p21 induziert wird, jedoch zeigte der MTT-Viabilitätsassay in p53-depletierten UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen, dass die Effizienz der Wirkung von SNS-032 unabhängig von der An- oder Abwesenheit von funktionalem p53 ist, da keine signifikante Veränderung der IC₅₀- bzw. IC₉₀-Werte im Vergleich zu den mit einer scrambled shRNA transduzierten und den parental Neuroblastomzelllinien festgestellt werden konnte. In den p53-depletierten Zellen wurde die Expression des p53 Proteins im isogenen Zellmodell durch einen *TP53* shRNA-codierenden Vektor stabil gehemmt und sind durch einen wesentlich höheren IC₅₀- und IC₉₀-Wert für den p53-abhängigen MDM2-Inhibitor Nutlin-3 charakterisiert (Rothweiler et al., 2010). Andere in der Krebstherapie etablierte zytotoxische Arzneimittel wie Actinomycin D, Cisplatin, Melphalan oder Vincristin wurden im Gegensatz zu SNS-032 in ihrer Wirkung im MTT-Viabilitätsassay durch die Unterdrückung des p53 Proteins in Neuroblastomzellen ebenfalls negativ beeinträchtigt (Löschmann et al., 2013). Die im Western Blot nachgewiesene Akkumulation von p53 in den beiden Wiltyp-p53 Zelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 könnte möglicherweise durch eine Inhibierung der Synthese von MDM2 aufgrund der transkriptionshemmenden Eigenschaften von SNS-032 verursacht werden (Scrace et al., 2008; Lu et al., 2001). Untersuchungen von SNS-032 in CLL Lymphozyten mit deletiertem 17p (*TP53* Genlocus) wiesen ebenfalls die gleiche Effizienz von SNS-032 im Vergleich zu Lymphocyten mit normalen *TP53* Genlocus auf, was einen weiteren Hinweis für eine p53-unabhängige Wirkung von SNS-032 gibt (Chen et al., 2009).

Mutationen im p53 Gen können an sehr vielen verschiedenen Stellen der Gensequenz auftreten. Frühere Studien in Neuroblastomzellen, in denen die Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-6 in jeweils 10 unabhängigen Experimenten an Nutlin-3 adaptiert wurden, haben gezeigt, dass in den an 10 μ M Nutlin-3 adaptierten UKF-NB-3 Zellen (UKF-NB-3^rNutlin^{10 μ M}, UKF-NB-3^rNutlin^{10 μ M} I-IX) 5 von 10 Zelllinien in Folge der Adaptierung an Nutlin-3 ein mutiertes TP53-Gen mit 3 unterschiedlichen „*loss of function*“ Mutationen tragen (Michaelis et al., 2011; Michaelis et al., 2012). In UKF-NB-6 Zellen konnten sogar in allen an 10 μ M Nutlin-3 adaptierten Sublinien (UKF-NB-6^rNutlin^{10 μ M}, UKF-NB-6^rNutlin^{10 μ M} I-X) 7 unterschiedliche *de novo TP53*-Mutationen detektiert werden. In weiteren Experimenten wurden von der parentalen p53-Wildtyp Zelllinie UKF-NB-3 Einzelzellklone selektiert und 8 dieser Klone wiederum in 10 unabhängigen Experimenten an Nutlin-3 adaptiert. Auch hier konnten diverse unterschiedliche Mutationen im *TP53*-Gen festgestellt werden. Bei der Untersuchung einer Auswahl dieser Nutlin-3-resistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zelllinien mit unterschiedlichen Mutationen im *TP53*-Gen zeigte sich im MTT-Viabilitätsassay eine ähnliche Sensitivität gegenüber SNS-032 im Vergleich zu den parentalen UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die Wirkung von SNS-032 unabhängig von der Funktionalität des p53 Proteins ist. Besonders hervorzuheben ist hier die Zelllinie UKF-NB-3Klon1^rNutlin^{10 μ M} I, welche ein Stopcodon im Exon 4 des *TP53*-Genes trägt und im Western Blot keine Bande für p53 aufweist (Daten nicht gezeigt). Auch in dieser zeigte sich eine ähnliche Aktivität von SNS-032 auf die Zellviabilität im Vergleich zur parentalen Zelllinie UKF-NB-3.

Die Fragestellung ob SNS-032 in Neuroblastomzellen eine Apoptose auslöst wurde mit Hilfe diverser Untersuchungen zur intrinsischen Apoptose in UKF-NB-3 und IMR-32 Zellen bearbeitet. Die eingesetzten Konzentrationen von 100 und 300 nM SNS-032 wurden dabei aus Studien abgeleitet, welche 300 nM SNS-032 als maximal effektive Konzentration in 4 Mantelzelllymphomzellen bestimmt hatten (Chen et al., 2010). Die zeitkinetische Untersuchung der Wirkung dieser spezifischen SNS-032 Konzentration innerhalb dieser Arbeit hat ebenfalls bestätigt, dass 300 nM SNS-032 ausreichend sind, um die untersuchten Neuroblastomzelllinien vollständig in ihrer Viabilität zu hemmen. Nach 24 h Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 konnte eine dosisabhängige Aktivierung von BAX, eine Reduzierung des mitochondrialen Membranpotentials und eine Freisetzung des im Membranzwischenraum des Mitochondriums lokalisierten Cytochrom C in das Cytosol nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte ebenfalls eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 detektiert werden. Dabei war zu erkennen, dass die Zelllinie IMR-32 im Zeitverlauf deutlich eher

auf die Behandlung mit SNS-032 reagiert als die Zelllinie UKF-NB-3, da in IMR-32 Zellen bereits nach 6 h eine signifikant gesteigerte Aktivität der Caspase 3 und 7 im Vergleich zu den UKF-NB-3 Zellen detektiert werden konnte. Die im Western Blot nachgewiesenen Spaltprodukte von Caspase 3 und der Initiatorcaspase 9 gaben einen weiteren Hinweis, dass SNS-032 in Neuroblastomzellen eine intrinsische Caspase-abhängige Apoptose auslöst. Ebenfalls im Western Blot konnte die proteolytische Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) nach 12 und 24 h Inkubationszeit mit SNS-032 nachgewiesen werden, welche durch die aktive Caspase 3 katalysiert wird (Boulares et al., 1999). Einer der späten Schritte der Apoptose ist die Fragmentierung der zellulären DNA durch die von Caspase 3 und 7 aktivierten DNAsen (Caspase-aktivierte DNase / CAD) (Triscioglio et al., 2009). Durch den Verlust zellulärer DNA nach Permeabilisierung der Zellmembran weisen Zellen in der späten apoptotischen Phase einen sogenannten Sub-G1-DNA Gehalt auf, welcher durch Markierung der zellulären DNA mit Hilfe fluoreszierender, in Nukleinsäuren interkalierende Farbstoffe nachweisbar gemacht werden kann. Die Untersuchung der beiden Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und IMR-32 auf den prozentualen Anteil von Zellen in der als apoptotisch definierten Sub-G1-Phase nach Behandlung mit 100 und 300 nM SNS-032 zeigte einen deutlich dosisabhängigen und signifikanten Anstieg nach 24 und 48 h Inkubationszeit.

Um den Einfluss von SNS-032 auf die Funktion der einzelnen postulierten Zielproteine CDK2, 7 und 9 (Nuwayhid et al., 2006; Heath et al., 2008; Chen et al., 2009; Chen et al., 2010) näher zu untersuchen, wurden die drei chemosensitiven parentalen Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3, IMR-32 und UKF-NB-6 zunächst mit 300 nM SNS-032 für 12 und 24 h behandelt und anschließend im Western Blot auf die Expression von CDK2, 7 und 9 und ihren spezifischen Zielproteinen analysiert.

Die Western Blot Analysen zu CDK2 und seinem nachfolgendem Zielprotein Rb zeigen eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 807 / 811 nach 12 und 24 h. Die Expression von CDK2 selbst und des Rb Proteins wurde ebenfalls vermindert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen in Mantelzelllymphomzellen, in denen die Behandlung mit SNS-032 ebenfalls neben der Reduktion der phosphorylierten Form von Rb eine Verminderung des Gesamt-Rb-Gehaltes der Zellen zur Folge hatte (Chen et al., 2010). Die Autoren dieser Arbeit postulierten, dass die reduzierte Rb-Menge mit dem ausgelösten Zelltod und der PARP-Spaltung korrelieren, welche in Neuroblastomzellen ebenfalls bereits nach 12 h nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren kann Rb auch von aktiven Caspasen

gespalten werden und somit für den verwendeten spezifischen Primärantikörper nicht mehr bindungsfähig sein (Tan und Wang, 1998).

Die synthetisch letale Wirkung einer Hemmung von CDK2, wie sie in der ebenfalls *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie IMR-32 postuliert wurde (Molenaar et al., 2009), konnte im UKF-NB-3 Zellmodell nicht reproduziert werden. Die einzelne RNAi-vermittelte Hemmung der CDK2 Expression hatte in UKF-NB-3 Zellen keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Andere Studien in verschiedenen Tumorzelllinien haben ebenfalls schon gezeigt, dass CDK2 für die Zellproliferation von manchen Tumorzellen offenbar entbehrlich ist und die Zellproliferation und der Zellzyklus durch verminderte Expression von CDK2 nicht beeinträchtigt werden (Tetsu et al., 2003).

Bei der Untersuchung der hauptsächlich an der Transkription beteiligten CDKs 7 und 9 und ihrem primären Zielprotein, der RNA-Polymerase II via Western Blot Analyse konnte eine deutliche Verminderung der Phosphorylierung der RNA-Polymerase II an Serin 2 und 5 innerhalb der CTDs in allen drei untersuchten Neuroblastomzelllinien festgestellt werden. Auch hier konnte eine Verminderung der RNA-Polymerase II-Menge festgestellt werden. Dies deckt sich ebenfalls mit den Untersuchungen in Mantelzelllymphomen (Chen et al., 2010). Auch in diesen Zellen konnte nach Behandlung mit SNS-032 eine reduzierte Menge der RNA-Polymerase II neben der stark reduzierten Phosphorylierung nachgewiesen werden. Das gleiche Phänomen konnte in der Akuten myeloiden Leukämie (AML) HL-60 Zelllinie (Meng et al., 2013), in Patientenmaterial mit CLL nach Behandlung mit SNS-032 (Tong et al., 2010) und CLL Zelllinien (Chen et al., 2009) festgestellt werden.

Dass die unterdrückte Phosphorylierung an Serin 2 und 5 der RNA-Polymerase II als Folge der inhibierten Funktion der CDKs 7 und 9 durch SNS-032 tatsächlich zu einer verminderten zellulären Transkription führt, konnte in einem Assay, welcher ein Uridin-Analogon nutzt, um neusynthetisierte RNA zu bestimmen, nach 6 h Inkubationszeit dosisabhängig mit 100 und 300 nM SNS-032 nachgewiesen werden. Das Zytostatikum Actinomycin D, welches an die DNA bindet und so die Öffnung des Doppelstranges verhindert, wurde als Referenzsubstanz verwendet und inhibierte die Neusynthese von mRNA im gleichen Maße wie 300 nM SNS-032.

Durch eine RNAi-vermittelte Hemmung der SNS-032 Zielproteine CDK7 und CDK9 konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der Expression von CDK9 eine erhebliche antitumorale Wirkung in Neuroblastomzellen auslöste, während die RNAi-vermittelte Depletion von CDK7 keinen wesentlichen Einfluss auf die Viabilität von Neuroblastomzellen hatte. Die Wirkung der Unterdrückung von CDK9 konnte

durch gleichzeitige siRNA-vermittelte inhibierte Expression von CDK7 jedoch noch wesentlich gesteigert werden. Die unterschiedliche Wirkung der RNAi-vermittelten Hemmung von CDK7 und CDK9 könnte durch Studien erklärt werden, welche nachweisen konnten, dass CDK9 die Funktion von CDK7 bei der Phosphorylierung von Serin 5 der RNA-Polymerase II kompensieren kann (Ramanathan et al., 2001; Bark-Jones et al., 2006). Somit würde die RNA-Polymerase II bei einer Unterdrückung von CDK7 durch RNA-Interferenz ihre volle Funktion beibehalten, was im RNA-Synthese-Assay nach der Transfektion mit CDK7 spezifischer siRNA in Neuroblastomzellen auch bestätigt werden konnte. Im Vergleich dazu war die Aktivität der RNA-Polymerase II nach der Transfektion mit CDK9 spezifischer siRNA in Neuroblastomzellen deutlich inhibiert und konnte durch gleichzeitige Transfektion mit siRNA gegen CDK7 noch stärker inhibiert werden. Anhand dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass CDK9 das hauptsächlich therapeutisch wirksame Zielprotein von SNS-032 zu sein scheint. Diese Vermutung deckt sich mit anderen Studien, in welchen ebenfalls die Inhibierung von CDK9 stärkere antitumorale Effekte als CDK7 aufweist (Lemke et al., 2013). Jedoch zeigte sich durch kombinierte Inhibierung von CDK7 und 9 in ihrem Fall keine Steigerung der Effekte (Krystof et al., 2012).

Bemerkenswert ist auch, dass der antitumorale Effekt durch RNAi-vermittelte Unterdrückung von CDK9 auch in den beiden chemoresistenten UKF-NB-3 Sublinien UKF-NB-3^{VCR}¹⁰ und UKF-NB-3^{CDDP}¹⁰⁰⁰ detektiert werden konnte, insbesondere da die an Vincristin adaptierten UKF-NB-3^{VCR}¹⁰ Zellen aufgrund ihrer hohen ABCB1-Expression eine ausgeprägte Resistenz gegenüber SNS-032 aufweisen. Die mit den UKF-NB-3^{CDDP}¹⁰⁰⁰ Zellen vergleichbare Verminderung der Viabilität durch die direkte Inhibierung von CDK9 zeigt allerdings, dass die verminderte Sensitivität gegenüber SNS-032 in UKF-NB-3^{VCR} Zellen wahrscheinlich ausschließlich durch ABCB1 verursacht wird.

Frühere Studien zur Wirkung von SNS-032 haben gezeigt, dass die unterdrückte zelluläre Transkription von mRNA aufgrund der inhibierten RNA-Polymerase II eine Verringerung der zellulären Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit zur Folge hat (Ali et al., 2007; Scrace et al., 2008; Conroy et al., 2009; Chen et al., 2009; Chen et al., 2010; Tong et al., 2010; Wu et al., 2012; Meng et al., 2013). Dies betrifft vor allem antiapoptotische Proteine, da diese einem strengen Gleichgewicht aus Auf- und Abbau unterliegen. Die dabei am intensivsten untersuchten Proteine sind Mcl-1, Bcl-2 und XIAP (Scrace et al., 2008; Conroy et al., 2009; Chen et al., 2009; Chen et al., 2010; Tong et al., 2010; Wu et al., 2012). Um neben diesen beiden Proteinen zu

untersuchen, ob auch noch weitere antiapoptotische Proteine durch die Behandlung von SNS-032 und der nachfolgenden Inhibierung der Transkription beeinflusst werden, wurde die Expression diverser Proteine der Bcl2-Familie und IAPs via Western Blot Analyse nach Behandlung mit 300 nM SNS-032 in drei Neuroblastomzelllinien bestimmt. Neben den bereits bekannten von SNS-032 beeinflussten Proteinen Mcl-1 und XIAP konnte auch eine verminderte Expression von Survivin und cIAP-1 in allen drei untersuchten Neuroblastomzelllinien festgestellt werden. In 2 von 3 Zelllinien konnte zudem auch eine geringe Abnahme der Expression eines weiteren Vertreters der IAPs, cIAP-2, detektiert werden. Die verminderte Expression von cIAP-1 und Survivin durch SNS-032 steht im Einklang mit Untersuchungen in Zellen der Akuten myeloiden Leukämie (Meng et al., 2013) In anderen malignen hämatologischen Zellen konnte dagegen keine Verminderung von Survivin durch Behandlung mit SNS-032 festgestellt werden (Wu et al., 2012) Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen in diversen anderen malignen Zelltypen konnte in den Neuroblastomzelllinien auch eine leichte Verminderung des Bcl2-Proteins 24 h nach Behandlungsbeginn mit SNS-032 nachgewiesen werden (Conroy et al., 2009; Chen et al., 2009; Chen et al., 2010; Meng et al., 2013). Die relative Halbwertszeit des Bcl2-Proteins ist mit circa 18 bis 24 h im Vergleich zu beispielsweise Mcl-1, dessen relative Halbwertszeit nur circa 1 bis 2 h beträgt, als antiapoptotisches Protein auch deutlich größer (Goldsmith et al., 2005).

Insbesondere die starke Inhibierung von Survivin durch SNS-032 in Neuroblastomzellen ist ein neues und sehr interessantes Merkmal. Das zu den IAPs gehörende Survivin ist in differenzierten Geweben normalerweise nicht vorhanden. Ausnahmen sind Plazentagewebe, Testis und sich schnell teilende Zellen wie zum Beispiel CD34-positive Knochenmarkstammzellen (Fukada et al., 2001) Jedoch kann in fast allen Tumorzellen verschiedener Entitäten Survivin auch mit zum Teil hoher Expression nachgewiesen werden (O'Connor et al., 2000). Im Neuroblastom steht die Überexpression von Survivin zudem stark in Korrelation mit einer schlechten Prognose für den Patienten (Adida et al., 1998; Islam et al., 2000; Azuhata et al., 2001; Ito et al., 2005). Das Gen für Survivin ist auf dem chromosomalen Abschnitt 17q25 lokalisiert (Hogarty, 2003), welcher im Neuroblastom in Folge chromosomaler unbalancierter Aberration in 30 -80 % der Fälle hinzugewonnen wird und ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert werden kann (Hildebrandt et al., 2005; Wood und Lowis, 2008; Maris und Matthay, 1999; Maris et al., 2007). Der Zugewinn des Abschnittes 17q kann daher zu einer zusätzlichen Überexpression von Survivin im Neuroblastom beitragen. Frühere Studien im Neuroblastom haben bereits gezeigt, dass die Inhibierung von Survivin mittels shRNA/siRNA oder dem Survivin-Inhibitor

YM155 eine starke Apoptose auslöst (Lamers et al., 2012; Lamers et al., 2011; Liang et al., 2013). Der darin postulierte Mechanismus des Zelltodes durch die Inhibierung von Survivin ist eine Caspase 2 und p53-abhängige Apoptose nachfolgend einer sogenannten mitotischen Katastrophe (Lamers et al., 2011; Lamers et al., 2012). Andere Untersuchungen mit YM155 postulieren eine Caspase 8 und 3 abhängige Apoptose durch die Verminderung von Survivin und Mcl-1 (Feng et al., 2013). Survivin kann neben seiner Funktion in der Mitose-Regulation jedoch direkt oder indirekt auch die Aktivität der Caspase 3,7 und 9 inhibieren (Deveraux und Reed, 1999).

Die RNAi-vermittelte Hemmung von Survivin in UKF-NB-3 Zellen führte zu einem starken Anstieg der Zellen in der Sub-G1-Phase, vergleichbar mit anderen Studien in Neuroblastomzellen (Lamers et al., 2011; Lamers et al., 2012). Die Inhibierung von Mcl-1 mittels siRNA zeigte im Gegensatz dazu in Neuroblastomzellen einen deutlich geringen Einfluss auf die Zellviabilität. Diese Diskrepanz zum postulierten Wirkmechanismus von SNS-032 über die Ausdünnung von Mcl-1 und XIAP wurde auch schon in Studien in Osteosarcomzellen gezeigt. Auch dort hatte die RNAi-vermittelte Depletion von Mcl-1 (und XIAP) keinen Einfluss auf die Viabilität (Scrace et al., 2008).

Es ist wahrscheinlicher, dass der SNS-032-vermittelte antitumorale Mechanismus im Neuroblastom, das Ergebnis eines Zusammenspiels mehrerer Faktoren ist. Das sensible Gleichgewicht zwischen anti- und proapoptotischen Proteinen innerhalb einer Zelle, welches im Normalzustand dafür zuständig ist, die Zelle vor einem spontanen Auslösen einer Apoptose zu schützen, könnte jedoch durch die verminderte Expression mehrerer antiapoptotischer Proteine infolge der Wirkung von SNS-032 zu Gunsten der proapoptotischen Proteine fallen und somit eine intrinsische Apoptose auslösen. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass insbesondere Tumorzellen zum Überleben stärker auf die Suppression der Apoptose mittels übersteigerter Expression antiapoptotischer Faktoren angewiesen sind (Goldsmith und Hogarty, 2005; Chen et al., 2009). Beispielsweise korreliert eine hohe Expression von Mcl-1 in CLL Lymphozyten mit einer verringerten Induktion von vollständigen Remissionen (Kitada et al., 1998). Auch eine Bcl2-Überexpression korreliert in CLL Zellen mit einer schlechten Prognose (Rogalinska et al., 2012).

Wird dieses Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl2-Proteinen zum Beispiel durch die Reduktion von Mcl-1 zu Gunsten der proapoptotischen Mitglieder der Bcl2-Familie, Bax und Bak, gestört, kann die Apoptose durch freies Bak ausgelöst werden (Willis et al., 2005; 2007; Zhai et al., 2008). Vorläufige Daten in der

Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 zeigten eine Aktivierung von Bak durch SNS-032, welche mit der nachgewiesenen Aktivierung von Bax vergleichbar ist (Daten nicht gezeigt). Studien in HL-60 Zellen (AML) mit SNS-032 konnten zeigen, dass die Expression von Bax und Bim durch SNS-032 beispielsweise nicht beeinflusst wird (Meng et al., 2013).

Durch die Unterdrückung der Neusynthese und nachfolgender Depletierung von diversen IAPs durch SNS-032 wäre die Caspase-Inhibierung ebenfalls beeinträchtigt und könnte dazu beitragen, dass die Caspase-Kaskade nach einem apoptotischen Auslöser in einem stärkeren Ausmaß stattfindet, als sie sich in der Anwesenheit von IAPs ereignen würde. In diesem Modell würde die Reduktion von Survivin in Zusammenhang mit seiner Funktion als Inhibitor der Caspasen 3, 7 und 9 in der Progression der Apoptose eine wichtigere Rolle spielen, als es die Auslösung der Apoptose durch mitotische Katastrophe bei Survivin-Depletion tun würde. Es wurde gezeigt, dass alleinige RNAi-vermittelte Depletion von Survivin den Zelltod über den letzteren Mechanismus auslösen kann (Lamers et al., 2011). Jedoch könnte die Kombination der Vielzahl an beeinflussten Proteine durch SNS-032 die initial durch die Mcl-1 Reduktion ausgelöste Apoptose so weit verstärken, auch wenn alleinige RNAi-vermittelte Depletion von Mcl-1 nur in der Lage ist in einem kleinen Teil der Population Apoptose auszulösen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur erfolgsversprechenden antitumoralen Wirkung von SNS-032 in Neuroblastomzelllinien und auch im *in vivo* Modell lassen die Vermutung zu, dass SNS-032 und andere insbesondere gegen CDK9 gerichtete Therapiestrategien eine potentielle Möglichkeit zur Behandlung des Neuroblastoms einschließlich therapieresistenter Tumoren darstellt. Bedauerlicherweise wurde SNS-032 mit der Begründung nicht tolerierbarer Nebenwirkungen und eines zu weiten Wirkspektrums aus klinischen Studien ausgeschlossen. Jedoch werden nicht selten Wirkstoffe, welche zunächst ebenfalls nach erfolgten klinischen Phase I Studien eingestellt wurden, nach einiger Zeit und eventuell neueren präklinischen Untersuchungen wieder in klinische Studien integriert. Diese Neuaufnahme in neu angestrebte Studien in Patienten kann derzeit zum Beispiel bei irreversiblen Kinaseinhibitoren beobachtet werden (Sanderson, 2013). Diese wurden zunächst aufgrund der potentiellen Gefahr der zu starken systemischen Wirkung und nachfolgender nicht tolerierbarer toxischen Nebenwirkungen vor einigen Jahren eingestellt. Eventuell tritt dieser Fall in der Zukunft auch für SNS-032 ein.

Darstellungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Chemische Struktur von SNS-032	12
Abbildung 2.1	Umsetzung des gelben MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid) zu dem wasserunlöslichen violetten Formazan Quelle: http://www.chemie.uni-hamburg.de/bcpraktika/Zellbiologie_e.html	31
Abbildung 2.2	Reaktion zur Markierung neu synthetisierter RNA (Quelle: Protokoll Click-iT® RNA Alexa Fluor® 488 HCS Assay (http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C10327))	38
Tabelle 3.1	Konzentrationen von SNS-032, welche die Zellviabilität von Neuroblastomzellen um 50 % (IC ₅₀) bzw. 90 % (IC ₉₀) im MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h vermindern.	46
Abbildung 3.1	Wirkung von SNS-032 auf Neuroblastomzellen	51
Tabelle 3.2	Konzentrationen von SNS-032, welche die Viabilität von primären Neuroblastomkulturen um 50 % (IC ₅₀) beziehungsweise 90 % (IC ₉₀) nach einer Inkubationszeit von 120 h im MTT-Viabilitätsassay vermindern	53
Abbildung 3.2	Effekt von SNS-032 in Kombination mit zytotoxischen Chemotherapeutika in parentalen UKF-NB-3 Zellen	54
Abbildung 3.3	Effekt von SNS-032 in Kombination mit zytotoxischen Chemotherapeutika in UKF-NB-3 Zellen resistent zu Cisplatin (UKF-NB-3 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰), Melphalan (UKF-NB-3 ^r MEL ⁴⁰⁰) oder Topotecan (UKF-NB-3 ^r TOPO ¹⁵)	55
Tabelle 3.3	Profil der Kreuzresistenzen von UKF-NB-3 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰ Zellen zu diversen antitumoralen Arzneimitteln im Vergleich zur chemosensitiven parentalen UKF-NB-3 Zelle	56
Abbildung 3.4	Wirkung von SNS-032 <i>in vivo</i>	57
Abbildung 3.5	Wirkung von SNS-032 <i>in vivo</i> (individuelle Wachstumskurven)	58
Tabelle 3.4	Wirkung des ABCB1-Inhibitors Verapamil (10 µM) auf die Sensitivität von SNS-032 in ABCB1-positiven oder -negativen Neuroblastomzellen	60
Abbildung 3.6	Wirkung von Verapamil auf die Sensitivität gegenüber SNS-032	62
Tabelle 3.5	Wirkung des ABCB1-Inhibitors Verapamil (10 µM) auf die Sensitivität gegenüber SNS-032 in parentalen chemosensitiven, Leervektor-exprimierende (UKF-NB-3 ^{piCer2}) und ABCB1-überexprimierenden (UKF-NB-3 ^{ABCB1}) UKF-NB-3 Zellen	63

Abbildung 3.7	siRNA-vermittelte Hemmung von ABCB1 in UKF-NB-3 ^{ABCB1} Zellen	65
Abbildung 3.8	Wirkung der siRNA-vermitteltem Expressionshemmung von ABCB1 auf die Sensitivität gegenüber SNS-032 und Vincristin in UKF-NB-3 ^{ABCB1} Zellen	66
Abbildung 3.9	Wirkung von SNS-032 auf die Akkumulation von Rhodamin 123	67
Abbildung 3.10	Wirkung von SNS-032 auf primäre Neuroblastomkulturen	68
Abbildung 3.11	Wirkung von SNS-032 auf sphäroid wachsende Neuroblastoma	70
Tabelle 3.7	Wirkung von SNS-032 in Ab- und Anwesenheit des ABCB1-Inhibitors Verapamil (10 µM) auf parentale und an SNS-032 adaptierte (UKF-NB-3 ^{rSNS-032^{300nM}}) UKF-NB-3 Zellen	71
Abbildung 3.12	Expression von ABCB1 in UKF-NB-3 ^{rSNS-032^{300nM}} Zellen	72
Tabelle 3.8:	Kreuzresistenz von UKF-NB-3 ^{rSNS-032^{300nM}} Zellen gegenüber diversen Zytostatika im Vergleich zu parentalen UKF-NB-3 Zellen	73
Tabelle 3.9:	Einfluss der Expression von ABCG2 auf die antitumorale Wirkung von SNS-032 verglichen mit dem zytotoxischen ABCG2-Substrat Mitoxantron	75
Abbildung 3.13	SNS-032-bedingte Induktion der Expression von p53 und p21 in Neuroblastomzellen	77
Abbildung 3.14	Antitumorale Wirkung von SNS-032 in p53 depletierten Neuroblastomzellen	78
Abbildung 3.15	Einfluss von 300 nM SNS-032 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen im kinetischen Verlauf	80
Abbildung 3.16	Aktivierung von BAX durch SNS-032 in Neuroblastomzellen	81
Abbildung 3.17	Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (ψ) durch SNS-032 in Neuroblastomzellen	82
Abbildung 3.18	Freisetzung von Cytochrom C durch SNS-032 in Neuroblastomzellen	83
Abbildung 3.19	Aktivierung der Caspase 3 und 7 durch SNS-032 in Neuroblastomzellen	84
Abbildung 3.20	Spaltung von Caspase 9, Caspase 3 und PARP durch SNS-032 in Neuroblastomzellen	85
Abbildung 3.21	Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit SNS-032	86
Abbildung 3.22	Induktion von Zellen in der SubG1-Phase durch SNS-032 in Neuroblastomzellen	87

Abbildung 3.23	Einfluss von SNS-032 auf die Expression von CDK2 und Zielproteinen in Neuroblastomzellen	88
Abbildung 3.24	Einfluss der RNAi-vermittelten Hemmung von CDK2 auf die Viabilität und die Expression von CDK2 in Neuroblastomzellen	89
Abbildung 3.25	Einfluss von SNS-032 auf die Expression von CDK7, CDK9 und ihre Zielproteine in Neuroblastomzellen	90
Abbildung 3.26	Nachweis der RNAi-vermittelten Expressionshemmung von CDK7 und CDK9 in Neuroblastomzellen	91
Abbildung 2.27	Einfluss der Hemmung von CDK7 und CDK9 auf die Viabilität und RNA-Syntheseaktivität von Neuroblastomzellen	93
Abbildung 3.28	Einfluss der Hemmung von CDK9 auf die Viabilität von resistenten Neuroblastomzellen	94
Abbildung 3.29	Einfluss von SNS-032 auf die RNA-Synthese in Neuroblastomzellen	96
Abbildung 3.30	Einfluss von SNS-032 auf die Expression von pro- und anti-apoptischen Proteinen in Neuroblastomzellen	97
Abbildung 3.31	Einfluss der Hemmung von Mcl-1 und Survivin auf die Viabilität von Neuroblastomzellen	98

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
µM	Mikromol (10^{-6} Mol)
Abb.	Abbildung
ABCB1	Gensymbol für MDR1
ABCG2	Gensymbol für BCRP
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette</i> -Transporter
ActD	Actinomycin D
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ASCR	<i>autologous stem cell rescue</i> (autologe Stammzelltransplantation)
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRP1	<i>breast cancer resistance protein 1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARBO	Carboplatin
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CDDP	Cisplatin
CDK	<i>cyclin dependent protein</i>
clAP-1/2	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag/e

dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	Millipore-filtriertes Wasser
DM	<i>double-minute chromatin bodies</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCE	Docetaxel
DOX	Doxorubicin
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETO	Etoposid
EU	5-Ethynyluridin
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GEMCI	Gemcitabin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCS	<i>high-content screening</i>
HRS	<i>homogene staining regions</i>
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i> (halbmaximale Konzentration)
IC ₉₀	<i>Inhibitory Concentration 90</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbeccos Medium</i>
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i>
INRG	<i>International Neuroblastom Risk Groups</i>
INSS	<i>Internatinal Neuroblastoma Staging System</i>
JC-1	<i>1st J-aggregate-forming cationic dye found to be sensitive to the $\Delta\psi$</i>

kDa	kilo Dalton
l	Liter
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Mol
mA	Milliampère (10^{-3} Ampère)
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia 1</i>
MDM2	<i>Murin double minute 2</i>
MDR	<i>Multidrug-Resistance</i>
MDR1	<i>Multidrug-Resistance Protein 1</i>
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
MEL	Melphalan
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mM	Millimol (10^{-3} Mol)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRP1	<i>Multidrug-resistance-associated protein 1</i>
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaPPi	tetra-Natriumdiphosphat-decahydrat
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
nM	Nanomol (10^{-9} Mol)
NMRI:nu/nu	Stamm der Versuchsmäuse
NUTLIN	Nutlin-3
OD	Optische Dichte
OXALI	Oxaliplatin
p53	Transkriptionsfaktor p53; Tumorsuppressorgen
PACLI	Paclitaxel
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
P-gp	P-glycoprotein (weitere Bezeichnung für MDR1)
pH	<i>per Hydronium</i>
R123	Rhodamin 123
Rb	Retinoblastom-Protein
RFU	<i>Relative Fluorescenc Units</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Scr-shRNA	<i>scrambled short-hairpin RNA</i> (Kontroll-shRNA)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
shRNA	<i>short-hairpin RNA</i>
si RNA	<i>short interfering RNA</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrale Domäne
TOPO	Topotecan
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Trk	Tyrosinkinase
VCR	Vincristin
VINB	Vinblastin
VINOR	Vinorelbin
VPL	Verapamil
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*. 1998 Mar 21;351(9106):882-3
- Ali MA, Choy H, Habib AA, Saha D. SNS-032 prevents tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting vascular endothelial growth factor. *Neoplasia* 2007;9:370-81.
- Aller S, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Het al. Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 2009;323:1718–22.
- Altura RA, Maris JM, Li H, Boyett JM, Brodeur GM, Look AT. Novel regions of chromosomal loss in familial neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Jul;19(3):176-84.
- Ambros PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, Ladenstein R, Fink FM, Horcher E, Printz G, et al. Regression and progression in neuroblastoma. Does genetics predict tumour behaviour? *Eur J Cancer*. 1995;31A(4):510-5
- Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, Wen J, Davidoff A, Fukuzawa M, Sandler A. The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2001 Dec;36(12):1785-91
- Bark-Jones SJ, Webb HM, West MJ. EBV EBNA 2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene*. 2006 Mar 16;25(12):1775-85
- Bettayeb K, Baunbæk D, Delehouze C, Loaëc N, Hole AJ, Baumli S, et al. CDK Inhibitors Roscovitine and CR8 Trigger Mcl-1 Down-Regulation and Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma Cells. *Genes Cancer* 2010;1:369-80.
- Biedler, J. L. and Spengler, B. A.. Metaphase chromosome anomaly association with drug resistance and cell-specific products. *Science* 1976. 191, 185-187.
- Bikadi Z, Hazai I, Malik D, Jemnitz K, Veres Z, Hari P, et al. Predicting P-glycoprotein-mediated drug transport based on support vector machine and three-dimensional crystal structure of P-glycoprotein. *PLoS One* 2011;6:e25815.
- Blachly JS, Byrd JC. Emerging drug profile: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2013 Oct;54(10):2133-43.
- Blaheta RA, Michaelis M, Natsheh I, Hasenberg C, Weich E, Relja B, Jonas D, Doerr HW, Cinatl J Jr. Valproic acid inhibits adhesion of vincristine- and cisplatin-resistant neuroblastoma tumour cells to endothelium. *Br J Cancer*. 2007 Jun 4;96(11):1699-706
- Boquoi A, Chen T, Enders GH. Chemoprevention of mouse intestinal tumorigenesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2:800-6.

- Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):22932-40.
- Bourhis J, Bénard J, Hartmann O, Boccon-Gibod L, Lemerle J, Riou G. Correlation of MDR1 gene expression with chemotherapy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Sep 20;81(18):1401-5
- Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR, Vandesompele J, Van Roy N. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999 Jun 24; 340(25):1954-61.
- Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol*. 2001 Dec;54(12):897-910.
- Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ, Simon R, Boecker W, Lampert F, Stoerkel S. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of neuroblastomas--an important methodological approach in paediatric tumour pathology. *J Pathol*. 1997 Apr;181(4):394-400.
- Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsiatis AA. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res*. 1981 Nov;41(11 Pt 1): 4678-86.
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993 Aug;11(8):1466-77.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984 Jun 8;224(4653):1121-4.
- Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer*. 1977 Nov;40(5):2256-63.
- Brodeur GM. Knowing your ABCCs: novel functions of ABCC transporters. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1207-8.
- Calin G, Ivan M, Stefanescu D. The difference between p53 mutation frequency in haematological and non-haematological malignancies: possible explanations. *Med Hypotheses*. 1999 Oct;53(4):326-8
- Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bökkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voûte PA, Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996 Jan 25;334(4):225-30.

- Caron H, van Sluis P, van Hove M, de Kraker J, Bras J, Slater R, Mannens M, Voûte PA, Westerveld A, Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nat Genet.* 1993 Jun;4(2):187-90.
- Caron H. Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 1995 Apr;24(4):215-21.
- Carr-Wilkinson J, O'Toole K, Wood KM, Challen CC, Baker AG, Board JR, et al. High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:1108-18.
- Castleberry RP, Pritchard J, Ambros P, Berthold F, Brodeur GM, Castel V, Cohn SL, De Bernardi B, Dicks-Mireaux C, Frappaz D, Haase GM, Haber M, Jones DR, Joshi VV, Kaneko M, Kemshead JT, Kogner P, Lee RE, Matthay KK, Michon JM, Monclair R, Roald BR, Seeger RC, Shaw PJ, Shuster JJ, et al. The International Neuroblastoma Risk Groups (INRG): a preliminary report. *Eur J Cancer.* 1997 Oct;33(12):2113-6.
- Chen L, Tweddle DA. p53, SKP2, and DKK3 as MYCN Target Genes and Their Potential Therapeutic Significance. *Front Oncol* 2012;2:173.
- Chen R, Chubb S, Cheng T, Hawtin RE, Gandhi V, Plunkett W. Responses in mantle cell lymphoma cells to SNS-032 depend on the biological context of each cell line. *Cancer Res.* 2010 Aug 15;70(16):6587-97.
- Chen R, Wierda WG, Chubb S, Hawtin RE, Fox JA, Keating MJ, et al. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:4637-45.
- Christiansen H, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe HJ, Lampert F. Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1995;31A(4):541-4.
- Cinatl J Jr, Cinatl J, Mainke M, Weissflog A, Rabenau H, Kornhuber B, Doerr HW. In vitro differentiation of human neuroblastoma cells induced by sodium phenylacetate. *Cancer Lett.* 1993 Jun 15;70(1-2):15-24
- Cinatl J Jr, Cinatl J, Scholz M, Driever PH, Henrich D, Kabickova H, Vogel JU, Doerr HW, Kornhuber B. Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs.* 1996 Sep;7(7):766-73
- Cinatl J Jr, Vogel JU, Cinatl J, Weber B, Rabenau H, Novak M, et al. Long-term productive human cytomegalovirus infection of a human neuroblastoma cell line. *Int J Cancer* 1996;65:90-6.
- Cinatl J Jr, Vogel JU, Cinatl J, Weber B, Rabenau H, Novak M, Kornhuber B, Doerr HW. Long-term productive human cytomegalovirus infection of a human neuroblastoma cell line. *Int J Cancer.* 1996 Jan 3;65(1):90-6

- Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldut A, Hero B, Ichihara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK; INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 10;27(2):289-97.
- Collins I, Garrett MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2005 Aug;5(4):366-73.
- Combaret V, Gross N, Lasset C, Balmas K, Bouvier R, Frappaz D, Beretta-Brognara C, Philip T, Favrot MC, Coll JL. Clinical relevance of TRKA expression on neuroblastoma: comparison with N-MYC amplification and CD44 expression. *Br J Cancer*. 1997;75(8):1151-5.
- Combaret V, Gross N, Lasset C, Frappaz D, Peruisseau G, Philip T, Beck D, Favrot MC. Clinical relevance of CD44 cell-surface expression and N-myc gene amplification in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas. *J Clin Oncol*. 1996 Jan;14(1):25-34.
- Conroy A, Stockett DE, Walker D, Arkin MR, Hoch U, Fox JA, et al. SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:723-32.
- Corrias MV, Cornaglia-Ferraris P, Di Martino D, Stenger AM, Lanino E, Boni L, Tonini GP. Expression of multiple drug resistance gene, MDR1, and N-myc oncogene in an Italian population of human neuroblastoma patients. *Anticancer Res*. 1990 Jul-Aug;10(4):897-902
- Coulon A, Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Liberman J, Balmas-Bourlout K, Nardou K, Yan P, Tercier S, Joseph JM, Sommer L, Gross N. Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model. *Neoplasia*. 2011 Oct;13(10):991-1004.
- Cox D, Yuncken C, Spriggs A. Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood. *Lancet* 1965 (2): 55-58
- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. 1973 *Biochem. Biophys. Acta*, 323, 466.
- de Cremoux P, Jourdan-Da-Silva N, Couturier J, Tran-Perennou C, Schleiermacher G, Fehlbaum P, et al. Role of chemotherapy resistance genes in outcome of neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:311-7.
- Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Gen Develop* 1999; 13: 239-252
- Dhooge CR, De Moerloose BM, Benoit YC, Van Roy N, Philippé, Laureys GG. Expression of the MDR1 gene product P-glycoprotein in childhood neuroblastoma. *Cancer* 1997;80:1250-7.
- Evans E, D'Angio G, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. *Cancer* Volume 27, Issue 2, 1971

- Fan J, Fahr B, Stockett D, Chan E, Cheeti S, Serafimova I, Lu Y, Pham P, Walker DH, Hoch U, Choong IC. Modifications of the isonipecotic acid fragment of SNS-032: analogs with improved permeability and lower efflux ratio. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Dec 1;18(23):6236-9.
- Favrot M, Combaret V, Goillot E, Wagner JP, Bouffet E, Mazingue F, Thyss A, Bordigoni P, Delsol G, Bailly C, et al. Expression of P-glycoprotein restricted to normal cells in neuroblastoma biopsies. *Br J Cancer*. 1991 Aug;64(2):233-8
- Favrot MC, Combaret V, Lasset C. CD44-a new prognostic marker for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1993 Dec 23;329(26):1965.
- Feng W, Yoshida A, Ueda T. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 24;435(1):52-7
- Fong CT, Dracopoli NC, White PS, Merrill PT, Griffith RC, Housman DE, Brodeur GM. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(10):3753-7.
- Fong CT, White PS, Peterson K, Sapienza C, Cavenee WK, Kern SE, Vogelstein B, Cantor AB, Look AT, Brodeur GM. Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res*. 1992 Apr 1;52(7):1780-5.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006 Sep;13(9):1423-33
- Garrofé-Ochoa X, Cosialls AM, Ribas J, Gil J, Boix J. Transcriptional modulation of apoptosis regulators by roscovitine and related compounds. *Apoptosis* 2011;16:660-70.
- Gehring M, Berthold F, Edler L, Schwab M, Amler LC. The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res*. 1995 Nov 15;55(22):5366-9.
- Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, Rinaldt V, Vinikoor N, Weisband J. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res*. 1984 Nov;44(11):5444-9.
- Goldschneider D, Horvilleur E, Plassa LF, Guillaud-Bataille M, Million K, Wittmer-Dupret E, et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2006;34:5603-12.
- Goldsmith KC, Hogarty MD. Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2005 Oct 18;228(1-2):133-41
- Goldstein LJ, Fojo AT, Ueda K, Crist W, Green A, Brodeur G, Pastan I, Gottesman

- MM. Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastomas. *J Clin Oncol.* 1990 Jan;8(1):128-36
- Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53:615-27.
 - Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004 Jul 30;305(5684):626-9
 - Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene.* 1999 Sep 2;18(35):4948-57.
 - Haber M, Bordow SB, Haber PS, Marshall GM, Stewart BW, Norris MD. The prognostic value of MDR1 gene expression in primary untreated neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1997 Oct;33(12):2031-6
 - Hahntow IN, Schneller F, Oelsner M, Weick K, Ringshausen I, Fend F, Peschel C, Decker T. Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 2004 Apr;18(4):747-55.
 - Harms D, Wilke H. Grading procedures for neuroblastoma. *Klin Padiatr.* 1979 Mar;191(2):228-33.
 - Harper JW, Elledge SJ. The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev.* 1998 Feb 1;12(3):285-9.
 - Hayashi Y, Ueki K, Waha A, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastomamultiforme. *Brain Pathol* 1997;7:871-5.
 - Heath EI, Bible K, Martell RE, Adelman DC, Lorusso PM. A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors. *Invest New Drugs* 2008;26:59-65.
 - Hildebrandt T, Traunecker H. Neuroblastoma: A tumour with many faces. *Current Paediatrics* 2005 Oct, Volume 15, Issue 5, 412-420
 - Hogarty MD. The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. *Cancer Lett.* 2003 Jul 18;197(1-2):173-9

- Ieiri I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27(1):85-105.
- Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.* 2000 Feb 3;19(5):617-23
- Ito R, Asami S, Motohashi S, Ootsuka S, Yamaguchi Y, Chin M, Shichino H, Yoshida Y, Nemoto N, Mugishima H, Suzuki T. Significance of survivin mRNA expression in prognosis of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull.* 2005 Apr;28(4):565-8
- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Nov 11;455(1):152-62.
- Kaatsch P. German Childhood Cancer Registry and its favorable setting. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2004 May;47(5):437-43
- Kamath AV, Chong S, Chang M, Marathe PH. P-glycoprotein plays a role in the oral absorption of BMS-387032, a potent cyclin-dependent kinase 2 inhibitor, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:110-6.
- Keshelava N, Seeger RC, Groshen S, Reynolds CP. Drug resistance patterns of human neuroblastoma cell lines derived from patients at different phases of therapy. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5396-405
- Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 2001;61:6185-93.
- Keshelava N, Zuo JJ, Waidyaratne NS, Triche TJ, Reynolds CP. p53 mutations and loss of p53 function confer multidrug resistance in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:563-8.
- Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood.* 1998 May 1;91(9):3379-89
- Kodym E, Kodym R, Reis AE, Habib AA, Story MD, Saha D. The small-molecule CDK inhibitor, SNS-032, enhances cellular radiosensitivity in quiescent and hypoxic non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer.* 2009 Oct;66(1):37-47.
- Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschellá G, Persson H. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res.* 1993 May 1;53(9):2044-50.

- König A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4307-12.
- Kotchetkov R, Cinatl J, Blaheta R, Vogel JU, Karaskova J, Squire J, et al. Development of resistance to vincristine and doxorubicin in neuroblastoma alters malignant properties and induces additional karyotype changes: a preclinical model. *Int J Cancer* 2003;104:36-43.
- Kotchetkov R, Driever PH, Cinatl J, Michaelis M, Karaskova J, Blaheta R, et al. Increased malignant behavior in neuroblastoma cells with acquired multi-drug resistance does not depend on P-gp expression. *Int J Oncol* 2005;27:1029-37.
- Kramer K, Cheung NK, Gerald WL, LaQuaglia M, Kushner BH, LeClerc JM, LeSauter L, Saragovi HU. Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997 Oct;33(12):2098-100.
- Kruse U, Pallasch CP, Bantscheff M, Eberhard D, Frenzel L, Ghidelli S, et al. Chemoproteomics-based kinome profiling and target deconvolution of clinical multi-kinase inhibitors in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2011;25:89-100.
- Krystof V, Baumli S, Fürst R. Perspective of cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a drug target. *Curr Pharm Des* 2012;18:2883-90.
- Lacrima K, Rinaldi A, Vignati S, Martin V, Tibiletti MG, Gaidano G, Catapano CV, Bertoni F. Cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib shows in vitro activity in diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2007 Jan;48(1):158-67.
- Lacrima K, Valentini A, Lambertini C, Taborelli M, Rinaldi A, Zucca E, Catapano C, Cavalli F, Gianella-Borradori A, Maccallum DE, Bertoni F. In vitro activity of cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (Seliciclib, R-roscovitine) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol*. 2005 Jul;16(7):1169-76.
- Lamers F, Schild L, Koster J, Versteeg R, Caron HN, Molenaar JJ. Targeted BIRC5 silencing using YM155 causes cell death in neuroblastoma cells with low ABCB1 expression. *Eur J Cancer*. 2012 Mar;48(5):763-71
- Lamers F, van der Ploeg I, Schild L, Ebus ME, Koster J, Hansen BR, Koch T, Versteeg R, Caron HN, Molenaar JJ. Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Oct 27;18(6):657-68
- Lastowska M, Cotterill S, Pearson AD, Roberts P, McGuckin A, Lewis I, Bown N. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. *Eur J Cancer*. 1997 Sep;33(10):1627-33.

- Lemke J, von Karstedt S, Abd El Hay M, Conti A, Arce F, Montinaro A, Papenfuss K, El-Bahrawy MA, Walczak H. Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1. *Cell Death Differ.* 2014 Mar;21(3):491-502
- Liang H, Zhang L, Xu R, Ju XL. Silencing of survivin using YM155 induces apoptosis and chemosensitization in neuroblastomas cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013 Nov;17(21):2909-15.
- Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005 Jan;205(2):275-92.
- Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1984 Jul 26;311(4):231-5.
- Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1991 Apr;9(4):581-91.
- Lu W, Chen L, Peng Y, Chen J. Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene.* 2001 May 31;20(25):3206-16
- Malumbres M, Pevarello P, Barbacid M, Bischoff JR. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Jan;29(1):16-21.
- Maris JM, Guo C, Blake D, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Rajalingam V, Gerbing R, Stram DO, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM. Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001 Jan;36(1):32-6.
- Maris JM, Guo C, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001 Jan;36(1):24-7.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007 Jun 23;369(9579):2106-20
- Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1999 Jul;17(7):2264-79
- Maris JM, White PS, Beltinger CP, Sulman EP, Castleberry RP, Shuster JJ, Look AT, Brodeur GM. Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res.* 1995 Oct 15;55(20):4664-9.
- Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362:2202-11.
- Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct;9(10):714-23. Epub 2009 Sep 4. Review.

- Meijer L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol.* 1996 Oct;6(10):393-7.
- Meng H, Jin Y, Liu H, You L, Yang C, Yang X, Qian W. SNS-032 inhibits mTORC1/mTORC2 activity in acute myeloid leukemia cells and has synergistic activity with perifosine against Akt. *J Hematol Oncol.* 2013 Feb 18;6:18
- Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 1999 Apr 15;59(8):1903-10.
- Michaelis M, Kleinschmidt MC, Barth S, Rothweiler F, Geiler J, Breitling R, et al. Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines. *Biochem Pharmacol* 2010;79:130-6.
- Michaelis M, Rothweiler F, Agha B, Barth S, Voges Y, Löschmann N, et al. Human neuroblastoma cells with acquired resistance to the p53 activator RITA retain functional p53 and sensitivity to other p53 activating agents. *Cell Death Dis* 2012;3:e294.
- Michaelis M, Rothweiler F, Barth S, Cinatl J, van Rikxoort M, Löschmann N, et al. Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug resistant cancer cells. *Cell Death Dis* 2011;2:e243.
- Michaelis M, Rothweiler F, Klassert D, von Deimling A, Weber K, Fehse B, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance by the MDM2 antagonist nutlin-3. *Cancer Res* 2009;69:416-21.
- Misra RN, Xiao HY, Kim KS, Lu S, Han WC, Barbosa SA, et al. N-(cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a highly efficacious and selective antitumor agent. *J Med Chem* 2004;47:1719-28.
- Modak S, Cheung NK. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat Rev.* 2010 Jun;36(4):307-17
- Molenaar JJ, Ebus ME, Geerts D, Koster J, Lamers F, Valentijn LJ, Westerhout EM, Versteeg R, Caron HN. Inactivation of CDK2 is synthetically lethal to MYCN over-expressing cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12968-73
- Morgenstern DA, Baruchel S, Irwin MS. Current and future strategies for relapsed neuroblastoma: challenges on the road to precision therapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 Jul;35(5):337-47

- Morgenstern DA, Marzouki M, Bartels U, Irwin MS, Sholler GL, Gammon J, Yankanah R, Wu B, Samson Y, Baruchel S. Phase I study of vinblastine and sirolimus in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Jan;61(1):128-33
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 1983; 65: 55-63.
- Mossé YP, Lipsitz E, Fox E, Teachey DT, Maris JM, Weigel B, Adamson PC, Ingle MA, Ahern CH, Blaney SM. Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of MLN8237, an investigational oral selective small-molecule inhibitor of Aurora kinase A: a Children's Oncology Group Phase I Consortium study. *Clin Cancer Res*. 2012 Nov 1;18(21):6058-64
- Mukhopadhyay P, Ali MA, Nandi A, Carreon P, Choy H, Saha D. The cyclin-dependent kinase 2 inhibitor down-regulates interleukin-1beta-mediated induction of cyclooxygenase-2 expression in human lung carcinoma cells. *Cancer Res* 2006;66:1758-66.
- Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Clinical significance of expression of neurotrophic factors and their receptors in neuroblastoma. *Prog Clin Biol Res*. 1994;385:155-61.
- Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1993 Mar 25;328(12):847-54.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):515-27
- N'gompaza-Diarra J, Bettayeb K, Gresh N, Meijer L, Oumata N. Synthesis and biological evaluation of selective and potent cyclin-dependent kinase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2012 Oct;56:210-6.
- Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets*. 2006 Jul;7(7):861-79.
- Nuwayhid SJ, Hyde J, A Aleshin A, Walker DH, R. Arkin MR. SNS-032 is a potent and selective inhibitor of CDK2, 7 and 9 and induces cell death by inhibiting cell cycle progression and the expression of antiapoptotic proteins. *Experimental and Molecular Therapeutics 13: Cell Cycle Components in Therapeutics Abstract #2079*
- O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97(24):13103-7

- Oue T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies. *J Pediatr Surg.* 2009 Feb;44(2):377-80.
- Ozvegy-Laczka C, Cserepes J, Elkind NB, Sarkadi B. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist Updat* 2005;8:15-26.
- Peterlin BM, Price DH. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 2006;23:297-305.
- Pituch-Noworolska A, Zaremba M, Wieczorek A. Expression of proteins associated with therapy resistance in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma tumour cells. *Pol J Pathol* 2009;60:168-73.
- Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK, Pellarin M, Seeger RC, Feuerstein BG. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* 1997 Jan;150(1):81-9.
- Puppo M, Pastorino S, Melillo G, Pezzolo A, Varesio L, Bosco MC. Induction of apoptosis by flavopiridol in human neuroblastoma cells is enhanced under hypoxia and associated with N-myc proto-oncogene down-regulation. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10(24):8704-19.
- Ramanathan Y, Rajpara SM, Reza SM, Lees E, Shuman S, Mathews MB, Pe'ery T. Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J Biol Chem.* 2001 Apr 6;276(14):10913-20
- Ribas J, Boix J, Meijer L. (R)-roscovitine (CYC202, Seliciclib) sensitizes SH-SY5Y neuroblastoma cells to nutlin-3-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2006 Jul 15;312(12):2394-400.
- Robak P, Robak T. A Targeted Therapy for Protein and Lipid Kinases in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Med Chem* 2012;19:5294-318.
- Rothweiler F, Michaelis M, Brauer P, Otte J, Weber K, Fehse B, et al. Anticancer effects of the nitric oxide-modified saquinavir derivative saquinavir-NO against multidrug-resistant cancer cells. *Neoplasia* 2010;12:1023-30.
- Sanderson K. Irreversible kinase inhibitors gain traction. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Sep;12(9):649-51.
- H. Schägger und G. Von Jagow (1987) *Anal. Biochem.* 166, 368-379
- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature.* 1983 Sep 15-21;305(5931):245-8.
- Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 20;23(36):9408-21.

- Scrace SF, Kierstan P, Borgognoni J, Wang LZ, Denny S, Wayne J, et al. Transient treatment with CDK inhibitors eliminates proliferative potential even when their abilities to evoke apoptosis and DNA damage are blocked. *Cell Cycle* 2008;7:3898-907.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988 Sep 1;48(17):4827-33
- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 1985 Oct 31;313(18):1111-6.
- Seeger RC, Wada R, Brodeur GM, Moss TJ, Bjork RL, Sousa L, Slamon DJ. Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Prog Clin Biol Res.* 1988;271:41-9.
- Senderowicz AM, Headlee D, Stinson SF, Lush RM, Kalil N, Villalba L, Hill K, Steinberg SM, Figg WD, Tompkins A, Arbuck SG, Sausville EA. Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol.* 1998 Sep;16(9):2986-99.
- Senderowicz AM. Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs.* 1999;17(3):313-20.
- Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2010;10:241-53.
- Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, et al. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;67(22):11012-20.
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer.* 1999 Jul 15;86(2):364-72.
- Stellrecht CM, Chen LS. Transcription inhibition as a therapeutic target for cancer. *Cancers (Basel).* 2011 Nov 23;3(4):4170-90.
- Svensson T, Rydén M, Schilling FH, Dominici C, Sehgal R, Ibáñez CF, Kogner P. Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1997 Oct;33(12):2058-63.
- Takayama H, Suzuki T, Mugishima H, Fujisawa T, Ookuni M, Schwab M, Gehring M, Nakamura Y, Sugimura T, Terada M, et al. Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene.* 1992 Jun;7(6):1185-9.

- Takeda O, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Kanda N, Schwab M, Nakamura Y, Kaneko Y. There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 May;10(1):30-9.
- Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J. Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene*. 1995 Nov 2;11(9):1829-34.
- Tan X, Wang JY. The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol*. 1998 Mar;8(3):116-20
- Tetsu O, McCormick F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell*. 2003 Mar;3(3):233-45
- Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matisse TC, White PS. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001 Jan;36(1):28-31.
- Tong WG, Chen R, Plunkett W, Siegel D, Sinha R, Harvey RD, et al. Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010;28:3015-22.
- Trisciuoglio L, Bianchi ME. Several nuclear events during apoptosis depend on caspase-3 activation but do not constitute a common pathway. *PLoS One*. 2009 Jul 29;4(7):e6234.
- Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J. Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 2001;61:8-13.
- Tweddle DA, Pearson AD, Haber M, Norris MD, Xue C, Flemming C, Lunec J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003;197:93-8.
- Wagner L, Turpin B, Nagarajan R, Weiss B, Cripe T, Geller J. Pilot study of vincristine, oral irinotecan, and temozolomide (VOIT regimen) combined with bevacizumab in pediatric patients with recurrent solid tumors or brain tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Sep;60(9):1447-51
- Wang S, Fischer PM. Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Jun;29(6):302-13.
- Walsby E, Lazenby M, Pepper C, Burnett AK. The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 has single agent activity in AML cells and is highly synergistic with cytarabine. *Leukemia*. 2011 Mar;25(3):411-9
- Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. *Cell Death Differ* 2003;10:853-5.

- White PS, Maris JM, Beltinger C, Sulman E, Marshall HN, Fujimori M, Kaufman BA, Biegel JA, Allen C, Hilliard C, Valentine MB, Look AT, Enomoto H, Sakiyama S, Brodeur GM. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5520-4.
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 19, 1294–1305
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2007) Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856–859
- Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol*. 2006 Sep;17 Suppl 10:x315-24.
- Wood L, Lowis S. An update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health* 2008 March Volume 18, Issue 3, 123-128
- Wu Y, Chen C, Sun X, Shi X, Jin B, Ding K, Yeung SC, Pan J. Cyclin-dependent kinase 7/9 inhibitor SNS-032 abrogates FIP1-like-1 platelet-derived growth factor receptor α and bcr-abl oncogene addiction in malignant hematologic cells. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 1;18(7):1966-78.
- Xue C, Haber M, Flemming C, Marshall GM, Lock RB, MacKenzie KL, et al. p53 determines multidrug sensitivity of childhood neuroblastoma. *Cancer Res* 2007;67:10351-60.
- Yankulov KY, Bentley DL. Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIF. *EMBO J* 1997;16:1638-46.
- Zhai, D., Jin, C., Huang, Z., Satterthwait, A. C., and Reed, J. C. (2008) Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J. Biol. Chem.* 283, 9580–9586
- Zhang C, Lundgren K, Yan Z, Arango ME, Price S, Huber A, Higgins J, Troche G, Skaptason J, Koudriakova T, Nonomiya J, Yang M, O'Connor P, Bender S, Los G, Lewis C, Jessen B. Pharmacologic properties of AG-012986, a pan-cyclin-dependent kinase inhibitor with antitumor efficacy. *Mol Cancer Ther*. 2008 Apr;7(4):818-28.
- Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem*. 2008;15(20):1981-2039.
- Zhou SF. Role of multidrug resistance associated proteins in drug development. *Drug Discov Ther*. 2008 Dec;2(6):305-32.

Anhang A.1: TP53-Status und Angabe der p53-Mutationen der untersuchten parentalen Neuroblastomzelllinien und ihren zugehörigen Nutlin-3-resistenten Sublinien

Zelllinie	p53 Status
UKF-NB-3	Wildtyp
UKF-NB-3rNutlin10µM	G245C, homozygot
UKF-NB-3rNutlin10µM II	Wildtyp
UKF-NB-3rNutlin10µM III	Wildtyp
UKF-NB-3rNutlin10µM VI	P278A, heterozygot
UKF-NB-3rNutlin10µM VIII	D281G, heterozygot
UKF-NB-3Klon1	Wildtyp
UKF-NB-3Klon1rNutlin10µM I	Stopcodon in Exon 4
UKF-NB-3Klon1rNutlin10µM III	R248W, heterozygot
UKF-NB-3Klon1rNutlin10µM IV	V173L, heterozygot
UKF-NB-3Klon1rNutlin10µM VI	R196Q, heterozygot
UKF-NB-3Klon1rNutlin10µM VIII	Y236C, heterozygot
UKF-NB-3Klon1rNutlin10µM X	P151R, heterozygot
UKF-NB-3Klon3	Wildtyp
UKF-NB-3Klon3rNutlin10µM I	P152L, heterozygot
UKF-NB-3Klon3rNutlin10µM IV	A275P, heterozygot
UKF-NB-3Klon3rNutlin10µM VII	C176F, heterozygot
UKF-NB-3Klon3rNutlin10µM VIII	N239S, heterozygot
UKF-NB-3Klon3rNutlin10µM X	I251F, heterozygot
UKF-NB-6	Wildtyp
UKF-NB-6rNutlin10µM	K123N, heterozygot; P223L, homozygot)
UKF-NB-6rNutlin10µM I	S241F, homozygot
UKF-NB-6rNutlin10µM IV	C135F; D281Y, heterozygot
UKF-NB-6rNutlin10µM VIII	C277F, homozygot
UKF-NB-6rNutlin10µM X	R248Q, homozygot

Anhang A.2: siRNA Sequenzen der verwendeten siRNAs

ON-TARGETplus non-targeting Pool siRNA

UGGUUUACAUGUCGACUAA
UGGUUUACAUGUUGUGUGA
UGGUUUACAUGUUUUCUGA
UGGUUUACAUGUUUCCUA

ON-TARGETplus SMARTpool - Human ABCB1 siRNA

CCAGGUAUGCCUAUUUUA
GACCAUAAAUGUMGGUUU
GAAAGUAUACCUCCAGUUU
GAGCUUMCACCCGACUUA

ON-TARGETplus SMARTpool - Human CDK2 siRNA

GAGCUUAACCAUCCUAAUA
GAAACAAGUUGACGGGAGA
GGAGUUACUUCUAUGCCUG
GGCCUAGCUUUCUGCCAU

ON-TARGETplus SMARTpool - Human CDK7 siRNA

CAUACAAGGCUUAUUCUUA
AAACUGAUCUAGAGGUUAU
CAACAUUGGAUCCUACAUA
GAUGACUCUUAAGGAUUA

ON-TARGETplus SMARTpool - Human CDK9 siRNA

GGCAAACGUGGACAACUA
GUAUAUACCUUGGUUCGA
GGACAUGAAGGCUGCUAAU
UAUAACCGCUGCAAGGGUA

ON-TARGETplus SMARTpool - Human MCL 1 siRNA

GGUUUGGCAUAUCUAAUAA
GAAGGUGGCAUCAGGAAUG
GAUUAUCUCUCGGUACCUU
CGAAGGAAGUAUCGAAUUU

ON-TARGETplus SMARTpool - Human BIRC5 (Survivin) siRNA

GCAAAGGAAACCAACAAUA
GGAAAGGAGAUCAACAUUU
CACCGCAUCUCUACAUUCA
CCACUGAGAACGAGCCAGA

Anhang A.3 ABCB1-Expressionsmessung mittels Durchflusszytometrie in verschiedenen ABCB1-positiven bzw. -negativen Neuroblastomzellen

Zelllinie	ABCB1-Expression [rfu]
Be(2)C	1170,0 ± 64,7
IMR-5	178,5 ± 7,5
IMR-5 ^r VCR ¹⁰	2255,0 ± 98,1
IMR-5 ^r DOX ²⁰	967,5 ± 154,2
IMR-32	83,0 ± 25,4
IMR-32 ^r VCR ¹⁰	2499,0 ± 120,1
IMR-32 ^r DOX ²⁰	748,0 ± 130,5
NLF	14,0 ± 1,2
NLF ^r VCR ¹⁰	0
NLF ^r DOX ⁴⁰	0
SHEP	134,5 ± 67,5
SHEP ^r VCR ¹	3534,5 ± 64,1
SH-SY5Y	207,0 ± 16,2
UKF-NB-2	281,5 ± 50,6
UKF-NB-2 ^r VCR ¹⁰	16113 ± 217,1
UKF-NB-2 ^r DOX ²⁰	699,5 ± 17,9
UKF-NB-3	25,5 ± 4,0
UKF-NB-3 ^r VCR ¹⁰	474,0 ± 34,5
UKF-NB-3 ^r DOX ²⁰	2272,3 ± 133,3
UKF-NB-4	8734,5 ± 251,1
UKF-NB-6	65,0 ± 3,5
UKF-NB-6 ^r VCR ¹⁰	5707 ± 528,9
UKF-NB-6 ^r DOX ²⁰	772,0 ± 118,9

Anhang A.4: Konzentrationen von SNS-032, welche die Zellviabilität von Neuroblastomzellen um 50 % (IC₅₀) beziehungsweise 90 % (IC₉₀) in An- bzw. Abwesenheit von 10 µM Verapamil im MTT-Viabilitätsassay nach einer Inkubationszeit von 120 h vermindern.

Zelllinie	Wirkung von SNS-032			
	IC ₅₀ (nM)		IC ₉₀ (nM)	
	- Verapamil	+ Verapamil	- Verapamil	+ Verapamil
Be(2)C	508,9 ± 43,3	75,4 ± 18,2 (6,7)¹	1230,3 ± 69,5	156,4 ± 25,5 (7,9)²
CHP-134	104,5 ± 3,7	77,5 ± 0,4 (1,4)	226,7 ± 10,2	199,9 ± 3,0 (1,1)
GI-ME-N	188,2 ± 4,3	191,4 ± 3,6 (1,0)	259,0 ± 9,0	282,1 ± 9,2 (0,9)
IMR-5	126,2 ± 6,6	78,2 ± 2,9 (1,6)	181,4 ± 3,3	114,3 ± 2,9 (1,6)
IMR-5 ^r CARBO ⁵⁰⁰⁰	114,5 ± 5,7	114,5 ± 8,9 (1,0)	160,4 ± 4,2	150,0 ± 4,3 (1,0)
IMR-5 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	158,4 ± 14,5	115,0 ± 16,6 (1,4)	332,8 ± 16,7	156,2 ± 10,5 (2,1)
IMR-5 ^r DOCE ²⁰	14615 ± 361	231,6 ± 14,7 (63,1)	> 20000	391,5 ± 32,3 (>51,1)
IMR-5 ^r DOX ²⁰	1161 ± 66	148,7 ± 8,1 (7,8)	2141 ± 63	180,4 ± 16,7 (11,9)
IMR-5 ^r ETO ¹⁰⁰	101,9 ± 5,2	74,8 ± 2,6 (1,4)	158,6 ± 7,0	85,1 ± 3,4 (1,9)
IMR-5 ^r GEMCI ²⁰	130,3 ± 8,6	83,8 ± 0,5 (1,6)	188,2 ± 6,4	120,0 ± 1,0 (1,6)
IMR-5 ^r MEL ³⁰⁰⁰	102,7 ± 11,2	72,2 ± 4,0 (1,4)	169,2 ± 6,1	111,6 ± 0,8 (1,5)
IMR-5 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	162,8 ± 7,0	93,9 ± 3,2 (1,7)	251,2 ± 9,7	147,4 ± 2,4 (1,7)
IMR-5 ^r PCL ²⁰	3367 ± 114	98,0 ± 3,6 (34,4)	6629 ± 73	161,4 ± 7,7 (41,1)
IMR-5 ^r TOPO ²⁰	64,2 ± 6,4	58,1 ± 1,8 (1,1)	114,3 ± 2,2	93,5 ± 3,7 (1,2)
IMR-5 ^r VCR ¹⁰	2355 ± 148	108,9 ± 6,3 (21,6)	4401 ± 154	179,0 ± 4,0 (24,8)

IMR-5 ^r VINOR ²⁰	5989 ± 81	141,6 ± 3,2 (42,3)	11660 ± 73	195,2 ± 7,5 (59,7)
IMR-32	104,9 ± 12,8	78,8 ± 16,7 (1,3)	159,9 ± 15,4	136,9 ± 25,6 (1,2)
IMR-32 ^r CARBO ⁴⁰⁰⁰	980,0 ± 71,5	212,1 ± 4,9 (4,6)	2585 ± 120	326,9 ± 12,1 (7,9)
IMR-32 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	309,0 ± 14,8	146,2 ± 23,4 (2,1)	478,1 ± 47,8	216,3 ± 36,2 (2,2)
IMR-32 ^r DOX ²⁰	2403 ± 344	105,2 ± 12,6 (22,8)	5123 ± 1242	169,4 ± 27,3 (30,2)
IMR-32 ^r ETO ¹⁰⁰	104,8 ± 14,8	77,1 ± 9,1 (1,4)	164,1 ± 6,2	144,8 ± 12,9 (1,1)
IMR-32 ^r GEMCI ²⁵	96,2 ± 3,6	76,2 ± 0,1 (1,3)	156,9 ± 8,3	122,3 ± 2,3 (1,3)
IMR-32 ^r MEL ⁵⁰⁰	151,5 ± 32,7	109,9 ± 23,5 (1,4)	217,5 ± 33,3	161,5 ± 22,0 (1,3)
IMR-32 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	65,9 ± 2,2	47,7 ± 9,3 (1,4)	128,0 ± 7,3	120,2 ± 9,2 (1,1)
IMR-32 ^r TOPO ^{7.5}	104,4 ± 29,9	107,6 ± 47,5 (1,0)	227,5 ± 42,7	205,6 ± 55,0 (1,1)
IMR-32 ^r VCR ¹⁰	1201 ± 419	129,7 ± 47,9 (9,3)	2958 ± 726	209,7 ± 36,1 (14,1)
IMR-32 ^r VINOR ⁵	834,4 ± 56,3	108,3 ± 1,7 (7,7)	1564 ± 12	169,1 ± 4,1 (9,2)
Kelly	124,2 ± 25,7	104,2 ± 24,9 (1,2)	171,0 ± 8,7	158,4 ± 12,9 (1,1)
LAN2	114,2 ± 9,5	103,4 ± 13,6 (1,1)	289,6 ± 18,4	290,5 ± 8,7 (1,0)
LAN5	190,1 ± 17,4	148,8 ± 3,3 (1,3)	244,0 ± 15,0	204,3 ± 6,6 (1,2)
NGP	95,7 ± 7,3	72,7 ± 6,7 (1,3)	239,2 ± 5,3	128,8 ± 3,0 (1,9)
NGP ^r GEMCI ²⁰	108,1 ± 2,7	89,5 ± 8,1 (1,2)	212,5 ± 22,6	203,4 ± 29,0 (1,0)
NLF	97,0 ± 3,5	115,8 ± 2,6 (0,8)	152,4 ± 11,4	159,7 ± 5,0 (1,0)
NLF ^r CARBO ⁵⁰⁰⁰	124,6 ± 4,6	86,1 ± 1,4 (1,4)	180,0 ± 3,8	152,7 ± 5,3 (1,2)
NLF ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	119,5 ± 2,4	83,0 ± 4,0 (1,4)	169,7 ± 9,2	154,5 ± 6,6 (1,1)

NLF ^r DOCE ²⁰	132,6 ± 7,7	95,2 ± 3,0 (1,4)	710,2 ± 55,9	154,8 ± 4,3 (4,6)
NLF ^r DOX ⁴⁰	96,9 ± 3,9	99,0 ± 8,3 (1,0)	159,4 ± 11,9	150,3 ± 4,1 (1,1)
NLF ^r ETO ¹⁰⁰	115,1 ± 6,5	112,8 ± 2,2 (1,0)	218,0 ± 4,4	223,6 ± 8,2 (1,0)
NLF ^r GEMCI ²⁰	111,9 ± 7,7	148,9 ± 0,2 (0,8)	256,6 ± 13,4	230,9 ± 2,7 (1,1)
NLF ^r MEL ³⁰⁰⁰	125,3 ± 3,3	124,6 ± 8,9 (1,0)	217,8 ± 9,5	219,9 ± 19,3 (1,0)
NLF ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	167,4 ± 10,0	156,9 ± 0,5 (1,1)	199,8 ± 36,8	206,5 ± 49,9 (1,0)
NLF ^r PCL ²⁰	58,3 ± 12,4	68,8 ± 7,0 (0,8)	106,4 ± 22,6	126,3 ± 20,1 (0,8)
NLF ^r VCR ⁵	155,4 ± 22,3	136,0 ± 6,4 (1,1)	170,2 ± 5,0	200,4 ± 7,4 (0,8)
NLF ^r VINB ¹⁰	109,6 ± 7,8	115,0 ± 9,2 (1,0)	215,7 ± 8,7	215,5 ± 15,4 (1,0)
NMB	259,8 ± 18,5	72,1 ± 14,7 (3,6)	821,1 ± 22,4	209,1 ± 16,7 (3,9)
SHEP	600,2 ± 35,2	118,2 ± 6,2 (5,1)	1163 ± 40	217,0 ± 19,9 (5,4)
SHEP ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	2402 ± 494	241,6 ± 10,6 (9,9)	3209 ± 77	318,8 ± 10,3 (10,1)
SHEP ^r ETO ¹⁰⁰	1781 ± 78	155,2 ± 6,3 (11,5)	3167 ± 107	205,1 ± 0,1 (15,4)
SHEP ^r VCR ¹	10852 ± 764	356,2 ± 1,8 (30,5)	> 20000	651,3 ± 25,3 (>30,7)
SH-SY5Y	406,6 ± 95,6	75,9 ± 15,0 (5,4)	1250 ± 288	140,3 ± 27,4 (8,9)
SH-SY5Y ^r CDDP ²⁰⁰	463,7 ± 105,7	103,1 ± 18,6 (4,5)	1277 ± 355	202,2 ± 24,6 (6,3)
SK-N-AS	256,8 ± 22,7	94,2 ± 7,2 (2,7)	686,3 ± 57,4	186,7 ± 14,6 (3,7)
SK-N-SH	1029 ± 128	96,3 ± 1,9 (10,7)	2227 ± 79	171,3 ± 20,9 (13,0)
UKF-NB-2	251,3 ± 39,5	207,2 ± 26,7 (1,2)	514,2 ± 51,2	319,1 ± 108,6 (1,6)
UKF-NB-2 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	171,1 ± 25,9	77,2 ± 1,9 (2,2)	2051 ± 36	191,3 ± 31,6 (10,7)

UKF-NB-2 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	195,8 ± 24,0	125,4 ± 12,9 (1,6)	337,9 ± 98,6	241,4 ± 29,7 (1,4)
UKF-NB-2 ^r DOCE ¹⁰	4010 ± 1177	156,1 ± 14,7 (25,7)	16702 ± 3808	639,0 ± 93,9 (26,1)
UKF-NB-2 ^r DOX ²⁰	2172 ± 23	162,0 ± 2,9 (13,4)	5019 ± 872	230,9 ± 65,3 (21,7)
UKF-NB-2 ^r MEL ⁶⁰⁰	2403 ± 50	252,1 ± 2,8 (9,5)	7484 ± 618	352,1 ± 2,4 (21,3)
UKF-NB-2 ^r OXALI ⁶⁰⁰	196,2 ± 11,9	125,6 ± 36,4 (1,6)	2455 ± 386	475,6 ± 4,7 (5,2)
UKF-NB-2 ^r TOPO ¹⁰	3079 ± 150	288,7 ± 30,9 (10,7)	5631 ± 612	543,8 ± 10,5 (10,4)
UKF-NB-2 ^r VCR ¹⁰	7957 ± 1100	240,4 ± 88,9 (33,1)	11254 ± 1277	455,3 ± 175,7 (24,7)
UKF-NB-2 ^r VINB ¹⁰	3559 ± 265	211,5 ± 5,4 (16,8)	9266 ± 738	413,7 ± 4,7 (22,4)
UKF-NB-2 ^r VINOR ¹⁰	4590 ± 491	308,6 ± 1,0 (14,9)	6917 ± 227	400,1 ± 4,4 (17,3)
UKF-NB-3	148.9 ± 20,8	133,7 ± 22,9 (1,1)	272.5 ± 36,6	235,7 ± 29,3 (1,2)
UKF-NB-3 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	869,3 ± 23,5	114,3 ± 8,6 (7,6)	2862 ± 104	210,2 ± 0,6 (13,6)
UKF-NB-3 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	126,7 ± 28,0	103,8 ± 30,9 (1,0)	197,7 ± 54,6	160,8 ± 39,7 (1,2)
UKF-NB-3 ^r DOCE ²⁰	3704 ± 372	151,5 ± 5,8 (24,4)	6160 ± 427	243,6 ± 0,8 (25,3)
UKF-NB-3 ^r DOX ²⁰	4284 ± 302	242,2 ± 39,4 (17,7)	8530 ± 2211	361,8 ± 40,6 (26,3)
UKF-NB-3 ^r ETO ¹⁰⁰	182,0 ± 40,1	115,0 ± 29,4 (1,6)	324,2 ± 40,6	213,5 ± 17,4 (1,5)
UKF-NB-3 ^r GEMCI ¹⁰	132,6 ± 5,0	94,0 ± 0,1 (1,4)	205,4 ± 10,8	148,1 ± 9,4 (1,4)
UKF-NB-3 ^r MEL ⁴⁰⁰	587,4 ± 148,1	185,6 ± 53,7 (3,2)	855,4 ± 164,5	205,1 ± 34,6 (4,2)
UKF-NB-3 ^r OXALI ²⁰⁰⁰	113,6 ± 10,2	83,3 ± 5,6 (1,4)	250,6 ± 15,2	202,6 ± 22,5 (1,2)
UKF-NB-3 ^r PCL ²⁰	4700 ± 196	306,6 ± 52,0 (15,3)	9250 ± 1855	433,7 ± 77,7 (21,3)
UKF-NB-3 ^r TOPO ¹⁵	119,2 ± 13,3	66,7 ± 13,5 (1,8)	219,0 ± 8,6	141,1 ± 14,6 (1,6)

UKF-NB-3 ^r VCR ¹⁰	727,5 ± 191,1	140,1 ± 10,5 (5,2)	1747 ± 481	261,0 ± 40,4 (6,7)
UKF-NB-3 ^r VINB ¹⁰	3189 ± 132	165,7 ± 8,2 (19,2)	4844 ± 136	247,9 ± 2,5 (19,5)
UKF-NB-3Klon1	140,1 ± 31,4	98,5 ± 0,3 (1,4)	285,9 ± 50,7	200,6 ± 26,6 (1,4)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} II	181,2 ± 3,3	148,0 ± 1,4 (1,2)	329,7 ± 26,2	262,1 ± 17,2 (1,3)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} III	204,1 ± 8,1	150,1 ± 2,0 (1,4)	331,8 ± 4,4	237,7 ± 1,6 (1,4)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} IV	173,5 ± 11,9	155,7 ± 10,7 (1,1)	293,9 ± 5,2	248,9 ± 5,6 (1,2)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} VI	178,8 ± 4,8	141,8 ± 6,4 (1,3)	291,1 ± 17,5	247,1 ± 8,6 (1,2)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} VIII	177,7 ± 6,8	145,2 ± 1,0 (1,2)	335,5 ± 6,7	280,7 ± 2,2 (1,2)
UKF-NB-3Klon1 ^r Nutlin ^{10μM} X	222,0 ± 7,9	163,9 ± 0,2 (1,4)	373,4 ± 13,7	233,6 ± 7,2 (1,6)
UKF-NB-3Klon3	167,2 ± 38,4	119,0 ± 0,4 (1,4)	301,3 ± 65,5	194,2 ± 6,4 (1,6)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} I	111,9 ± 18,3	148,4 ± 9,7 (0,8)	254,0 ± 12,2	292,4 ± 32,1 (0,9)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} IV	222,2 ± 1,9	147,4 ± 16,0 (1,5)	405,1 ± 33,4	260,8 ± 18,0 (1,6)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} VII	240,2 ± 7,4	156,8 ± 2,6 (1,5)	481,8 ± 20,0	325,9 ± 1,6 (1,5)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} VIII	204,7 ± 12,6	137,5 ± 4,3 (1,5)	342,1 ± 20,0	275,6 ± 3,3 (1,2)
UKF-NB-3Klon3 ^r Nutlin ^{10μM} X	182,2 ± 28,2	169,8 ± 2,8 (1,1)	293,1 ± 10,6	303,6 ± 1,6 (1,0)
UKF-NB-4	1671 ± 259	155,7 ± 27,0 (10,7)	2611 ± 358	250,5 ± 48,0 (10,4)
UKF-NB-6	109,5 ± 18,2	76,6 ± 12,0 (1,4)	310,4 ± 77,8	156,3 ± 34,5 (2,0)
UKF-NB-6 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	296,3 ± 31,9	118,0 ± 13,5 (2,5)	754,0 ± 41,3	202,1 ± 17,3 (3,7)
UKF-NB-6 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	308,9 ± 26,2	95,0 ± 5,7 (3,3)	799,4 ± 98,0	195,6 ± 21,2 (4,1)
UKF-NB-6 ^r DOX ²⁰	452,6 ± 81,0	68,2 ± 10,5 (6,6)	1178 ± 332	118,6 ± 24,7 (9,9)

UKF-NB-6 ^r ETO ²⁰⁰	306,0 ± 82,1	73,6 ± 9,7 (4,2)	949,3 ± 325,5	127,4 ± 27,5 (7,5)
UKF-NB-6 ^r GEMCI ¹⁰	160,1 ± 10,0	60,8 ± 0,9 (2,6)	525,3 ± 11,3	163,5 ± 5,4 (3,2)
UKF-NB-6 ^r MEL ¹⁰⁰⁰	132,2 ± 19,7	121,8 ± 25,4 (1,1)	210,7 ± 12,6	191,5 ± 35,1 (1,1)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM}	197,5 ± 2,7	131,5 ± 3,2 (1,5)	384,1 ± 19,6	181,0 ± 1,0 (2,1)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM} I	138,8 ± 8,8	91,4 ± 14,5 (1,5)	233,3 ± 7,9	171,0 ± 4,7 (1,4)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM} IV	239,1 ± 7,4	125,9 ± 8,4 (1,9)	459,3 ± 2,3	175,4 ± 2,9 (2,6)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM} VIII	128,4 ± 22,4	85,2 ± 25,1 (1,5)	520,3 ± 5,5	229,3 ± 12,2 (2,3)
UKF-NB-6 ^r Nutlin ^{10μM} X	119,0 ± 2,0	80,7 ± 15,2 (1,5)	388,0 ± 36,2	233,4 ± 33,3 (1,7)
UKF-NB-6 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	172,9 ± 15,2	89,4 ± 2,8 (1,9)	655,1 ± 150,0	164,2 ± 10,1 (4,0)
UKF-NB-6 ^r PCL ²⁰	1290 ± 187	86,0 ± 15,4 (15,0)	3335 ± 494	176,3 ± 36,9 (18,9)
UKF-NB-6 ^r TOPO ²⁰	435,6 ± 55,3	104,4 ± 6,9 (4,2)	1231 ± 239	200,3 ± 39,8 (6,1)
UKF-NB-6 ^r VCR ¹⁰	1896 ± 222	115,6 ± 22,2 (16,4)	3792 ± 616	202,0 ± 22,0 (18,8)
UKF-NB-6 ^r VINOR ⁴⁰	6268 ± 64	134,8 ± 19,9 (46,5)	15135 ± 4493	226,6 ± 8,8 (66,8)

¹ IC₅₀ ohne Verapamil / IC₅₀ mit Verapamil

² IC₉₀ ohne Verapamil / IC₉₀ mit Verapamil