

Untersuchung eines Survivin-Inhibitors an chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen und nähere Charakterisierung des Wirkmechanismus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Yvonne Voges
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main 2016

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Cinatl

Datum der Disputation:.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Neuroblastom	3
2.1.1 Definition, Epidemiologie und Klassifikation.....	3
2.1.2 Molekularbiologische Merkmale des Neuroblastoms	4
2.1.3 MYCN Amplifikation.....	4
2.1.4 Veränderungen der ALK- (<i>anaplastic lymphoma kinase</i>) Expression.....	5
2.1.5 Chromosomale Aberrationen	5
2.1.6 Therapie	6
2.2 Chemoresistenz.....	7
2.2.1 ABC-Transporter	8
2.2.2 ‚Solute carrier‘ Protein SLC35F2	9
2.3 Survivin.....	10
2.3.1 Struktur und Funktion	10
2.3.2 Survivin Isoformen.....	13
2.4 Survivin Inhibitoren in der Tumorthherapie.....	15
2.4.1 YM155.....	16
2.5 DNA-Schadensantwort von Einzel- und Doppelstrangbrüchen	17
3. Material und Methoden	22
3.1 Materialien	22
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
3.1.2 Chemikalien und Stoffe	23
3.1.3 Verwendete kommerzielle Reaktionskits und Standards	25
3.1.4 <i>real-time quantitative</i> PCR Primer	26
3.1.5 Zellkultur.....	26
3.1.6 Puffer und Gelzusammensetzung für Western-Blot	27
3.1.7 Puffer für Comet-Assay	29
3.1.8 Viabilitätsassay (MTT-Test).....	30
3.1.9 Verwendete Antikörper	30
3.1.10 Verwendete siRNAs	32
3.1.11 Verwendete Zellen	32
3.1.11 Verwendete Software	36
3.2 Methoden.....	37

3.2.1 Zellkultivierung	37
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl	37
3.2.3 MTT-Viabilitätstest.....	37
3.2.4 Western-Blot	39
3.2.5 Einzell-Gelelektrophorese (,Comet Assay').....	42
3.2.6 ,DNA-Damage' Kit	44
3.2.7 Bestimmung der Expression von ABC-Transporter am Durchfluss- zytometer	44
3.2.8 RNA Interferenz mittels siRNA Transfektion	46
3.2.9 Transduktion	47
3.2.10 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR).....	48
3.2.11 Statistik.....	51
4. Ergebnisse.....	52
4.1 Effekte von YM155 auf Neuroblastomzellen	52
4.1.1 Antitumorale Wirkung von YM155 auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen.....	52
4.1.2 Charakterisierung von YM155 adaptierten Neuroblastomzellen	56
4.2 Einfluss der ABCB1 und SLC35F2 Expression auf die Wirksamkeit von YM155 in Neuroblastomzellen	62
4.2.1 Einfluss von ABCB1 auf die Sensitivität gegenüber YM155 in Neuroblastomzellen.....	62
4.2.2 Einfluss von SLC35F2 auf die Sensitivität gegenüber YM155 in Neuroblastomzellen.....	69
4.2.3 Zusammenspiel der ABCB1- und SLC35F2-Expression in Neuroblastomzellen.....	71
4.4 YM155 wirkt primär auf Survivin.....	76
4.4.1 Was kommt nach YM155 Behandlung zuerst: Survivin-Inhibierung oder DNA-Schadensantwort?	76
3.4.2 Weitere Nachweise der DNA-Schadensantwort.....	80
4.5 Einfluss von p53 auf die zelluläre Antwort auf YM155.....	83
4.5.1 Einfluss der Nutlin-3 Behandlung auf die Wirkung von YM155	88
4.6 Einfluss von Bestrahlung auf die Wirkung von YM155	93
4.7 Charakterisierung von YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen	97
5. Diskussion.....	103
5.1 Resistenzmechanismus gegen YM155	105
5.2 Was tritt durch die YM155 Behandlung zuerst auf: DNA-Schadensantwort oder Survivin-Inhibierung?	109

5.3 Einfluss von Bestrahlung und p53 auf die Wirkung von YM155.....	110
Abbildungsverzeichnis.....	114
Tabellenverzeichnis.....	117
Literaturverzeichnis.....	118
Anhang A.1: siRNA Sequenzen.....	131
Wissenschaftliche Publikationen.....	132
Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Erklärung.....	134
Versicherung.....	134

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
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
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRP1	<i>Breast cancer resistance protein 1</i>
BIRC5	<i>Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing-5</i>
BIR-Domäne	<i>Baculovirus-IAP repeat domain</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CARBO	Carboplatin
CDDP	Cisplatin
CDK	<i>Cyclin dependent protein</i>
Chk2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
clAP-1/2	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	<i>Chromosomal-passenger-complex</i>

Abkürzungsverzeichnis

d	Tage
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
ddH ₂ O	<i>Millipore</i> -filtriertes Wasser
DDR	<i>DNA-Damage response</i>
DM	<i>Double-minute chromatin bodies</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOCE	Docetaxel
DOX	Doxorubicin
DSB	<i>Double-strand breaks</i>
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETO	Etoposid
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GEMCI	Gemcitabin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEN2	<i>Nescient helix-loop-helix 2</i>
HRS	<i>High-content screening</i>
HSR	<i>Homogeneously staining region</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration 50</i>
IC ₉₀	<i>Inhibitory concentration 90</i>
IMDM	<i>Isocove's Modified Dulbeccos Medium</i>
INRG	<i>International Neuroblastom Risk Group</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
kDa	Kilo Dalton
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

LMO1	<i>LIM domain only 1</i>
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-Resistenz</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
MELPH	Melphalan
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mM	Millimol (10^{-3} Mol)
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</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)
NUTLIN	Nutlin-3
OD	Optische Dichte
OXALI	Oxaliplatin
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>
PHOX2B	<i>Paired-like homebox 2B</i>
rfu	<i>Relative fluorescence units</i>

Abkürzungsverzeichnis

RING-Domäne	<i>Really interesting new gene domain</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
scr-shRNA	<i>Scrambled short-hairpin RNA (Kontroll-shRNA)</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Short interfering siRNA</i>
SLC	<i>Solute carrier protein</i>
Sp1	<i>Specifity protein 1</i>
SSB	<i>Single-strand breaks</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembran-Domäne
TOPO	Topotecan
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan-hydrochlorid
Trk	Tyrosinkinase
UBA-Domäne	<i>Ubiquitin-associated domain</i>
VCR	Vincristin
VINB	Vinblastin
VINOR	Vinorelbin
wt	Wildtyp
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
z.B.	Zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Die Chemotherapie mit einer Kombination verschiedener Chemotherapeutika stellt die gängigste Behandlung bei einer Krebserkrankung dar. Kommt es im Verlauf einer Therapie zu einer Ausbildung einer Chemoresistenz gegen die eingesetzten Therapeutika, so richtet sich diese meist auch gegen andere Zytostatika und es entstehen Kreuzresistenzen. Die Entwicklung einer solchen ‚*multidrug*‘-Resistenz stellt einen häufigen Grund für ein Therapieversagen dar. Aufgrund dessen ist es von großer Bedeutung Resistenzmechanismen gegen Chemotherapeutika aufzuklären. Der Survivin-Inhibitor YM155 ist Bestandteil einiger abgeschlossener klinischer Phase II Studien, vor allem beim Mamma-, und Prostatakarzinom und anderer Tumorentitäten. Das anti-apoptotisch wirkende Protein Survivin stellt ein vielversprechendes Ziel in der Krebstherapie dar, da dieses nahezu ausschließlich während der Embryonalentwicklung gebildet wird und im ausdifferenzierten Gewebe kaum noch vorzufinden ist. Dagegen liegt das Protein in fast allen Tumorzellen überexprimiert vor.

In dieser Arbeit wurde YM155 anhand eines Neuroblastom-Zellmodells bezüglich seiner antitumoralen Wirkung, sowie möglicher Resistenzmechanismen untersucht. Mit Hilfe eines Viabilitäts-‚*Screenings*‘ wurde eine Auswahl von 113 chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen auf mögliche Kreuzresistenzen gegen YM155 untersucht. Hinsichtlich der IC_{50} Werte gegen YM155, lagen insgesamt 74 % der untersuchten Zelllinien im therapeutisch erreichbaren Bereich von unter 50 nM. Zusätzlich wurden Neuroblastom-, Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen an eine klinisch relevante YM155 Konzentration adaptiert. Diese zeigten wiederum, dass durch die Adaptierung hervorgerufene Expressionsänderung des ABC-Transporters ABCB1 und des ‚*solute carrier*‘ Protein SLC35F2 eine bedeutsame Rolle hinsichtlich des Resistenzmechanismus gegen YM155 spielen. Durch den Einsatz von spezifischen ABCB1-Inhibitoren, als auch durch siRNA-vermittelte Reduzierung von ABCB1 konnte eine Abhängigkeit für die Wirksamkeit YM155 von ABCB1 in Neuroblastomzellen bestätigt werden. Des Weiteren wurde in den untersuchten Zelllinien ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von YM155 und der Expression des ‚*solute carrier*‘ Proteins SLC35F2 hergestellt. Dazu wurden Zellen mit verminderter SLC35F2 Expression verwendet, welche durch Transduktion mit einem für eine SLC35F2 spezifische shRNA kodierenden Vektor etabliert wurden. Dabei führte eine verminderte SLC35F2 Expression zu einer starken Minderung der Sensitivität gegen YM155. Das Zusammenspiel dieser beiden Transporter und der damit verbundene Resistenzmechanismus gegen YM155, konnte in fast allen etablierten YM155-resistenten Zelllinien (UKF-NB-3^{YM155}²⁰, 22RV1^{YM155}³⁰⁰, PC-3^{YM155}²⁰, HCC-

1806^rYM155²⁰ und MDA-MB-231^rYM155²⁰) gezeigt werden. Wobei diese Zellen unabhängig von der Tumorentität als Resistenzmechanismus gegen YM155 entweder eine signifikant induzierte ABCB1 Expression (verstärkter YM155 Efflux) und/oder eine verminderte SLC35F2 Expression (verringertes YM155 Influx) entwickelten. Außerdem konnte mit Hilfe der p53-depletierten Zelllinie UKF-NB-3^{pc-p53} eine Abhängigkeit der YM155 Wirkung vom Tumorsuppressor p53 nachgewiesen werden, wobei es durch die Depletierung von p53 zu einer verminderten Sensitivität der Zellen gegen YM155 kam. Zudem kam es durch die Nutlin-3 hervorgerufene p53 Aktivierung und Akkumulierung zu einer Verstärkung der YM155 Wirkung in den untersuchten Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der p53 Status von Zellen einen Einfluss auf deren YM155 Resistenz haben kann. Da in der Behandlung von Neuroblastomen neben der Chemotherapie auch Bestrahlung eingesetzt wird, wurde zusätzlich untersucht ob eine Adaptierung von Neuroblastomzellen an YM155 zu einer verminderten Sensitivität gegen Bestrahlung führen kann. Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten UKF-NB-3 Zelllinien (UKF-NB-3 und UKF-NB-3^rYM155²⁰) eine ähnliche Sensitivität gegenüber der Bestrahlung aufwiesen, konnte kein Zusammenhang zwischen einer Adaptierung an YM155 und der Ausbildung einer Bestrahlungsresistenz gezeigt werden.

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit war es, den primären Wirkmechanismus von YM155 in Neuroblastomzellen zu untersuchen. In vorangegangenen Studien wurde die vom Hersteller beschriebene Wirkung von YM155 als Survivin-Inhibitor in Frage gestellt. Stattdessen soll der primäre Apoptose-induzierende Effekt in erster Linie durch DNA-Schäden hervorgerufen werden, während die Survivin Inhibierung lediglich darauf folgen soll. In einer zeitlichen und konzentrationsabhängigen Kinetik der YM155 Behandlung konnte in UKF-NB-3 Zellen der genaue Zeitpunkt der Survivin-Inhibierung und der Induktion der DNA-Schadensantwort ermittelt werden. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in Neuroblastomzellen als Antwort auf die YM155 Behandlung zuerst eine Survivin-Inhibierung erfolgt, und die DNA-Schadensantwort als Folge dieser induziert wird. Darüber hinaus belegte die siRNA-vermittelte Survivin-Inhibierung in UKF-NB-3 und UKF-NB-6, dass eine fehlende Survivin Expression die DNA-Schadensantwort induziert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals in YM155 adaptierten Neuroblastomzellen der Resistenzmechanismus gegen YM155 näher untersucht werden und darüber hinaus wurde demonstriert, dass die Wirkung von YM155 in Neuroblastomzellen nicht auf die Induktion der DNA-Schadensantwort beruht, sondern primär auf die Survivin-Inhibierung zurückzuführen ist.

2. Einleitung

2.1 Neuroblastom

2.1.1 Definition, Epidemiologie und Klassifikation

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle, solide Tumor der im Kleinkindalter auftritt und stellt die häufigste Krebserkrankung in den ersten fünf Lebensjahren dar (1). Zum Zeitpunkt der Diagnose sind die betroffenen Kinder durchschnittlich 17 Monate alt (2). Beim Neuroblastom handelt es sich um eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems, die insbesondere in der Nebennierenrinde (50 %) entlang des sympathischen Grenzstrangs und den Paraganglien entsteht. Der klinische Verlauf des Neuroblastoms zeichnet sich durch eine hohe Heterogenität aus. So reicht das Krankheitsbild von einer überaus aggressiven Form, welche fast ausschließlich zum Tod führt, bis hin zu einer spontanen und vollständigen Regression des Tumors (3, 4, 5). Daher ist eine klinische Einstufung wichtig und entscheidet auch über den anstehenden Therapieansatz

Bezüglich histologischen und chirurgischen Kriterien erfolgt die Einteilung nach dem ‚*International Neuroblastoma Staging System*‘ (INSS) und unterteilt sich in sechs Stadien, die in Tabelle 1 aufgeführt sind (4).

Tabelle 1 | ‚*International Neuroblastoma Staging System*‘ (INSS). Klinische Einteilung der Tumorstadien bei einer Neuroblastom Erkrankung (4).

Stadium	Erscheinungsbild	Vorkommen
I	Primärtumor ohne Fernmetastasen	~ 25 %
IIA	Primärtumor infiltriert Umgebungsgewebe; Mittellinie wird nicht überschritten; kein Lymphknotenbefall	~ 20 %
IIB	Primärtumor infiltriert Umgebungsgewebe; Mittellinie wird nicht überschritten; mit Lymphknotenbefall	(Stadium II)
III	Primärtumor infiltriert Umgebungsgewebe; mit Überschreitung der Mittellinie; regionaler Lymphknotenbefall	~ 15 %
IV	Bildung von Fernmetastasen	~ 40 %
IVS	<u>Sonderfall</u> Primärtumor wie bei I - IIB; Metastasierung begrenzt auf Leber, Haut und in geringem Maß das Knochenmark; bei Kinder unter einem Jahr; Möglichkeit auf spontane Regression	~ 10 %

Neben den histopathologischen Befunden (5) und der Einstufung der Risiko-Klassifikation nach *International Neuroblastom Risk Groups* (INRG) (6), schließt die neuste Variante von 2009 auch molekulare Marker wie MYCN Amplifikation und chromosomale Aberrationen (7, 8) in die Einstufung ein, die im Folgenden genauer erläutert werden.

2.1.2 Molekularbiologische Merkmale des Neuroblastoms

Veränderungen der Genexpression verschiedenster Proteine können einen malignen Tumor entstehen lassen. Dabei korreliert eine differentielle Expression meist mit den unterschiedlichen Stadien der Erkrankung, als auch mit der Prognose. Ein Beispiel zum Neuroblastom stellt eine veränderte Expression der Neurotrophinrezeptoren Tyrosinkinase A (TrkA), B und C (9) dar. Diese Rezeptoren sind bei der Regulation der embryonalen Neuralleistenentwicklung beteiligt und zeigen bei einer veränderten Expression einen malignen Charakter. Eine erhöhte Expression von TrkA ist mit einem niedrigen klinischen Stadium und einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (10, 11, 12, 14), wobei eine hohe TrkB-Expression mit schlechten klinischen Stadien und einer MYCN-Amplifikation korreliert (12).

Zur Ermittlung von prognostischen Biomarkern können somatisch genetische Veränderungen in Neuroblastomen beitragen. Dabei kommt es entweder zu einem Verlust (*loss*) oder einem Zugewinn (*gain*) an chromosomalen Material. Über die letzten Jahrzehnte wird vor allem die Amplifikation des Onkogens MYCN als prognostischer Marker verwendet (4).

2.1.3 MYCN Amplifikation

Als Transkriptionsfaktor ist MYCN im Zellkern lokalisiert und reguliert die Transkription von Proteinen die bei Proliferation, der Regulation des Zellzyklus, sowie dem programmiertem Zelltod (Apoptose) eine Rolle spielen (13, 14). Der Begriff der Amplifikation beschreibt eine Erhöhung der Gen-Kopie Anzahl. Im Fall von MYCN zeigt sich eine Zunahme von 50-400 Kopien pro Zelle (15). Die Entstehung multipler Kopien eines Gens innerhalb eines chromosomalen Segments kann zu einer sichtbaren Verlängerung des betroffenen Chromosomenabschnitts (*homogeneously staining region*; HSR) führen. Alternativ dazu können diese genannten DNA-Abschnitte auch außerhalb der Chromosomen, als extrachromosomale Genpakete (*double minutes*; DM) im Zytoplasma vorliegen (16, 17).

Eine Amplifikation von MYCN, auf dem Chromosom 2p24, wird bei 20-25 % aller Neuroblastom-Fälle beobachtet (4, 18) und ist mit einer schlechten Prognose verbunden (15). Folglich wird der MYCN Status des Patienten zur Stadiums-Einstufungen, sowie für den Therapieansatz verwendet. Die mit der Amplifikation verbundene erhöhte MYCN Expression (15) ist in den fortgeschrittenen klinischen Stadien (3 und 4) laut INSS mit 31 % deutlich häufiger als bei den Stadien 1 und 2 (4 %), als auch bei Stadium 4S (8 %) (19). Eine weitere Korrelation zeigt sich bezüglich einer MYCN Amplifikation und dem Verlust der Heterozygotie an Chromosom 1p (*Loss of heterozygosity*; LOH) (20, 21). Dabei zeigen alle MYCN amplifizierte Neuroblastome eine 1p LOH.

2.1.4 Veränderungen der ALK- (*anaplastic lymphoma kinase*) Expression

Einen familiären Hintergrund zeigen lediglich 1-2 % aller neu diagnostizierten Neuroblastome (22). Dabei ist eine autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutation bereits beschrieben (23, 24). Das ALK- (*anaplastic lymphoma kinase*) Gen kann durch Mutation bei der Neuroblastom-Entwicklung beteiligt sein (25). Die Mutation auf Chromosom 2p23 erfolgt durch einen Basenaustausch in der Kinase-Domäne, was zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase führt und zu einer Entartung der Zellen beitragen kann (26). Diese Mutation tritt bei mehr als der Hälfte der familiären Fälle auf (27). Weitere Assoziation zu einer familiär prädestinierten Entwicklung des Neuroblastoms zeigen sich bei Mutationen der Gene PHOX2B (*Paired-like homebox 2B*) (28, 29), LMO1 (*LIM domain only 1*) (30), sowie von HEN2 (*Nescient helix-loop-helix 2*) (31). Bei allen aggressiven Neuroblastom Erkrankungen ist eine erhöhte Expression von LMO1 vorzufinden. Ursprünglich ist LMO1 bei der Regulation der Genexpression im Nervensystem beteiligt.

2.1.5 Chromosomale Aberrationen

Eine Veränderung des genetischen Materials geht bei den meisten Neuroblastom Erkrankungen mit einer schlechten Prognose einher. Dabei kann es zum einen zu einer Vermehrung von Chromosomenabschnitten, als Ploidie bezeichnet, oder auch zu einem Verlust von genetischem Material kommen. Während es bei letzterem zwangsläufig zum Verlust der Diploidie kommt (19).

Eine Deletion des kurzen Armes des Chromosoms 1 (1p36) ist sehr häufig beim Neuroblastom zu finden und tritt bei etwa 35 % aller Primärtumore auf (32). Diese Anomalität bewirkt meist den Verlust der Heterozygotie dieser Chromosomenregion

und zeigt eine Korrelation zur MYCN Amplifikation (wie bereits in Abschnitt 2.1.3 erläutert wurde). Der 1p LOH zeigt ebenfalls eine Verbindung zu Hoch-Risiko-Faktoren im Neuroblastom, wie das Alter bei Diagnosestellung und Metastasen (33, 34).

Deletionen am kurzen Arm des Chromosoms 11 (11q) treten bei 35-45 % der Patienten auf und korrelieren negativ mit der MYCN Amplifikation (21, 35, 36). Diese Aberration ist ebenfalls prognostisch ungünstig und könnte einen Marker für eine schlechte Prognose unabhängig von der MYCN Amplifikation darstellen.

Ein bedeutendes Beispiel für den Zugewinn an genetischem Material ist bei Chromosom 17q zu finden. Eine Trisomie 17q ist bei etwa 72 % aller Primärtumore im Neuroblastom vorzufinden (37) und ist ebenfalls mit der Deletion des 1p36 Chromosoms, sowie der Amplifikation von MYCN assoziiert (38). Auch diese chromosomale Aberration ist mit einer schlechten Prognose verbunden (39).

2.1.6 Therapie

Der Behandlungsansatz orientiert sich in erster Linie nach dem Malignitätsstadium und Alter des Patienten. Dabei wird ein Patient mit einem niedrigen Risiko und ohne klinisch bedrohlichen Symptomen (d.h. Säuglinge unter einem Jahre mit Neuroblastom-Stadien I, II, III oder IVS, sowie Kleinkinder über einem Jahr der Stadien I oder II ohne MYCN Amplifikation) vorläufig unter Beobachtung gestellt. Ein lokal auftretender Tumor kann durch eine operative Entfernung des befallenen Gewebes behandelt werden. Bei vielen Patienten liegen jedoch zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen vor (Stadium IV). Die Behandlung erfolgt in diesem Fall aus einer Kombination aus Chemotherapie, Bestrahlung und operativer Entfernung des Tumorgewebes (40, 41).

Ein großes Problem der chemotherapeutischen Behandlung von Neuroblastomen stellt die primäre oder erworbene Chemoresistenz gegenüber den eingesetzten Therapeutika dar. Ist eine Chemoresistenz vorhanden, ist es meist schwierig eine Alternativ-Therapie zu finden, da es in vielen Fällen zu Kreuzresistenzen kommen kann (42). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung die Mechanismen hinter der Chemoresistenz auf molekularer Ebene besser zu verstehen, um diese im Nachhinein umgehen zu können.

2.2 Chemoresistenz

Die Chemotherapie ist die gängigste Behandlung bei einer Krebserkrankung. Dabei werden den Patienten verschiedene Chemotherapeutika, meist in Kombination verabreicht. Die Entwicklung einer Chemoresistenz gegen diese Zytostatika stellt einen häufigen Grund für ein Therapieversagen dar. Bei der Chemoresistenz wird zwischen einer intrinsischen (bereits vorhandenen; primären) und einer erst im Verlauf der Therapie auftretenden, erworbenen Resistenz unterschieden (43). Das Problem der erworbenen Resistenz ist, dass diese sich meist nicht alleine gegen das eingesetzte Medikament richtet, sondern es zu Kreuzresistenzen kommen kann. Dabei werden die Tumore gegen andere Zytostatika resistent, die sich strukturell und bezüglich des Wirkmechanismus unterscheiden können (44). Diese Eigenschaft wird als ‚*Multidrug*‘-Resistenz (MDR) bezeichnet und steht in der Regel für eine schlechte Prognose durch Therapieversagen (43).

Die Chemoresistenz wird meist durch die Tätigkeit von ABC-Transportern gewährleistet. Die Transporter aus dieser Superfamilie transportieren unter ATP-Verbrauch hauptsächlich Substrate aus der Zelle heraus (Efflux). Im Falle von ABCB1 (‚*multidrug resistance protein 1*‘ (MDR1), auch bekannt als p-Glykoprotein) erfolgt der Efflux von einem breiten Spektrum an Substraten, dazu zählen beispielsweise Zytostatika, die der Gruppe der Vincaalkaloide oder Taxanen angehören (45). Neuste Studien zeigen, dass eine weitere Transporter-Superfamilie, die ‚*solute carrier*‘ (SLC) Proteine an einer Chemoresistenz beteiligt sein können. Dazu zählen beispielsweise SLC19A1 (transportiert Methotrexat aus Zellen heraus) oder SLC29A1 (transportiert Cladribin, AraC, Fludarabin und Gemcitabin aus Zellen heraus) (46, 47).

Neben einer fehlgeleiteten Expression verschiedener Transporter stellen sich die Mechanismen der Entstehung von Chemoresistenzen als sehr komplex dar. Darunter zählen Veränderungen bzw. Mutationen bei den Zielstrukturen der eingesetzten Zytostatika, als Folge des Selektionsdrucks der Zellen während der Chemotherapie (48). Diese Mutationen können dazu führen, dass die jeweiligen Zytostatika ihre inhibierende Funktion nicht weiter ausüben können und die Zellen wiederum eine geringe Sensitivität gegen dieses Zytostatikum zeigen.

2.2.1 ABC-Transporter

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer MDR spielen wie bereits erwähnt verschiedene ABC-Transporter. Diese können primär im Tumor vorhanden sein, oder durch die Behandlung mit Chemotherapeutika in den Tumorzellen induziert werden.

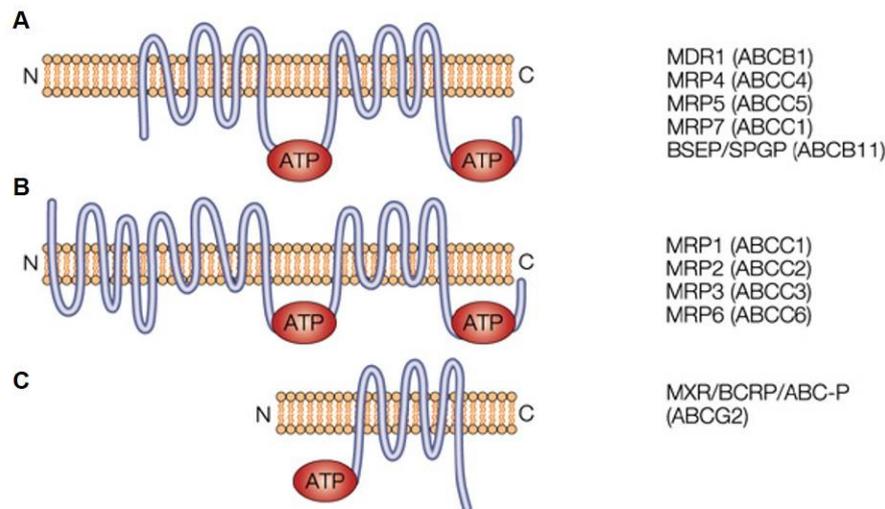


Abbildung 1 | Struktureller Aufbau von ABC-Transportern. Ein Vergleich der Strukturen zeigt einen unterschiedlichen Aufbau. **A)** ABC-Transporter wie ABCB1 (MDR1 -,*multidrug resistance 1*ˆ) weisen zwölf Transmembrandomänen (TMDs) und zwei ATP-Bindungsdomänen auf. Einen ähnlichen Aufbau zeigen ABC-Transporter wie **B)** ABCC1 (MRP1 -,*multidrug resistance-associated protein 1*ˆ). Diese weisen fünf weitere Transmembrandomänen am N-terminalen Ende auf. Mit insgesamt 17 transmembranen Domänen besitzt diese Gruppe ebenfalls zwei ATP-Bindetaschen. **C)** Mit nur einer ATP-Bindedomäne und sechs TMDs wird ABCG2 (BCRP -,*breast cancer resistance protein*ˆ) auch als „halber Transporter“ bezeichnet (49).

Das namensgebende Merkmal der ABC-Transporter ist die ATP-Bindedomäne („*ATP-binding cassette domain*ˆ). Diese Domäne dient zur Bindung und Hydrolyse von ATP, was die nötige Energie liefert um die Substrate der Transporter entgegen eines Konzentrationsgradienten aus den Zellen heraus zu befördern. ABC-Transporter sind in der Regel membrangebunden und können einerseits sehr substratspezifisch sein, während andere wiederum eine Reihe von verschiedenen Substanzen transportieren können (49). Die meisten ABC-Transporter zeichnen sich entweder über zwölf Transmembran-Domänen (TMD), wie bei ABCB1, oder über siebzehn TMDs (ABCC1; MRP1) aus. In jedem Fall sind zwei ATP-Bindedomänen vorzufinden (siehe Abb. 1). Eine Ausnahme stellt der Transporter ABCG2, auch als BCRP (*breast cancer resistance protein*) bekannt, dar. Dieser wird auch als „halber Transporter“ bezeichnet und besitzt lediglich eine ATP-Bindedomäne und sechs TMDs (45, 50).

Die Bindung der Substrate an die TMD der ABC-Transporter stimuliert die Aktivität der ATP-Domäne. Die ATP-Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung des Transporters und das Substrat wird dadurch aus der Zelle transportiert (48). Die Hydrolyse eines zweiten ATP-Moleküls bringt den Transporter wieder in seinen

Ausgangszustand zurück. Der Transporter ist anschließend in der Lage ein weiteres Substrat-Molekül zu binden und zu transportieren.

2.2.2 ,Solute carrier' Protein SLC35F2

Die Nährstoff- und Mineralienversorgung der Zellen erfolgt überwiegend über die Aufnahme durch spezifische Membrantransporter. Auch ein Abtransport von Stoffwechselprodukten oder giftiger Substanzen aus der Zelle wird durch verschiedene Transporter gewährleistet. Eine große Transportergruppe mit aktuell 52 bekannten Familien stellen die SLC- (,solute carrier protein') Transporter dar (51). Sie sind vorwiegend in der Zellmembran lokalisiert und transportieren Metabolite, Ionen, Peptide oder auch Medikamente (52). Ihr Aufbau zeichnet sich durch transmembrane α -Helices aus, welche untereinander durch hydrophile intra- und extrazelluläre Loops verbunden sind. In der Regel sind 10-14 Transmembran α -Helices vorzufinden (Abb. 2).

SLC35F2 ist der Familie 35, Subfamilie F und Isoform 2 zuzuordnen. Diese Transporterfamilie ist normalerweise für den Transport von Nukleosid-Zucker verantwortlich (53). Die Spezifität von SLC35F2 beschränkt sich jedoch nicht nur auf Zuckermoleküle, der Transporter ist ebenfalls in der Lage niedermolekulare Substanzen in die Zellen hinein zu transportieren (Influx). Dazu zählt unter anderem YM155 (54).

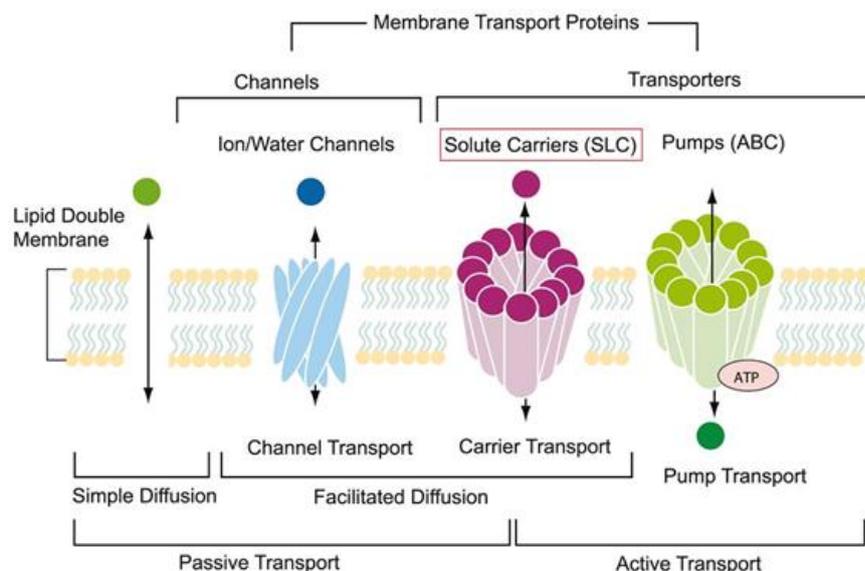


Abbildung 2 | Überblick zu membrangebundenen Transportern. Bei dem Transport von Substanzen in oder aus der Zelle heraus, ist zunächst zwischen einem passiven oder dem aktiven Transport zu unterscheiden. Während bei der passiven Variante der Transport bezüglich eines Konzentrations- oder auch Ladungsgradienten erfolgt, so wird beim aktiven Transport Energie, meist in Form von ATP, benötigt. Dabei kann der Transport gegen ein Konzentrations- bzw. Potentialgefälle stattfinden. Der Transport durch ein ,carrier' Protein erfolgt in der Regel passiv durch die Bindung des Substrates an die entsprechende Bindungsstelle des ,carriers'. Manche ,carrier' Proteine sind sehr substratspezifisch, während andere

wiederrum eine Reihe von verschiedenen Substraten transportieren können. Durch die Bindung des ‚carrier‘ Proteins mit dem Substrat kommt es zu einer Konformationsänderung und das Substrat wird auf der anderen Membranseite freigesetzt.¹

2.3 Survivin

Die Entstehung von Krebs wird durch eine Vielzahl von Fehlfunktionen in der Zelle gefördert. Ein entscheidender Faktor dabei ist eine veränderte Expression bestimmter Proteine. Survivin, ein Mitglied der Familie der Apoptose-hemmenden Proteine (auch als IAPs - ‚inhibitor of apoptosis proteins‘ abgekürzt) ist in Zellen verschiedener Tumorentitäten, wie beispielsweise beim Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Kolorektalkarzinom überexprimiert (55, 56, 57, 58, 59). Als einziges IAP wird Survivin nicht im differenzierten Gewebe exprimiert, sondern befindet sich lediglich in embryonalen und sich schnell teilenden Zellen, wie CD34⁺ Stammzellen, Plazenta-, Thymus-, Magen- und Kolonepithelzellen (60, 61). Aus diesem Grund stellt Survivin ein vielversprechendes Ziel im Kampf gegen Krebs dar.

2.3.1 Struktur und Funktion

Neben den anderen Mitgliedern der IAP-Familie, NAIP, c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP, Apollon, Livin und ILP2, codiert das Survivin Gen (*BIRC5*; ‚baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing-5‘) für ein 16,5 kDa großes Protein und stellt das kleinste Mitglied dieser Proteinfamilie dar (62, 63, 64, 65). Im Menschen ist das Survivin Gen am telomeren Ende von Chromosom 17 (17q25) lokalisiert (61). Die molekulare Struktur von Survivin ist mit nur einem N-terminalen Zink-bindendem ‚baculovirus-IAP-repeat‘ (BIR)-Motif und einem C-terminalen amphipatischem α -helikalem *coil* einzigartig unter den IAPs (66). Dabei vermitteln die BIR-Domänen die Protein-Protein-Interaktionen der IAP-Familie. Die anderen Mitglieder besitzen eine C-terminale RING-Domäne (*really interesting new gene*), sowie eine CARD-Domäne (*caspase recruitment domain*) (67). Die bei cIAP1, cIAP2, XIAP und ILP2 enthaltene UBA-Domäne (*Ubiquitin-associated domain*), als auch die UBC-Domäne (*Ubiquitin-conjugase-like*) bei Apollon sind bei der Ubiquitinierung und dem proteasomalen Abbau spezifischer Caspasen und somit der Unterdrückung der Apoptose beteiligt (68, 69, 70).

¹ Bild von http://caltagmedsystems.blogspot.de/2012_08_01_archive.html

2. Einleitung

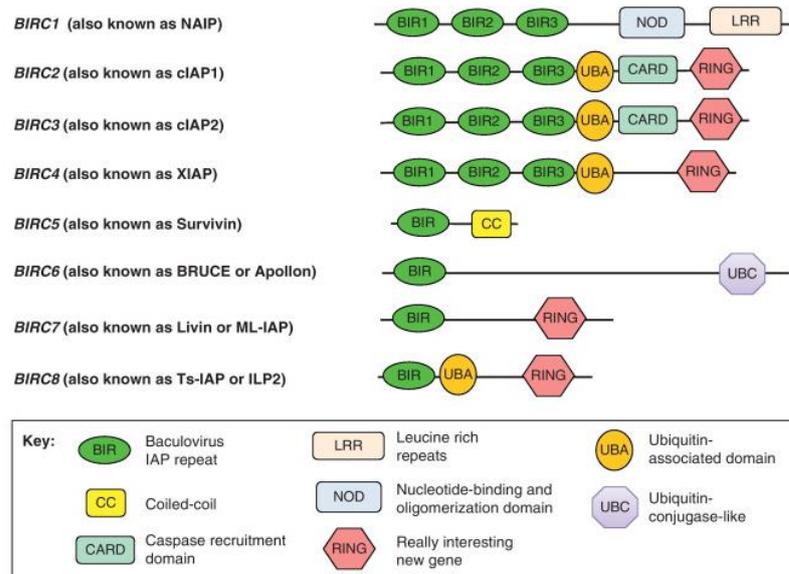


Abbildung 3 | Übersicht der strukturellen Unterschiede zwischen den bekannten ‚Inhibitor of Apoptosis‘ Proteinen (IAPs). Vom molekularen Aufbau spaltet sich die ‚inhibitor of Apoptosis‘ Protein (IAP) Familie in zwei Gruppen auf. Dabei zeigen die oberen vier Proteine NAIP, cIAP1, cIAP2 und XIAP jeweils drei BIR-Domänen (‚Baculovirus IAP repeat‘), während die restlichen vier nur eine BIR-Domäne besitzen. Survivin zeigt als einziges IAP eine ‚coiled-coil‘ Domäne und wie NAIP und Apollon auch keine RING-Domäne (‚Really interesting new gene‘). Lediglich cIAP1 und cIAP2 zeigen eine zusätzliche CARD-Domäne (‚Caspase recruitment domain‘). Die bei cIAP1, cIAP2, XIAP und ILP2 enthaltene UBA- (‚Ubiquitin-associated domain‘) oder UBC- (‚Ubiquitin-conjugase-like‘) Domäne sind für die Ubiquitinierung und dem proteasomalen Abbau einiger Caspasen, und somit der Inhibierung der Apoptose verantwortlich (71).

Survivin zeigt sich als ein multifunktionales Protein und ist an verschiedenen zellulären Prozessen wie Zellteilung, Apoptose und zellulärer Stressantwort beteiligt. Die Funktion kann je nach Lokalisation in der Zelle (Zellkern oder Zytoplasma) und posttranslationalen Modifikationen variieren (67). Eine transkriptionelle Regulation erfolgt hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor Sp1 (‚specificity protein 1‘). Da dem Survivin Promotor eine typische TATA- oder CCAAT-Box fehlt, spielt Sp1 eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Transkription, indem es direkt an die Promotorregion des Survivin Gens bindet und die Survivin Expression fördert (72, 73). Die Synthese und Degradierung von Survivin ist des Weiteren zellzyklusabhängig und lässt durch die erhöhte Expression des Proteins während der G2/M-Phase vermuten, dass es bei der Mitose-Regulation selbst eine Rolle spielt (72). Zum einen stabilisiert Survivin durch direkte Bindung die Mikrotubuli, zum anderen bildet es zusammen mit Borealin, Aurorakinase B und INCENP (‚inner centromere protein‘) den sogenannten ‚chromosomalen-passenger-complex‘ (CPC) und hilft bei der Chromosomen Segregation. Dieser Komplex sorgt für die korrekte Ausrichtung der Chromosomen und regelt die Mikrotubuli-Dynamiken am Kinetochor (74, 75).

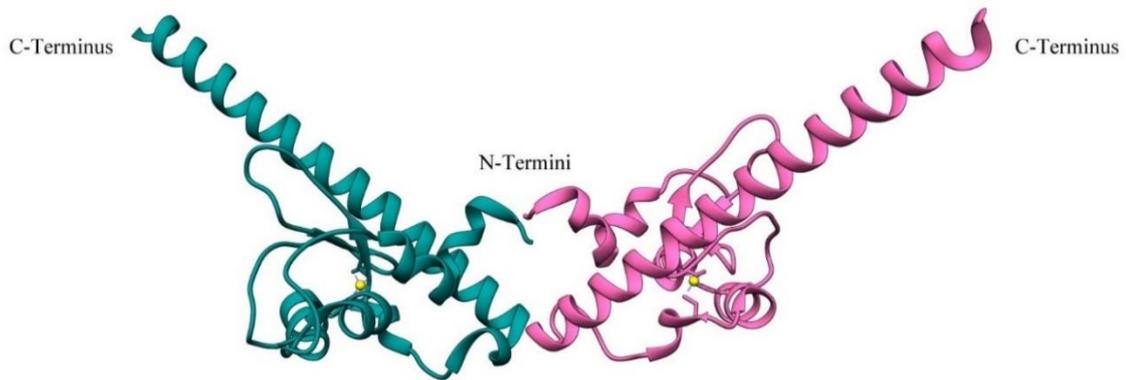


Abbildung 4 | Proteinstruktur von Survivin. Erkennbar sind die beiden Survivin Monomere (grün und rosa), welche sich zu einem Homodimer zusammenlagern. Die Zn^{2+} -Ione (gelb) werden von einer BIR-Domäne gebunden. (abgeändert nach (76))

Eine weitere Funktion von Survivin liegt als IAP in der Inhibierung der Apoptose. Ältere Studien behaupteten, dass Proteine aus der Familie der IAPs die Zellen vor der Caspase-abhängigen Apoptose schützen, indem sie direkt an die Caspasen 3 und 7 binden. Dies ist *in vivo* jedoch nur bei XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) zu beobachten (77) und erfolgt durch die Interaktion eines in der BIR-Domäne von XIAP enthaltenen ‚*IAP-binding motif*‘ (IBM) mit den Initiator- und Effektor-Caspasen (78), (79). Survivin beherbergt kein IBM, wodurch keine direkte Interaktion mit den Caspasen möglich ist (67). Stattdessen erfolgt die Inhibierung der Apoptose womöglich indirekt durch die Interaktion mit HBXIP (*hepatitis B X-interacting protein*), XIAP oder SMAC/DIABLO (80, 81). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Eine Komplexbildung mit HBXIP ist für eine erfolgreiche Bindung an die pro-Caspase 9 notwendig. Dadurch wird die Vermittlung an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) verhindert und folglich die Bildung des Apoptosoms gestört (64). Das Apoptosom wiederum ist für die Aktivierung von Caspase 9 erforderlich. Als Antwort auf eine Zelltod-Stimulation interagiert Survivin mit XIAP über die konservierten BIR-Domänen. Dieser Komplex erhöht die Stabilität von XIAP und führt zur synergistischen Caspase 9-Inhibierung.

Survivin agiert außerdem als Verbindungsstück zwischen der Apoptose-Maschinerie und dem Checkpoint, der die mitotische Progression kontrolliert (64). Diese duale Funktion liefert das onkogene Potential von Survivin. Denn eine Störung der „normalen“ Funktion könnte es den Zellen ermöglichen den G2/M Checkpoint der Zellteilung zu umgehen, wodurch sich fehlerhafte Zellen vermehren könnten. Des Weiteren könnte eine Umgehung der Zellzyklus-kontrollierten Apoptose erfolgen, was wiederum eine Vermehrung von fehlerhaften Zellen begünstigen würde.

Zu Beginn wurde vermutet, dass Survivin nur als Homodimer funktionsfähig ist, neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass es auch als Monomer aktiv ist. Diese Monomere interagieren mit SMAC/DIABLO und XIAP und schützen somit die Zellen vor der Caspase-abhängigen Apoptose (82). Dabei wird der SMAC/DIABLO Komplex inhibiert und durch die Interaktion mit XIAP, wird dieses stabilisiert und vor Ubiquitinierung geschützt. Survivin Monomere sind ebenfalls zusammen mit CRM1 (*chromosome region maintenance 1* oder auch Exportin-1) für den nukleären Transport zuständig (83) und sind Teil des CPC (84). Darüber hinaus können die Spleiß-Varianten Survivin 2 α , Survivin 2B und Survivin Δ Ex3 zusammen mit Wildtyp Survivin Monomeren heterodimerisieren. Ein Survivin 2 α /Survivin wt Heterodimer ändert so seine anti-apoptotische Funktion und fördert die Apoptose.

2.3.2 Survivin Isoformen

Während der Transkription können aus derselben prä-mRNA verschiedene reife mRNA-Moleküle gebildet werden. Dieser Vorgang wird als alternatives, differentielles oder auch gewebespezifisches Spleißen bezeichnet. Dabei können in der DNA platzsparend mehrere Varianten eines Proteins, auch Isoformen genannt, kodiert sein. Dadurch, dass in einer DNA-Sequenz die kodierenden Sequenzen (Exons) von nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) unterbrochen sind, können während des Spleißvorgangs die Exons in unterschiedliche Kombinationen zusammengesetzt werden. Dabei enthält eine bereits transkribierte prä-mRNA weiterhin sowohl Exons als auch Introns. Erst während des Spleißens wird zwischen kodierenden und nicht-kodierenden Sequenzen unterschieden, wobei die Regulation und Selektion über bestimmte Proteine gesteuert wird. Diese ‚*Splicing*‘-Aktivator- und ‚*Splicing*‘-Repressor-Proteine erkennen entsprechende Signale auf der RNA, die markieren welche Bereiche herausgeschnitten werden können und welche Stücke bleiben. Die Introns werden somit aus der prä-mRNA entfernt und die reife mRNA kann für die Translation aus dem Zellkern transportiert werden. Die gebildeten Protein-Isoformen können sich in ihrer Funktion stark unterscheiden (85, 86).

Das Survivin-Gen besteht aus vier Exons (mit zwei alternativen Exons, 2B und 3B), welche wiederum von vier Introns voneinander getrennt sind (87). Bisher sind sechs humane Spleiß-Varianten bekannt, die in Abbildung 5 zusammengefasst sind. Dabei sind die Isoformen in verschiedenen subzellulären Komponenten vorzufinden und üben dort anti- oder pro-apoptotische Funktionen aus (88).

2. Einleitung

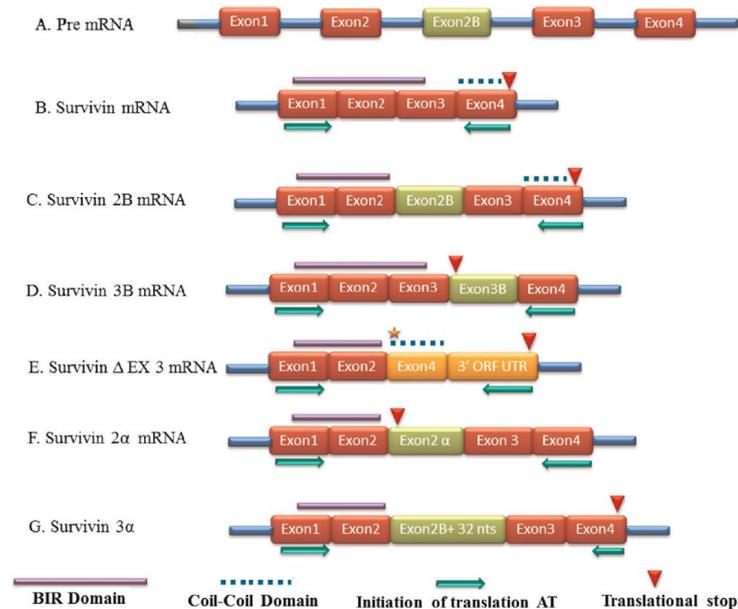


Abbildung 5 | Spleißvarianten von Survivin. Die prä-mRNA besteht aus vier (plus zwei alternativen) Exons und drei Introns. Für die verschiedenen Varianten werden Exons entweder komplett entfernt oder es werden Stücke der Introns zu den Exons hinzugefügt. Bei Isoform Survivin 2B wird ein 69 bp Nukleotid Fragment (Exon 2B) zusätzlich eingeführt, wohingegen bei Survivin ΔEx3 ein 102 bp langes Stück von Exon 3 übersprungen wird. Im Falle von Survivin 3B kommt es zu einer Einführung eines 165 bp Fragmentes von Exon 3B und bei Survivin 2α wird ein 197 bp langes Ende von Intron 2 eingeführt (89).

Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, sind die meisten Survivin Spleiß-Varianten in einer Vielzahl von verschiedenen Tumorentitäten vorzufinden. Dabei scheint die biologische Signifikanz, die Expression und auch die Funktion dieser Isoformen unter den verschiedenen Krebsarten sehr unterschiedlich zu sein.

Tabelle 2 | Survivin Isoformen mit ihrer entsprechenden Funktion und die für ihre Expression bekannten Tumorentitäten. Der Einfluss auf die Apoptose ist unter den Survivin Isoformen sehr vielfältig, sowie deren Expressionen in den unterschiedlichen Tumorentitäten.

Survivin Isoform	Funktion	Tumorentität
<i>wt</i>	Anti-apoptisch	Mammakarzinom, Kolorektalkarzinom, Gebärmutterhalskrebs, Schilddrüsenkrebs, Blasenkarzinom, Prostatakarzinom, Glioblastom, Magenkarzinom
2B	Pro-apoptotisch	Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Neuroblastom
ΔEx3	Anti-apoptotisch	Mammakarzinom, Kolorektalkarzinom, Gebärmutterhalskrebs, Schilddrüsenkrebs, Blasenkarzinom, Prostatakarzinom, Glioblastom, akute und chronische Leukämie,
3B	Anti-apoptotisch	Magenkarzinom, akuter myeloischer Leukämie

2α	Pro-apoptotisch	Prostatakarzinom, Mammakarzinom
3α	Nicht bekannt	Mammakarzinom

Die Isoformen Survivin 2B und Survivin Δ Ex3 sind bislang am besten untersucht. Dabei ist die pro-apoptotisch wirkende Survivin 2B Variante beim Neuroblastom laut Literatur am stärksten vertreten und mit einer guten Prognose verbunden (90). Ist Survivin 2B im Vergleich zu Survivin wt überexprimiert, zeigen diese Zellen ein reduziertes anti-apoptotisches Potential (91, 92, 93, 94).

2.4 Survivin Inhibitoren in der Tumorthherapie

Aufgrund der verminderten Expression von Survivin im differenziertem Gewebe und der Überexpression in malignen Zellen stellt Survivin ein geeignetes Ziel in der Tumorbekämpfung dar. Seit dem Jahr 1997, in dem Survivin zum ersten Mal beschrieben wurde, wurden diverse Stoffe und niedermolekulare Substanzen getestet, welche Survivin inhibieren. Dazu zählen neben dem bekanntesten Vertreter YM155 auch NSC80467, FL118, als auch die ‚*antisense*‘ Moleküle SPC3042 und LY2181308.

FL118 ist ein Camptothecin Analogon und ähnelt strukturell dem Topoisomerase 1 Inhibitor Irinotecan (95). Neben Survivin inhibiert diese niedermolekulare Substanz auch andere Mitglieder der IAPs, wie XIAP und cIAP2 aber auch das anti-apoptotische Protein Mcl-1 (*myeloid leukemia cell differentiation protein*). Die Inhibierung erfolgt durch die Unterdrückung der jeweiligen Promotoraktivität (96). Im Fall des fusionierten Naphtochinon Imidazol Derivat NSC80467 ist der Wirkmechanismus noch nicht ausreichend geklärt, die Wirkung erfolgt jedoch vermutlich durch die Induktion der DNA-Schadensantwort (97).

Die ‚*antisense*‘ Moleküle, SPC3042 und LY2181308 interagieren mit der Survivin mRNA. Dabei wird die Translation von Survivin unterbunden. Der Vorteil hierbei im Vergleich zu siRNAs ist, dass die chemisch modifizierten einzelsträngigen Oligonukleotide eine höhere Nuklease Resistenz und Beständigkeit aufweisen, weshalb sie besser von den Zellen aufgenommen werden (98).

2.4.1 YM155

Die Substanz Sepantronium Bromid (1-(2-Methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromid), auch als YM155 bekannt, wurde 2007 von dem Pharmaunternehmen Astellas als spezifischer Survivin-Inhibitor entwickelt und getestet (99). Diese auf ein Imidazol basierende Verbindung hat ein Molekulargewicht von 443,29 g/mol und wird den niedermolekularen Substanzen („*small molecules*“) zugeordnet (Abb. 6). In Maus-Experimenten konnte gezeigt werden, dass YM155 nicht zu den Zytostatika-üblichen Nebenwirkungen führt (100). Eine kombinierte Behandlung mit Cisplatin und Carboplatin zeigte eine erhöhte Apoptose-induzierte Wirkung durch YM155, wobei vermutet wurde, dass YM155 die Reparatur der durch die Platin-Derivate verursachten DNA-Schäden inhibiert (101). In 2012 wurde aufgrund Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen die Vermutung aufgestellt, dass YM155 nicht in erster Linie die Survivin Expression inhibiert, sondern eigenständig und primär DNA-Schäden in Krebszellen verursacht (97).

Zellen mit einer erhöhten Expression des ABC-Transporters ABCB1 zeigen eine niedrigere Sensitivität gegenüber einer YM155 Behandlung (102, 103). Wohingegen eine hohe Expression des SLC-Transporters SLC35F2, eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegen YM155 zur Folge hat (54).

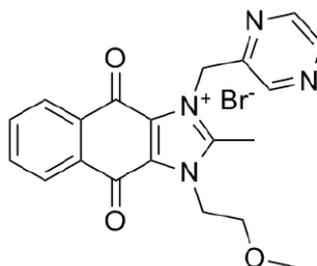


Abbildung 6 | YM155. Chemische Strukturformel von YM155.

YM155 soll Survivin in einer bisher noch nicht vollständig verstandenen Weise spezifisch inhibieren. Dabei gibt es mehrere vorgeschlagene Wirkmechanismen. In einer Publikation wurde beschrieben, dass YM155 die Survivin-Gen-Promotor Aktivität inhibiert und Survivin *in vitro* herunterreguliert (99). In einer späteren Studie zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor ILF3/NF110 („*interleukin enhancer-binding factor 3*“), als auch das Protein p54^{nrb} mit dem Survivin Promotor assoziieren. YM155 soll direkt an den ILF3/p54^{nrb}-Komplex binden und diesen spalten (104). Die einzigartige C-terminale

Region von ILF3/NF110 scheint sowohl für die Survivin Expression, als auch für die hoch affine Bindung zu YM155 entscheidend zu sein (105).

Eine andere Variante zeigt sich über die Interaktion von YM155 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1. Sp1 ist bei vielen zellulären Prozessen involviert und zeigt eine verstärkte Expression in Tumorzelllinien (106). Durch seine Zink-Finger DNA-Bindedomäne, bindet Sp1 bevorzugt an Guanin/Cytosin-(GC-)reiche DNA-Sequenzen und somit auch an den Survivin-Kern-Promotor (107). Da dem Survivin Promotor eine typische TATA- oder CCAAT-Box fehlt, ist ein Transkriptionsfaktor wie Sp1 nötig der diese Region erkennt und markiert. Nach dieser Hypothese inhibiert YM155 die Survivin Expression, indem es die Bindung von Sp1 an die Survivin-Promotorregion unterbindet. Folglich kann die Survivin mRNA nicht transkribiert werden (107).

Die Wirksamkeit von YM155 wurde bereits durch zahlreiche Studien *in vitro* bestätigt und befindet sich darüber hinaus in mehreren klinischen Phase I und II Studien. Aktuell abgeschlossene Studien sind in Verbindung mit Prostatakarzinoma, Melanoma, Non-Hodgkin's Lymphoma, NSCLC (*non-small-cell lung cancer*) und Brustkrebs vorzufinden².

2.5 DNA-Schadensantwort von Einzel- und Doppelstrangbrüchen

Zellen erleiden jeden Tag tausende DNA-Schäden. Diese können durch verschiedene Behandlungen in der Tumorthherapie (wie Bestrahlung oder Chemotherapeutika) oder auch spontan während unterschiedlicher zellulärer Prozesse (wie zum Beispiel oxidative Schäden oder Replikationsfehlern) ausgelöst werden. DNA-Schäden können dazu beitragen, dass Proteine falsch oder nicht mehr exprimiert werden. Des Weiteren können auch bestimmte Zellfunktionen, wie die Mitose, fehlerhaft sein oder es kommt durch Doppelstrangbrüche (*double-strand breaks; DSB*) zur Abspaltung wichtiger Chromosomenbereiche. Dadurch ist es in den betroffenen Zellen von großer Bedeutung die entstandenen Schäden rechtzeitig zu erkennen und anschließend zu reparieren. Ist eine Reparatur nicht mehr möglich, muss die geschädigte Zelle aus dem Organismus entfernt werden. Dies wird durch die Einleitung der Apoptose, dem programmierten Zelltod, gewährleistet. Die Apoptose unterliegt einer strengen Regulierung, an der eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist. Durch die bereits genannten exogenen und/oder endogenen Einflüsse kommt es zu Einzelstrang- (*single-strand breaks; SSB*) und Doppelstrangbrüchen in der DNA. Als Antwort auf

² <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=YM-155&Search=Search>

diese Brüche leitet die Zelle die DNA-Schadensantwort (*DNA-damage response; DDR*) ein, es kommt zum Zellzyklus-Arrest und die Proteine für die DNA-Reparatur oder die Apoptose werden exprimiert (108).

Die Erkennung von DNA-Schäden erfolgt vornehmlich an bestimmten Punkten des Zellzyklus, den sogenannten Checkpoints (Abb. 7). Diese Kontrollpunkte sorgen dafür, dass geschädigte DNA durch entsprechende Proteine erkannt und die Zellteilung eventuell gestoppt wird. Nur auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass während der Zellteilung keine fehlerhafte DNA an die Tochterzellen weitergegeben wird. Denn eine Ansammlung von Fehlern während der Replikation kann zu einer gestörten Zellfunktion führen.

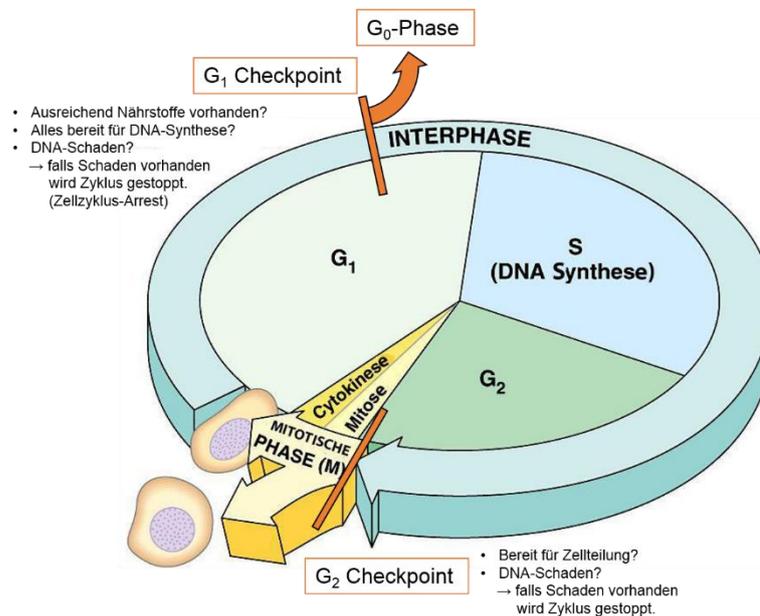


Abbildung 7 | Überblick Zellzyklus. Der Kreislauf der Zellteilung setzt sich im Allgemeinen aus der Interphase und der mitotischen (M-) Phase zusammen. Während die Interphase eine Vorbereitung auf die bevorstehende Zellteilung beschreibt, erfolgt während der M-Phase die Zweiteilung der Chromosomen (Mitose). Die Interphase setzt sich zudem aus drei weiteren Phasen zusammen. Während der G₁-Phase kommt es zur Ergänzung von Zellbestandteilen und die Zelle wächst. Zuletzt wird in der G₁-Phase überprüft, ob für die anstehende Replikation in der Synthese (S-) Phase ausreichend Nährstoffe und Wachstumsfaktoren vorhanden sind. Des Weiteren wird geprüft, ob ein DNA-Schaden vorliegt, worauf folglich der Zellzyklus gestoppt und die entsprechenden Reparaturmechanismen der Zelle eingeleitet werden. Außerdem ist möglich, dass die Zelle in eine Ruhephase (G₀-Phase) übergeht. Dies bedeutet entweder, dass sich diese Zellen nie wieder teilen werden (z.B. Nervenzellen) oder die Zellen nach der Ausdifferenzierung in die Ruhephase eintreten, um zu einem geeigneten Zeitpunkt wieder in den Zellzyklus zurückkehren. Nach der Replikation der DNA in der S-Phase, gelangen die Zellen in die G₂-Phase. Auch hier prüft die Zelle eingangs die Bedingungen der bevorstehenden Zellteilung und entscheidet am G₂ Kontrollpunkt über den Übergang in die Mitose oder dem Zellzyklus-Arrests, falls DNA-Schäden erkannt wurden. In der mitotischen (M-) Phase erfolgt die Zellteilung, worauf die Zellen wieder in die post-mitotische G₁-Phase eintreten.³

³ Abgeändert nach www.thealevelbiologist.co.uk

Der Reparaturmechanismus richtet sich nach der Schadensart der DNA. Dabei wird von vornherein zwischen Einzelstrang- und Doppelstrang-Schadensreparatur unterschieden. Betrifft der Schaden einen DNA-Einzelstrang kann entweder die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) oder die Basenfehlpaarung- (Mismatch-) Reparatur (MMR) eingeleitet werden. Bei der BER werden Fehler einzelner Basen behoben, wohingegen bei NER Veränderungen in der helikalen Struktur der DNA, sogenannte ‚*bulky lesions*‘ (eine Art Wölbung der DNA) erkannt und behoben werden. Bei der MMR erfolgt eine weitere Überprüfung des neu synthetisierten DNA-Strangs während der Replikation über entsprechende DNA-*Mismatch*-Reparaturproteine. Dies erfolgt durch die DNA-Polymerase, welche noch während der Synthese den neuen Strang prüft und mit der Matrize, dem Elternstrang, vergleicht (109).

Bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen kann entweder eine homologe Reparatur oder eine nicht-homologe Reparatur eingeleitet werden. Im Falle der nicht-homologen Reparatur erfolgt während der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus die Reparatur ohne Verwendung einer homologen Vorlage. Dabei werden die DNA-Enden direkt miteinander verbunden, was zu deutlich mehr Fehlern führt. Dieser Mechanismus wird auch ‚*non-homologous end-joining*‘ (NHEJ) genannt und verläuft über einen Protein-Komplex, bestehend aus Ku70 und Ku80, welcher initiiert an die Bruchstellen bindet (110, 111).

Die homologe Reparatur (HR) erfolgt ebenfalls durch die Erkennung des Doppelstrangbruchs über einen Protein-Komplex. Dieser besteht in diesem Fall aus den Proteinen MRE11, RAD50 und NBS1 (zusammen als MRN-Komplex bezeichnet) und dient als initialer DSB Sensor (112) (Abb. 8). Ebenfalls von Bedeutung ist die Anlagerung der Proteine 53BP1 (‚*p53-binding Protein*‘) und MDC1 (‚*mediator of DNA damage checkpoint 1*‘) an der Bruchstelle. MDC1 wirkt als positiver Rückkoppler, indem es nach dessen Aktivierung zu einer Bindung mit γ H2A.X kommt und somit eine weitere Akkumulierung von aktivem, phosphoryliertem ATM (113) und des MRN-Komplexes begünstigt (114). Der MRN-Komplex rekrutiert Mediator- und Transduktions-Proteine, welche das Signal über eine Signaltransduktionskaskade weiterleiten und die Effektor-Proteine das Signal umsetzen (62, 115). Die aktive Kinase ATM (‚*ataxia telangiectasia mutated*‘), deren Aktivität wiederum durch 53BP1 verstärkt wird (111), phosphoryliert eine Reihe von Proteinen, dazu zählen Histon H2A.X, NBS1, p53, BRCA1, Chk2 und KAP1. Diese Effektor-Proteine üben im Anschluss an ihre Phosphorylierung sehr unterschiedliche Funktionen aus.

2. Einleitung

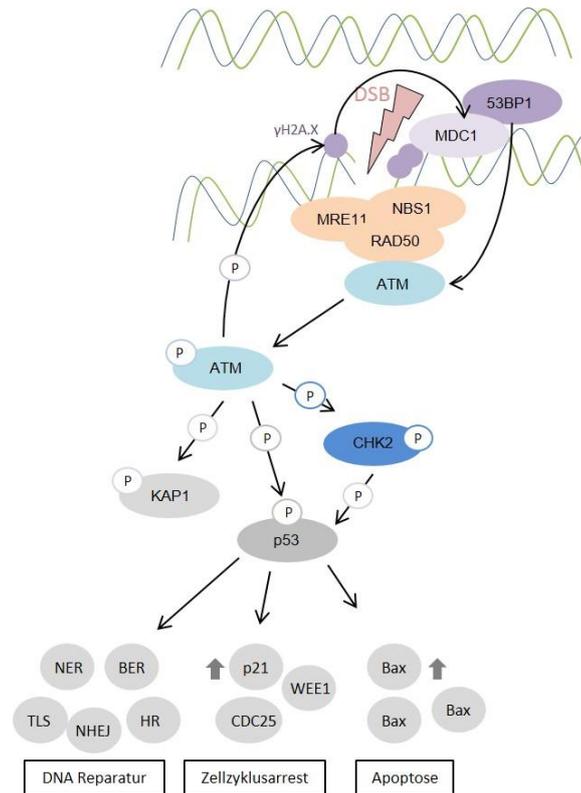


Abbildung 8 | Überblick über DNA-Schadensantwort. Der Bruch im DNA-Doppelstrang wird durch den MRN-Komplex erkannt. Dieser setzt sich aus den Proteinen MRE11, NBS1 und RAD50 zusammen und dient als initialer DSB Sensor. Mit Hilfe dieses Komplexes werden andere Proteine wie γ H2A.X und die apikale Kinase ATM aktiviert und zum DSB rekrutiert. ATM aktiviert durch Phosphorylierung wiederum eine Reihe von Effektor-Proteinen. Eine zentrale Rolle hierbei spielt p53. Im phosphoryliertem Zustand kann p53 den Zellzyklus stoppen, anschließend die entsprechenden DNA-Reparatur Mechanismen aktivieren oder die Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten lassen.⁴

Histon H2A.X wird durch ATM am Serin 139 phosphoryliert und somit aktiviert (116). Die Phosphorylierung kann auch durch andere PIKKs (*phosphoinositide 3-kinase-related protein kinase*) erfolgen, dazu zählen ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) und DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Dabei wird die phosphorylierte Form als γ H2A.X bezeichnet. An einem einzelnen DSB kommt es zu einer sehr starken Akkumulation von γ H2A.X. Inzwischen ist auch bekannt, dass γ H2A.X als eine Art Plattform für andere Proteine der Reparatur- oder Checkpoint-Mechanismen dienen kann (117).

Die Phosphorylierung von KAP1 (*KRAB-associated protein-1*; auch als TIF1 β (*transcriptional intermediary factor 1 β*) bezeichnet) führt zu einer Derepression von Zielgenen die den Zellzyklusarrest und die Apoptose begünstigen (118, 119). Desweiteren dient eine Phosphorylierung von KAP1 dem Zweck der Dekondensation

⁴ Abbildung nach 117 erstellt.

der DNA, so dass die Proteine wie beispielsweise γ H2A.X, die den DNA-Schaden am DNA-Bruch direkt markieren, einen besseren Zugang zum Bruch haben (120, 121).

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Erkennung von DNA-Schäden an bestimmten Punkten des Zellzyklus, den sogenannten Checkpoints. Sie überwachen den Replikationsstatus und die Integrität des genetischen Materials. Wird während des Zellzyklus das Erbmateriale geschädigt und an den entsprechenden Checkpoints erkannt, ist die Zelle in der Lage den Zellzyklus zu stoppen und den Schaden entweder zu reparieren oder die Apoptose einzuleiten (122). Die Checkpoint-Kinase-2 (Chk2) stellt ein wichtiges Protein für die Zellzyklus-Kontrolle dar. Nach der Phosphorylierung durch die Kinase ATM am Threonin68, phosphoryliert pChk2 wiederum die Phosphatase Cdc25A (*cell division cycle 25*). Diese Aktivierung führt zur Proteolyse von Cdc25A und hat zur Folge, dass die notwendige Dephosphorylierung des CDK2/Cyclin-E-Komplexes nicht erfolgen kann und der Zellzyklus gestoppt wird (123).

Die aktive Checkpoint-Kinase-2 (pChk2) phosphoryliert des Weiteren p53 am Serin 20 (124, 125). Durch diese Aktivierung kann der negative Regulator von p53, MDM2 nicht mehr an p53 binden, was zu einer Stabilisierung von p53 führt. Akkumuliert p53 im Zellkern induziert es als Transkriptionsfaktor die Expression von p21 und stoppt den Zellzyklus in der G₁-Phase (126). Dies unterbricht die laufende Replikation und gewährt der Zelle Zeit, um den erkannten Schaden zu beheben und die entsprechenden DNA-Reparatur-Mechanismen einzuleiten (115). Wurde der Schaden behoben wird die p53 Stabilisierung aufgehoben und die Expression von p21 wird eingestellt, so dass der Zellzyklus fortgesetzt wird. Kommt es jedoch zu einer sehr starken p53 Akkumulation, werden Proteine der pro-apoptischen Bcl-2-Familie transkribiert und die Apoptose wird eingeleitet. Ein weiterer Checkpoint im Zellzyklus befindet sich am Übergang von der G₂- zur M-Phase. An dieser Stelle soll der Eintritt von Zellen mit geschädigter DNA in die Mitose-Phase verhindert werden. Werden Doppelstrangbrüche erkannt, so wird der ATM-Chk2-Cdc25-Signalweg aktiviert und die Zelle bleibt in der G₂-Phase des Zellzyklus bis der Schaden behoben wurde. Kann der Schaden nicht repariert werden, wird wiederum die Apoptose eingeleitet und die Zelle stirbt (127).

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav	Systemec; Wettenberg, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare; Little Chalfont, UK
Blotpapier	A. Hartenstein GmbH, Würzburg; Deutschland
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung (MCO-20AIC)	Sanyo Biomedicals; Secaucus; NJ, USA
Combitips (2,5 ml; 5 ml; 10 ml)	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
<i>Countess cell counting chamber slides</i>	Invitrogen; Carlsbad. CA, USA
Cryotubes (1,8 ml)	Nunc; Penfield, NY, USA
Durchflusszytometer <i>FACSCanto II</i>	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA
Einmalspritzen	Braun; Melsungen, Deutschland
Eismaschine	Wessamat; Kaiserslautern, Deutschland
Filterpapier	Biorad; Hercules, CA, USA
Gefrierschränke	Liebherr; Kirchdorf, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	Biorad; Hercules, CA, USA
Glasflaschen	Schott; Mainz, Deutschland
Handschuhe	Kimberley-Clark Professional; Irving, TX, USA
Infrarotscanner (<i>Odyssey</i>)	LI-COR Biosciences; Lincoln, NE, USA
Kühlschränke	Liebherr; Kirchdorf; Deutschland
Magnetrührer	Velp Scientifica; Usmat, Italien
Mikroschraubröhrchen (0,5 ml; 2 ml)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Mikroskope	Olympus; Shinjuku, Japan
Mikrovolumen Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000)	VWR International GmbH, Erlangen; Deutschland
MultipipetteL®plus	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
NEON® Transfektionssystem	Invitrogen; Carlsbad. CA, USA
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Whatman; Maidstone, UK
Petrischalen	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA
Proteintransferkammern	Biorad; Hercules, CA, USA
pH-Messgerät	WTW; Weilheim, Deutschland
Photometer (<i>infinite M200</i>)	Tecan, Männedorf, Schweiz

3. Material und Methoden

Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Greiner; Kremsmünster, Österreich Starlab; Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfen	Interga Biosciences; Fernwald, Deutschland Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage RiOs™	Millipore; Billerica, MA, USA
Rotierer	Labortechnik Fröbel; Lindau, Deutschland
Rundboden-Röhrchen (für FACS)	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA
Serologische Pipetten (2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Corning; New York, NY, USA
Spannungsquellen (<i>Power Pac HC</i>)	Biorad; Hercules, CA, USA
Sterilwerkbänke	Heraeus; Hanau, Deutschland
Thermomixer 1,5 ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe	HLC Biotech; Pforzheim, Deutschland
Vortex	Velp Scientifica; Usmat, Italien
Waagen	Kern; Balingen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatten (12-, 24-, 48- und 96- Loch)	Greiner; Kremsmünster, Österreich Starlab; Hamburg, Deutschland
Zellzählgerät (<i>Countess</i>)	Invitrogen; Carlsbad, CA, USA
Zentrifugen	Hettich; Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA

3.1.2 Chemikalien und Stoffe

Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Braun; Melsungen, Deutschland
Aqua dest. (dH ₂ O)	Braun; Melsungen, Deutschland
BSA (bovines Serum Albumin)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Carboplatin (CARBO)	Bristol-Myers-Squibb; München, Deutschland
Cisplatin (CDDP)	GRY Pharma; Kirchzarten, Deutschland
CP-466722 (ATM Kinase Inhibitor)	SelleckChem; Houston, TX, USA
Cytofix/Cytoperm-Puffer	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA

3. Material und Methoden

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Dimethylformamid	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Docetaxel (DOC)	Sanofi-Aventis; Frankfurt, Deutschland
Doxorubicin (DOX)	Medac (Gesellschaft für klinische Spezialpräparate)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumsalz Dihydrat	
Ethanol (EtOH)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Etoposid (ETO)	Teva GmbH
Gemcitabin (GEMCI)	Lilly; Bad-Homburg, Deutschland
L-Glutamin	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth; Karlsruhe, Deutschland
KU-55933 (ATM Kinase Inhibitor)	SelleckChem; Houston, TX, USA
Laemmli Puffer, 2x	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
<i>Low Melting Point</i> (LMP) Agarose	Roth; Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Melphalan (MELPH)	GRY Pharma; Kirchzarten, Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid)	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Natriumacetat	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Fluka; Buchs SG, Schweiz
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Natriumpyrophosphat, anorganisch (NaPPi)	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Nutlin (NUT)	AbMole Bioscience; Houston, TX, USA
Oxaliplatin (OXALI)	Sanofi-Aventis; Frankfurt, Deutschland
Paraformaldehyd	Riedel-de Haën; Seelze, Deutschland
Perm/Wash-Puffer	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA

3. Material und Methoden

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Protease-Inhibitor Tabletten (<i>complete mini</i>)	Roche; Penzberg, Deutschland
Rhodamin123 (R-123)	Merck Serono; Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese®Gel 30	Roth; Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Topotecan (TOPO)	Glaxo Smith-Kline; Brentford, Großbritannien
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
TRIS Hydrochlorid	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer, 10x	Biorad; München, Deutschland
Triton X-100	Fluka; Buchs SG, Schweiz
Trypanblau (0,4 %)	Invitrogen; Carlsbad, CA, USA
Tween 20	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
Verapamil (VPL)	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Vinblastin (VBA)	GRY Pharma; Kirchzarten, Deutschland
Vincristin (VCR)	GRY Pharma; Kirchzarten, Deutschland
Vinorelbin (VINO)	Pierre Fabre Pharma; Freiburg, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
YM-155	SelleckChem; Houston, TX, USA
Zosuquidar (LY335979)	SelleckChem; Houston, TX, USA

3.1.3 Verwendete kommerzielle Reaktionskits und Standards

Reagenz	Hersteller
BD Perm/Wash™	BD Biosciences; San Diego, CA, USA
ColorPlus™ Prestained Protein Ladder	New England Biolabs; Ipswich, MA, USA
Comet Assay® Electrophoresis System	Trevigen Inc.; Helgerman Ct, MD, USA
Comet Assay® Lysis Solution	Trevigen Inc.; Helgerman Ct, MD, USA
Comet Slides™	Trevigen Inc.; Helgerman Ct, MD, USA
DC Protein Assay Reagents	Biorad; München, Deutschland
DNA Damage Detection Kit	PromoKine; Heidelberg, Deutschland
High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland

3. Material und Methoden

iQ SYBR® Green Supermix	Biorad; Hercules, CA, USA
MycoAlert PLUS Mycoplasma detection kit	Lonza; Basel; Schweiz
peqGOLD Total RNA Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland
SuperSignal West FEMTO	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA

3.1.4 *real-time quantitative PCR Primer*

Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
SLC35F2 forward	ACATTTCTCCATCACTCATTCC	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
SLC35F2 reverse	GACTTAGTTTCTTGAGCTGATGC	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
β-Actin forward	AGCACTACGAGCTGCCTGAC	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
β-Actin reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
GAPDH forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
GAPDH reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

3.1.5 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in supplementiertem IMDM kultiviert. Die Komponenten und entsprechenden Konzentrationen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Konzentration	Zusammensetzung/Lagerung	Hersteller
1 % Pen/Strep (<i>Penicillin/Streptomycin</i>)	1 Flasche 10 Mega Penicillin und 10 g Streptomycinsulfat mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern	Penicillin: Grünenthal; Stolberg, Deutschland Streptomycin: Sigma-Aldrich; München, Deutschland
2 % <i>Glutamin</i>	29,2 g L-Glutamin mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, steril filtrieren,	Sigma-Aldrich; München, Deutschland

3. Material und Methoden

	Lagerung bei -20 °C	
10 % FKS (<i>fetales Kälberserum</i>)	Gebrauchsfertig erworben, Lagerung bei -20 °C	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
IMDM (<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium – Iscove Basal Medium</i>)	Gebrauchsfertig erworben, mit 15 mg/l Phenolrot und 3,024 g/l NaHCO ₃ Lagerung bei 4°C	Biochrom AG; Berlin, Deutschland

Zusätzliche Lösungen die für das Passagieren der Zellen verwendet wurden sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Konzentration	Zusammensetzung/Lagerung	Hersteller
10x Phosphat buffered Saline (PBS)	95,5 g PBS mit Aqua ad iniectabilia auf 1 l auffüllen, autoklavieren, Lagerung bei RT	Biochrom AG; Berlin, Deutschland
1x PBS	50 ml 10x PBS mit Aqua ad iniectabilia auf 500 ml auffüllen, Lagerung bei RT	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Trypsin	2 g Trypsin und 0,6 g Titriplex III mit 1x PBS auf 1 l auffüllen, steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C	Sigma-Aldrich; München, Deutschland Merck; Darmstadt, Deutschland

3.1.6 Puffer und Gelzusammensetzung für Western-Blot

Triton-X100 Lysispuffer

Komponenten	Konzentration
TRIS/HCl, pH 7,5	20 mM
Natriumchlorid	150 mM
NaPPi	10 mM
Natriumfluorid	20 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
Lagerung bei 4 °C	

2x Probenpuffer

Komponenten	Konzentration
Laemmli-Puffer, 2x	95 %
β -Mercaptoethanol	5 %

1x Laufpuffer

Komponenten	Konzentration [Menge je l]
TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer, 10x	100 ml
Aqua bidest.	Ad 1 l

Lagerung bei 4 °C

10x Transferpuffer

Komponenten	Konzentration
TRIS/HCl	250 mM
Glycin	1,9 M

Lagerung bei RT

1x Transferpuffer: 20 % Methanol zugeben; pH-Wert 8,3 einstellen (Lagerung 4 °C)

Blockierpuffer

Komponenten	Konzentration
Milchpulver	5 % (w/v) in PBS

Komponenten	Konzentration
TRIS/HCl	1 M (pH 7,5)
Natriumchlorid	200 mM
BSA	3 %
Tween 20	0,05 % (v/v)

Lagerung bei -20 °C

Gelzusammensetzung (für je zwei Gele; 0,75 mm)

Komponenten	5 %	8 %	12 %	15 %
	Sammelgel	Trenngel	Trenngel	Trenngel
H ₂ O	2,48 ml	4,3 ml	2,7 ml	1,5 ml
Rotiphorese®Gel 30	0,55 ml	3,2 ml	4,0 ml	6,0 ml
TRIS/HCl pH 8,8	--	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml
TRIS/HCl pH 6,8	0,44 ml	--	--	--
SDS, 10% (v/v)	35 µl	120 µl	120 µl	120 µl
APS 10% (w/v)	24 µl	90 µl	90 µl	90 µl
TEMED	4,5 µl	15 µl	15 µl	15 µl

3.1.7 Puffer für Comet-Assay

1x neutraler Elektrophorese Puffer

Komponenten	Konzentration
TRIS Base	100 mM
Natriumacetat	300 mM
Essigsäure	Bis pH 9

Lagerung bei 4°C

DNA-Präzipitationslösung

Komponenten	Konzentration [Menge je l]
Ammoniumacetat (7,5 M)	6,7 ml
EtOH (95 %)	43,3 ml
Aqua bidest.	Ad 1 l

Lagerung bei RT

PI-Lösung

Komponenten	Konzentration [Menge je 10 ml]
Propidiumiodid	10 g
1x PBS	ad 10 ml

Lagerung bei 4 °C

3.1.8 Viabilitätsassay (MTT-Test)

Komponenten	Zusammensetzung	Hersteller
MTT (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	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
20 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	400 g SDS auf 2 Liter (1:1 dH ₂ O /Dimethylformamid), pH 4,7; bei RT lagern	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland Fisher Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland

3.1.9 Verwendete Antikörper

Western-Blot

Primärantikörper	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
anti-β-Aktin	1:5000	Maus IgG _{2a}	BioVision; Milpitas, CA, USA
anti-Histon2A.X	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-γHiston2A.X (Ser139)	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-Chk2	1:1000	Maus IgG _{2B}	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-phospho-Chk2 (Thr68)	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-Survivin	1:500	Kaninchen IgG	R&D Systems; Minneapolis, MN, USA
anti-clAP1	1:1000	Ziege IgG	R&D Systems; Minneapolis, MN, USA
anti-clAP2	1:1000	Kaninchen IgG	Millipore; Darmstadt, Deutschland
anti-XIAP	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-cleaved PARP (Asp214)	1:1000	Maus IgG ₁	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-p21	1:1000	Maus IgG _{2A}	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-p53	1:1000	Maus IgG _{2A}	Alexis; Lörrach, Deutschland
anti-phospho-TIF-	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling; Danvers, MA, USA

3. Material und Methoden

1 β (Ser824)		IgG	
anti-Mcl-1	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling; Danvers, MA, USA
anti-SLC35F2	1:200	Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA
anti-MDR1	1:1000	Kaninchen IgG	Cell Signaling; Danvers, MA, USA

Sekundärantikörper	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
Goat anti-rabbit IgG (H&L), Peroxidase-konjugiert	1:20000	Kaninchen IgG	Calbiochem GmbH; Bad Soden, Deutschland
Goat anti-mouse IgG (H&L), Peroxidase-konjugiert	1:20000	Maus IgG	Calbiochem GmbH; Bad Soden, Deutschland
Rabbit anti-goat IgG (H&L), Peroxidase-konjugiert	1:20000	Ziege IgG	Calbiochem GmbH; Bad Soden, Deutschland
IR-Dye 800CW Donkey anti-rabbit	1:20000	Kaninchen IgG	LI-COR Biosciences; Lincoln, NE, USA
IR-Dye 800CW Goat anti-mouse	1:20000	Maus IgG	LI-COR Biosciences; Lincoln, NE, USA
IR-Dye 800CW Donkey anti-goat	1:20000	Ziege IgG	LI-COR Biosciences; Lincoln, NE, USA

Durchflusszytometrie

Primärantikörper	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
anti-BCRP	1:20	Maus IgG ₁	Kamiya Biomedical Company; Seattle, WA, USA
anti-MDR1	1:20	Maus IgG _{2A}	Kamiya Biomedical Company; Seattle, WA, USA
anti-MRP1	1:20	Maus IgG _{2A}	Kamiya Biomedical Company; Seattle, WA, USA

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat F(ab) ₂ Anti-Maus IgG (H+L) Phycoerythrin	unverdünnt	R&D Systems; Minneapolis, MN, USA
Maus IgG _{2A} Phycoerythrin Isotype Control	unverdünnt	R&D Systems; Minneapolis, MN, USA
Maus IgG ₁ Phycoerythrin Isotype Control	unverdünnt	R&D Systems; Minneapolis, MN, USA

3.1.10 Verwendete siRNAs

Die Sequenzen der hier aufgeführten siRNAs sind im Anhang A1 zu finden.

Ziel-Protein	Hersteller
ON-TARGETplus non-targeting Pool	GE Healthcare; Little Chalfont, UK
ON-TARGETplus SMARTpool human Survivin	GE Healthcare; Little Chalfont, UK
ON-TARGETplus SMARTpool human ABCB1	GE Healthcare; Little Chalfont, UK
ON-TARGETplus SMARTpool human SLC35F2	GE Healthcare; Little Chalfont, UK

3.1.11 Verwendete Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer Vielzahl von chemosensitiven und chemoresistenten Tumorzellen gearbeitet, darunter hauptsächlich Neuroblastomzellen (siehe Tab. 5). Die verwendeten Zellen gehören alle der Sammlung ‚Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection‘⁵ an. Für die Etablierung der chemoresistenten Sublinien wurde die chemosensitive, parentale Zelle Schritt für Schritt an das entsprechende Zytostatikum adaptiert. Dabei wurde die parentale Ausgangszelle anfangs mit einer geringen Konzentration des Zytostatikums passagiert, bis diese genauso stabil wuchs wie die parental Zelle ohne Zytostatikum-Zugabe. Daraufhin wurde die Zytostatikum-Konzentration erhöht. Dieser Prozess wurde so oft wiederholt, bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Die resistenten Zelllinien wurden durch ein hochgestelltes „r“ gekennzeichnet, wobei die Konzentration des Zytostatikums, an welches die jeweilige Zelle adaptiert wurde, in ng/ml (im Fall von YM155: nM) angegeben und ebenfalls hochgestellt wurde. Somit ergab sich die Schreibweise für die gegen 10 ng/ml Vincristin adaptierte UKF-NB-3 Zelllinie: UKF-NB-3^rVCR¹⁰.

⁵ www.kent.ac.uk/stms/cmp/RCCL/RCCLabout.html

3. Material und Methoden

Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika, sowie eine kurze Beschreibung der jeweiligen Wirkung ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3 | Zusammenfassung der verwendeten Zytostatika und deren Wirkmechanismus. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zytostatika gehören verschiedenen Familien an und unterscheiden sich teilweise sehr in ihrem Wirkmechanismus.

Zytostatikum	Wirkmechanismus
Carboplatin (CARBO)	Platin-Derivat; Vernetzung zweier benachbarter Guanin-Basen - verursacht einen Replikationsstopp
Cisplatin (CDDP)	Platin-Derivat; verursacht Quervernetzungen in und zwischen DNA-Strängen durch kovalente Bindung des Platinatoms an zwei benachbarter Guanin- und Adenin-Basen
Dacarbazin (DACARB)	Alkylantien; Hemmung der DNA-Synthese - Überträgt Alkylgruppe auf die DNA, es kommt zur Vernetzung von DNA-Strängen
Docetaxel (DOC)	Taxan; Bindung an Mikrotubuli-Apparat - Spindelapparat verliert Funktion (Blockade der Mitose)
Doxorubicin (DOX)	Anthracyclin; Topoisomerasehemmer; Interkaliert in die DNA; hemmt Topoisomerase II
Etoposid (ETO)	Topoisomerasehemmer; hemmt Topoisomerase II; führt zu Doppelstrangbrüchen in der DNA
Gemcitabin (GEMCI)	Antimetabolit; Pyrimidinanalogon - statt Cytidin wird während der DNA-Synthese Gemcitabin in die DNA eingebaut
Melphalan (MELPH)	Alkylantien; Hemmung der DNA-Synthese - Überträgt Alkylgruppe auf die DNA, es kommt zur Vernetzung von DNA-Strängen
Nutlin (NUT)	Cis-Imidazol Analogon; Inhibiert die Interaktion zwischen Mdm2 und p53; p53 wird stabilisiert
Oxaliplatin (OXALI)	Platin-Derivat; verursacht Quervernetzungen in und zwischen DNA-Strängen durch kovalente Bindung des Platinatoms an zwei benachbarter Nukleinbasen
Topotecan (TOPO)	Topoisomerasehemmer; hemmt Topoisomerase I; führt zu Doppelstrangbrüchen in der DNA
Vinblastin (VBA)	Vincaalkaloid; Mitosehemmer; bindet an Tubulin verhindert dadurch die Ausbildung der Mikrotubuli; bei der Zellteilung wird die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen unterbunden
Vincristin (VCR)	Vincaalkaloid; Mitosehemmer; bindet an Tubulin verhindert dadurch die Ausbildung der Mikrotubuli; bei der Zellteilung wird die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen unterbunden

Vinorelbin (VINO)	Vincaalkaloid; Mitosehemmer; bindet an Tubulin verhindert dadurch die Ausbildung der Mikrotubuli; bei der Zellteilung wird die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen unterbunden
--------------------------	---

Zusätzlich wurden Sublinien verwendet, die mittels Transduktion mit einem entsprechenden lentiviralen Vektorsystem ein bestimmtes Protein hoch- (z.B. ABCB1 oder BCRP1) bzw. runterregulieren (z.B. p53 oder SLC35F2). Als Kontrolle wurde dieselbe Ausgangszelle mit einem entsprechenden Kontrollvektor transduziert, der für eine Sequenz ohne Ziel in der Zelle kodiert. Die transduzierten Zellen sind in der nachstehenden Tabelle 4 aufgeführt und kurz beschrieben.

Tabelle 4 | Aufstellung der verwendeten transduzierten Zelllinien. Nach erfolgter Transduktion mit dem entsprechenden Vektor wird ein bestimmtes Protein bezüglich seiner Expression entweder hoch- bzw. runterreguliert. Dabei wurden UKF-NB-3^{ABCB1}, UKF-NB-3^{ABCG2} und UKF-NB-3^{pc-p53} zuvor bereits beschrieben (128), während die UKF-NB-3 Zellen, die die SLC35F2 Expression runterregulieren in dieser Arbeit etabliert wurden.

Transduzierte Zellen	Effekt der Transduktion
UKF-NB-3 ^{ABCB1}	Überexpression von ABCB1 (MDR1; P-Glykoprotein)
UKF-NB-3 ^{Cer2}	Kontrollzelle zu UKF-NB-3 ^{ABCB1}
UKF-NB-3 ^{ABCG2}	Überexpression von BCRP1
UKF-NB-3 ^{piG2}	Kontrollzelle zu UKF-NB-3 ^{BCRP}
UKF-NB-3 ^{pc-p53}	Runterregulierung von p53
UKF-NB-3 ^{pc-scr}	Kontrollzelle zu UKF-NB-3 ^{pc-p53}
UKF-NB-3 ^{sh1 SLC35F2}	Runterregulierung von SLC35F2 (Vektor kodiert für eine shRNA mit der Sequenz 1 : CTCTTTCTGTTTGGCTATA)
UKF-NB-3 ^{sh2 SLC35F2}	Runterregulierung von SLC35F2 (Vektor kodiert für eine shRNA mit Sequenz 2: GAGGAATACATCGTGAAGA)
UKF-NB-3 ^{sh3 SLC35F2}	Runterregulierung von SLC35F2 (Vektor kodiert für eine shRNA mit der Sequenz: CAGGGAGTGATGTATTGAT)
UKF-NB-3 ^{shCTRL SLC35F2}	Kontrollzelle zu UKF-NB-3 ^{shSLC35F2}

3. Material und Methoden

Tabelle 5 | Auflistung der getesteten Zelllinien. Zu jeder Zelllinie ist die entsprechende Tumorentität und die Herkunft aufgezeigt.

Zelllinie	Tumorentität	Herkunft
22RV1	Prostatakarzinom	CLS
Be(2)c	Neuroblastom	ATCC ⁶
CHP-134	Neuroblastom	DSMZ ⁷ #ACC-653
GIMEN	Neuroblastom	CLS ⁸ #330179
HCC-1806	Mammakarzinom	ATCC® CRL-2335™
HCC-38	Mammakarzinom	ATCC® CRL-2314™
IMR-5	Neuroblastom	ATCC
IMR-32	Neuroblastom	ATCC® CCL-127™
Kelly	Neuroblastom	DSMZ #ACC-355
LAN-5	Neuroblastom	DSMZ #ACC-673
LAN-6	Neuroblastom	ATCC
MDA-MB-231	Mammakarzinom	CLS #330275
NB-S-124	Neuroblastom	DSMZ
NGP	Neuroblastom	ATCC
NLF	Neuroblastom	ATCC
NMB	Neuroblastom	DSMZ #ACC-657
PC-3	Prostatakarzinom	ATCC® CRL-1435™
RT-112	Harnblasenkarzinom	DSMZ #ACC-418
SHEP	Neuroblastom	ATCC
SH-SY5Y	Neuroblastom	ATCC® CRL-2266™
SK-ES-1	Osteosarkom	ATCC® HTB-86™
SK-N-AS	Neuroblastom	ATCC® CRL-2137™
SK-N-SH	Neuroblastom	ATCC® HTB-11™
UKF-NB-2	Neuroblastom	Patientenisolat
UKF-NB-3	Neuroblastom	Patientenisolat ⁹
UKF-NB-5 D	Neuroblastom	Patientenisolat
UKF-NB-6	Neuroblastom	Patientenisolat

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem die chemosensitiven Neuroblastom-Linien UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6, sowie die Zelllinien PC-3 (Prostatakarzinom),

⁶ Zellen wurden von ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) erworben

⁷ Zellen wurden von DSMZ (*Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Braunschweig, Deutschland) bezogen

⁸ Zellen wurden von CLS (*Cell lines service*, Eppelheim, Deutschland) erworben

⁹ Aus Knochenmarkmetastasen eines Patienten mit Neuroblastom INSS Stadium 4 (129)

3. Material und Methoden

HCC-1806 und MDA-MB-231 (Mammakarzinom), jeweils an 20 nM und die Prostatakarzinomzelle 22RV1 an 300 nM YM155 adaptiert.

Tabelle 6 | Aufstellung der gegen YM155 adaptierten Zelllinien. Die Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit an die entsprechende YM155 Konzentration adaptiert.

Zelle	Adaptiert gegen
22RV1 ^r YM155 ³⁰⁰	300 nM YM155
HCC-1806 ^r YM155 ²⁰	20 nM YM155
MDA-MB-231 ^r YM155 ²⁰	20 nM YM155
PC-3 ^r YM155 ²⁰	20 nM YM155
UKF-NB-2 ^r YM155 ²⁰	20 nM YM155
UKF-NB-3 ^r YM155 ²⁰	20 nM YM155
UKF-NB-6 ^r YM155 ²⁰	20 nM YM155

3.1.11 Verwendete Software

Software	Hersteller
CalcuSyn	Biosoft; Cambridge, UK
<i>Comet Assay IV</i>	Perceptive Instruments; Bury Saint Edmunds, UK
EndNote X7.4	Thomson Reuters; Carlsbad, USA
<i>FACSCanto II</i>	BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, USA
Image Studio 3.1	LI-COR Biosciences; Lincoln, NE, USA
MS Office 2010	Microsoft Deutschland; Unterschleißheim

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden alle in supplementiertem IMDM (siehe Abschnitt 3.1.5) und bei 37 °C, sowie 5 % CO₂ kultiviert. Die adhärent wachsenden Neuroblastomzellen wurden in der Regel alle sieben Tage passagiert, dabei war die Splittingrate von der Zelllinie abhängig.

Für das Passagieren wurde das alte Medium abgenommen und der adhärente Zellrasen mit PBS gewaschen. Durch den Waschschrift sollten Mediumreste entfernt werden, da das im Medium enthaltene FKS die anschließende „Trypsinierung“ der Zellen verhindert. Nach dem Waschen wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben. Die enzymatische Reaktion ermöglichte ein Loslösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche und führte zudem zu einer Vereinzelung der Zellen. Danach wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die verwendeten Zellen wurden im STR- (*short tandem repeat*) Profiling authentifiziert und mithilfe des ‚*MycAlert PLUS Mycoplasma detection*‘ Kits der Firma Lonza regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie bereits zuvor beschrieben gewaschen, „trypsinisiert“ und in neuem Medium aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl eines 1:1-Mischverhältnisses von Zellsuspension und 0,4 % Trypanblau auf eine zugehörige Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Zellzählgeräts (*Countess*®) bestimmt. Da bei toten Zellen, im Gegensatz zu lebenden, die Integrität der Zellmembran zerstört ist, kann der Farbstoff in tote Zellen eindringen und diese anfärben. Das Zählgerät konnte aus diesem Grund zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden und gab neben der Zellzahl pro Milliliter, auch einen prozentualen Viabilitäts-Wert an.

3.2.3 MTT-Viabilitätstest

Dieser Viabilitätstest ist eine einfache und effiziente Methode die Wirksamkeit eines Stoffes bzw. Zytostatikums auf die Viabilität von Zellen zu bestimmen. Das Prinzip dieses kolorimetrischen Tests beruht auf der Aktivität zellulärer Enzyme (Succinat-

Tetrazolium-Reduktase-Systems). Dabei setzen vitale Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) in violette Formazan um (130, 131). Die Reduktion ist in Abbildung 9 dargestellt. Da diese enzymatische Reaktion ausschließlich in lebenden Zellen stattfinden kann, gibt die Menge an gebildetem Formazan Aufschluss über die Anzahl der lebenden Zellen in der jeweiligen Probe. Dabei erfolgt die Auswertung an einem Photometer.

Der zu testende Stoff wurde in acht Verdünnungsschritten auf eine 96-Lochplatte pipettiert (je 50 µl pro getestetes Loch) (Abb. 10). Zusätzlich wurde in den ersten beiden Spalten für die Mediumkontrolle (MK) 100 µl Medium und in die letzten beiden Spalten für die Zellkontrolle (ZK) 50 µl Medium gegeben. Abschließend wurden die Verdünnungsreihe, als auch die ZK mit 50 µl Suspension der zu testenden Zellen versehen (Spalten 3-12). Dabei hatte jeder Ansatz das Gesamtvolumen von 100 µl.

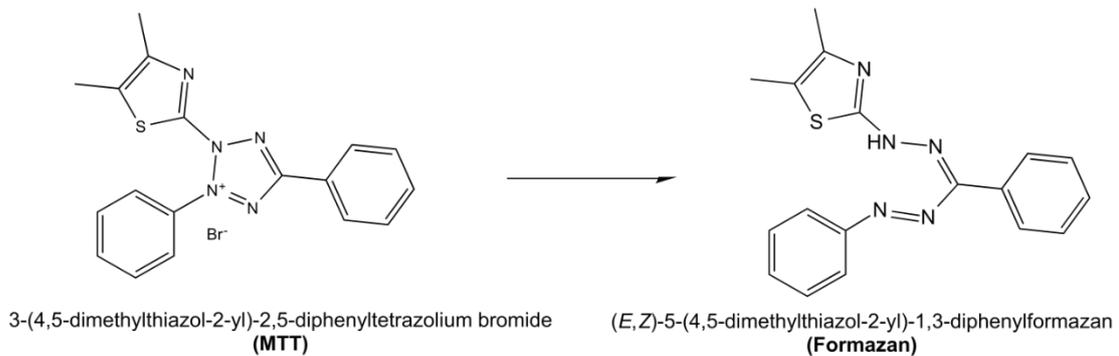


Abbildung 9 | Reduktion von MTT zu Formazan (abgeändert nach 130). Durch die Zugabe des MTT-Reagenz, ist es möglich kolorimetrisch zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden.

Bei Kombinationsansätzen mit Inhibitoren wurde die Verdünnungsreihe wie bereits oben beschrieben angesetzt, allerdings mit je 25 µl pro Loch. Auf die untere Hälfte der Platte (Reihen E-H; Spalten 3-12) wurde zusätzlich zu der zu testenden Substanz eine feste Konzentration des Inhibitors pipettiert (25 µl), wohingegen auf die obere Hälfte (Reihen A-D; Spalten 3-12) lediglich 25 µl Medium aufgetragen wurden. Abschließend wurden wiederum 50 µl Zellsuspension pro Loch pipettiert, um auf ein Gesamtvolumen von 100 µl zu kommen.

Nach der Inkubationszeit von fünf Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde jedes Loch mit 25 µl der MTT-Lösung (2 mg/ml in PBS) versehen und für weitere 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um die ausgefallenen Formazankristalle zu lösen und die Zellen zu lysieren, wurde anschließend zu jedem Loch 100 µl einer 20 %-igen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) zugefügt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ wurde die Absorption am Photometer bei einer Wellenlänge von 560

nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm *Excel*.

Eine abschließende Bestimmung der IC_{50} -Werte („*inhibitory concentration 50*“) erfolgte mit dem Programm *CalcuSyn*. Der IC_{50} -Wert gibt an, bei welcher Konzentration der untersuchten Substanz das Wachstum von 50 % der Zellen inhibiert wird.

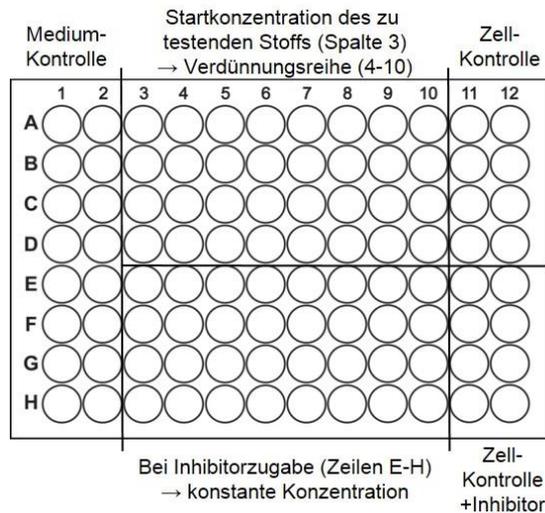


Abbildung 10 | Pipettierschema beim MTT-Viabilitätstest. Dabei wurde in die ersten zwei Spalten (1 und 2) die Mediumkontrolle pipettiert und in die letzten zwei (11 und 12) die Zellkontrolle. Im Falle einer Kombination vom zu testenden Stoffs und eines Inhibitors, wurde vorerst ähnlich der einfachen Auftragung die Verdünnungsreihe des Stoffes beginnende in Spalte 3 pipettiert. Anschließend wurde eine konstante Inhibitor Konzentration auf die untere Hälfte der 96-Loch Platte (Zeilen E-H) gegeben, einschließlich der Zellkontrolle.

3.2.4 Western-Blot

Für eine gezielte Proteindetektion dient der Western-Blot. Dabei werden die Proteine aus einem Zelllysat auf ein SDS-Gel aufgetragen und durch Anlegen einer elektrischen Spannung hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteinextraktion erfolgt zuvor unter einem Überschuss an SDS. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladungen der Proteine, es entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung.

3.2.4.1 Proteinextraktion und -bestimmung

Um die Zellen aufzubrechen wurde zunächst das Medium abgenommen und der Zellrasen mit kaltem PBS gewaschen. Je nach Zellmenge wurde ein entsprechendes Volumen des Triton X-100 Lysepuffer auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben.

Die Proteinbestimmung erfolgte auf Eis und wurde mit dem *DC Protein Assay Kit* durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip nach Lowry (132), wobei in der ersten Reaktion unter alkalischen Bedingungen Kupfer-(II)-Ionen einen Komplex mit den Peptidbindungen der Proteine bildet. Daraufhin wird das Kupfer-(II) zu Kupfer-(I) reduziert, welches wiederum Molybdän-(VI)- und Wolfram-(VI)-Heteropolysäuren zu Molybdänblau reduziert. Die erhaltene Blaufärbung kann anschließend photometrisch bestimmt werden und ist proportional zum Proteingehalt der gemessenen Probe.

Für die Proteinbestimmung wurde 5 µl der zu bestimmenden Proben, sowie 5 µl der Standards im Dreifachansatz in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei hatten die Standards bekannte Proteinkonzentrationen (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/ml BSA), womit eine Eichgerade erstellt wurde. Anschließend wurden 25 µl des A-Mixes (1 ml Reagenz A (alkalisches Kupfertartrat) und 20 µl Reagenz S (Surfactant Lösung)) des *DC Protein Assay Kit* und 200 µl des Reagenz B (verdünntes Folin-Reagenz) in jedes Loch pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT erfolgte die Auswertung am Photometer durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 620 nm.

Mithilfe der Eichgeraden konnte bezüglich der gemessenen OD-Werte die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet und entsprechend auf eine bestimmte Proteinkonzentration eingestellt werden.

Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben unter SDS Überschuss bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Dies führte zur Zerstörung der Tertiär- und Sekundärproteinstruktur. Um ein Aufbrechen der Disulfid-Verbindungen der Proteine zu gewährleisten, wurde hier mit dem Zusatz an β-Mercaptoethanol gearbeitet. Die Proben konnten bei Bedarf bei -20 °C gelagert werden.

3.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) /Immunoblot

Um die Proben hinsichtlich ihrer Größe aufzutrennen, wurden die eingestellten Proteinproben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch ein bestimmtes Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid entsteht durch das Hinzufügen der Katalysatoren APS und TEMED eine Quervernetzung im Gel zu Polyacrylamid. Die Größe der gebildeten Poren ist von der Menge des Acrylamids abhängig. Dabei gilt, je höher die Acrylamidkonzentration, desto enger werden die Poren und größeren Molekülen wird ein stärkerer Widerstand entgegen gesetzt. Dies ist beim Detektieren von kleinen Proteinen von Vorteil. Umgekehrt wird eine niedrigere Acrylamidkonzentration beim

Detektieren von großen Proteinen verwendet. Die Gelzusammensetzung ist dem Abschnitt 3.1.6 zu entnehmen.

Im ersten Schritt wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und im Anschluss die Kämme zwischen die Glasplatten gesteckt. Das fertige Gel wurde in die Gelelektrophoresevorrichtung eingespannt und mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Geltaschen wurden mit 15 µl Probe und pro Gel 8 µl eines Standard-Marker beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für zwei Stunden.

Um die im Gel aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen, wurde das Gel mit der Membran und je zwei Filterpapieren und ‚Fiberpads‘ in die Transfervorrichtung gespannt, sowie mit 1x Transferpuffer versehen. Damit die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen werden, wurde für 1,5 Stunden eine konstante Stromstärke von 0,25 A angelegt.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 40 Minuten mit einer Blockierlösung inkubiert. Diese Lösung war abhängig vom Primärantikörper der anschließend verwendet wurde. Entweder erfolgte dieser Schritt mit BSA-Puffer oder mit gelöstem Milchpulver. Da die Detektion der gesuchten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper erfolgte, wurden unspezifische Bindestellen zuvor blockiert. Daraufhin wurde die Blockierlösung wieder abgenommen und der Erstantikörper wurde über Nacht bei 4 °C zur Membran gegeben. Um mehrere Proteine auf einer Membran nachzuweisen, wurde in Vorhinein geprüft, dass sich die Signale der einzelnen Antikörper nicht überlappen und die untersuchten Proteine aufgrund unterschiedlicher molekularer Größen eindeutig zu unterscheiden sind. Zum einen wurde entweder mit Antikörpern aus verschiedenen Spezies gearbeitet oder, bei gleicher Spezies, die Antikörper nacheinander inkubiert. Dabei wurden nach der ersten Auswertung die zuvor gebundenen Antikörper in einem etwa vierstündigen Waschschrift von der Membran entfernt und anschließend nach dem Blockierungsschritt mit dem nächsten Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper wieder abgenommen und die Membran wurde dreimal mit 5 ml Waschpuffer für jeweils 10 Minuten gewaschen. Dadurch wird garantiert, dass ungebundene Antikörper kein verfälschtes Ergebnis liefern. Anschließend wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser richtete sich nach der Spezies aus welcher der Erstantikörper gewonnen wurde. Um den Erstantikörper nachweisen zu können ist der Sekundärantikörper entweder mit einem Enzym oder mit einem Fluorophor konjugiert. In beiden Fällen wurde der Zweitantikörper 1:20000 in BSA-Blockingpuffer verdünnt und die Membran für eine Stunde bei RT inkubiert.

Erfolgte eine abschließende Entwicklung am Infrarotscanner („*Infrared Imager*“ (*Odyssey*)), wurde die Membran mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (dieser Schritt musste in einem lichtundurchlässigen Reaktionsgefäß erfolgen). Nach einem weiteren Waschdurchgang (dreimal für 10 Minuten), erfolgte die Auswertung abschließend am Computer. Wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, erfolgte die Detektion mit einer ‚*Enhanced Chemiluminescence*‘ (ECL-) Lösung. Mit Hilfe dieser Lösung konnten die Sekundärantikörper durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Dabei katalysiert die Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol. Die entstandene Lumineszenz wurde mittels eines Röntgenfilms detektiert. Das so emittierte Licht führt bei einer angemessenen Belichtungsdauer zur Schwärzung des Röntgenfilms und macht die antikörpermarkierten Proteine sichtbar.

3.2.5 Einzell-Gelelektrophorese („*Comet Assay*“)

Mit Hilfe der Einzell-Gelelektrophorese („*Comet Assay*“) ist es möglich DNA-Schäden in eukaryotischen Zellen direkt nachzuweisen. Dabei wird die Wanderung von DNA in auf Objektträgern gegossenen Gelen beobachtet (133).

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer ‚*Low-melting point*‘ (LMP) Agarose eingebettet und unter schwach alkalischen Bedingungen (pH 9) lysiert. Anschließend wurde eine Elektrophorese durchgeführt, wobei die negativ geladene DNA zur Anode wandert. Weist die zu untersuchende DNA Schäden auf, so befanden sich DNA Bruchstücke im Zellkern. Diese geschädigte, fragmentierte DNA war wegen ihrer geringen Größe in der Lage aus dem Zellkern der lysierten Zellen auszutreten und in der Elektrophorese aufgrund der Größe schneller und weiter zu wandern. Chromosomale DNA ist zu groß um als Ganzes aus dem Zellkern zu wandern und bleibt somit im Zellkern zurück. Daraufhin wurde das Agarosegel mit einem fluoreszierenden Farbstoff angefärbt und unter dem Mikroskop ein kometenähnliches Bild sichtbar gemacht. Die bruchstückhafte, geschädigte DNA befand sich im Schweif („*tail*“) und die unfragmentierte im Kopfteil („*head*“) des „Kometen“. Dabei ergab sich eine Korrelation zwischen der Länge sowie der Intensität des Schweifs und der Anzahl der DNA Strangbrüche.

Die Durchführung erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll der Firma Trevigen. Die Zellen wurden für bestimmte Zeit mit der entsprechenden YM155 Konzentration behandelt. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Ansatz für 20 Minuten mit 100 μM Wasserstoffperoxid inkubiert und ein Ansatz blieb als Negativ-Kontrolle unbehandelt.

Eine 2 %-tige LMP-Agarose Stocklösung wurde in einem Wasserbad bei 95 °C geschmolzen und daraus eine 0,5 %-ige Arbeitslösung hergestellt. Diese wurde anschließend im Brutschrank auf 37 °C abgekühlt. Die ‚Lysis Solution‘ und der Elektrophoresepuffer wurden vor Versuchsbeginn auf 4 °C gekühlt. Um von Beginn an die DNA-Schäden der zu untersuchenden Zellen zu reduzieren, wurden bei der Zellernte der Zellerasen in der Zellkulturflasche nicht trypsiniert sondern direkt vom Zellboden gespült. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, anschließend mit 5 ml PBS gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml kaltem PBS aufgenommen und auf Eis aufbewahrt, während die Zellzahl bestimmt wurde. Mit Hilfe des Geräts *Countess*® wurde die Zellzahl auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. 50 µl der hergestellten Zellsuspension wurden mit 500 µl der 0,5 %-igen LMP-Agarose (37 °C) vermischt. Daraufhin wurden 50 µl dieses Gemisches auf die zugehörigen *CometSlides*® überführt und vorsichtig mit der Pipettenspitze verteilt. Zum Erstarren der Agarose wurden die *CometSlides*® für 1 Stunde im Kühlschrank in 4 °C kalte Lysis Solution getaucht. Nach der Lyse wurden die Zellen für etwa 20 Minuten in kalten neutralen Elektrophoresepuffer getaucht und danach in die Elektrophoresekammer überführt. Die Elektrophorese wurde auf Eis für 45 Minuten und 1 V/cm durchgeführt. Danach wurden die *CometSlides*® für 30 Minuten in DNA-Präzipitationslösung getaucht, was der DNA-Fällung aus der wässrigen Lösung diente. Anschließend wurden die Objektträger im Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Für die Anfärbung wurden 50 µl DAPI pro Ansatz auf die Agarose gegeben und die Zellen mit einem Deckgläschen abgedichtet. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff welcher sich in die kleine Furche der DNA einlagert und mit ultraviolettem Licht angeregt und somit unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

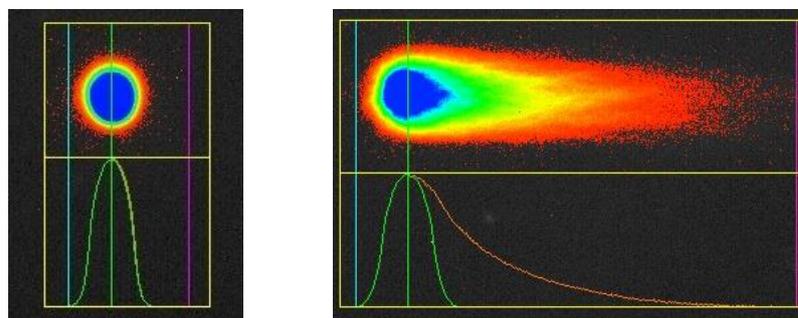


Abbildung 11 | Auswertung des ‚Comet Assay‘ mit Hilfe des Programms *Comet Assay IV*. Die erhaltenen Bilder stellen die Messprofile der untersuchten Zellen dar. Dabei zeigt das linke Bild eine Zelle die keinerlei DNA-Schaden erfahren hat, während das rechte Bild die typische Kometenform aufweist. Das Programm misst zum einen die Schweiflänge des Kometen, desweiteren werden die relativen Fluoreszenz-Intensitäten von Kopf und Schweif ermittelt. Mittels dieser Werte kann das ‚*Olive Tail moment*‘ berechnet werden und gibt das Produkt der Schweiflänge (‚*Tail Length*‘) und dem prozentualen Anteil der DNA im Schweif an.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Comet Assay IV* (ein exemplarisches Messbild ist in Abbildung 11 dargestellt), dabei gibt es verschiedene Varianten die Ergebnisse darzustellen. Zu den bekanntesten gehören die Auswertung der ‚*Tail Length*‘, des ‚*Olive Tail moments*‘ und die Fluoreszenz-Intensität von ‚*head*‘ und ‚*tail*‘. Die ‚*Tail Length*‘ beschreibt die Distanz der DNA-Migration von Zellkern aus berechnet. Das ‚*Olive Tail moment*‘ zeigt das Produkt aus ‚*Tail Length*‘ und dem prozentualen Anteil der DNA im Schweif (72). Mit Hilfe der relativen Fluoreszenz-Intensitäten von *head* und *tail* kann der prozentuale Anteil der DNA im Schweif und im Kopf ermittelt werden. Bezüglich der Aussagekraft gibt es jedoch Unterschiede, denn mittels der *Tail Length* kann keine genaue Aussage über die Quantität der DNA-Schäden getroffen werden, da schon bei relativ geringen Schäden ein Schweif zu sehen ist. Das ‚*Olive Tail moment*‘ ist der am häufigsten verwendete Parameter. Der Nachteil hierbei ist, dass dieser Wert nicht linear in Bezug zur Dosis steht. Bei der ‚*Tail intensity*‘ wird eine lineare Beziehung zur Bruch-Frequenz beschrieben und gibt somit eine quantitative Aussage.

3.2.6 ‚DNA-Damage‘ Kit

Mit Hilfe dieses ‚DNA-Damage‘ Kits der Firma PromoKine können kolorimetrisch AP- (*apurinic/aprimidinic*-) Stellen in der DNA detektiert werden. AP-Stellen beschreiben wiederum DNA-Abschnitte, die weder Purine, noch Pyrimidine aufweisen und durch DNA-Schäden hervorgerufen werden. Die Anzahl der AP-Stellen der untersuchten Zellen dient somit als Indikator für DNA-Läsionen und für die Reparatur gegen chemisch hervorgerufene Schäden. Dabei wird mit dem Reagenz ARP (*Aldehyde Reactive Probe*) gearbeitet, das wiederum mit der Aldehydgruppe des durch den DNA-Schaden geöffneten Zuckerrings reagiert und dieser dadurch markiert werden kann. Der Versuchsablauf wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt.

3.2.7 Bestimmung der Expression von ABC-Transporter am Durchflusszytometer

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, einzelne Zellpopulationen aufgrund ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften sichtbar zu machen. Um die Expression verschiedener ABC-Transporter am Durchflusszytometer zu ermitteln wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern behandelt. Dabei wurde zu jedem Dreifachansatz einer Probe jeweils eine ungefärbte Kontrolle und eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Mithilfe der ungefärbten Kontrolle konnte eine Aussage über die Eigenfluoreszenz der zu untersuchenden Zellen getroffen werden. Die

Isotypenkontrolle zeigte die Fluoreszenz, welche durch eine unspezifische Bindung, die durch die Immunglobulinklasse des verwendeten Primärantikörpers hervorgerufen wird. Dieser gemessene Wert wurde in der Auswertung von der gefärbten Probe subtrahiert.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben von Zellkulturflaschenboden gelöst und in 10 ml PBS mit 10 % FKS aufgenommen. Danach wurden jeweils 1×10^6 Zellen pro Ansatz in Rundbodenröhrchen verteilt, wobei die Zellen zentrifugiert (5 Minuten bei 1800 rpm) und der Überstand verworfen wurde. Nach einem Waschschrift mit PBS richtete sich die weitere Vorgehensweise nach dem Epitop an dem der Primärantikörper bindet (siehe 3.2.7.1 bzw. 3.2.7.2).

3.2.7.1 Extrazelluläre Färbung

Da der Antikörper gegen ABCB1 ein extrazelluläres Epitop bindet, wurden die Zellen direkt für 30 Minuten bei 4 °C mit dem Primärantikörper gegen humanes MDR1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (5 Minuten bei 1600 rpm) und der Überstand verworfen. Nach dem Waschschrift wurde der Phycoerithrin (PE)-markierte Sekundärantikörper, entsprechend der Spezies aus dem der Primärantikörper gewonnen wurde, unverdünnt hinzugefügt (10 µl) und ein weiteres Mal für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden die Proben, die für die Kontrolle des Isotyps verwendet wurden, mit der PE-markierte Isotypenkontrolle (10 µl) inkubiert. Daraufhin erfolgte ein weiterer Waschschrift und die Zellen wurden in 300 µl PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden die Proben am Durchflusszytometer *FACSCanto II* analysiert.

3.2.7.2 Intrazelluläre Färbung

Befindet sich das zu bindende Epitop intrazellulär, so müssen die Zellen vor der Antikörperfärbung permeabilisiert und fixiert werden. Dabei wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4 °C mit 100 µl einer 3,7 %-igen Paraformaldehydlösung inkubiert. Nach einem Waschschrift und erneuter Zentrifugation wurde 100 µl der *Perm/Wash*TM Lösung für 10 Minuten bei 4 °C zu den Zellen gegeben. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS und nach der Zentrifugation wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurden 10 µl des PE-markierten Zweitantikörpers unverdünnt für 30 Minuten bei 4 °C zu den Zellen gegeben. Auch bei der intrazellulären Färbung wurde zu den Kontrollen des Isotyps des Primärantikörpers 10 µl einer PE-markierte Isotypenkontrolle pipettiert. Danach

erfolgte ein letzter Waschschrift und die Zellen wurden in 300 µl PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen am Durchflusszytometer *FACSCanto II* analysiert.

3.2.8 RNA Interferenz mittels siRNA Transfektion

Der Begriff der Transfektion beschreibt im Bereich der Zellbiologie das Einbringen fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird zwischen der transienten (temporäre Einbringen von siRNA oder eines Plasmids) und der stabilen Transfektion (Einbau in das Genom der Wirtszelle) unterschieden. Mit Hilfe der RNA Interferenz (RNAi) kann durch das Einbringen einer synthetischen siRNA ein bestimmtes Protein in seiner Expression unterdrückt werden. Dabei werden die siRNA Oligonukleotide mittels Elektroporation mit dem Gerät *NEON* in die Zellen eingebracht. Die Zellen wurden in Suspension gebracht und zusammen mit der siRNA einer elektrischen Spannung ausgesetzt. Dabei wird die Zellmembran für einen kurzen Augenblick permeabel und die siRNA kann in die Zellen diffundieren. Für ein optimales Transfektionsergebnis erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 24 unterschiedlichen Elektroporationsprogrammen mit variabler Spannung, Pulslänge und Anzahl der Pulse. Bei diesem Optimierungsschritt wurde das Programm gesucht, bei dem die Effizienz der Transfektion möglichst hoch und die Mortalität der Zellen möglichst niedrig war. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion passagiert, damit sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60-80 % aufwiesen und sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Für die siRNA-vermittelte Unterdrückung der gewünschten Proteinexpression wurden je vier verschiedene siRNAs als Gemisch von *ON-TARGETplus SMARTpool* verwendet. Als Kontrollen wurden zu jedem Versuchsansatz eine siRNA Puffer Kontrolle und eine ‚*non targeting*‘ siRNA mitgeführt, wobei letztere gegen keine Ziel-Sequenz in der Zelle gerichtet war.

3.2.8.1 Transfektionsoptimierung

Für die Optimierung der Transfektion wurde eine fluoreszierende Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte siRNA verwendet. Diese ist gegen kein bestimmtes Zielgen im humanen Genom gerichtet und dient dadurch der Ermittlung der Transfektionseffizienz.

Vor Versuchsbeginn wurde eine 24-Lochplatte mit komplementiertem Medium versehen (500 µl pro Loch) und im Brutschrank bei 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben geerntet und gezählt. Dabei wurde pro Elektroporationsprogramm $1,5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt. Die gewünschte Zellzahl wurde bei 150 g zentrifugiert und anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Nach einem weiteren

Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit 297 μl Resuspensionspuffer R aufgenommen und mit 500 nM FITC-markierter siRNA versetzt. Danach wurden für jedes der 24 Elektroporationsprogramme $1,5 \times 10^5$ Zellen mit einer 10 μl Elektroporationsspitze aufgenommen und mit dem entsprechenden Programm behandelt. Die Zellen wurden danach in die vorgewärmte 24-Lochplatte gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Bestimmung der Effizienz der Transfektion und die Viabilität erfolgten am Durchflusszytometer *FACSCanto II*. Dabei wurden die Zellen zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumjodid (PI) behandelt, um zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können. Dabei werden lebende Zellen aufgrund der intakten Zellmembran nicht angefärbt, wohingegen bei toten Zellen das PI in die Zellen gelangt und infolge dessen in die DNA interkalieren kann. Für die Auswertung wurden bezüglich der Transfektionseffizienz die FITC-positiven Zellen, als auch deren prozentualer Anteil gegenüber den nicht fluoreszierenden Zellen bestimmt. Dabei gab die Signalstärke einen Aufschluss über die Anzahl der aufgenommenen siRNA-Moleküle und wurde bei der Auswahl des optimalen Transfektionsprogramms berücksichtigt.

3.2.8.2 Transfektion

Das durch die Optimierung ermittelte Transfektionsprogramm (für die entsprechende Zelllinie) wurde für alle durchgeführten Transfektionsversuche verwendet. Dabei wurden die Zellen wie bei der Transfektionsoptimierung geerntet und gezählt. Für einen Ansatz wurden $7,2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt und im Doppelansatz mit den Kontrollen (Pufferkontrolle und *non targeting* siRNA) nach dem zweiten Zentrifugationsschritt in 600 μl Resuspensionspuffer R aufgenommen. Je 200 μl der Zellsuspension wurden zu der entsprechenden siRNA mit einer Endkonzentration von 2,5 μM pipettiert. Nach erfolgter Transfektion im Elektroporationsgerät wurden die Zellen mit der 100 μl Transfektionsspitze in die entsprechende Mediummenge gegeben und auf 96-Lochplatten oder in Zellkulturflaschen aufgeteilt und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach erfolgter Inkubation konnten die Zellen entweder mit verschiedenen Stoffen behandelt werden oder in Western-Blot Analysen untersucht werden.

3.2.9 Transduktion

Die Transduktion stellt eine weitere Methode dar, um fremdes genetisches Material in Zellen einzubringen. In der Natur wird der Vorgang der Transduktion bei Bakterien durch Bakteriophagen beobachtet, wobei auf diesen Weg ein Gentransfer stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit wurden lentivirale Vektoren in Neuroblastomzellen eingebracht. Diese führten in den Zellen entweder zu einer spezifischen Überexpression oder zu einer Verminderung der Expression eines Proteins (LeGO-Vektor-System, (134)). Bei einer Proteinüberexpression wird eine für das gewünschte Protein kodierende cDNA über den lentiviralen Vektor in die Zellen gebracht. Im Falle einer Expressionsverminderung wird ebenfalls ein lentiviraler Vektor mit einer für eine shRNA kodierende Sequenz in die Zellen eingebracht, dabei wird diese in das Genom eingebaut. Die in der Zelle transkribierte shRNA wird in eine spezifische siRNA prozessiert, welche komplementär an die mRNA des Zielproteins bindet. Folglich wird diese mRNA abgebaut und das entsprechende Protein kann nicht translatiert werden.

Für die Transduktion wurden die Neuroblastomzellen in einer 24-Lochplatte bis zu einer Konfluenz von 70-80 % angezogen, am nächsten Tag der Virusüberstand (4×10^6 Viruspartikel/pro ml) in das Medium pipettiert und die Zellen für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Falle einer Selektion über eine erworbene Resistenz wurden anschließend durch die Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums die nicht-transduzierten Zellen abgetötet. Trug der eingebrachte Vektor ein Fluoreszenzgen, wurde der Erfolg der Transduktion am Fluoreszenzmikroskop und/oder am Durchflusszytometer überprüft.

3.2.10 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Für die Quantifizierung von Nukleinsäuren kann die quantitative Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) angewandt werden. Um die Menge an transkribierter mRNA ermitteln zu können, wird die isolierte RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und in einen PCR-Ansatz eingesetzt. Dabei entspricht die Versuchsabfolge der klassischen PCR, welche sich in drei Reaktionsschritte unterteilt. Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die Einzelstränge, auch als *Annealing* bekannt. Zuletzt kommt es zur Elongation, wobei die DNA-Polymerase die Einzelstränge zu zwei neuen Doppelsträngen zusammenfügt. Mit Hilfe eines *housekeeping Gens*, welches bei jeder Quantifizierung mitgeführt wird, kann die mRNA des untersuchten Gens quantifiziert werden.

3.2.10.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion der RNA erfolgte mit Hilfe des Kits *peqGOLD Total RNA*. Dabei wurden die behandelten Zellen mit 200 µl des *RNA Lysis Buffer T* lysiert und resuspendiert. Daraufhin wurde das Lysat auf eine *DNA Removing Column* gegeben und für eine

Minute bei 12000 g zentrifugiert. Der Durchfluss der Säule wurde mit gleichem Volumen 70 %-igem Ethanol gemischt und auf eine ‚*PerfectBind RNA Column*‘ gegeben. Anschließend wurde die Säule für eine Minute bei 10000 g zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Silikamembran der Säule. Diesmal wurde der Durchfluss verworfen und auf die Probe wurden 500 µl des ‚*RNA Wash Buffer I*‘ hinzugefügt, zentrifugiert (15 sec bei 10000 g) und mit 600 µl mit 100 % Ethanol komplettiertem ‚*RNA Wash Buffer II*‘ versehen. Nach einem zweiminütigem Zentrifugationsschritt bei 10000 g wurde die Säule getrocknet. Für die Eluierung der RNA von der Silikamembran, wurden 75 µl RNase-freies dH₂O direkt auf die Matrix pipettiert und bei RT für drei Minuten inkubiert. Danach wurde die Säule ein weiteres Mal für eine Minute bei 5000 g zentrifugiert. Die Konzentration der eluierte RNA wurde am *NanoDrop* bestimmt und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.10.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die isolierte RNA in cDNA („*complementary DNA*“) umgeschrieben. Dabei wurde mit dem *High Capacity RNA-to-cDNA* Kit gearbeitet. Dieses enthält einen Puffer Mix („*RT Buffer Mix 2x*“) mit dNTPs (Desoxyribonukleosid-Triphosphate) und zufällige Oktameren, die statistisch gesehen die gesamte Länge der komplementären Bereiche der RNA abdecken und somit als Primer dienen. Der *RT Enzyme Mix 20x* beinhaltet die RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) und ein RNase Inhibitor Protein. Diese Komponenten wurden zusammen mit 1 µg/µl der RNA nach Angaben des Herstellers pipettiert.

Während des Zusammenfügens der Komponenten wurde auf Eis gearbeitet, da die reverse Transkriptase bereits bei RT aktiv ist. Anschließend wurden die Proben mit folgendem Programm in den Thermocycler gestellt:

Temperatur	Zeit
37 °C	60 min
95 °C	5 min
4 °C	∞

Nach dem Umschreiben konnten die Proben bei -20 °C gelagert werden oder direkt in einen quantitativen *real-time* PCR Ansatz eingesetzt werden.

3.2.10.3 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Ähnlich der klassischen Polymerasekettenreaktion, erfolgt bei der quantitativen real-time PCR ebenfalls die Abfolge von Denaturierung, Primer Anlagerung (*„Annealing“*) und Elongation, immer abwechselnd in einer bestimmten Zyklusanzahl. Um die entstehenden Produkte der PCR in Echtzeit (*„real-time“*) messen zu können, wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR® Green verwendet. Dieser bindet an doppelsträngige DNA, wodurch eine hohe Signalstärke nach Laseranregung messbar ist. Die Stärke der Fluoreszenz gibt Aufschluss über die Menge der gebildeten PCR-Produkte, da mit der Bildung der doppelsträngigen DNA die Fluoreszenz proportional zunimmt.

Für die Auswertung wurde die relative Quantifizierung angewandt, dabei wurde das Verhältnis des Zielgens zu einem Referenzgen bestimmt. Als Referenzgen wird zumeist ein *„housekeeping“* Gen verwendet, welches in der Regel unter verschiedenen experimentellen Bedingungen seine Expression nicht verändert. In dieser Arbeit wurde die β -Aktin als Standard verwendet. Für jede zu untersuchende Probe wurde ein Doppelansatz mit den folgenden Komponenten auf Eis pipettiert:

RT-qPCR Ansatz	
IQ SYBR® Green Supermix	10 μ l
Primer <i>forward</i>	0,5 μ l
Primer <i>reverse</i>	0,5 μ l
Nuklease-freies H ₂ O	9 μ l
cDNA	1 μ l

Danach wurden die Proben im *„real-time Cycler“* mit dem nachstehenden Programm inkubiert:

		Temperatur	Zeit
Schritt 1	Aufwärmphase	50 °C	2 min
	Initialaktivierung der Polymerase	95 °C	10 min
Schritt 2 *	Denaturierung der DNA	95 °C	15 sec
	Annealing und Elongation	60 °C	1 min
* Schritt 2 wird für 40 Zyklen wiederholt			

Durch die mit der Software *SDS 2.1* (Firma Applied Biosystems) erhaltenen Daten wurde der $\Delta\Delta$ Ct-Wert ermittelt. Der Ct-Wert (*„cycle threshold“*) beschreibt die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt. Dabei

wurden die Werte mit der endogenen Kontrolle β -Aktin, sowie auf die entsprechenden unbehandelten Kontrollen normalisiert. Dieses Verhältnis wurde durch den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ausgedrückt.

3.2.11 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Western-Blot Bilder zeigen ein repräsentatives Beispiel für mindestens drei unabhängige Extraktionen. Die gezeigten Daten ergeben sich aus dem erhaltenen Mittelwert \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad *Prism* mit dem Studentschen t-Test (** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ und * $P < 0,05$).

4. Ergebnisse

4.1 Effekte von YM155 auf Neuroblastomzellen

4.1.1 Antitumorale Wirkung von YM155 auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen

Die Entwicklung einer Chemoresistenz ist einer der häufigsten Gründe für das Versagen der Chemotherapie. Der Adaptierungsprozess von Krebszellen an verschiedene Zytostatika repräsentiert ein wertvolles Modell zum Verständnis der Chemoresistenz und für die Optimierung von Therapieansätzen. Besonders negativ ist die Entwicklung einer MDR, bei der Krebszellen eine Kreuzresistenz gegen andere Zytostatika entwickeln. Um eventuelle und interessante Kreuzresistenzen gegen YM155 in einer Vorauswahl an chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen bestimmen zu können, wurden MTT-Viabilitätstest durchgeführt. Dabei wurde mit chemoresistenten Sublinien gearbeitet, die gegen verschiedene Stoffklassen von Zytostatika adaptiert wurden.

In diesem ‚*Screening*‘ wurden die Konzentrationen von YM155 bestimmt, welche das Zellwachstum um 50 % (IC_{50} ; ‚*inhibitory concentration*‘) inhibieren (Tab. 7). Anschließend wurden die IC_{50} Werte der chemoresistenten Zellen im Verhältnis zu der jeweiligen parentalen, chemosensitiven Zelllinie gesetzt, um eine Steigerung in der Sensitivität gegen YM155 festzustellen.

Tabelle 7 | Antitumorale Wirkung von YM155 auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen. Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstest wurden die Konzentrationen von YM155 ermittelt, bei welchen die Zellviabilität der Neuroblastomzellen um 50 % (IC_{50}) nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen verringert ist. Das Verhältnis der IC_{50} -Werte der chemoresistenten Sublinie im Vergleich zur entsprechenden chemosensitiven, parentalen Zelllinie ist in der rechten Spalte angezeigt.

Zelllinie	Wirkung von YM155	
	IC_{50} [nM]	Verhältnis zur chemosensitiven Zelllinie
Be(2)C	24,25 ± 1,59	--
CHP-134	2,67 ± 0,50	--
GI-ME-N	33,70 ± 2,26	--
IMR-5	7,18 ± 0,57	--
IMR-5 ^f CARBO ⁵⁰⁰⁰	8,55 ± 0,15	1,2
IMR-5 ^f CDDP ¹⁰⁰⁰	19,71 ± 2,70	2,8
IMR-5 ^f DOC ²⁰	21548,85 ± 638,12	3011,2

4. Ergebnisse

IMR-5 ^r DOX ²⁰	116,33 ± 21,58	16,2
IMR-5 ^r ETO ¹⁰⁰	8,29 ± 1,95	1,2
IMR-5 ^r GEMCI ²⁰	7,08 ± 1,20	1,0
IMR-5 ^r MELPH ³⁰⁰⁰	11,10 ± 1,57	1,6
IMR-5 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	10,18 ± 2,69	1,4
IMR-5 ^r PACLI ²⁰	440,80 ± 19,98	61,4
IMR-5 ^r TOPO ²⁰	4,88 ± 1,72	0,7
IMR-5 ^r VBA ²⁰	1608,43 ± 212,27	224,0
IMR-5 ^r VCR ¹⁰	472,87 ± 97,40	65,9
IMR-5 ^r VINO ⁵	4977,50 ± 147,15	693,3
IMR-32	7,18 ± 1,04	--
IMR-32 ^r CARBO ⁴⁰⁰⁰	9,35 ± 0,97	1,3
IMR-32 ^r DOX ²⁰	35,63 ± 2,23	5,0
IMR-32 ^r ETO ¹⁰⁰	1,53 ± 0,13	0,2
IMR-32 ^r GEMCI ²⁵	2,16 ± 0,22	0,3
IMR-32 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	0,60 ± 0,02	0,1
IMR-32 ^r TOPO ^{7,5}	0,45 ± 0,06	0,1
IMR-32 ^r VINO ⁵	16,43 ± 1,08	2,3
Kelly	1,83 ± 0,17	--
LAN-5	2,23 ± 0,12	--
LAN-6	248,10 ± 12,93	--
NGP	12,48 ± 3,01	--
NGP ^r CARBO ⁵⁰⁰⁰	112,25 ± 5,02	9,0
NGP ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	13,00 ± 0,42	1,0
NGP ^r DOC ²⁰	158,97 ± 19,52	12,7
NGP ^r DOX ²⁰	306,94 ± 78,49	24,6
NGP ^r ETO ⁴⁰⁰	59,20 ± 11,40	4,7
NGP ^r GEMCI ²⁰	41,55 ± 6,13	3,3
NGP ^r MELPH ³⁰⁰⁰	21,10 ± 3,86	1,7
NGP ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	6,93 ± 0,28	0,6
NGP ^r VBA ²⁰	7348,15 ± 613,24	588,8
NGP ^r VCR ²⁰	6986,35 ± 715,54	559,8
NLF	26,78 ± 4,04	--
NLF ^r CARBO ⁵⁰⁰⁰	340,45 ± 34,52	12,7
NLF ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	12,58 ± 5,39	0,5
NLF ^r DOC ²⁰	21,60 ± 5,98	0,8

4. Ergebnisse

NLF ^r DOX ⁴⁰	34,88 ± 4,33	1,3
NLF ^r ETO ¹⁰⁰	7,40 ± 0,54	0,3
NLF ^r GEMCI ²⁰	1,84 ± 0,47	0,1
NLF ^r MELPH ³⁰⁰⁰	15,36 ± 3,20	0,6
NLF ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	33,67 ± 2,67	1,3
NLF ^r VBA ¹⁰	38,10 ± 12,02	1,4
NLF ^r VCR ²⁰	334,5 ± 21,58	12,5
NMB	6,40 ± 0,86	--
SHEP	10,15 ± 0,84	--
SHEP ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	30,83 ± 2,24	3,0
SHEP ^r ETO ¹⁰⁰	20,24 ± 1,06	2,0
SHEP ^r VCR ¹	20,95 ± 1,45	2,1
SH-SY-5Y	31,80 ± 6,50	--
SK-N-AS	3,55 ± 0,21	--
SK-N-SH	74,90 ± 19,52	--
UKF-NB-2	4,18 ± 0,27	--
UKF-NB-2 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	318,21 ± 42,68	76,1
UKF-NB-2 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	1,15 ± 0,21	0,3
UKF-NB-2 ^r DOC ¹⁰	1107,77 ± 178,76	265,0
UKF-NB-2 ^r DOX ²⁰	346,95 ± 55,18	83,0
UKF-NB-2 ^r Nutlin ¹⁰	9,05 ± 1,04	2,2
UKF-NB-2 ^r OXALI ⁶⁰⁰	3,25 ± 0,64	0,8
UKF-NB-2 ^r VCR ¹⁰	5940,00 ± 247,25	1421,1
UKF-NB-2 ^r YM155 ²⁰	150,45 ± 19,73	36,0
UKF-NB-3	0,61 ± 0,08	--
UKF-NB-3 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	155,40 ± 24,61	254,8
UKF-NB-3 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	5,35 ± 1,21	8,8
UKF-NB-3 ^r DOC ²⁰	469,60 ± 113,08	769,8
UKF-NB-3 ^r DOX ²⁰	16075,00 ± 530,33	26352,5
UKF-NB-3 ^r ETO ¹⁰⁰	7,97 ± 0,13	13,1
UKF-NB-3 ^r GEMCI ¹⁰	0,40 ± 0,01	0,7
UKF-NB-3 ^r NUT ¹⁰	1,18 ± 0,08	1,9
UKF-NB-3 ^r NUT ¹⁰ II	0,69 ± 0,09	1,1
UKF-NB-3 ^r NUT ¹⁰ III	0,86 ± 0,04	1,4
UKF-NB-3 ^r OXALI ²⁰⁰⁰	1,80 ± 0,78	3,0
UKF-NB-3 ^r TOPO ¹⁵	7,40 ± 0,71	12,1

4. Ergebnisse

UKF-NB-3 ^r VCR ¹⁰	19,43 ± 1,17	31,9
UKF-NB-3 ^r YM155 ²⁰	302,55 ± 7,57	496,0
UKF-NB-3 Klon1	0,35 ± 0,07	--
UKF-NB-3 Klon1 ^r NUT ¹⁰ II	0,40 ± 0,11	1,1
UKF-NB-3 Klon1 ^r NUT ¹⁰ III	0,60 ± 0,08	1,7
UKF-NB-3 Klon1 ^r NUT ¹⁰ IV	0,45 ± 0,06	1,3
UKF-NB-3 Klon1 ^r NUT ¹⁰ VI	0,55 ± 0,17	1,6
UKF-NB-3 Klon1 ^r NUT ¹⁰ VIII	0,50 ± 0,14	1,4
UKF-NB-3 Klon1 ^r NUT ¹⁰ X	0,73 ± 0,27	2,1
UKF-NB-3 Klon3	0,45 ± 0,06	--
UKF-NB-3 Klon3 ^r NUT ¹⁰ I	1,50 ± 0,61	3,3
UKF-NB-3 Klon3 ^r NUT ¹⁰ VIII	0,50 ± 0,08	1,1
UKF-NB-3 Klon3 ^r NUT ¹⁰ IX	1,03 ± 0,13	2,3
UKF-NB-3 Klon3 ^r NUT ¹⁰ X	0,58 ± 0,09	1,3
UKF-NB-3 Klon5 ^r NUT ¹⁰ III	0,60 ± 0,05	--
UKF-NB-3 Klon5 ^r NUT ¹⁰ VII	1,21 ± 0,08	--
UKF-NB-3 Klon5 ^r NUT ¹⁰ X	0,40 ± 0,01	--
UKF-NB-3 Klon7 ^r NUT ¹⁰ VIII	0,60 ± 0,02	--
UKF-NB-3 Klon7 ^r NUT ¹⁰ X	0,65 ± 0,07	--
UKF-NB-5D	1,05 ± 0,21	--
UKF-NB-6	1,08 ± 0,15	--
UKF-NB-6 ^r CARBO ²⁰⁰⁰	16,83 ± 1,62	15,6
UKF-NB-6 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	67,62 ± 17,42	62,6
UKF-NB-6 ^r DOX ²⁰	11,80 ± 1,55	10,9
UKF-NB-6 ^r ETO ²⁰⁰	3,60 ± 0,01	3,3
UKF-NB-6 ^r GEMCI ¹⁰	2,11 ± 0,84	2,0
UKF-NB-6 ^r NUT ¹⁰	0,60 ± 0,14	0,6
UKF-NB-6 ^r NUT ¹⁰ I	0,50 ± 0,00	0,5
UKF-NB-6 ^r NUT ¹⁰ IV	0,41 ± 0,14	0,4
UKF-NB-6 ^r OXALI ⁴⁰⁰⁰	5,34 ± 0,71	4,9
UKF-NB-6 ^r TOPO ²⁰	3,47 ± 0,81	3,2
UKF-NB-6 ^r VCR ¹⁰	64,20 ± 9,48	59,4
UKF-NB-6 ^r VINO ⁴⁰	228,53 ± 41,54	211,6
UKF-NB-6 ^r YM155 ²⁰	185,92 ± 35,76	172,2

Die für YM155 ermittelten IC_{50} Werte der hier untersuchten Neuroblastomzelllinien reichten von 0,35 nM in UKF-NB-3 Klon1 bis 21548,85 nM in IMR-5^rDOC²⁰. Für die parentalen, chemosensitiven Zelllinien ergab sich ein IC_{50} -Bereich von 0,61 nM für UKF-NB-3 bis 248,1 nM in LAN-6 Zellen. Darüber hinaus wurde das Verhältnis der entsprechenden chemoresistenten Zelle zu ihrer chemosensitiven Zelle ermittelt (Tab. 7; rechte Spalte). Die verwendeten chemoresistenten Neuroblastomzellen wurden gegen eine Reihe von Zytostatika der Stoffklasse der Vincaalkaloide (Vincristin, Vinorelbin, Vinblastin), Platinderivate (Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin), Taxane (Docetaxel, Paclitaxel) und der Topoisomerase I/II Hemmer (Doxorubicin, Etoposid, Topotecan) adaptiert.

Eine starke Kreuzresistenz zu YM155 zeigten nahezu alle chemoresistenten Neuroblastomzellen, die gegen Docetaxel, Doxorubicin, Vincristin, Vinorelbin und Vinblastin adaptiert wurden. Dabei reichte das ermittelte Verhältnis des IC_{50} Wertes der chemoresistenten Zelllinie zur jeweiligen chemosensitiven Zelle von einem maximalen Faktor von 3011 für IMR-5^rDOC²⁰ bis minimal zu einem Faktor von 0,8 für NLF^rDOC²⁰. Die gegen Cisplatin (Faktorbereich 0,3 bis 62), Etoposid (Faktorbereich 0,2 bis 13,1) und Gemcitabin (Faktorbereich 0,1 bis 3,3) adaptierten Zellen zeigten ein sehr heterogenes Bild bezüglich der Kreuzresistenz gegenüber YM155. Die Adaptierung an diese drei genannten Stoffe hatte somit abhängig von der jeweiligen parentalen Zelllinie eine Sensitivierung oder eine Kreuzresistenz gegen YM155 zur Folge.

4.1.2 Charakterisierung von YM155 adaptierten Neuroblastomzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden parentale Neuroblastom-, sowie Prostatakarzinom- und Mammakarzinom-Zelllinien schrittweise mit steigenden Konzentrationen von YM155 bis zu einer Endkonzentration von 20 nM (300 nM für 22RV1) adaptiert. Mit Hilfe dieser Zelllinien ist es möglich eine entwickelte YM155 Resistenz bezüglich ihres Resistenzmechanismus näher zu untersuchen.

Da in den vorangegangenen Viabilitätstests größtenteils die Zellen, die gegen bekannte ABCB1 Substrate (z.B. Docetaxel, Doxorubicin, sowie die Vincaalkaloide, Vincristin und Vinblastin) adaptiert wurden auch eine Kreuzresistenz gegen YM155 zeigten, wurden in weiteren MTT Viabilitätstests die YM155-adaptierten Neuroblastomzellen vorerst gegen YM155 im Vergleich zu ihren parentalen Ausgangszellen untersucht und anschließend in Kombination mit ABCB1 Inhibitoren in nicht-toxischen Konzentrationen behandelt. Die ermittelten IC_{50} Werte sind Tabelle 8 zu entnehmen. Mit dem Einsatz von verschiedenen ABCB1-Inhibitoren ist es möglich die

4. Ergebnisse

Sensitivität der Zellen gegenüber Zytostatika, die ein ABCB1-Substrat darstellen, wieder herzustellen. In dieser Arbeit wurde mit den Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar gearbeitet. Verapamil ist in erster Linie ein Calciumkanalblocker und wird seit Jahren bei der Behandlung von koronarer Herzkrankheit, Störungen der Arrhythmie, Bluthochdrucks, sowie von Cluster-Kopfschmerz eingesetzt (135, 136). Es ist allerdings auch ein Inhibitor von verschiedenen ABC-Transportern, darunter zählen neben ABCB1 (MDR1), auch ABCC1 (MRP1) und ABCG2 (BCRP) (137, 138). Da die Inhibierung in diesem Fall unspezifisch gegen ABCB1 erfolgt, wurde zusätzlich mit dem hochspezifischen ABCB1-Inhibitor Zosuquidar (LY335979) gearbeitet (139).

Tabelle 8 | IC₅₀ Wert der parentalen und YM155 resistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen gegen YM155 in Kombination mit 10 µM Verapamil oder 1,25 µM Zosuquidar. Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests wurden IC₅₀ Werte ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine Kombinationsbehandlung von YM155 mit den ABCB1 Inhibitoren Verapamil (10 µM) bzw. Zosuquidar (1,25 µM). ***P<0,001; **P<0,01; *P<0,05 im Verhältnis zu der jeweiligen parentalen Zelllinie oder bei einer Verapamil bzw. Zosuquidar Kombinationsbehandlung im Verhältnis zu IC₅₀ Wert gegen YM155 (--). ¹Verhältnis zu den jeweiligen parentalen Zelllinien. ²Verhältnis zu den nicht mit Verapamil bzw. Zosuquidar behandelten Zellen.

Zelllinie	IC ₅₀ YM155 [nM]		
	--	+ Verapamil (10 µM)	+ Zosuquidar (1,25 µM)
UKF-NB-3	0,61 ± 0,08	0,61 ± 0,13 (² 1,0)	0,74 ± 0,10 (² 0,8)
UKF-NB-3^rYM155²⁰	302,55 ± 7,57*** (¹ 495,9)	90,54 ± 5,87*** (² 3,3)	34,90 ± 0,98*** (² 8,7)
UKF-NB-6	1,08 ± 0,15	0,35 ± 0,06* (² 3,1)	0,30 ± 0,01** (² 3,6)
UKF-NB-6^rYM155²⁰	185,92 ± 35,76* (¹ 172,2)	22,50 ± 1,73*** (² 8,3)	25,38 ± 2,73** (² 7,3)

Die Viabilitätsdaten zeigen, dass die an YM155 adaptierten Sublinien eine geringere Sensitivität gegenüber YM155 und somit eine erfolgreich entwickelte Resistenz aufweisen. Dabei ist bei UKF-NB-3^rYM155²⁰ (IC₅₀: 302,55 ± 7,57 nM) eine fast 500-fach verringerte Sensitivität gegenüber YM155 im Vergleich zu der chemosensitiven Linie UKF-NB-3 (IC₅₀: 0,61 ± 0,08 nM) zu beobachten. Im Fall von UKF-NB-6^rYM155²⁰ ist eine Reduktion der Sensitivität um den Faktor 172 messbar (UKF-NB-6^rYM155²⁰ IC₅₀: 185,92 ± 35,76 nM; UKF-NB-6 IC₅₀: 1,08 ± 0,15 nM). Durch die kombinierte Behandlung von YM155 mit den Inhibitoren Verapamil (10 µM) oder Zosuquidar (1,25 µM) zeigt die parentale Linie UKF-NB-3 keine Veränderung des IC₅₀ Wertes. Bei UKF-NB-6 verringert sich dagegen der IC₅₀ Wert von 1,08 ± 0,15 nM auf 0,35 ± 0,06 nM

durch die Zugabe von 10 μM Verapamil, sowie auf $0,30 \pm 0,01$ nM mit 1,25 μM Zosuquidar. Bei den YM155 resistenten Sublinien zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Sensitivität durch den Einsatz dieser Inhibitoren. Bei UKF-NB-3^rYM155²⁰ wird der IC_{50} Wert von $302,55 \pm 7,57$ nM in der Kombination mit Zosuquidar auf $34,90 \pm 0,98$ nM (Faktor 8,7) und mit Verapamil auf $90,54 \pm 5,87$ nM (Faktor 3,3) reduziert, erreichen jedoch nicht den parentalen Wert. Das gleiche Muster ist auch bei UKF-NB-6^rYM155²⁰ zu beobachten, dabei zeigt der IC_{50} Wert für YM155 in der an 20 nM YM155 adaptierten UKF-NB-6^rYM155²⁰ Zellen (IC_{50} : $185,92 \pm 35,76$ nM) eine Reduktion um den Faktor 8,3 mit Verapamil (IC_{50} : $22,50 \pm 1,73$ nM) und um den Faktor 7,3 mit Zosuquidar (IC_{50} : $25,38 \pm 2,73$ nM) im Vergleich zu der parentalen Linie. Durch die Zugabe von Verapamil oder Zosuquidar erfolgt jeweils eine Steigerung der Sensitivität der Zellen gegenüber YM155. Allerdings ist ein Erreichen des parentalen Niveaus bei allen YM155 adaptierten Zelllinien durch die Inhibitor Zugabe nicht gegeben.

Aufgrund des Selektionsdrucks können Tumorzellen die Expression einer Reihe von ABC-Transporter induzieren, welche wiederum für die Resistenzentwicklung dieser Zellen verantwortlich sind (128, 140). Da die Behandlung mit den ABCB1-Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar die Sensitivität der an YM155 adaptierten Zellen gegenüber YM155 beeinflusst, wurde in den etablierten UKF-NB-3^rYM155²⁰ und UKF-NB-6^rYM155²⁰ neben der ABCB1 Expression, die Expression der ABC-Transporter ABCG2 und ABCC1 überprüft (Abb. 12).

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, zeigen lediglich die an 20 nM YM155 adaptierten UKF-NB-3^rYM155²⁰ Zellen eine erhöhte ABCB1 Expression, während bei UKF-NB-6^rYM155²⁰ keine Erhöhung in der ABCB1 Expression zu beobachten war (Abb. 12 A). Die Adaptierung zeigt darüber hinaus keinen Einfluss auf die Expression von ABCG2 und ABCC1 in den untersuchten Zellen.

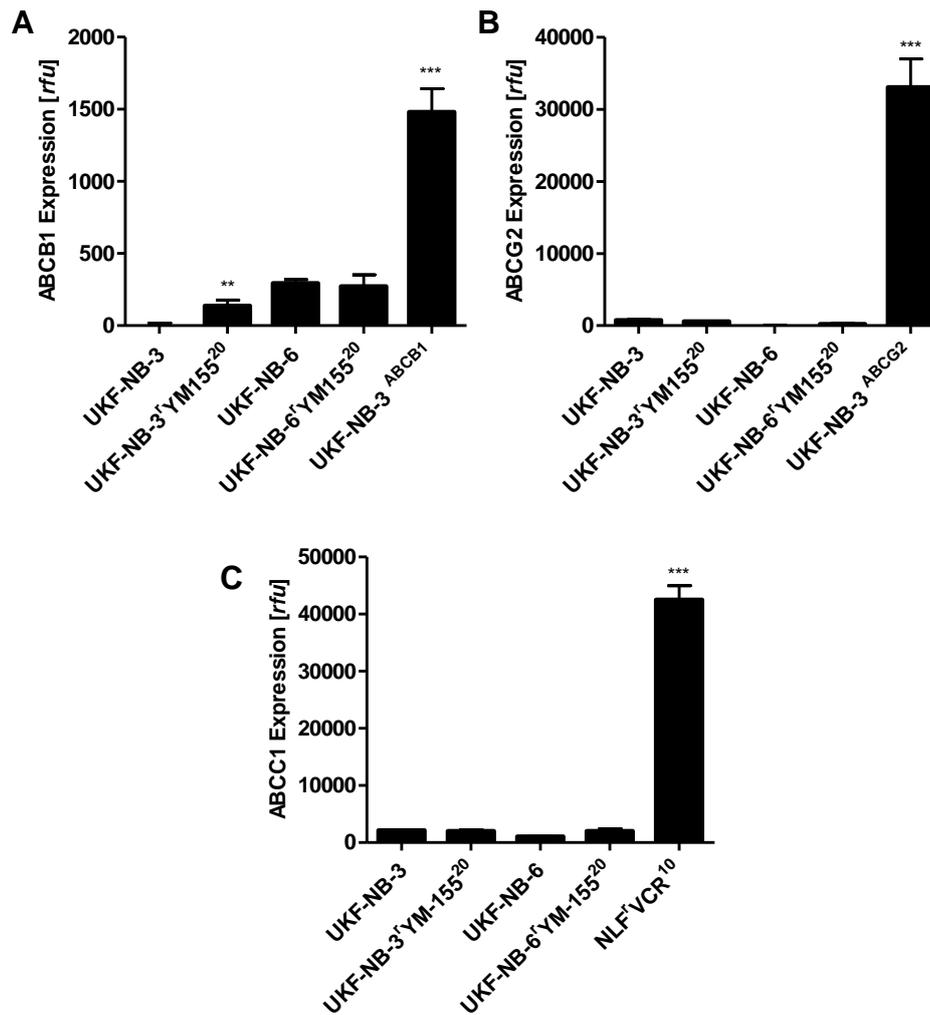


Abbildung 12 | ABCB1, ABCC1 und ABCG2 Expression in YM155 adaptierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen im Vergleich zu den parentalen, chemosensitiven Linien. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der ABC-Transporter **A) ABCB1**, **B) ABCG2** und **C) ABCC1** mit spezifischen Antikörpern in UKF-NB-3, UKF-NB-3'YM155²⁰, UKF-NB-6 und UKF-NB-6'YM155²⁰ ermittelt. Als Positivkontrolle wurde für ABCB1 die ABCB1 überexprimierende UKF-NB-3^{ABCB1} Zelle mitgeführt. Für ABCG2 diente eine für ABCG2 überexprimierende UKF-NB-3 Zelle, während als ABCC1 Positivkontrolle die an 10 ng/ml Vincristin adaptierte NLF^{VCR}¹⁰ mitgeführt wurde. ***P<0,001, **P<0,01 im Vergleich zu UKF-NB-3 bzw. UKF-NB-6.

Die an YM155 adaptierten UKF-NB-3'YM155²⁰ Zellen wurden nachfolgend auf mögliche Kreuzresistenzen gegenüber anderen Chemotherapeutika, darunter auch bekannten ABCB1 Substrate, untersucht. Die ermittelten IC₅₀ Werte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

In den folgenden Experimenten wurde für initiale Experimente mit den beiden Neuroblastomzellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6 gearbeitet, um somit zellspezifische Effekte auszuschließen. Für alle weiterführenden Experimente wurde der Fokus auf UKF-NB-3 gelegt.

4. Ergebnisse

Tabelle 9 | Kreuzresistenzen der an YM155 adaptierte UKF-NB-3^{YM155}20 Zelle. Gezeigt sind die IC₅₀ Werte, im Vergleich zu den parentalen, chemosensitiven UKF-NB-3 Zelle. ¹Verhältnis zum IC₅₀ Wert der parentalen, chemosensitiven UKF-NB-3 Zelle.

Zytostatikum	IC ₅₀ [ng/ml]	
	UKF-NB-3	UKF-NB-3 ^{YM155} 20
Carboplatin (CARBO)	508,54 ± 55,69	1144,61 ± 710,98 (¹ 2,3)
Cisplatin (CDDP)	175,74 ± 11,26	193,89 ± 8,59 (¹ 0,7)
Dacarbazin (DACARB)	4643,48 ± 321,37	1977,44 ± 86,38 (¹ 0,4)
Docetaxel (DOC)	0,25 ± 0,01	0,57 ± 0,04 (¹ 2,3)
Doxorubicin (DOX)	2,00 ± 0,10	5,76 ± 0,11 (¹ 2,9)
Etoposid (ETO)	26,64 ± 8,44	25,59 ± 14,93 (¹ 0,9)
Gemcitabin (GEMCI)	1,07 ± 0,09	1,13 ± 0,29 (¹ 1,1)
Melphalan (MELPH)	255,50 ± 38,85	309,13 ± 50,22 (¹ 1,2)
Oxaliplatin (OXALI)	204,82 ± 7,67	292,06 ± 73,65 (¹ 1,4)
Paclitaxel (PACLI)	1,32 ± 0,19	11,95 ± 8,85 (¹ 9,1)
Topotecan (TOPO)	2,21 ± 0,26	1,85 ± 0,33 (¹ 0,8)
Vinblastin (VBA)	0,19 ± 0,02	0,36 ± 0,06 (¹ 1,9)
Vincristin (VCR)	0,13 ± 0,06	0,66 ± 0,09 (¹ 5,1)
Vinorelbin (VINOR)	0,29 ± 0,05	0,92 ± 0,06 (¹ 3,2)

Die an YM155 adaptierten UKF-NB-3 Zellen zeigen im MTT-Viabilitätstest gegen einige der getesteten Zytostatika eine deutliche Kreuzresistenz. Im Vergleich zu der parentalen, chemosensitiven UKF-NB-3 Zelllinie ist gegenüber den Taxanen, Docetaxel (IC₅₀ 2,3-fach erhöht) und Paclitaxel (IC₅₀ 9,1-fach erhöht) eine starke Kreuzresistenz in UKF-NB-3^{YM155}20 zu beobachten. Der IC₅₀ Wert ist ebenfalls für die Vincaalkaloide Vincristin (IC₅₀ 5,1-fach erhöht), Vinblastin (IC₅₀ 1,9-fach erhöht) und Vinorelbin (IC₅₀ 3,2-fach erhöht) deutlich erhöht. Auch für Doxorubicin (Faktor 2,9) und Carboplatin (Faktor 2,3) ist die Konzentration, welche die Viabilität der Zellen um 50 % vermindert (IC₅₀), im Vergleich zur parentalen UKF-NB-3 Zelle erhöht. Alle bis jetzt aufgezählten Zytostatika sind auch bereits beschriebene ABCB1 Substrate. Dagegen zeigt sich bei CDDP (Faktor 0,7), DACARB (Faktor 0,4), Etoposid (Faktor 0,9), Gemcitabin (Faktor 1,1), Melphalan (Faktor 1,2), Oxaliplatin (Faktor 1,4) und Topotecan (Faktor 0,8) keine Kreuzresistenz gegen YM155.

Da andere Proteine, wie SLC35F2 oder p53, einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von YM155 haben können (siehe Abschnitte 2.2.2 und 2.5), wurden in den etablierten UKF-NB-3^{YM155}20, neben der bereits gezeigten erhöhten ABCB1 Expression, die Proteinlevel von SLC35F2, p53 und Survivin überprüft (Abb. 13).

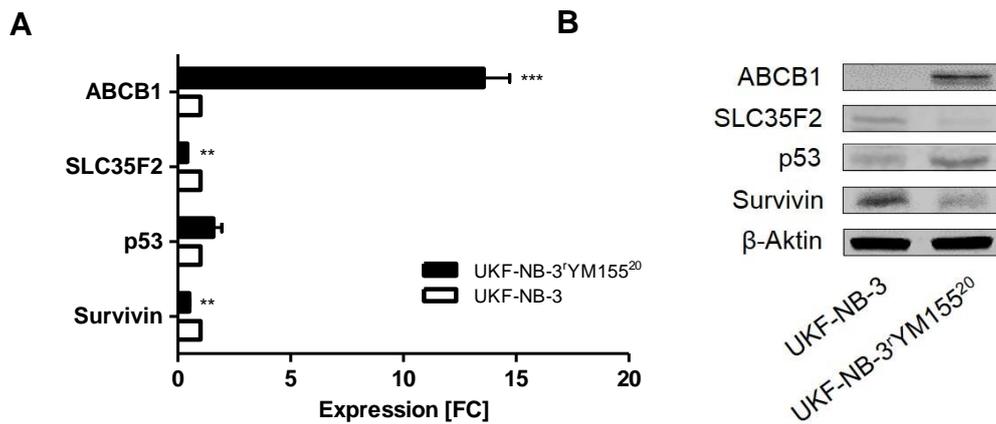


Abbildung 13 | Der Adaptierungsprozess an YM155 zeigt in UKF-NB-3 einen Einfluss auf die basale Expression ausgewählter Proteine. A) Die Quantifizierung erfolgte am Odyssey Gerät, wobei unter Berücksichtigung der Ladekontrolle β -Aktin, die Expression der UKF-NB-3^rYM155²⁰ im Verhältnis zu der parentalen UKF-NB-3 Zelle gesetzt wurde. **B)** Western-Blot Analysen für die Expression von ABCB1, SLC35F2, p53 und Survivin. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ als Quotient zu UKF-NB-3.

Als Folge des Prozesses der Adaptierung zeigt sich, wie bereits zuvor beobachtet, eine deutliche Erhöhung in der ABCB1 Expression (nahezu 14-fach im Vergleich zu UKF-NB-3), sowie eine signifikante Erniedrigung der SLC35F2 Expression (eine Reduktion um 58 %) in UKF-NB-3^rYM155²⁰. Eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung in der p53 Expression (von 1 in UKF-NB-3 auf 1,57 für UKF-NB-3^rYM155²⁰), als auch eine Halbierung der Survivin Expression zeigt sich als Resultat der YM155 Adaptierung. Aufgrund dessen wurde in UKF-NB-3 und UKF-NB-3^rYM155²⁰ untersucht inwiefern sich eine siRNA-bedingte Survivin Reduktion auf die Zellviabilität auswirkt, welche wiederum der Survivin-inhibierenden Wirkung von YM155 entsprechen würde (Abb. 14).

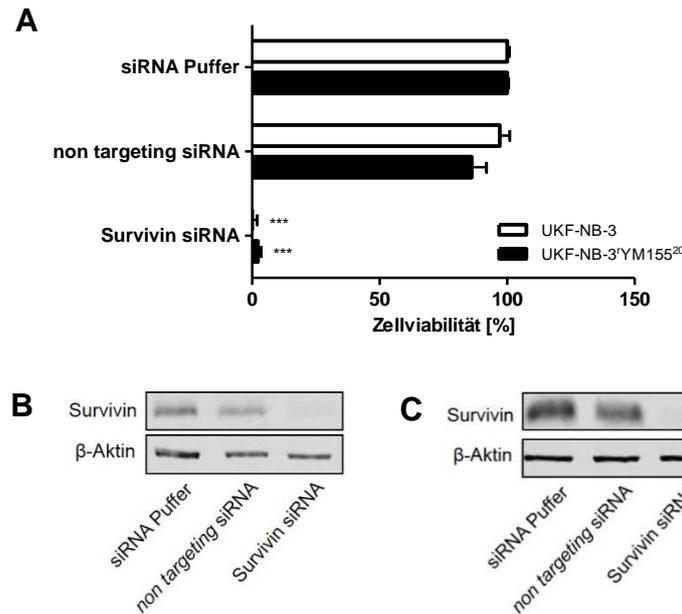


Abbildung 14 | Einfluss der siRNA-vermittelten Survivin Depletierung auf die Zellviabilität in UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{YM155}. A) Die Survivin Expression wurde durch die Transfektion mit spezifischer siRNA unterdrückt und anschließend die Zellviabilität im MTT-Viabilitätstest ermittelt. Als Kontrollen wurden eine Pufferkontrolle, sowie eine ‚non targeting‘ siRNA mitgeführt. In Western-Blot Analysen wurde die Survivin siRNA Transfektion für (B) UKF-NB-3 und (C) UKF-NB-3^{YM155} bestätigt, dabei dient β-Aktin als Ladekontrolle. ***P<0,001 im Verhältnis zu der Puffer Kontrolle.

Dabei zeigt sich, dass sowohl bei der chemosensitiven parentalen UKF-NB-3 Zelle, als auch bei der an 20 nM YM155 adaptierten UKF-NB-3 Zelle durch die Survivin siRNA Transfektion die Zellviabilität signifikant herabgesetzt wird. Bei UKF-NB-3 sind im Verhältnis zu der Pufferkontrolle keine vitalen Zellen zu detektieren, während bei UKF-NB-3^{YM155} ein geringer Prozentsatz von 2,3 % überlebt.

4.2 Einfluss der ABCB1 und SLC35F2 Expression auf die Wirksamkeit von YM155 in Neuroblastomzellen

4.2.1 Einfluss von ABCB1 auf die Sensitivität gegenüber YM155 in Neuroblastomzellen

Der ABC-Transporter ABCB1 ist ein entscheidender Faktor bei der Resistenzentstehung. Dabei transportiert ABCB1 entsprechende Zytostatika aus der Zelle heraus (Efflux), so dass diese ihre Wirkung in den behandelten Zellen nicht entfalten können. Zu den bekannten ABCB1 Substraten, welche auch häufig in der Krebstherapie eingesetzt werden, gehören Zytostatika der Stoffklassen der Vincaalkaloide (Vincristin, Vinblastin und Vinorelbin), Taxane (z.B. Docetaxel),

4. Ergebnisse

Anthracycline (Doxorubicin), sowie einige andere Topoisomerasehemmer (z.B. Etoposid). YM155 wird ebenfalls als ABCB1 Substrat beschrieben (102).

Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests ist es möglich die Sensitivität einer Auswahl von Neuroblastomzellen gegenüber YM155 anhand des IC₅₀ Wertes zu ermitteln. Durch die Kombinationsbehandlung von YM155 mit den ABCB1-Inhibitoren Verapamil (10 µM) und Zosuquidar (1,25 µM), soll überprüft werden, ob der IC₅₀ Wert gegenüber YM155 durch die ABCB1-Inhibierung verändert wird. Als Modellzelllinien dienen in den nachfolgenden Experimenten die Neuroblastomzellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6.

Tabelle 10 | IC₅₀ Werte von chemosensitiven und chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen gegen YM155 in Kombination mit Verapamil und Zosuquidar. Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests wurde der IC₅₀ Wert gegen YM155 ermittelt. Durch die kombinierte Behandlung von YM155 mit 10 µM Verapamil bzw. 1,25 µM Zosuquidar wurde anhand der ermittelten IC₅₀ Werte der Einfluss des ABC-Transporters ABCB1 untersucht. ¹Faktor der die Sensitivität der Zellen gegen YM155 verringert wurde. ²Faktor der durch die Zugabe von Verapamil bzw. Zosuquidar die Sensitivität der Zellen gegen YM155 erhöht wurde. ***P<0,001; **P<0,01; *P<0,05 im Vergleich zur jeweiligen parentalen Zelle oder bei der Kombinationsbehandlung mit Verapamil bzw. Zosuquidar zum IC₅₀ Wert gegen YM155 (-).

Zelllinie	IC ₅₀ YM155 [nM]		
	--	+ Verapamil (10 µM)	+ Zosuquidar (1,25 µM)
UKF-NB-3	0,62 ± 0,04	0,78 ± 0,13 (² 0,8)	0,82 ± 0,10 (² 0,8)
UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰	5,35 ± 1,21* (¹ 8,6)	9,76 ± 0,75* (² 0,6)	10,49 ± 1,34* (² 0,5)
UKF-NB-3^rDOX²⁰	16075,00 ± 530,33*** (¹ 25927,4)	34,40 ± 11,73* (² 467,3)	1,70 ± 0,49*** (² 9455,9)
UKF-NB-3^rVCR¹⁰	19,43 ± 1,17* (¹ 31,3)	2,39 ± 0,23* (² 8,1)	1,35 ± 0,21* (² 14,4)
UKF-NB-3^rYM155²⁰	310,76 ± 5,28*** (¹ 501,2)	90,54 ± 3,14*** (² 3,4)	34,93 ± 1,61*** (² 8,9)
UKF-NB-3^{ABCB1}	2065,25 ± 137,89* (¹ 3331,1)	5,40 ± 0,27** (² 382,5)	1,10 ± 0,05** (² 1877,5)
UKF-NB-6	1,08 ± 0,15	0,58 ± 0,07* (² 1,9)	0,47 ± 0,07* (² 2,3)
UKF-NB-6^rCDDP¹⁰⁰⁰	67,62 ± 17,42* (¹ 62,6)	21,72 ± 1,87* (² 3,1)	7,34 ± 0,96* (² 9,2)
UKF-NB-6^rDOX²⁰	11,80 ± 1,55* (¹ 10,9)	1,35 ± 0,35* (² 8,7)	0,60 ± 0,07* (² 19,7)
UKF-NB-6^rVCR¹⁰	64,20 ± 9,48* (¹ 59,4)	3,60 ± 0,12* (² 17,8)	0,07 ± 0,01* (² 917,1)

4. Ergebnisse

UKF-NB-6^rYM155²⁰	190,55 ± 28,11*** (¹ 176,4)	22,50 ± 2,99* (² 8,5)	25,38 ± 1,73* (² 7,5)
UKF-NB-6^{ABC}B1	1013,46 ± 99,46* (¹ 938,4)	1,70 ± 0,05* (² 596,2)	0,40 ± 0,06* (² 2533,7)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Sublinien zeigen alle eine Kreuzresistenz gegenüber YM155 (Tab. 10). Dabei zeigt besonders die UKF-NB-3^rDOX²⁰ Sublinie eine starke Resistenz gegenüber YM155 mit einem 25927-fach höherem IC₅₀ Wert im Vergleich zur chemosensitiven Linie. Aber auch die restlichen chemoresistenten UKF-NB-3 Sublinien zeigen eine geringere Sensitivität gegen YM155 (Faktor von 8,6 bis 501,2). Ein ähnliches Bild ist bei den chemoresistenten UKF-NB-6 Sublinien zu beobachten. Dabei weisen diese Zellen eine zwischen 10,9- bis 176-fach geringere Sensitivität gegen YM155 auf.

Durch die Behandlung mit den ABCB1 Inhibitoren Verapamil (10 µM) und Zosuquidar (1,25 µM) ist zu erkennen, dass die meisten der chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Sublinien bezüglich der YM155 Behandlung resensitiviert werden können. Dabei ist der Effekt der Resensitivierung durch die kombinierte Behandlung von YM155 mit Zosuquidar bei den meisten Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei der Kombination mit Verapamil. Ein prägnantes Beispiel hierzu zeigt wiederum die UKF-NB-3^rDOX²⁰ Zelle. Dabei lässt sich für diese Zelllinie ein IC₅₀ Wert gegen YM155 von 16075,00 ± 530,33 nM ermitteln, während in der Kombination mit Verapamil die Sensitivität um den Faktor 467 (IC₅₀ Wert von 34,40 ± 11,73 nM), und mit Zosuquidar 9455-fach (IC₅₀: 1,70 ± 0,49 nM) erhöht wird.

Der Einfluss von ABCB1 auf die YM155 Sensitivität der Neuroblastomzellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6 lässt sich sehr deutlich anhand der ABCB1 überexprimierenden Zellen (UKF-NB-3^{ABC}B1 und UKF-NB-6^{ABC}B1) veranschaulichen (Abb. 15).

4. Ergebnisse

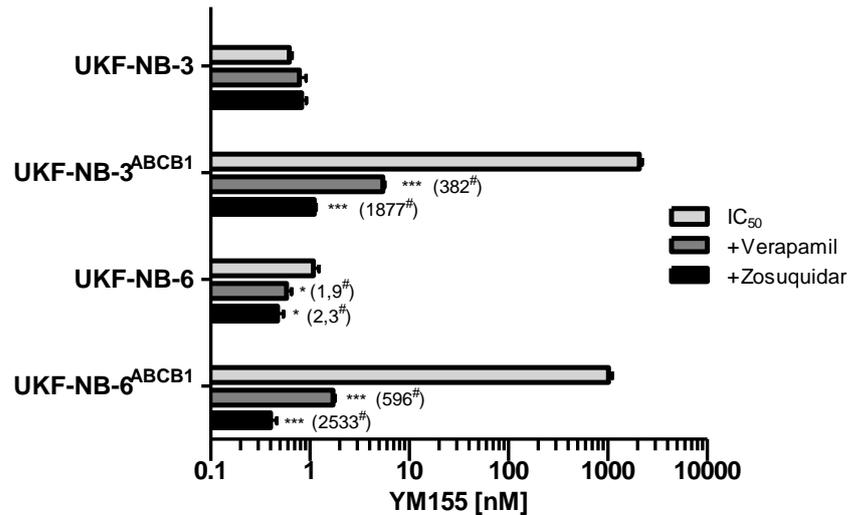


Abbildung 15 | IC₅₀ Werte der parentalen UKF-NB-3 und UKF-NB-6 sowie der ABCB1 überexprimierenden Zellen in Kombination mit den Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar. Zu den eigentlichen IC₅₀ Werten gegen YM155 sind zusätzlich die ermittelten IC₅₀ Werte gegen YM155 in Kombination mit 10 µM Verapamil bzw. 1,25 µM Zosuquidar dargestellt. ***P<0,001 im Verhältnis zum IC₅₀ Wert gegen YM155 alleine; [#]Faktor der Reduktion des IC₅₀ Wertes mit Einsatz der Inhibitoren im Vergleich zu den einfachen IC₅₀-Werten.

Die kombinierte Behandlung von YM155 mit 10 µM Verapamil beziehungsweise 1,25 µM Zosuquidar zeigt keinen Einfluss auf die Zellviabilität der UKF-NB-3 Zelllinie (IC₅₀: 0,62 ± 0,04 nM; IC₅₀ mit Verapamil 0,78 ± 0,13 nM; IC₅₀ mit Zosuquidar 0,82 ± 0,10 nM) (Abb. 15). Bei UKF-NB-6 dagegen zeigt sich durch die Zugabe der Inhibitoren eine leichte Reduktion des IC₅₀ Wertes (IC₅₀: 1,08 ± 0,15 nM; IC₅₀ mit Verapamil 0,58 ± 0,07 nM; IC₅₀ mit Zosuquidar 0,47 ± 0,07 nM). Deutlicher ist der Effekt bei den ABCB1 überexprimierenden Zellen UKF-NB-3^{ABCB1} und UKF-NB-6^{ABCB1} zu beobachten. Hier sinkt die Zellviabilität um ein Hundertfaches durch die Zugabe von Verapamil und gar um mehr als das Tausendfache durch die Kombinationsbehandlung von YM155 mit Zosuquidar. Der IC₅₀ Wert für YM155 bei UKF-NB-3^{ABCB1} (IC₅₀: 2065,25 ± 137,89 nM) sinkt mit der Kombination mit Verapamil um den Faktor 382 auf einen IC₅₀ Wert von 5,40 ± 0,27 nM und mit Zosuquidar um das 1877-Fache (IC₅₀: 1,10 ± 0,05 nM). Bei UKF-NB-6^{ABCB1} ist der Effekt deutlich größer, während der IC₅₀ gegen YM155 bei 1013,46 ± 99,46 nM liegt, wird in Kombination mit Verapamil die Sensitivität der Zellen um das 596-fache herabgesetzt (IC₅₀: 1,70 ± 0,05 nM) und mit Zosuquidar um das 2533-fache (IC₅₀: 0,40 ± 0,06 nM) reduziert. Im Fall von UKF-NB-6^{ABCB1} erfolgt durch die Zugabe von 1,25 µM Zosuquidar eine Sensitivierung auf das Niveau des IC₅₀ Wertes der parentalen Zelle.

4. Ergebnisse

Um grundlegend den ABCB1 Status bei einer Auswahl an chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen zu ermitteln, wurden Western-Blot und Analysen am Durchflusszytometer durchgeführt (Abb. 16 und 17).

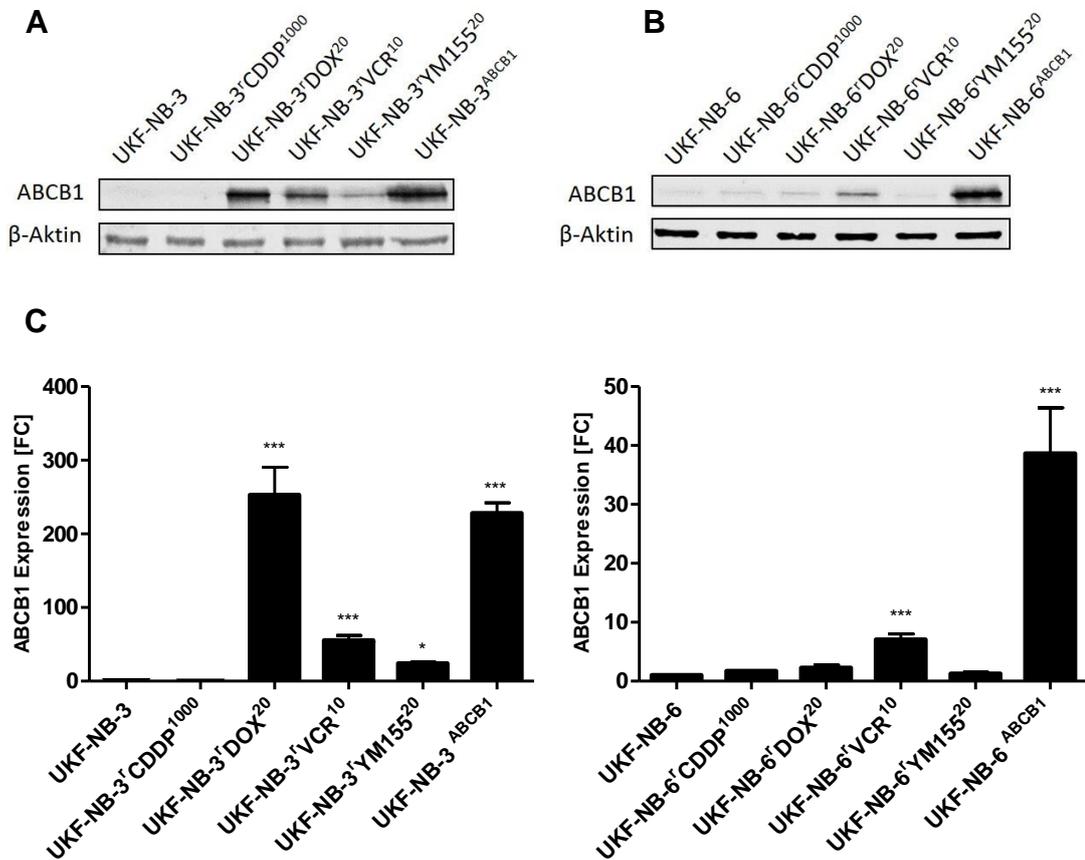


Abbildung 16 | ABCB1 Expression in chemosensitiven und chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zelllinien. Mittels Western-Blot wurde die ABCB1 Expression in verschiedenen **A)** UKF-NB-3 und **B)** UKF-NB-6 Zellen bestimmt. **C)** Für die Berechnung der Quantifizierung wurde die β -Aktin Ladekontrolle berücksichtigt und auf die jeweilige chemosensitive, parentale Zelle bezogen. *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ im Vergleich zu der jeweilige parentale Zelllinie.

Im Western-Blot zeigt sich, dass ABCB1 in einer Reihe von chemoresistenten UKF-NB-3 Sublinien exprimiert wird. Dies scheint bei UKF-NB-3^rDOX²⁰, UKF-NB-3^rVCR¹⁰, sowie UKF-NB-3^rYM155²⁰ ein entscheidender Faktor bei der verringerten Sensitivität gegenüber YM155 zu sein (Abb. 16 A). Bei der parentalen Linie UKF-NB-3, als auch bei UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰ ist keine ABCB1 Expression zu beobachten. Dies wird durch die Quantifizierung des Western-Blots bestätigt (siehe Abb. 16 C). Im Falle der UKF-NB-6 Linien zeigt sich von vornherein eine leichte ABCB1 Expression bei den parentalen UKF-NB-6 Zellen. Eine signifikant höhere Expression ist bei UKF-NB-6^rVCR¹⁰ zu beobachten (Abb. 16 B). Als Positivkontrollen wurde die ABCB1 überexprimierenden UKF-NB-3^{ABCB1} und UKF-NB-6^{ABCB1} mitgeführt, welche eine deutliche ABCB1 Expression aufweisen.

Mit durchflusszytometrischen Analysen bestätigten sich die ABCB1 Expressionen in den untersuchten Zelllinien annähernd im Vergleich zu den Western-Blot Quantifizierungen.

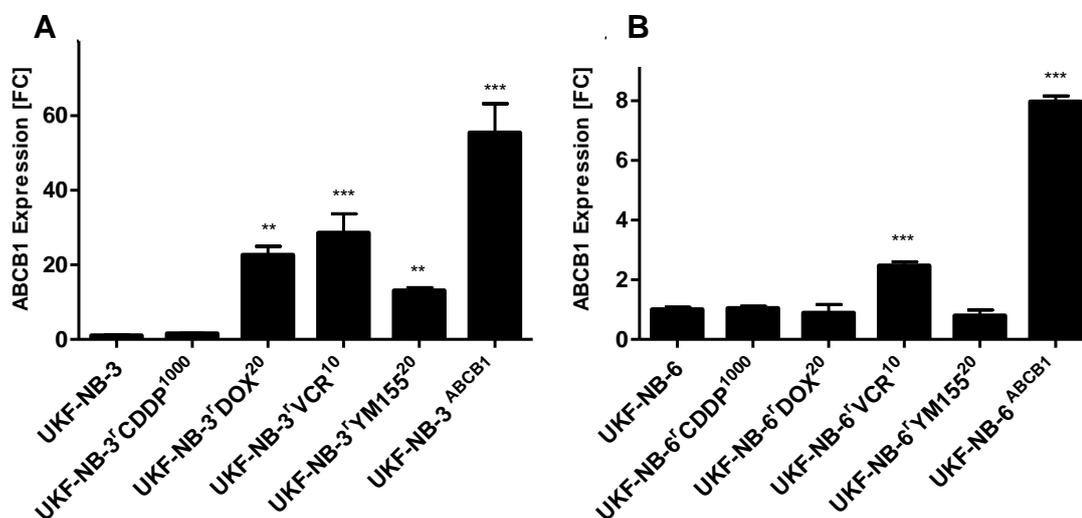


Abbildung 17 | Messung der ABCB1 Expression von UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen am Durchflusszytometer. A) UKF-NB-3 und B) UKF-NB-6 Sublinien wurden am Durchflusszytometer bestimmt. *P<0,001; **P<0,01 bezogen auf die jeweilige chemosensitive Zelllinie.**

Dabei ergibt sich durch die Messungen am Durchflusszytometer (Abb. 17) eine ABCB1 Expression der UKF-NB-3^{DOX²⁰}, UKF-NB-3^{VCR¹⁰} und UKF-NB-3^{YM155²⁰} Sublinien, wohingegen die parentale Linie UKF-NB-3, sowie UKF-NB-3^{CDDP¹⁰⁰⁰} keine ABCB1 Expression zeigen. Im Vergleich der Western-Blot Daten mit den am Durchflusszytometer gemessenen Daten, zeigt sich bezüglich der UKF-NB-3^{DOX²⁰} Zelle eine deutliche Diskrepanz. Zwar zeigt sich in beiden Methoden eine deutliche ABCB1 Expression, allerdings zeigt sich für UKF-NB-3^{DOX²⁰} im Verhältnis der gemessenen ABCB1 Expression zu den anderen UKF-NB-3 Zellen im Western-Blot die stärkste ABCB1 Expression. Während bei der durchflusszytometrischen Analyse UKF-NB-3^{DOX²⁰} im Verhältnis zu UKF-NB-3^{VCR¹⁰} und UKF-NB-3^{ABCB1} eine deutlich geringere ABCB1 Expression aufweist. Bei den UKF-NB-6 Sublinien zeigt neben der Positivkontrolle (UKF-NB-6^{ABCB1}) ebenfalls die UKF-NB-6^{VCR¹⁰} Zelle eine signifikant erhöhte ABCB1 Expression im Verhältnis zu den anderen UKF-NB-6 Zellen. Hier ist das Verhältnis der ermittelten ABCB1 Expression zwischen der im Western-Blot erhaltenen Daten und der Daten am Durchflusszytometer gleich.

Wird die jeweilige ABCB1 Expression dieser Auswahl an Zellen in Relation zu den ermittelten IC₅₀ Werten gegen YM155 (siehe Tab. 10) gesetzt, zeigt sich eine lineare Korrelation (Abb. 18). Dies weist darauf hin, dass YM155 ein Substrat von ABCB1 in

4. Ergebnisse

Neuroblastomzellen darstellt und die Sensitivität der Zellen gegenüber YM155 im Viabilitätstest signifikant vom jeweiligen ABCB1 Status abhängig ist ($P=0,0005$).

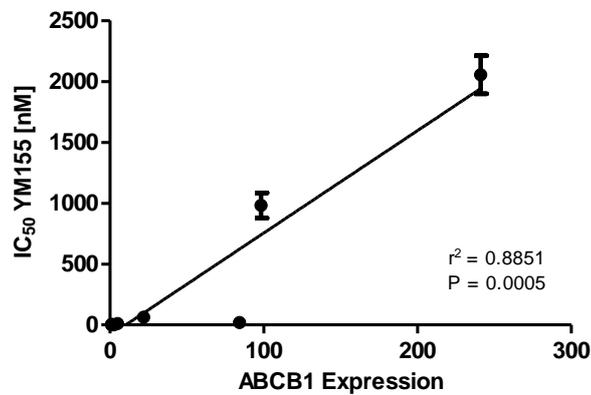


Abbildung 18 | Korrelation von IC₅₀ Werten gegen YM155 mit der ABCB1 Expression in Neuroblastomzellen. Bei diesem Verhältnis zeigt die Y-Achse die jeweiligen Konzentration von YM155, bei welcher die Zellen in ihrer Viabilität 50 % gehemmt sind (IC₅₀ Werte) und die X-Achse entspricht der im Western-Blot ermittelten ABCB1 Expression der untersuchten Zelllinien.

Des Weiteren wurde in ABCB1 überexprimierenden UKF-NB-3 Zellen mittels siRNA Transfektion die ABCB1 Expression gehemmt und anschließend im MTT-Viabilitätstest bezüglich der YM155 Sensitivität untersucht (Abb. 19).

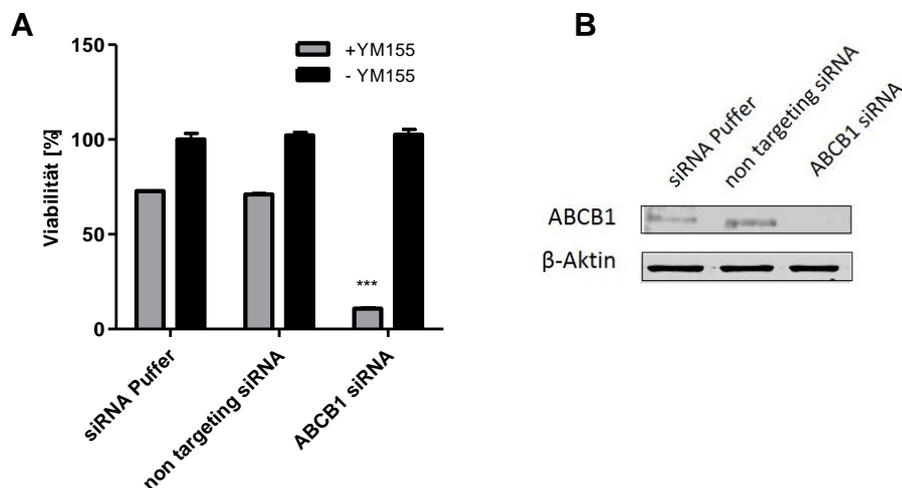


Abbildung 19 | Resensitivierung von UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen gegen YM155 nach ABCB1 siRNA Transfektion. Die ABCB1 Expression wurde siRNA-vermittelt inhibiert. **A)** UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 48 h nach Transfektion in den MTT-Viabilitätstest gegen YM155 eingesetzt. Als Kontrollen wurde eine Puffer Probe sowie eine ‚non targeting‘ siRNA Kontrolle mitgeführt. Dabei wurden die Zellen mit einer YM155 Konzentration von 125 nM behandelt (+YM155), während die unbehandelten Zellen als Kontrolle dienten (-YM155). **B)** Mittels Western Blot wurde die siRNA-vermittelte ABCB1 Depletierung bestätigt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin mitgeführt. *** $P<0,001$ im Verhältnis zur ‚non targeting‘ Kontrolle.

Anhand von Abbildung 19 ist zu erkennen, dass ABCB1 ein signifikanter Anteil an der erniedrigten Sensitivität der UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen gegen YM155 zuzuschreiben ist. Hierbei kommt es durch die Depletierung von ABCB1 in den für ABCB1

überexprimierenden UKF-NB-3 Zellen zu einer deutlichen Resensitivierung gegen YM155, während bei den mitgeführten Kontrollen (siRNA Puffer und ‚non targeting‘ siRNA) kein Effekt auf die YM155 Sensitivität zu beobachten war. Dieses Ergebnis ist ein weiteres Indiz dafür, dass YM155 ein Substrat für ABCB1 darstellt.

4.2.2 Einfluss von SLC35F2 auf die Sensitivität gegenüber YM155 in Neuroblastomzellen

Ein weiterer wichtiger Transporter bezüglich der YM155 Sensitivität stellt der SLC35F2 Transporter dar. Laut Literatur ist dieser Transporter in der Lage in KBM-7 (myeloide Leukämie) Zellen die niedermolekulare Substanz YM155 in die Zellen hinein zu transportieren, während die eigentliche Aufgabe des Transporters die Mineralstoffversorgung der Zellen ist (54). Aufgrund der zusätzlichen YM155 ‚Influx‘ Funktion würde eine erhöhte Expression dieses Transporters zu einer ebenfalls erhöhten Sensitivität gegenüber YM155 führen.

In Western-Blot Analysen mit den bereits zuvor untersuchten chemosensitiven und chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Neuroblastomzellen zeigt sich bezüglich der UKF-NB-3 Linien ein Unterschied in der SLC35F2 Expression (Abb. 20). Dabei weisen die Sublinien UKF-NB-3^rCDDP¹⁰⁰⁰, UKF-NB-3^rDOX²⁰ und UKF-NB-3^rYM155²⁰ eine verringerte SLC35F2 Expression auf, wohingegen bei den UKF-NB-6 Zellen für UKF-NB-6^rDOX²⁰ und UKF-NB-6^rVCR¹⁰ ebenfalls eine Verringerung in der SLC35F2 Expression festzustellen ist.

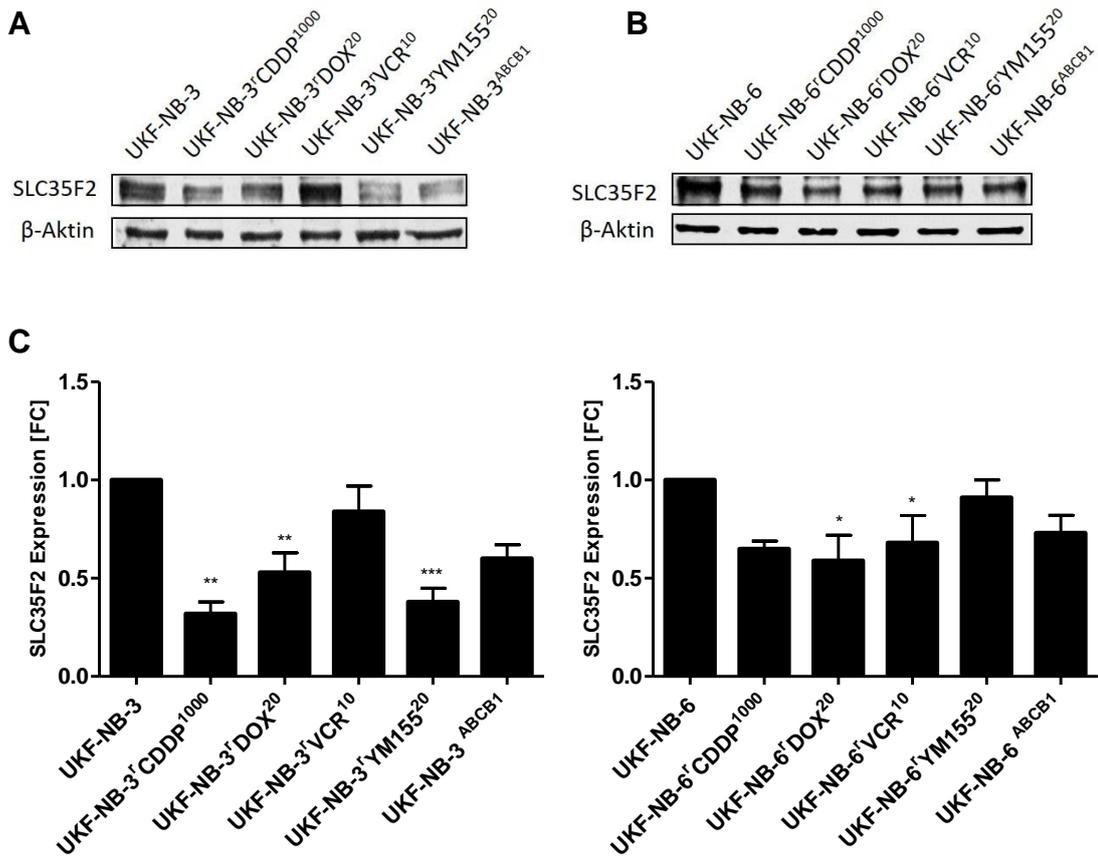


Abbildung 20 | SLC35F2 Expression in chemosensitiven und chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zelllinien. Mittels Western-Blot wurde der Grundstatus des SLC35F2 Transporters in **A)** UKF-NB-3 und **B)** UKF-NB-6 Zellen bestimmt. **C)** Quantifizierung der im Western-Blot ermittelten Expression von SLC35F2. β -Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt und bei der Quantifizierung berücksichtigt. *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ im Verhältnis zur parentalen Zelllinie.

Anhand der im Western-Blot und im MTT-Viabilitätstest erhaltenen Daten (Tab. 10) wurde die jeweilige SLC35F2 Expression der untersuchten Zellen in eine Korrelation zu den berechneten IC_{50} Werten aus dem MTT-Viabilitätstest gegen YM155 gesetzt (Abb. 21).

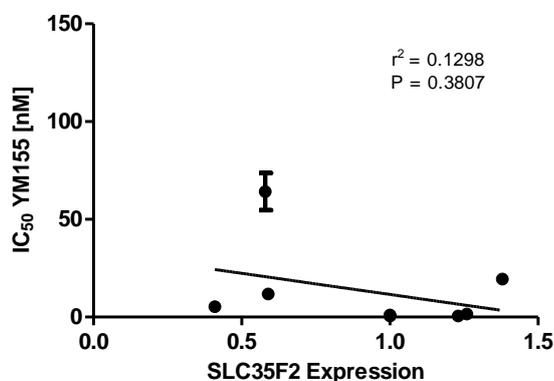


Abbildung 21 | Verhältnis der Sensitivität der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Sublinien (IC_{50} Wert) zur jeweiligen SLC35F2 Expression. Bei dieser Korrelation beschreibt die Y-Achse den jeweiligen im MTT-

4. Ergebnisse

Viabilitätstest ermittelten IC_{50} Wert gegen YM155 und die X-Achse entspricht der im Western-Blot ermittelten SLC35F2 Expression der untersuchten Zelllinien.

Anhand der in Abbildung 21 gezeigten Korrelation ist kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Sensitivität der untersuchten Neuroblastomzellen gegen YM155 und der entsprechenden SLC35F2 Expression erkennbar ($P=0,3807$). Trotz der nicht vorhandenen Korrelation, zeigte sich in siRNA-Transfektions Experimenten, dass die SLC35F2 Expression einen Einfluss auf die Sensitivität von Neuroblastomzellen gegenüber YM155 ausübte (Abb. 22). Dabei zeigten UKF-NB-3 Zellen durch die siRNA-vermittelte SLC35F2 Depletierung in anschließenden MTT-Viabilitätstests eine verminderte Sensitivität gegen YM155 und blieben trotz signifikanter geringerer Viabilität bei einer YM155 Konzentration von 2 nM weiterhin lebensfähig (Viabilität: 45 %), während die siRNA Puffer Kontrolle und ‚non targeting‘ siRNA Kontrolle bei dieser YM155 Konzentration vollständig abstarben.

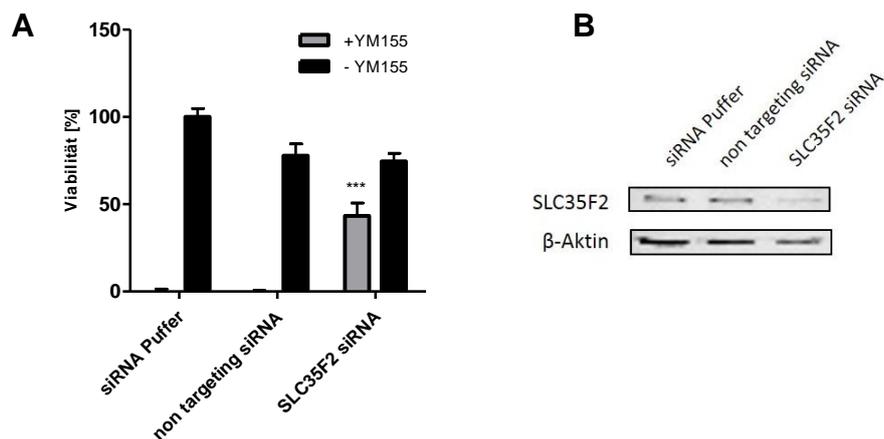


Abbildung 22 | Die siRNA-vermittelte SLC35F2 Depletierung führt zu einer erhöhten Resistenz gegen YM155 in UKF-NB-3 Zellen. A) Nach erfolgreicher siRNA Transfektion wurden UKF-NB-3 Zellen im MTT-Viabilitätstest mit einer YM155-Konzentration von 2 nM behandelt (+YM155), während die ermittelte Viabilität auf die unbehandelte siRNA Puffer Kontrolle bezogen wurde. **B)** Mittels Western-Blot wurde die siRNA-bedingte SLC35F2 Depletierung bestätigt, wobei β -Aktin als Ladekontrolle diente. *** $P < 0,001$ im Verhältnis zu der siRNA Puffer Kontrolle.

4.2.3 Zusammenspiel der ABCB1- und SLC35F2-Expression in Neuroblastomzellen

Um das Zusammenwirken der in dieser Arbeit untersuchten Transporter ABCB1 und SLC35F2 in Neuroblastomzellen näher zu analysieren, wurde in den nachstehenden Experimenten neben der UKF-NB-3 Zelllinie, ebenfalls mit der ABCB1 überexprimierenden Zelle UKF-NB-3^{ABCB1} gearbeitet. Da beide Zelllinien eine SLC35F2 Expression zeigen wurde diese siRNA-vermittelt reduziert. Dadurch ist es möglich in UKF-NB-3 Zellen, welche vornherein eine negative ABCB1 Expression aufweisen,

4. Ergebnisse

ebenfalls die SLC35F2 Expression zu unterdrücken (UKF-NB-3^{SLC35F2 siRNA}). Somit kann die Wirkung von YM155 in Abwesenheit beider Transporter getestet werden, wohingegen die ABCB1 überexprimierende UKF-NB-3^{ABCB1} Zelle für beide Transporter eine Expression zeigt. Wird die UKF-NB-3^{ABCB1} Zelle nun mit SLC35F2 siRNA behandelt, so ist es möglich die YM155 Wirkung bezüglich einer positiven ABCB1 und einer negativen SLC35F2 Expression zu testen (UKF-NB-3^{ABCB1/SLC35F2 siRNA}). In MTT-Viabilitätstests wurden die IC₅₀ Werte hinsichtlich des negativen und/oder positiven ABCB1 und SLC35F2 Status der UKF-NB-3 Zellen ermittelt (Abb. 23).

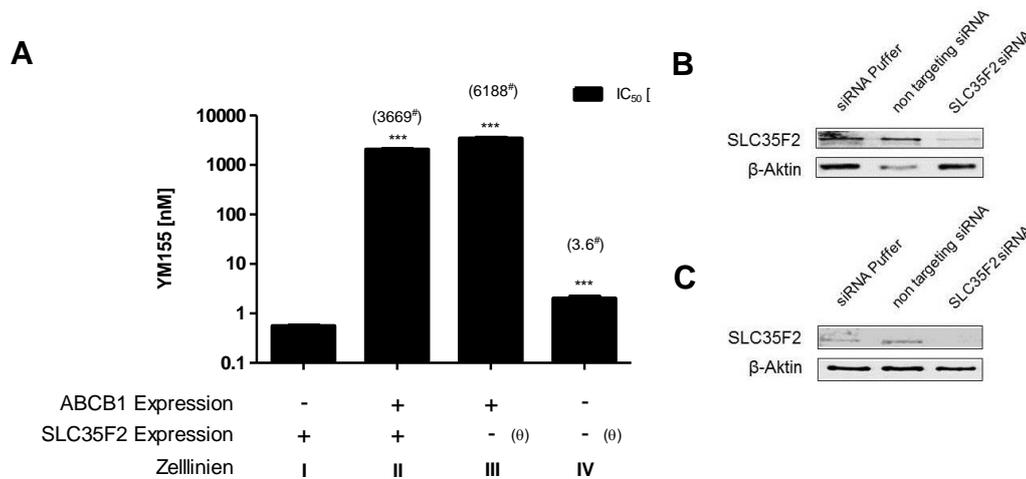


Abbildung 23 | Depletierung von SLC35F2 und ABCB1 mittels siRNA Transfektion in UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen. **A)** Um den Einfluss dieser beiden Transporter in Neuroblastomzellen näher untersuchen zu können, wurde nach siRNA-vermittelte Depletierung von SLC35F2 in negativen bzw. positiven ABCB1 exprimierenden Zellen die Viabilität im MTT-Viabilitätstest gegen YM155 überprüft und der IC₅₀ Wert berechnet. Zelllinie I: UKF-NB-3; Zelllinie II: UKF-NB-3^{ABCB1}; Zelllinie III: UKF-NB-3^{ABCB1} mit SLC35F2 siRNA behandelt; Zelllinie IV: UKF-NB-3 mit SLC35F2 siRNA behandelt. Im Western-Blot wurde die siRNA-vermittelte SLC35F Depletierung für **B)** UKF-NB-3 und **C)** UKF-NB-3^{ABCB1} bestätigt. Dabei dient β-Aktin als Ladekontrolle. [#]Verhältnis zur ABCB1 - und SLC35F2 + Zelle; (θ) SLC35F2 Depletierung wurde mit Hilfe von siRNA Transfektion herbeigeführt. ***P<0,001 im Verhältnis zur ABCB1 - und SLC35F2 + (UKF-NB-3) Zelle.

Durch die siRNA-vermittelte Depletierung von SLC35F2, sowie die positive bzw. negative ABCB1 Expression der verwendeten Zellen, zeigt Abbildung 23 das Zusammenspiel dieser beiden Transporter und ihren Einfluss auf die Sensitivität von UKF-NB-3 Zellen gegenüber YM155. Die höchste Sensitivität gegen YM155 zeigen die SLC35F2 positiven und ABCB1 negativen UKF-NB-3 Zellen (IC₅₀: 0,56 ± 0,03 nM). Bei einer Expression beider Transporter ist der IC₅₀ Wert um nahezu 3660-fach erhöht. Eine weitere knappe Verdopplung des IC₅₀ Wertes zeigt sich bei einer positiven ABCB1 und einer negativen SLC35F2 Expression (6188-fach; IC₅₀: 3464,99 ± 210,55 nM). Werden beide Transporter in ihrer Expression gehemmt zeigen die Zellen einen 3,6-fach höheren IC₅₀ Wert von 2,03 ± 0,19 nM gegenüber YM155.

4. Ergebnisse

Da es sich bei der siRNA-vermittelten Depletierung um einen transienten Zustand handelt, wurde mit Hilfe eines lentiviralen Vektorsystems drei verschiedene Konstrukte in die Neuroblastomzellen transduziert, welche für je eine shRNA Sequenz beinhaltet die für SLC35F2 kodierend ist (die Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt). Zusätzlich wurde eine Kontrollsequenz mitgeführt, welche kein Zielsequenz in den verwendeten Zellen aufweist (UKF-NB-3^{shCTRL} SLC35F2). Da wie bereits erwähnt, SLC35F2 für den ‚Influx‘, also den Transport von YM155 in die Zellen verantwortlich ist, wurde im Folgenden untersucht welchen Einfluss diese dauerhafte Depletierung von SLC35F2 auf die Sensitivität von Neuroblastomzellen gegen YM155 ausübt.

In Western-Blot Analysen wurde die verminderte SLC35F2 Expression in den lentiviral transduzierten UKF-NB-3 Zellen überprüft (Abb. 24). Wie zu erkennen ist, zeigen alle drei shRNA Sequenzen eine deutliche Reduktion der SLC35F2 Expression auf Proteinebene.

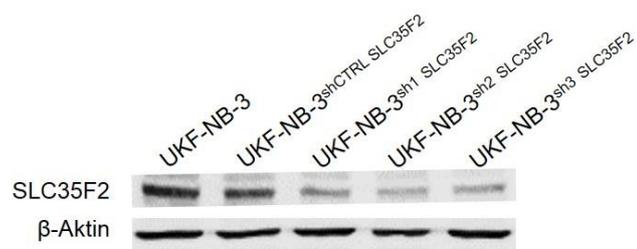


Abbildung 24 | SLC35F2 Expression in transduzierten UKF-NB-3 Zellen. Mittels Western-Blot wurden die SLC35F2 shRNA transduzierten Zellen bezüglich ihrer SLC35F2 Expression untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Eine weitere Bestätigung der reduzierten SLC35F2 Expression erfolgte durch die *real-time quantitative PCR* (Abb. 25 A). Auf mRNA-Ebene ist eine signifikante Depletierung zu erkennen, und zeigt für UKF-NB-3^{sh1} SLC35F2 eine nahezu 90 %-ige Reduktion in der SLC35F2 Expression. Bei UKF-NB-3^{sh2} SLC35F2 bleibt eine Expression von 20 % erhalten, wohingegen UKF-NB-3^{sh3} SLC35F2 eine Minderung der Expression von 50 % im Vergleich zu UKF-NB-3^{shCTRL} SLC35F2 aufweist.

4. Ergebnisse

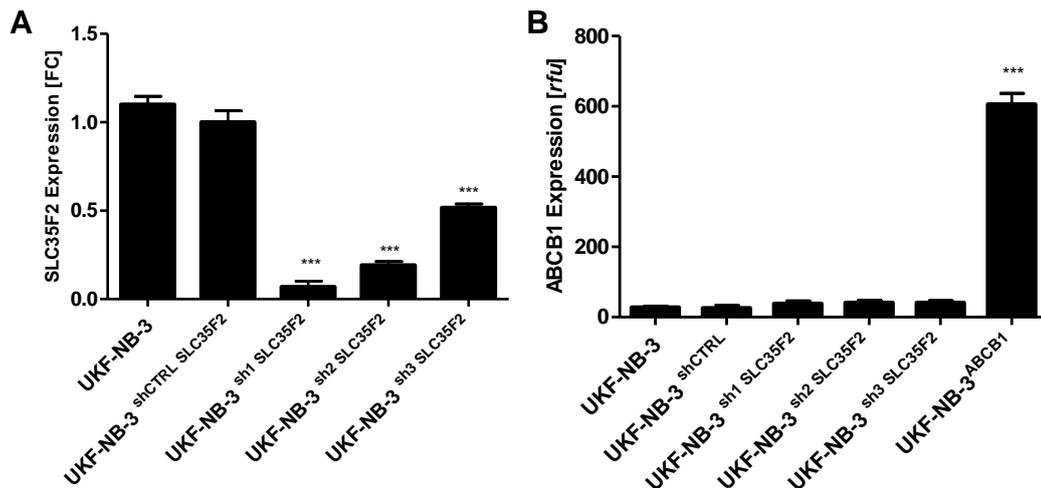


Abbildung 25 | SLC35F2 Expression auf mRNA Ebene nach lentiviraler Transduktion. A) Mittels *real-time quantitative* PCR wurde die SLC35F2 mRNA Menge quantitativ ermittelt. **B)** ABCB1 Messung am Durchflusszytometer nach einer fünfmaligen Selektion der transduzierten Zellen mit Puromycin. ***P<0,001 bezogen auf die Kontrollzelle UKF-NB-3.

Da eine Puromycin-Behandlung jedoch eine erhöhte ABCB1 Expression induzieren kann (141), wurden die transduzierten Zellen nach fünfmaliger Selektionierung mit Puromycin bezüglich ihrer ABCB1 Expression untersucht (Abb. 25 B). Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die erworbene Resistenz durch eine ABCB1 Induktion herbeigeführt wird. In durchflusszytometrischen Experimenten wurde gezeigt, dass bei den transduzierten UKF-NB-3 Zellen nach der Puromycin Behandlung keine erhöhte ABCB1 Expression induziert wurde.

Aus den erhaltenen Daten des MTT-Viabilitätstests geht hervor, dass alle drei shRNA Sequenzen eine verringerte Sensitivität gegen YM155 bewirken (Tab. 11). Im Fall von UKF-NB-3^{sh1} SLC35F2 (IC₅₀: 5,15 ± 0,91 nM) zeigt sich im Vergleich zu der Kontrollzelle UKF-NB-3^{shCTRL} SLC35F2 (IC₅₀: 0,58 ± 0,03 nM) eine signifikante 8,9-fache Erhöhung des IC₅₀ Wertes, ebenso bei UKF-NB-3^{sh3} SLC35F2 (IC₅₀: 4,85 ± 0,07 nM; Erhöhung: 8,4-fach). Bei UKF-NB-3^{sh2} SLC35F2 ist mit einem 6,2-fach höheren IC₅₀ Wert von 3,63 ± 0,41 nM immer noch eine signifikante Verringerung der Sensitivität gegen YM155 zu beobachten.

Tabelle 11 | IC₅₀ nach Transduktion eines lentiviralen Vektors mit einer für SLC35F2 kodierenden shRNA Sequenz in UKF-NB-3 Zellen. Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests wurden die IC₅₀ Werte gegen YM155 ermittelt. Die Depletierung von SLC35F2 zeigt durch die drei verwendeten Konstrukte eine verminderte Sensitivität gegenüber YM155. ***P<0,001; *P<0,05 im Verhältnis zur Kontrollzelle UKF-NB-3^{shCTRL} SLC35F2. ¹Verhältnis zur Kontrollzelle UKF-NB-3^{shCTRL} SLC35F2.

Zelllinie	IC ₅₀ YM155 [nM]
UKF-NB-3	0,68 ± 0,02
UKF-NB-3 ^{shCTRL} SLC35F2	0,58 ± 0,03

4. Ergebnisse

UKF-NB-3^{sh1} SLC35F2	5,15 ± 0,91* (18,9)
UKF-NB-3^{sh2} SLC35F2	3,63 ± 0,41* (16,2)
UKF-NB-3^{sh3} SLC35F2	4,85 ± 0,07*** (18,4)

Des Weiteren wurden die ABCB1 überexprimierenden UKF-NB-3 Zellen ebenfalls mit den zuvor beschriebenen Konstrukten gegen SLC35F2 transduziert. Auch in diesem Fall zeigte sich durch die zusätzliche SLC35F2 Depletierung eine Erhöhung des IC₅₀ Wertes. Dabei zeigten die IC₅₀ Werte, dass das Zusammenspiel der beiden genannten Transporter eine entscheidende Rolle bei der Sensitivität gegenüber YM155 in den untersuchten Zellen spielt (Tab. 12).

Tabelle 12 | IC₅₀ Werte der ABCB1 überexprimierenden UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen nach erfolgter SLC35F2 shRNA Transduktion. Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests wurden die IC₅₀ Werte der untersuchten UKF-NB-3 Zelllinien ermittelt. **P<0,01 im Verhältnis zur Kontrollzelle UKF-NB-3^{ABCB1 shCTRL SLC35F2}. ¹Verhältnis zur Kontrollzelle UKF-NB-3^{ABCB1 shCTRL SLC35F2}.

Zelllinie	IC ₅₀ YM155 [nM]
UKF-NB-3	0,53 ± 0,04
UKF-NB-3^{ABCB1 shCTRL SLC35F2}	653,75 ± 44,62
UKF-NB-3^{ABCB1 sh1 SLC35F2}	4623,65 ± 143,19** (17,1)
UKF-NB-3^{ABCB1 sh2 SLC35F2}	3258,65 ± 4,31** (15,0)
UKF-NB-3^{ABCB1 sh3 SLC35F2}	1335,10 ± 499,08 (12,0)

Dabei ist bei UKF-NB-3^{ABCB1 sh1 SLC35F2} (IC₅₀: 4623,65 ± 143,19 nM) ein 7,1-fach signifikant erhöhter IC₅₀ Wert gegenüber YM155 im Vergleich zu UKF-NB-3^{ABCB1 shCTRL SLC35F2} (IC₅₀: 653,75 ± 44,62 nM) zu beobachten. Bei UKF-NB-3^{ABCB1 sh2 SLC35F2} ist der Unterschied im IC₅₀ Wert mit 3258,65 ± 4,31 nM verglichen zu UKF-NB-3^{ABCB1 shCTRL SLC35F2} 5-fach signifikant erhöht (Tab. 12). UKF-NB-3^{ABCB1 sh3 SLC35F2} zeigt keine signifikante Erniedrigung der Sensitivität in Relation zu UKF-NB-3^{ABCB1 shCTRL SLC35F2}.

Das Zusammenspiel aus einer negativen SLC35F2 Expression und einer Überexpression von ABCB1 spiegelt sich in einer stark erniedrigten Sensitivität gegenüber YM155 in den untersuchten Neuroblastomzellen wider.

4.4 YM155 wirkt primär auf Survivin

4.4.1 Was kommt nach YM155 Behandlung zuerst: Survivin-Inhibierung oder DNA-Schadensantwort?

Wie bereits erläutert erleben Zellen jeden Tag tausende von DNA-Schäden. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, dass diese Schäden von den betroffenen Zellen rechtzeitig erkannt und beseitigt werden. In einer aktuellen Studie wurde postuliert, dass YM155 eigenständig und primär DNA-Schäden verursacht und aufgrund dieser Wirkung die Zellen die Apoptose einleiten. Dabei soll die Survivin-Inhibierung lediglich ein sekundärer Effekt sein (97). Um die Frage beantworten zu können, ob die Wirkung von YM155 primär einen DNA-Schaden verursacht oder auf der Survivin-Inhibierung basiert, wurde eingangs in UKF-NB-3 Zellen die Survivin Expression siRNA-vermittelt inhibiert und auf Proteinebene untersucht. Für die Detektion von entstanden DNA-Schäden können eine Reihe von Proteinen als Marker verwendet werden. Darunter zählen die phosphorylierte Form des Histons H2A.X (γ H2A.X) und die phosphorylierte Checkpoint Kinase 2 (pChk2). Die Phosphorylierungen dieser Proteine, die ebenfalls zu deren Aktivierung führt, werden als Antwort auf Doppelstrangbrüchen induziert.

Um den Einfluss einer fehlenden Survivin Expression genauer untersuchen zu können, wurden Transfektions-Experimente mit Survivin siRNA in UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen durchgeführt. Dabei wurde die Survivin-inhibierende Wirkung von YM155 nachempfunden. Zunächst wurde untersucht, welche Proteine von einer geringeren Survivin Expression beeinflusst werden (Abb. 26). Dieser Versuchsansatz würde der Survivin-inhibierenden Wirkung von YM155 entsprechen.

4. Ergebnisse

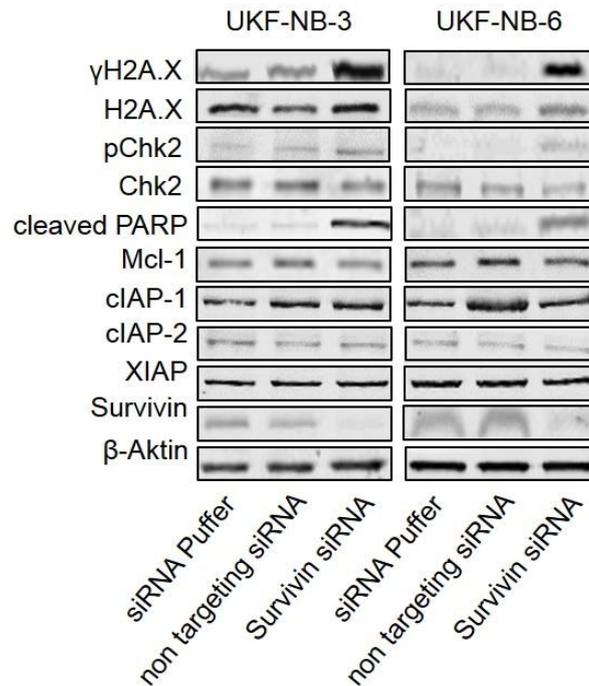


Abbildung 26 | Einfluss der siRNA-vermittelten verminderten Survivin Expression auf andere Proteine in UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen. In Western-Blot Analysen wurden die Expressionen von Marker-Proteinen der DNA-Schadensantwort (γ H2A.X und pChk2), sowie von Proteinen die bei der Inhibierung (Mcl-1, cIAP-1, cIAP-2, XIAP und Survivin) bzw. Induktion der Apoptose (*cleaved* PARP) beteiligt sind, 48 h nach erfolgter Transfektion durchgeführt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Durch die siRNA-bedingte Verringerung der Survivin Expression zeigt sich eine deutliche Induktion von γ H2A.X und pChk2 (Abb. 26). Beide Proteine kennzeichnen die Einleitung der DNA-Schadensantwort, wobei sich der Status der nicht phosphorylierten Formen, H2A.X und Chk2, durch die siRNA Behandlung nicht verändert. Die erhöhte Expression von *cleaved* PARP zeigt die Einleitung der Apoptose, wobei sich die Expression von Mcl-1, sowie der anderen IAP-Familienmitgliedern, cIAP-1, cIAP-2 und XIAP, durch die verminderte Survivin Expression nicht verändert. Eine jeweilige Survivin Reduktion wurde in beiden Zelllinien bestätigt.

Für die weiteren Versuche wurde der Fokus auf UKF-NB-3 als Neuroblastom-Zellmodell gelegt, da in den Survivin-siRNA Experimenten kein Unterschied zwischen UKF-NB-3 und UKF-NB-6 zu beobachten war, und so ein zellspezifischer Effekt ausgeschlossen werden kann (Abb.26). Durch den Einfluss der Survivin siRNA Behandlung zeigte sich in UKF-NB-3, dass die Zellen über den Zeitraum des MTT-Viabilitätstest ohne Survivin Expression nicht lebensfähig waren (Abb. 27).

Bei den chemosensitiven UKF-NB-3 Zellen ist zu erkennen, dass die Survivin Depletierung einen großen Einfluss auf die Viabilität ausübt. So waren nach der Survivin siRNA Transfektion kaum noch lebenden Zellen detektierbar. Für beide Kontrollen ist in der nachfolgenden YM155 Behandlung ein IC_{50} Wert von etwa 0,5 nM

erkennbar, während nach Survivin Depletierung kein IC_{50} Wert zu ermitteln war, da selbst in der unbehandelten Zellkontrolle die Zellen über den Zeitraum des MTT-Viabilitätstests nicht lebensfähig waren (Abb. 27 A). Diese Ergebnisse konnten auch mit Hilfe einer mikroskopischen Untersuchung bestätigt werden (Abb. 27 C). Die erfolgreiche Survivin Depletierung wurde mit Western-Blot Analysen bestätigt (Abb. 27 B).

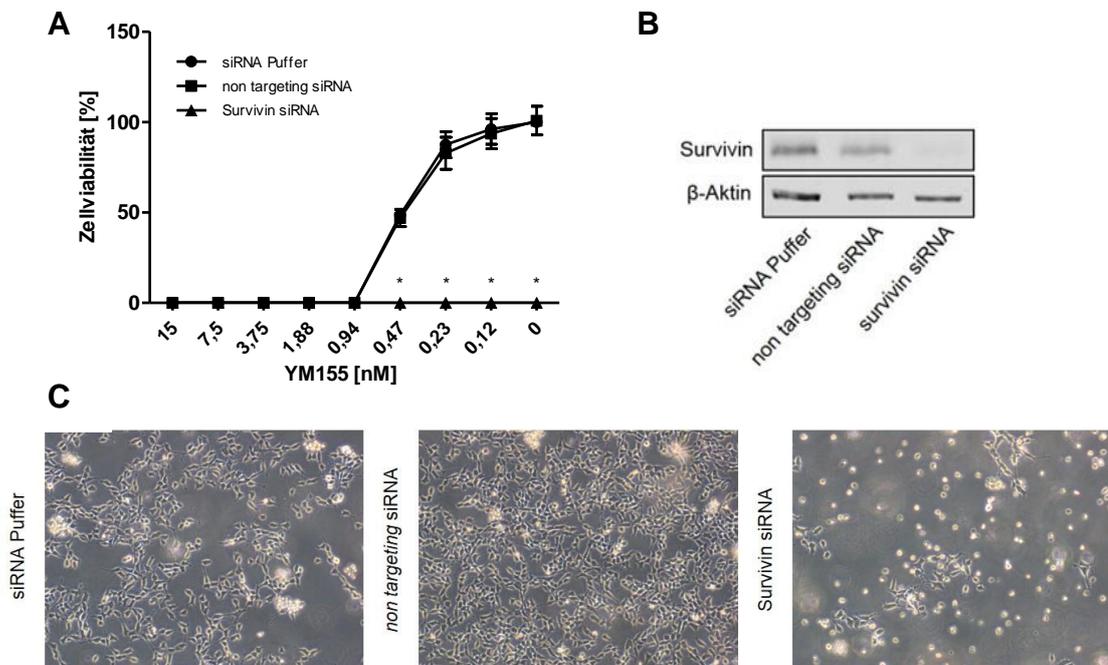


Abbildung 27 | Einfluss auf die Zellviabilität in UKF-NB-3 Zellen nach siRNA-vermittelter Survivin Hemmung. A) Mittels MTT-Viabilitätstests gegen YM155 ist zu erkennen, dass die Zellen nach erfolgter RNAi-vermittelter Survivin Reduktion nicht überleben. Bei jedem Ansatz wurden jeweils eine Pufferkontrolle und eine ‚non targeting‘ siRNA Kontrolle mitgeführt. **B)** Im Western-Blot wurde die reduzierte Survivin Expression 48 h nach der Transfektion überprüft. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. **C)** Des Weiteren wurden die Zellen 48 h nach erfolgter Transfektion am Mikroskop untersucht. * $P < 0,05$ im Verhältnis zu der ‚non targeting‘ siRNA Kontrolle.

Da gezeigt wurde, dass eine fehlende Survivin Expression die DNA-Schadensantwort induziert, wurden UKF-NB-3 Zellen einer zeitlichen, als auch konzentrationsabhängigen YM155 Behandlung ausgesetzt und ihre Proteinexpression untersucht, um herauszufinden ob zuerst eine Survivin-Inhibierung oder die Induktion der DNA-Schadensantwort erfolgt. In Western-Blot Analysen wurde die Expression von γ H2A.X und pChk2 (zeigen DNA-Schaden an), sowie *cleaved* PARP (zeigt Apoptose an) und Survivin überprüft (Abb. 28). Dabei wurden UKF-NB-3 Zellen mit YM155 Konzentration von 1 nM, 2,5 nM, 10 nM und 25 nM behandelt. Die Behandlung wurde jeweils für 8, 12, 14, 16, 18 und 24 Stunden durchgeführt.

4. Ergebnisse

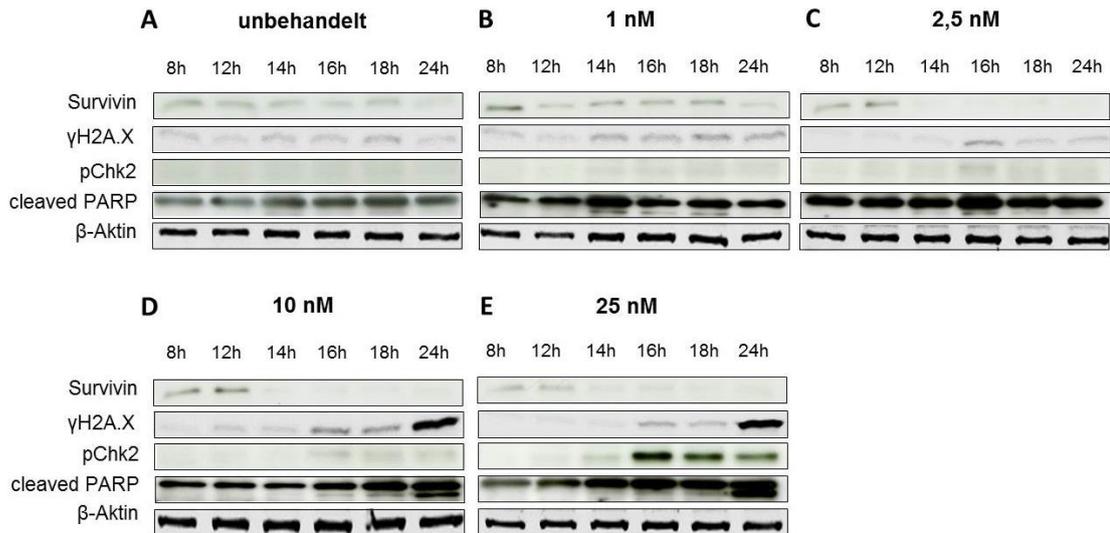


Abbildung 28 | Zeitliche und konzentrationsabhängige Kinetik der YM155 Behandlung in UKF-NB-3 Zellen. Die Zellen wurden mit den YM155 Konzentrationen 1 nM, 2,5 nM, 10 nM und 25 nM behandelt und zu den Zeitpunkten 8 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h und 24 h wurden die Proteinextrakte genommen. Die Zellextrakte wurden nach erfolgter Behandlung auf die Expression von Survivin, γ H2A.X, pChk2 und *cleaved* PARP geprüft. Die β -Aktin Blots dienten als Ladekontrolle.

Über den zeitlichen Verlauf der YM155 Behandlung wurden eine Reihe von DNA-Schaden-kennzeichnende Proteine auf ihre Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein Anstieg der γ H2A.X Expression erst deutlich nach 24 Stunden mit 10 nM YM155 Behandlung zu beobachten war (Abb. 28 D). Ebenfalls wurde eine Spaltung von PARP nach 24 Stunden mit 10 nM YM155 detektiert. Die für YM155 beschriebene Survivin-inhibierende Wirkung erfolgt jedoch deutlich früher bei 14 Stunden, mit einer ebenfalls geringeren YM155 Konzentration von 2,5 nM (Abb. 28 C). Um die Frage der primären Wirkung von YM155 auf UKF-NB-3 Zellen beantworten zu können, erfolgte eine Quantifizierung der Proteine Survivin und γ H2A.X über eine zeitliche und konzentrationsabhängige Darstellung (Abb. 29).

Die Quantifizierung der im Western-Blot detektierten Proteinexpression zeigt für Survivin ab 14 Stunden mit 2,5 nM YM155 Behandlung eine signifikante Reduktion in der Expression (Abb. 29 A), wobei zu diesen Parametern keine Steigerung in der γ H2A.X Expression festzustellen ist (Abb. 29 B). Einen Anstieg in der γ H2A.X Expression und somit auch die Induktion der DNA-Schadensantwort erfolgt signifikant erst nach 24 Stunden ab einer YM155 Konzentration von 10 nM.

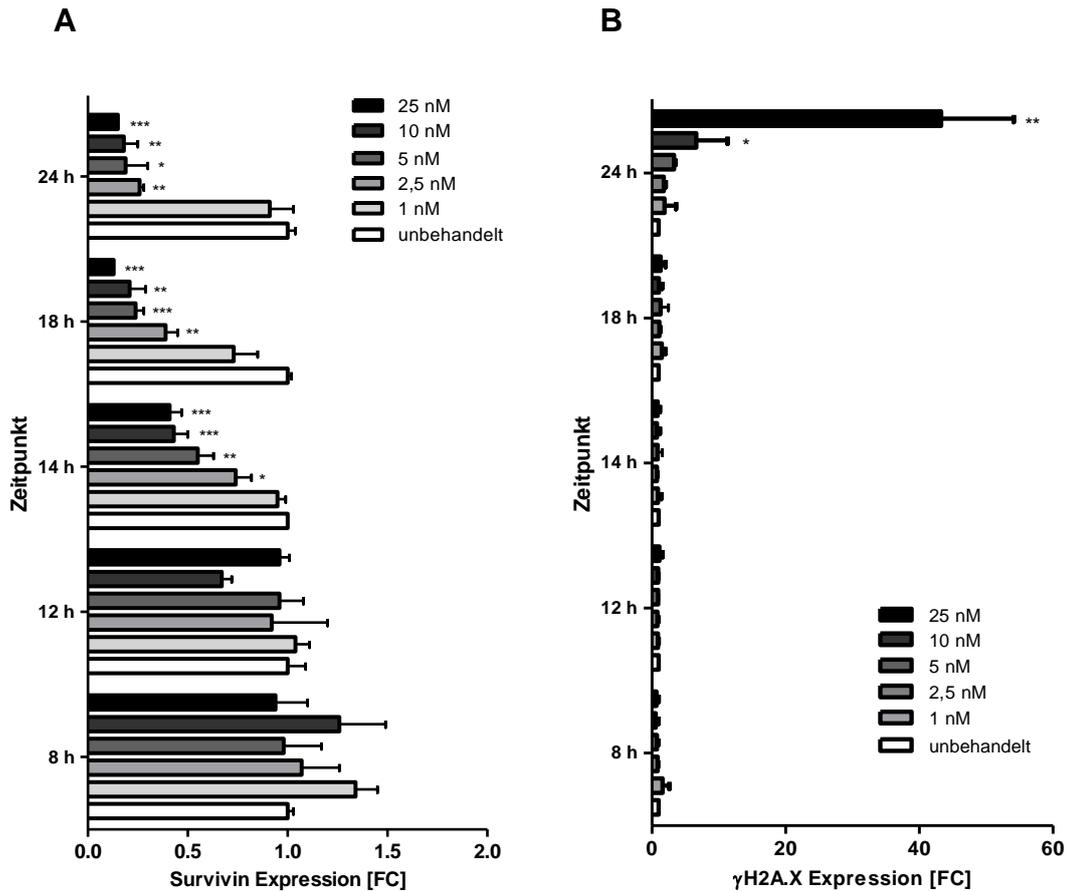


Abbildung 29 | Quantifizierung der Survivin und γ H2A.X Expression nach YM155 Behandlung. In Western-Blot Analysen wurden UKF-NB-3 Zellen mit den YM155 Konzentrationen 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM und 25 nM behandelt. Dabei wurde die Proteinextraktion zu den Zeitpunkten 8, 12, 14, 18 und 24 Stunden vorgenommen. Die Quantifizierung der im Western-Blot ermittelten Survivin- und γ H2A.X Expressionen erfolgte mit dem Gerät *Odyssey* der Firma Li-Cor. Unter Berücksichtigung der β -Aktin-Blots wurde die unbehandelte Kontrolle für jeden Zeitpunkt bei der Auswertung auf 1 gesetzt und die einzelnen YM155 Konzentrationen darauf bezogen. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts.

3.4.2 Weitere Nachweise der DNA-Schadensantwort

Das ‚Comet Assay‘ bietet eine weitere Möglichkeit die Induktion von Doppelstrangbrüchen nachzuweisen. Um durch diese Methode eine zusätzliche Aussage über den Zeitpunkt der DNA-Schadensantwort treffen zu können wurden UKF-NB-3 Zellen für 14 und 24 Stunden mit unterschiedlichen YM155 Konzentrationen behandelt und im ‚Comet Assay‘ untersucht (Abb. 30). Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 20 Minuten mit 100 μ M Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt.

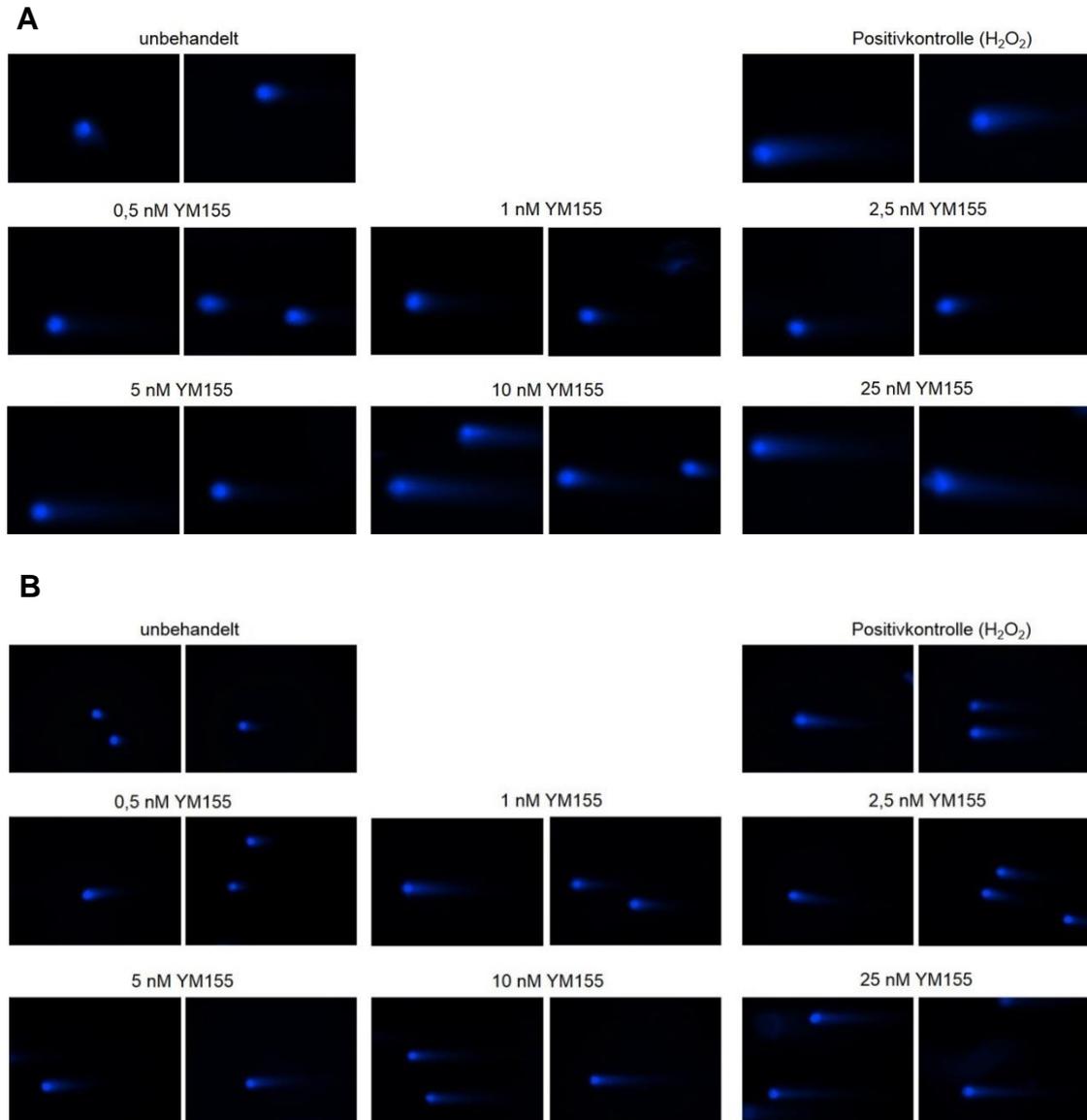


Abbildung 30 | Untersuchung der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) nach YM155 Behandlung bei UKF-NB-3 Zellen im ‚Comet Assay‘. Mit Hilfe des ‚Comet Assays‘ ist es möglich DSB direkt am Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Bilder zeigt eine repräsentative Auswahl an Ergebnissen. **A)** YM155 Behandlung für 14 h, während bei **B)** die Zellen für 24 h mit unterschiedlichen YM155-Konzentration behandelt wurden. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 20 Minuten mit 100 μM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt.

Bei visueller Betrachtung der Bilder des ‚Comet Assays‘ ist unter Berücksichtigung der untersuchten Zeitpunkte zu erkennen (Abb. 30), dass nach 14 Stunden unter dem Einsatz von 10 nM YM155 die UKF-NB-3 Zellen erste Doppelstrangbrüche zu sehen sind, während nach 24-stündiger Behandlung die Zellen bereits mit einer YM155 Konzentration von 1 nM Doppelstrangbrüche aufweisen. Um bei dieser Methode eine nicht nur rein optische Aussage über die Stärke des DNA-Schadens treffen zu können, wurden mit dem Programm *Comet Assay IV* die erhaltenen Daten ausgewertet.

4. Ergebnisse

Für die Auswertung gibt es zwei Möglichkeiten, zum einen wird das ‚*Olive Tail moment*‘ bestimmt, zum anderen die ‚*Tail intensity*‘ berechnet (Abb. 31 A). Während die ‚*Tail intensity*‘ den prozentualen Anteil der im Schweif vorhandenen, geschädigten DNA beschreibt, so zeigt das ‚*Olive Tail moment*‘ das Produkt aus der ‚*Tail intensity*‘ und der Schweiflänge (Abb. 31 B).

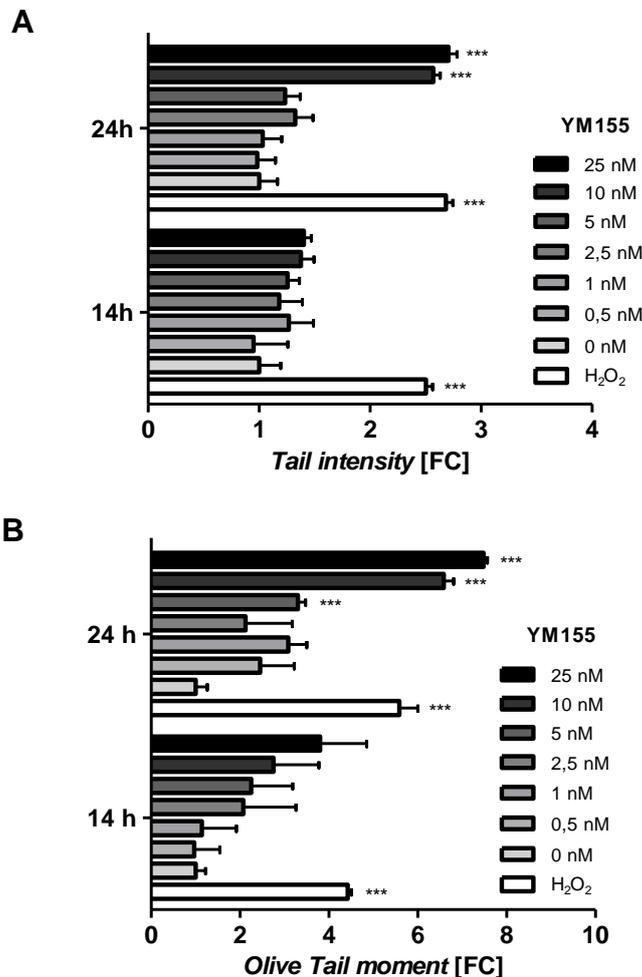


Abbildung 31 | Ermittlung der ‚*Tail intensity*‘ und dem ‚*Olive Tail Moment*‘ nach YM155 Behandlung von UKF-NB-3 Zellen mit Hilfe des ‚*Comet Assays*‘. Ermittelt wurde **A)** die ‚*Tail intensity*‘ und **B)** das ‚*Olive Tail moment*‘ in UKF-NB-3. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen YM155 Konzentrationen über eine Inkubationszeit von 14 h und 24 h behandelt. Für die Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten bezogen. ***P<0,001 im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrolle.

Entgegen der rein optischen Auswertung ist anhand der ‚*Tail intensity*‘ in den untersuchten UKF-NB-3 Zellen erst nach einer 24-stündigen YM155 Behandlung ab 10 nM ein signifikanter Anstieg der Doppelstrangbrüche (Faktor: 2,6) zu ermitteln (Abb. 31). Während bei der Berechnung des ‚*Olive Tail moments*‘ bereits ab einer YM155 Konzentration von 5 nM nach 24 Stunden eine signifikante Steigerung zu beobachten ist. Die Werte des 14 Stunden Zeitpunkts zeigen zwar ebenfalls eine von der YM155 Konzentration abhängige Steigerung von Doppelstrangbrüchen, jedoch sind diese Ergebnisse nicht signifikant.

Des Weiteren wurde zusätzlich mit einem ‚DNA Damage Detection‘ Kit der Firma PromoKine der Zeitpunkt ermittelt, zu welchem die YM155 Behandlung eine DNA-Schadensantwort induziert. Dabei wurden wiederum UKF-NB-3 Zellen für 14 und 24 Stunden mit 10 nM YM155 behandelt (Abb. 32).

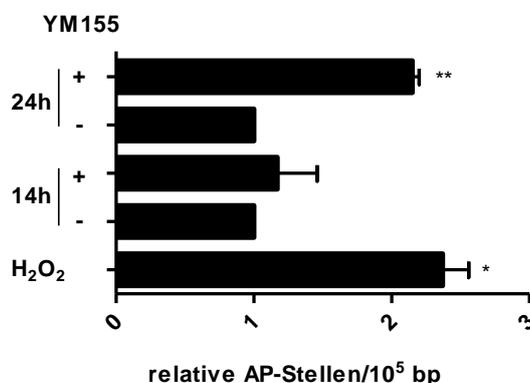


Abbildung 32 | Ermittlung der DNA-Schadensantwort mittels des ‚DNA Damage Detection‘ Kit. Dabei wurden UKF-NB-3 Zellen für jeweils 14 h und 24 h mit 10 nM YM155 (+) behandelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 20 Minuten mit 100 μ M H₂O₂ behandelt, während sich auf die unbehandelten Kontrollen bezogen wurde. **P<0,01, *P<0,05 im Verhältnis zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (-).

Durch die Ermittlung der AP-Stellen hinsichtlich der YM155 Behandlung zeigt sich, dass erst nach 24 Stunden ein signifikanter Anstieg der DNA-Schadensantwort zu beobachten ist. Nach vierzehnstündiger YM155 Behandlung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 32).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass durch die YM155 Behandlung die Survivin-Inhibierung nach 14 Stunden ab einer YM155 Konzentration von 2,5 nM erfolgte. Dahingegen konnte die Induktion der DNA-Schadensantwort mit mehreren verschiedenen Methoden erst nach 24 Stunden ab einer YM155 Konzentration von 5 nM beobachtet werden (Abb. 29, 31, 32).

4.5 Einfluss von p53 auf die zelluläre Antwort auf YM155

Das Protein p53 gilt als „Wächter des Genoms“ (142) und spielt eine entscheidende, sowie regulierende Rolle bei einer Vielzahl an zellulären Prozessen, wie Apoptose, Differenzierung oder DNA-Schadensantwort. Da p53 in vielen Tumorentitäten mutiert oder in seiner Funktion gestört ist (143), ist es bei neu entwickelten, antitumoralen Wirkstoffen von großer Bedeutung die Abhängigkeit ihrer Wirkung vom Vorhandensein von funktionalem p53 zu überprüfen.

4. Ergebnisse

Um den Einfluss von p53 innerhalb der YM155 Behandlung näher beurteilen zu können, wurde in den folgenden Versuchen mit transduzierten Zelllinien gearbeitet. Dabei wurde die p53 Expression in den Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-6 mittels eines lentiviralen Vektorsystems, welches für eine shRNA gegen p53 kodiert, stabil gehemmt (z.B. UKF-NB-3^{pc-p53}, UKF-NB-6^{pc-p53}) (128, 140). Als Negativkontrolle wurden diese Zelllinien ebenfalls mit einem lentiviralen Vektor transduziert, wobei dessen shRNA keine bestimmte Zielprotein-Sequenz (*scrambled* Kontrollzelle) besitzt (UKF-NB-3^{pc-scr}, UKF-NB-6^{pc-scr}).

Die p53 Depletierung wurde in UKF-NB-3^{pc-p53} und UKF-NB-6^{pc-p53} Zellen auf Proteinebene in Western-Blot Analysen bestätigen (Abb. 33). In beiden Zelllinien ist eine deutliche Reduzierung der p53 Expression in den depletierten Zellen zu beobachten. Dabei zeigt sich in den untersuchten Zellen keine Änderung in der Survivin Expression.

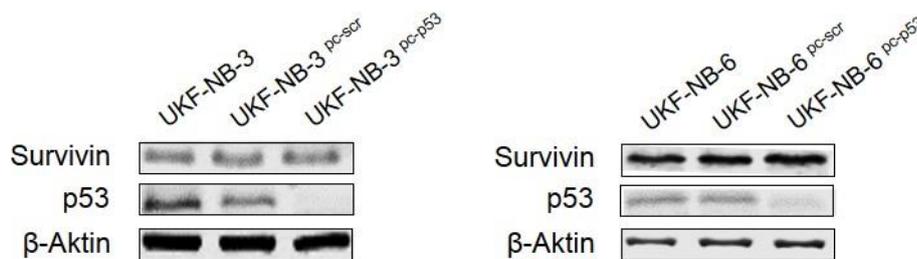


Abbildung 33 | Western-Blot der p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen. In Western-Blot Analysen wurde die Grundexpression von p53 und Survivin in den p53-depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} und UKF-NB-6^{pc-p53} untersucht. Als Kontrollen wurde die jeweilige parentale Ausgangszelle UKF-NB-3 und UKF-NB-6, sowie die mit dem *scrambled* Kontrollzellen UKF-NB-3^{pc-scr} und UKF-NB-6^{pc-scr} mitgeführt. Der β -Aktin Blot dient als Ladekontrolle.

In MTT-Viabilitätstests mit den genannten Neuroblastomzellen konnte gezeigt werden, dass die p53-depletierten Zellen eine niedrigere Sensitivität gegenüber YM155 aufweisen (Abb. 34). Im Vergleich zu der jeweiligen ‚scrambled‘ Kontrollzelle zeigt sich bei UKF-NB-3^{pc-p53} und UKF-NB-6^{pc-p53} ein 8,6- bzw. 8,1-fach erhöhter IC_{50} Wert gegen YM155. Dabei steigert sich bei der UKF-NB-3 Zelllinie der IC_{50} Wert signifikant gegen YM155 von $0,50 \pm 0,14$ nM (UKF-NB-3^{pc-scr}) auf $4,30 \pm 0,97$ nM für die p53-deletierte UKF-NB-3^{pc-p53}. Im Fall von UKF-NB-6 ist eine signifikante Erhöhung des IC_{50} Wertes im Vergleich zu der ‚scrambled‘ Linie (IC_{50} : $1,57 \pm 0,23$ nM) auf $12,68 \pm 0,33$ nM messbar.

4. Ergebnisse

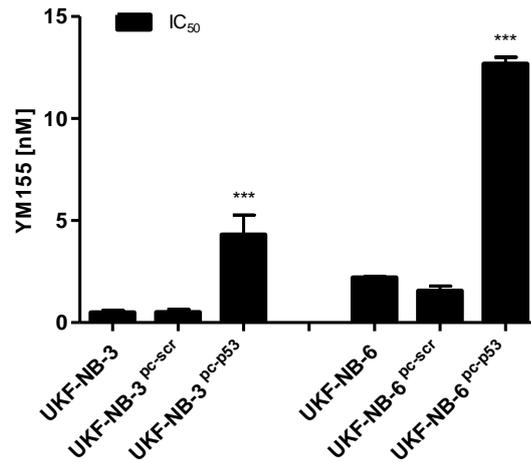


Abbildung 34 | Einfluss der p53 Depletierung auf die Sensitivität der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen gegenüber YM155. Die IC₅₀ Werte wurden mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests ermittelt. ***P<0,001 bezogen auf die jeweilige ,scrambled' Zelllinie.

Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, besteht ein Zusammenhang zwischen der p53 Expression der untersuchten Neuroblastomzellen und der Sensitivität gegenüber YM155. Dieser Zusammenhang ließ sich bereits durch eine rein mikroskopische Betrachtung von UKF-NB-3 Zellen beobachten (Abb. 35).

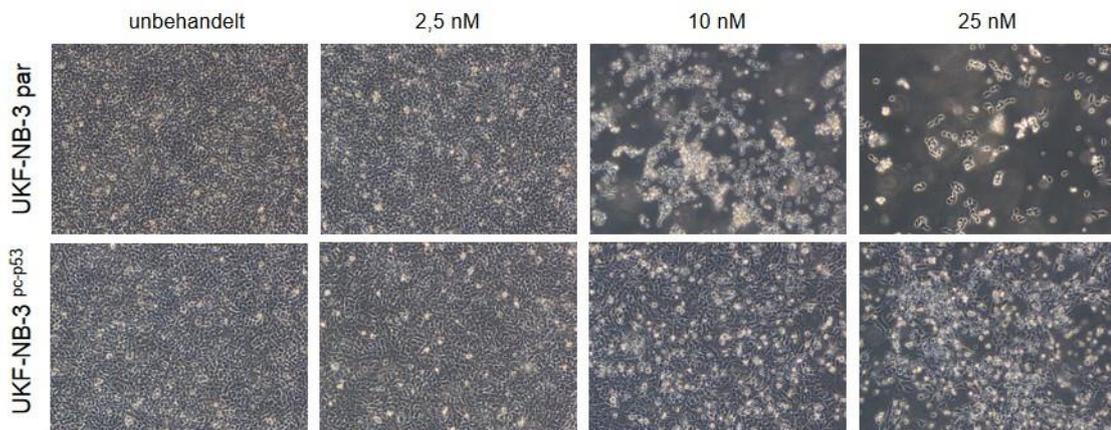


Abbildung 35 | Einfluss der YM155 Behandlung auf UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen YM155 Konzentrationen von 2,5 nM, 10 nM und 25 nM behandelt. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Untersuchung.

Dabei zeigte sich, dass die Wildtyp p53-exprimierende UKF-NB-3 Zelle nach einer YM155 Behandlung mit 10 nM für 24 Stunden eine verringerte Konfluenz des Zellrasens aufweist, während die p53-depletierte Zelle zwar auch eine leichte Veränderung in ihrer morphologischen Beschaffenheit aufweist, der Zellrasen aber keine Veränderung zeigt. Ein noch deutlicheres Bild zeigt sich nach einer Behandlung mit 25 nM YM155 für 24 Stunden, dabei sind im Fall von UKF-NB-3 noch wenige angehaftete Zellen und viele abgerundete, abgelöste Zellen vorzufinden. Die p53-

depletierte Zelle wiederum zeigt nur kleine Lücken im Zellrasen, wobei auch hier einige abgerundete und abgelöste Zellen erkennbar sind.

Während die Zellviabilität durch die YM155 Behandlung scheinbar vom p53 Status der untersuchten Neuroblastomzellen abhängig ist, bleibt zu prüfen inwiefern die funktionale p53 Expression eine Rolle innerhalb der zellulären Antwort auf YM155 spielt. Dabei wurden die parentalen, ‚scrambled‘ und p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen im Western-Blot nach der YM155 Behandlung hinsichtlich der Expression verschiedener Proteine untersucht (Abb. 36).

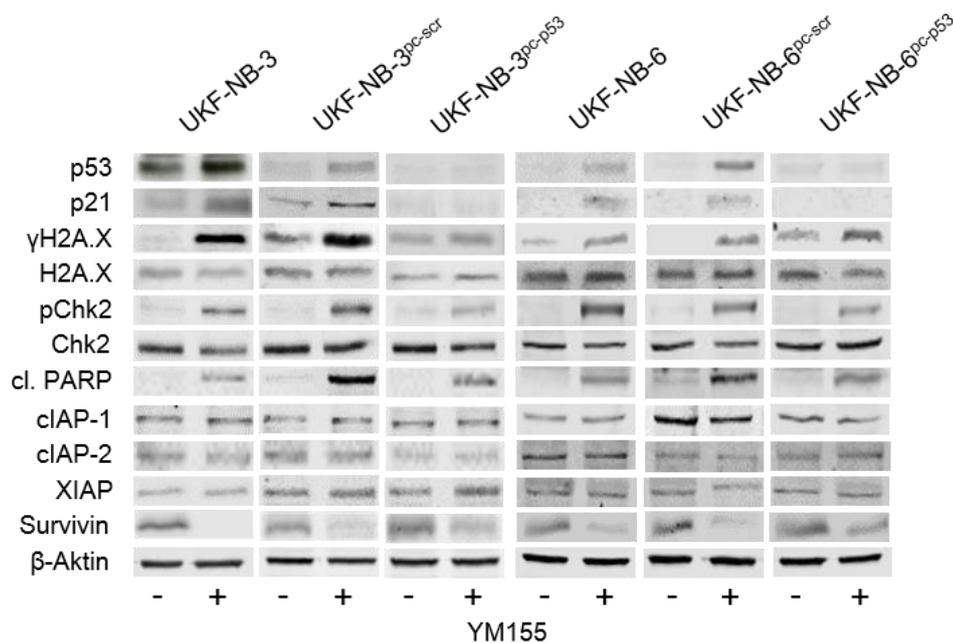


Abbildung 36 | Western-Blot nach YM155 Behandlung in parentalen, ‚scrambled‘ und p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen. Die genannten Zellen wurden jeweils für 24 h mit 25 nM YM155 behandelt (+), während eine unbehandelte Kontrolle (-) mitgeführt wurde. β-Aktin dient auch hier als Ladekontrolle.

Es zeigte sich durch die YM155 Behandlung in den parentalen und *scrambled* Zelllinien eine Akkumulation von p53, sowie eine Induktion der p21 Expression. Während die p53-depletierten Zellen keine p53 und p21 Expression aufweisen. Die parentalen und *scrambled* UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen zeigen einen Anstieg der phosphorylierten Formen von H2A.X (γH2A.X) und Chk2 (pChk2), was für das Vorkommen von DNA-Schäden spricht. Die nicht phosphorylierten Proteine H2A.X und Chk2 zeigen trotz YM155 Behandlung keinen Unterschied in ihrer Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle. Jedoch ist im Vergleich zu den parental bzw. *scrambled* Zellen eine geringere γH2A.X Expression der p53-depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} und UKF-NB-6^{pc-p53} Zelllinien als Folge der YM155 Zugabe zu beobachten. Eine weitere Abweichung zeigt sich bei den p53-depletierten Zellen in

4. Ergebnisse

einer geringeren Survivin Inhibierung durch die YM155 Behandlung im Vergleich zu UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{pc-scr} bzw. UKF-NB-6 und UKF-NB-6^{pc-scr}. Bezüglich des Anstiegs von *cleaved* PARP ist sowohl in den p53-depletierten, als auch in den beiden Kontrollen der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen durch die YM155 Behandlung, eine Einleitung der Apoptose angezeigt. Bei den anderen Proteinen der ‚*Inhibitor of apoptosis*‘-Familie, cIAP-1, cIAP-2 und XIAP zeichnete sich als Reaktion auf die YM155-Behandlung bei allen untersuchten Zelllinien keine Änderung in der Expression ab.

Da die Expression von p53 ein entscheidender Faktor bei der Wirkung von YM155 zu sein scheint, wurde untersucht, ob die in Abbildung 37 gezeigte herabgesetzte Induktion von γ H2A.X und ebenfalls geminderte Survivin-Inhibierung bei den p53-depletierten UKF-NB-3 Zellen einer zeitlichen Komponente bei der YM155 Behandlung besitzt. Um dies zu zeigen wurde mit den p53-depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} und der p53 Wildtyp Zelle UKF-NB-3 gearbeitet. Die Zellen wurden mit den YM155 Konzentrationen 2,5 nM, 10 nM und 25 nM behandelt, wobei die Proteinextraktion nach unterschiedlichen Inkubationszeiten erfolgte (Abb. 37).

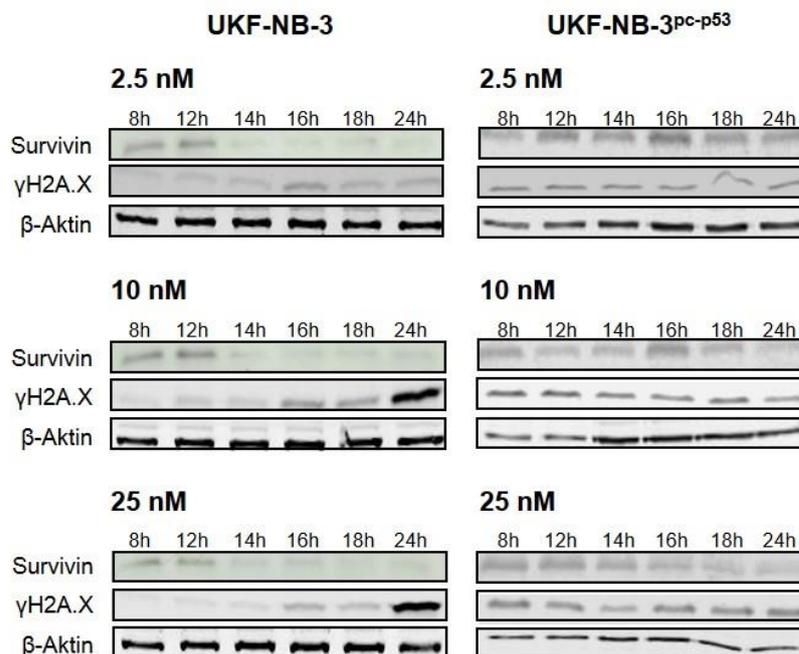


Abbildung 37 | Einfluss der YM155 Wirkung auf die Survivin und γ H2A.X Expression hinsichtlich des p53-Status der untersuchten Zellen. UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen wurden für unterschiedliche Inkubationszeiten mit den YM155 Konzentrationen 2,5 nM, 10 nM und 25 nM behandelt. β -Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

Während die Survivin Expression in der UKF-NB-3 Zelle, wie bereits zuvor gezeigt, bei einer YM155 Konzentration von 2,5 nM und einer Inkubationszeit über 14 Stunden deutlich inhibiert ist (Abb. 37), so zeigt sich eine Reduzierung des Survivin-Levels in

der p53-depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} Zelle erstmals nach 24 Stunden mit 10 nM YM155. Eine deutliche Induktion der DNA-Schadensantwort war bei UKF-NB-3 erst nach 24 Stunden (10 nM YM155) zu beobachten. Die p53-depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen zeigten selbst nach einer 24-stündigen Behandlung mit 25 nM YM155 keinen Anstieg der γ H2A.X Expression.

Um zu untersuchen, ob beziehungsweise wann eine eindeutige DNA-Schadensantwort in den p53-depletierten zu detektieren ist, wurde die Inkubationszeit der YM155 Behandlung auf 48 Stunden verlängert (Abb. 38).

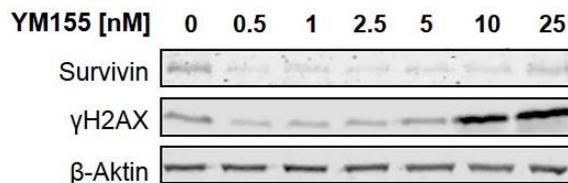


Abbildung 38 | Western-Blot mit p53-depletierten UKF-NB-3 Zellen nach YM155 Behandlung für 48 Stunden. Nach einer Inkubationszeit von 48 h und einer YM155 Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen, zeigt sich für UKF-NB-3^{pc-p53} eine deutliche Survivin Inhibierung, aber auch eine eindeutige γ H2A.X Expression.

Nach einer Behandlung von UKF-NB-3^{pc-p53} mit verschiedenen YM155 Konzentrationen und einer Inkubationszeit über 48 Stunden ist nun eine verstärkte Phosphorylierung von H2A.X, und somit eine Induktion der DNA-Schadensantwort zu erkennen. Dabei zeigt sich ein deutlicher Anstieg nach einer YM155 Behandlung mit 10 nM, während die Survivin Inhibierung zu diesem Zeitpunkt bereits mit einer YM155 Konzentration von 0,5 nM sichtbar ist. Dies zeigt, dass durch die p53 Depletierung die Wirkung von YM155 in den untersuchten Zellen deutlich verzögert erfolgt.

4.5.1 Einfluss der Nutlin-3 Behandlung auf die Wirkung von YM155

Um die Frage der Funktionalität von p53 beantworten zu können, wurden die parentalen, *scrambled* und p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen auf ihre Nutlin-3 Sensitivitäten im MTT-Viabilitätstest geprüft. Nutlin-3 ist ein *cis*-Imidazolin und inhibiert die Interaktion zwischen p53 und MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*). Dabei ist MDM2 ein negativer Regulator von p53, indem es an p53 bindet und dessen Funktion inhibiert. Nutlin-3 bindet an MDM2 und induziert somit die Freisetzung von p53, welches wiederum die Apoptose induziert (144).

Die MTT-Viabilitätstests zeigen durch die Nutlin-3 Behandlung bei den p53-depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} und UKF-NB-6^{pc-p53} eine verminderte Sensitivität gegenüber Nutlin-3 im Vergleich zur ‚*scrambled*‘ Kontrollzelllinien (Tab. 13). Bei den UKF-NB-3 Zelllinien ist eine Erhöhung des IC₅₀ Wertes der UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen (IC₅₀: 5,92 ± 0,51 μ M) um

4. Ergebnisse

den Faktor 4,1 im Vergleich zu UKF-NB-3^{pc-scr} (IC₅₀: 1,46 ± 0,35 µM) zu beobachten. In UKF-NB-6 ist ein 3,4-facher Unterschied im IC₅₀ Wert messbar (von 1,33 ± 0,16 µM für UKF-NB-6^{pc-scr} auf 4,52 ± 0,33 µM für UKF-NB-6^{pc-p53}).

Tabelle 13 | Nutlin-3 Behandlung der p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen. Mittels MTT-Viabilitätstests wurden die IC₅₀ Werte gegen Nutlin-3 ermittelt. ***P<0,001, **P<0,01 im Verhältnis zur ‚scrambled‘ Kontrollzelle Zelllinie. ¹Verhältnis zur ‚scrambled‘ Kontrollzelle.

Zelllinie	IC ₅₀ Nutlin-3 [µM]
UKF-NB-3	1,06 ± 0,01
UKF-NB-3 ^{pc-scr}	1,46 ± 0,35
UKF-NB-3 ^{pc-p53}	5,92 ± 0,51** (¹ 4,1)
UKF-NB-6	1,28 ± 0,08
UKF-NB-6 ^{pc-scr}	1,33 ± 0,16
UKF-NB-6 ^{pc-p53}	4,52 ± 0,33*** (¹ 3,4)

Da bereits zuvor gezeigt wurde, dass die Viabilität gegenüber YM155 vom jeweiligen p53 Status der verwendeten Neuroblastomzellen abhängig zu sein scheint, wurde untersucht inwieweit sich eine kombinierte Behandlung von YM155 mit dem p53 Aktivator Nutlin-3 auf die Viabilität der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen auswirkt (Abb. 39).

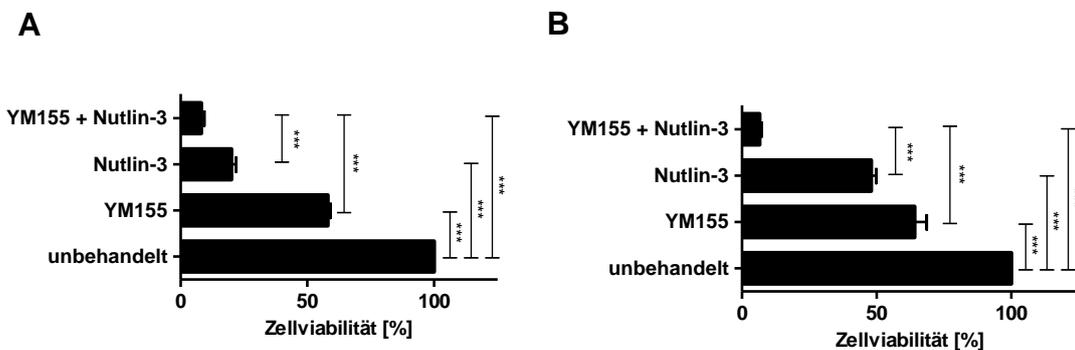


Abbildung 39 | Kombierter Effekt von YM155 und Nutlin-3 auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen. Die im MTT-Viabilitätstest eingesetzten YM155 Konzentration betrug 0,625 nM und für Nutlin-3 wurde mit einer Konzentration von 1 µM in **A)** UKF-NB-3 und **B)** UKF-NB-6 Zellen gearbeitet. ***P<0,001 im Vergleich untereinander.

Eine kombinierte Behandlung der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen mit 0,625 nM YM155 und 1 µM Nutlin-3 zeigt einen signifikant verstärkenden Effekt in beiden Zelllinien (Abb. 39). Die Konzentrationen dieser beiden Stoffe wurden um den jeweiligen IC₅₀ Wert gewählt. Wie zu erkennen ist, bewirkt bereits die alleinige YM155 Behandlung (0,625 nM) eine Sensibilisierung der Zellen (UKF-NB-3 Viabilität bei

4. Ergebnisse

58,1 ± 1,0 %; UKF-NB-6 Viabilität bei 64,2 ± 4,5 %), wobei der Effekt durch die Nutlin-3 Behandlung (1 µM) nochmals deutlicher ist (UKF-NB-3 Viabilität bei 20,1 ± 1,8 %; UKF-NB-6 Viabilität bei 42,9 ± 1,9 %). In der Kombination dieser beiden Stoffe wird für UKF-NB-3 eine verbleibende Viabilität von 8,2 ± 1,2 % gemessen, wohingegen die Viabilität der UKF-NB-6 Zellen auf 6,5 ± 0,7 % signifikant reduziert wird.

Dieses verstärkende Zusammenspiel von YM155 und Nutlin-3 auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen zeigt einen Zusammenhang zwischen der einerseits durch Nutlin-3 verursachten p53 Akkumulierung und andererseits der Survivin-inhibierenden Wirkung von YM155. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde im Western-Blot geprüft, inwiefern die kombinierte YM155 und Nutlin-3 Behandlung einen Einfluss auf die Expression entsprechender Proteine in UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen ausübt (Abb. 40).

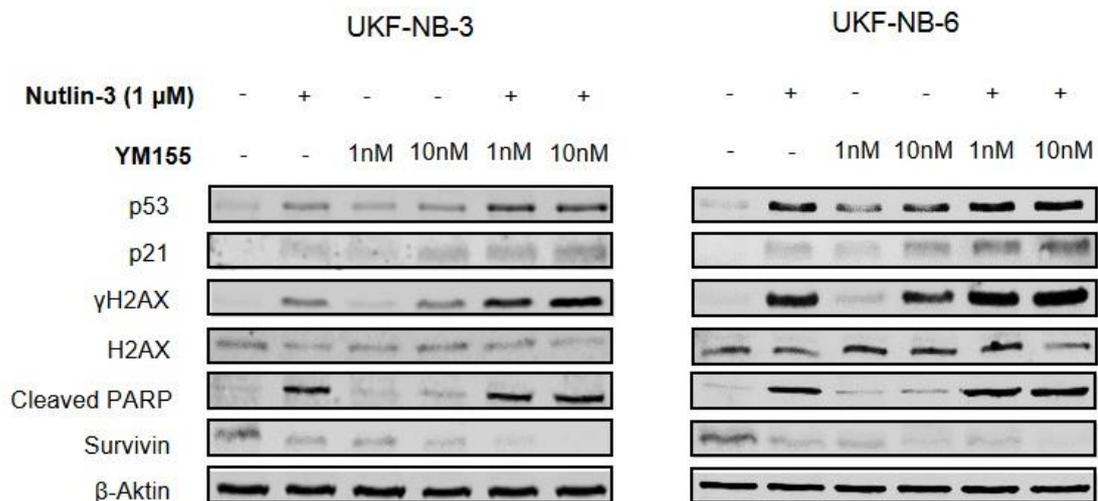


Abbildung 40 | Effekte von YM155, Nutlin-3 und deren Kombination auf die Proteinexpression von UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Proteinextraktion vorgenommen. Während eine alleinige Behandlung mit 1 nM bzw. 10 nM YM155 und 1 µM Nutlin-3 bei einigen Proteinen bereits einen Effekt zeigt, so steigert sich dieser nochmals bei der Kombination dieser beiden Stoffe. β-Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

Auch auf Proteinebene ist ein verstärkender Effekt dieser beiden Stoffe zu beobachten. So erfolgt durch die kombinierte Behandlung eine stärkere p53- und p21-Akkumulierung in beiden Zelllinien. Eine ebenfalls durch die YM155 und Nutlin-3 Kombination vermittelte Verstärkung der γH2A.X Expression bestätigt den kombinierten Effekt dieser Stoffe auf die Induktion der DNA-Schadensantwort. Die Kombinationsbehandlung zeigt zudem einen verstärkenden Effekt auf die Survivin-Inhibierung. Dabei war nach der Kombination mit 1 µM Nutlin-3 und 10 nM YM155 in beiden Zelllinien nahezu keine Survivin Expression mehr zu detektieren. Die gemessenen Proteinexpressionen wurden zudem quantifiziert und in den

4. Ergebnisse

nachstehenden Abbildungen aufgetragen (Abb. 41 für UKF-NB-3 und Abb. 42 für UKF-NB-6).

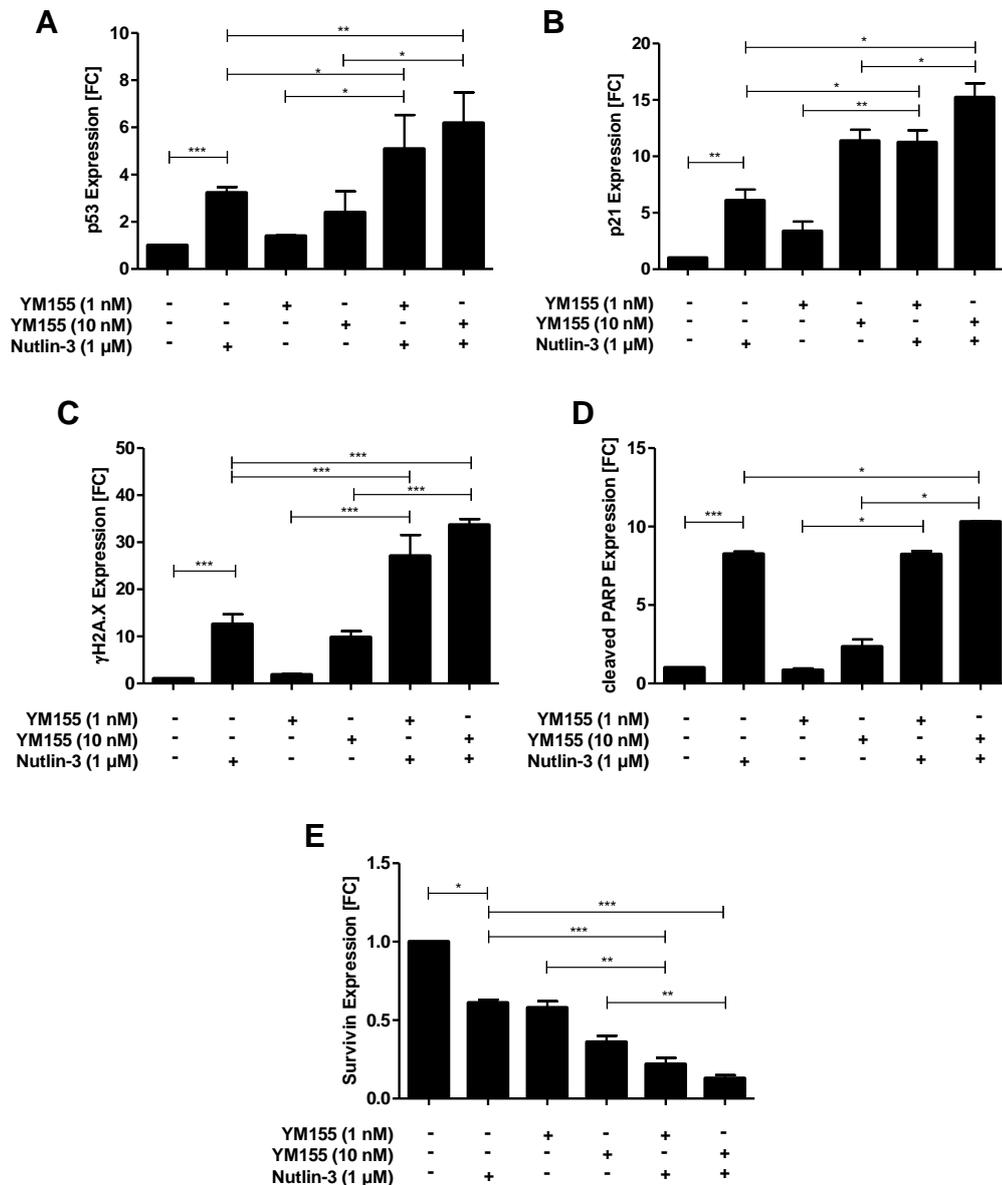


Abbildung 41 | Quantifizierung zum Western-Blot nach YM155 und Nutlin-3 Behandlung in UKF-NB-3 Zellen. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Konzentrationen von YM155 und Nutlin-3 über eine Inkubationszeit von 24 h behandelt. Die Western-Blots bezüglich der Proteine **A)** p53, **B)** p21, **C)** γH2A.X, **D)** cleaved PARP und **E)** Survivin wurden unter Berücksichtigung der β-Aktin Ladekontrollen mit dem Odyssey Gerät der Firma Li-Cor quantifiziert. Dabei wurden die einzelnen Behandlungen auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. ***P<0,001; **P<0,01 und *P<0,05 im Verhältnis untereinander.

Anhand der Quantifizierung ist in Abb. 41 A zu erkennen, dass die Nutlin-3 Behandlung (1 μM) einen signifikanten Anstieg von p53 in UKF-NB-3 bewirkt (3-fach). Auch die Zugabe von 10 nM YM155 verursacht einen Anstieg in der p53 Expression, wobei durch die Kombination von YM155 und Nutlin-3 ein signifikant synergistischer Anstieg der p53 Expression entsteht. Dabei zeigt sich durch die Behandlung von 1 μM Nutlin-3 und 10 nM YM155 eine 6-fach erhöhte p53 Expression im Vergleich zu der

4. Ergebnisse

unbehandelten Kontrolle. Ein ähnliches Bild zeigt sich bezüglich der p21 Expression (Abb. 41 B). Auch hier ist durch die kombinierte Behandlung mit 10 nM YM155 und 1 μ M Nutlin-3 eine 15-fache Erhöhung des p21 Proteinlevels in UKF-NB-3 zu beobachten. Ebenfalls erfolgt ein Anstieg der γ H2A.X Expression (Abb. 41 C). Dies zeigt, dass durch die Kombinationsbehandlung eine signifikant synergistisch erhöhte Induktion der DNA-Schadensantwort (Faktor 32) stattfand. Auch die Induktion der Apoptose, in diesem Versuchsansatz durch *cleaved* PARP angezeigt (Abb. 41 D), ist durch die Kombination von YM155 mit Nutlin-3 stärker. Die Survivin Expression wird durch die Kombination, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, als auch zu den Einzelbehandlungen, signifikant inhibiert (Abb. 41 E).

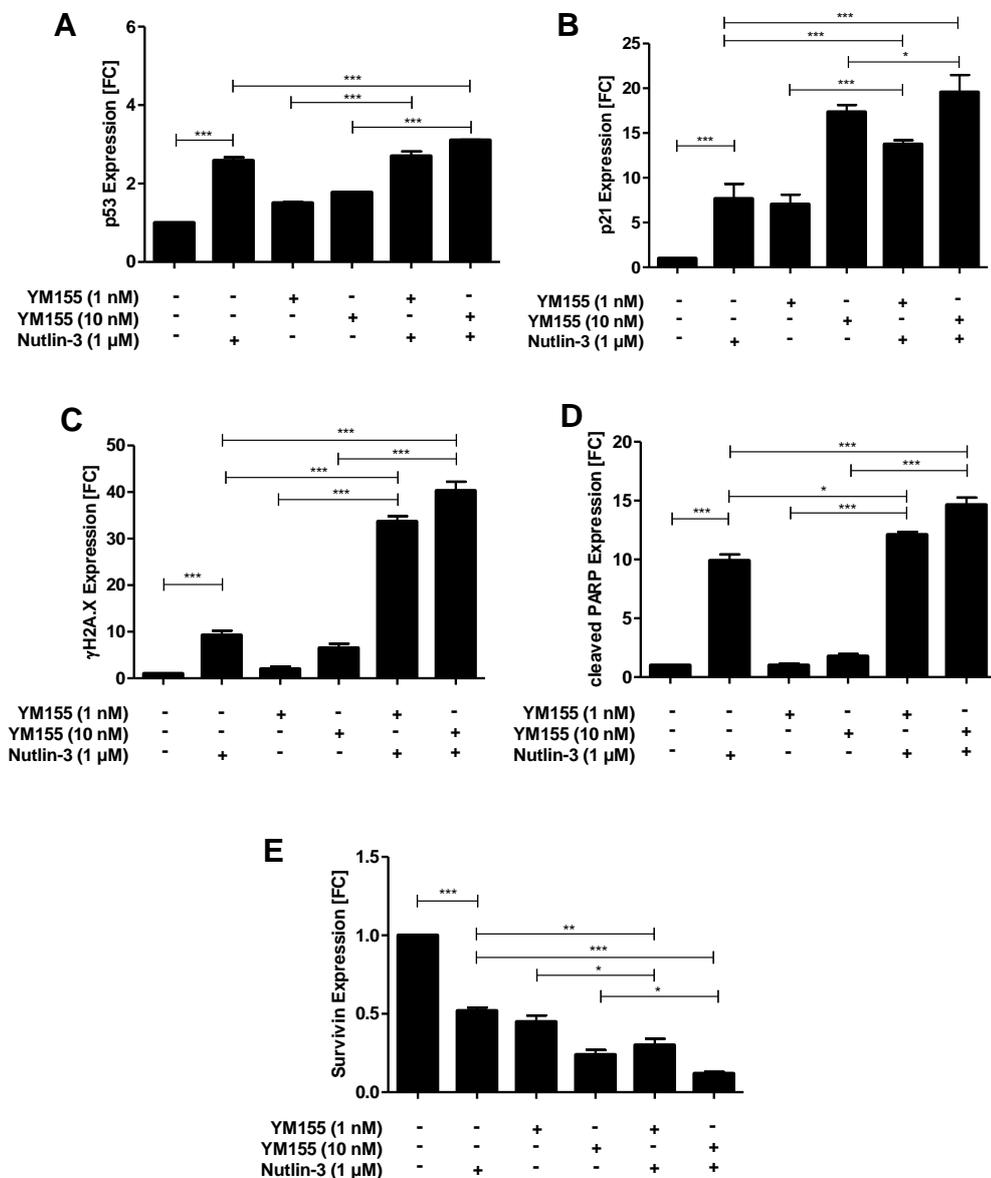


Abbildung 42 | Quantifizierung zum Western-Blot nach YM155 und Nutlin-3 Behandlung in UKF-NB-6 Zellen. Die Zellen wurden mit den jeweiligen YM155 und Nutlin-3 Konzentrationen für 24 h behandelt. Eine Quantifizierung der untersuchten Proteine **A)** p53, **B)** p21, **C)** γ H2A.X, **D)** *cleaved* PARP und **E)** Survivin erfolgte unter Berücksichtigung der β -Aktin Ladekontrolle am *Odyssey* Gerät. Die

unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ und * $P < 0,05$ im Verhältnis untereinander.

Auch in UKF-NB-6 Zellen zeigt sich durch die Kombinationsbehandlung mit YM155 (10 nM) und Nutlin-3 (1 μ M) ein synergistischer Effekt auf die Expression von p53 (3,1-fach erhöht), p21 (19,6-fach erhöht), γ H2A.X (40,3-fach erhöht) und *cleaved* PARP (14,2-fach erhöht) (Abb. 42). Die Survivin-Inhibierung erfolgt in UKF-NB-6 durch die Kombination von 10 nM YM155 und 1 μ M Nutlin-3 um über 80 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch die Kombination von YM155 mit dem p53-Aktivator Nutlin-3 die Wirkung beider Stoffe in den untersuchten Neuroblastomzellen verstärkt wird. Dieser Effekt ist sowohl hinsichtlich der Zellviabilität, als auch in der Proteinexpression von p53, p21, γ H2A.X, *cleaved* PARP und Survivin zu beobachten.

4.6 Einfluss von Bestrahlung auf die Wirkung von YM155

Als Auslöser der DNA-Schadensantwort können verschiedenste Umwelteinflüsse verantwortlich sein. Darunter fällt auch die Bestrahlung von Zellen, welche wiederum in der Therapie von gut- und bösartigen Tumoren eingesetzt wird. Auch bei der Behandlung von Neuroblastomen wird eine Strahlentherapie angewandt, falls nach erfolgter Operation und Chemotherapie noch aktive Tumorzellen im Patienten vorzufinden sind. Dabei bekommen die Patienten eine Gesamtdosis von 40 Gy verabreicht, wobei die Behandlung über vier bis sechs Wochen mit einer täglichen Dosis zwischen 1,5 und 2 Gy erfolgt (145)¹⁰. Um zu untersuchen inwieweit sich der durch die Bestrahlung induzierte DNA-Schaden auf das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell der UKF-NB-3 Zelllinien auswirkt, erfolgte deren Behandlung mit 1 Gy, 3 Gy und 5 Gy. Des Weiteren wurde neben der chemosensitiven UKF-NB-3 Zelle, ebenfalls untersucht wie die YM155 resistente UKF-NB-3^{rYM155}²⁰ mit der zuvor gezeigten reduzierten Survivin und erhöhten p53 Expression, sowie eine p53-Depletierung (in UKF-NB-3^{pc-p53}) sich auf die Viabilität nach der Bestrahlung der Zellen auswirkt.

Nach erfolgter Bestrahlung zeigten die p53 depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen bis einschließlich 5 Gy keine Änderung in der Zellviabilität (Abb. 43). Diese Zellen zeigten 24 Stunden nach Bestrahlung eine Viabilität vom $93,10 \pm 3,16$ %. Bei den anderen

¹⁰http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohneuroblpatinfo120120611/therapie/behandlungsmethoden/strahlentherapie/index_ger.html

4. Ergebnisse

Zelllinien war die Viabilität bei 3 Gy dagegen bereits signifikant gemindert: bei UKF-NB-3 sind 45,7 % der Zellen, bei UKF-NB-3^{pc-scr} 45,8 % der Zellen und bei UKF-NB-3^{fYM155²⁰} 69,1 % der Zellen vital. Nach einer Bestrahlung mit 5 Gy sind die zuvor genannten Zelllinien, außer UKF-NB-3^{pc-p53} signifikant um etwa 70 % in ihrer Viabilität inhibiert.

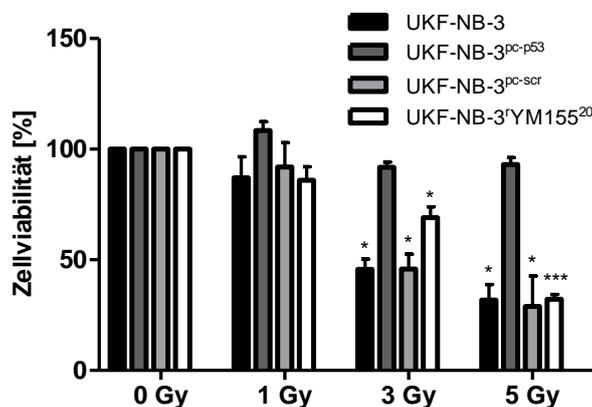


Abbildung 43 | Einfluss der Bestrahlung auf die Zellviabilität von UKF-NB-3 Zellen. UKF-NB-3, UKF-NB-3^{pc-scr}, UKF-NB-3^{pc-p53} und UKF-NB-3^{fYM155²⁰} wurden mit den Bestrahlungsdosen 1 Gy, 3 Gy und 5 Gy behandelt und danach für 24 h inkubiert. Danach wurden die Viabilität mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests ermittelt. ***P<0,001; *P<0,05 im Verhältnis zu der nicht bestrahlten Kontrolle.

Da die Bestrahlung einen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität ausübt, bleibt zu klären wie die Zellen auf diese Behandlung hinsichtlich ihrer Proteinexpression reagieren (Abb. 44).

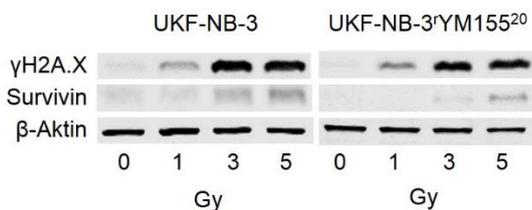


Abbildung 44 | Einfluss der Bestrahlung auf die Expression von γH2A.X und Survivin auf UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{fYM155²⁰} Zellen. 24 h nach erfolgter Bestrahlung mit den Dosen 1 Gy, 3 Gy und 5 Gy, wurde mittels Western-Blot die Expression von γH2A.X und Survivin in den genannten Zellen überprüft.

Auf Proteinebene zeigt sich, dass mit Zunahme der Bestrahlungsdosis ebenfalls ein Anstieg in der γH2A.X Expression in UKF-NB-3 und der an 20 nM YM155 adaptierten UKF-NB-3 Zelle zu beobachten ist (Abb. 44). Als Folge des durch die Bestrahlung induzierten DNA-Schadens, kommt es jedoch zu einem Anstieg der Survivin Expression. Wobei die Survivin-Induktion in den chemosensitiven UKF-NB-3 Zellen weitaus stärker ausfällt als bei UKF-NB-3^{fYM155²⁰}. Wie jedoch zuvor bereits gezeigt wurde, exprimiert die UKF-NB-3^{fYM155²⁰} Sublinie von vornherein eine geringere Survivin Menge.

4. Ergebnisse

Da funktionales p53 ein wichtiger Faktor bei der Bestrahlungsensitivität hinsichtlich der Zellviabilität darstellt (Abb. 43), wurden exemplarisch UKF-NB-3, UKF-NB-3^{pc-scr} und UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen mit den Dosen 1 Gy, 3 Gy und 5 Gy bestrahlt. Nach 24 Stunden wurde die Expression von Survivin und dem DNA-Schadensantwort-Marker γ H2A.X untersucht.

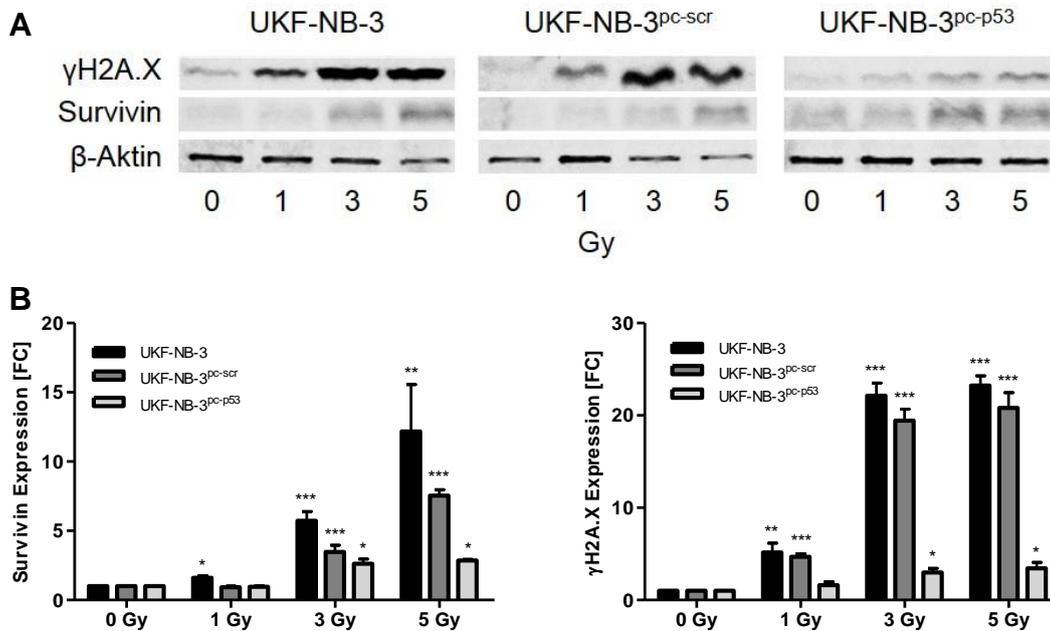


Abbildung 45 | Survivin und γ H2A.X Expression 24 Stunden nach Bestrahlung von UKF-NB-3, UKF-NB-3^{pc-scr} und UKF-NB-3^{pc-p53}. Die genannten Zellen wurden mit 1 Gy, 3 Gy und 5 Gy bestrahlt, wobei die Proteinextraktion 24 h nach der Bestrahlung erfolgte. **A)** Mittels Western-Blot Analysen wurde die Expression von Survivin und γ H2A.X nach der Behandlung überprüft. **B)** Die Quantifizierung wurde mit dem Odyssey Gerät der Firma Li-Cor durchgeführt, wobei β -Aktin als Ladekontrolle berücksichtigt und anschließend auf die jeweilige nicht bestrahlte Kontrolle bezogen wurde. ***P<0,001; **P<0,01; *P<0,05 im Verhältnis zur nicht bestrahlten Kontrolle.

Die Expression von Survivin wird in den p53-depletierten UKF-NB-3 Zellen mit steigender Bestrahlungsdosis deutlich weniger erhöht, als es bei UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{pc-scr} der Fall ist (Abb. 45). Bei diesen p53 Wildtyp (wt) Zelllinien ist bereits nach einer Behandlung mit 3 Gy eine signifikante Steigerung in der Survivin Expression zu detektieren, wobei bei einer Bestrahlung mit 5 Gy dieser Unterschied noch einmal deutlicher zu erkennen ist. Ein ähnliches Bild zeigt die γ H2A.X Expression, auch hier ist ein deutlicher Unterschied in der Proteinexpression zu beobachten. Dabei zeigen wiederum die p53-depletierten Zellen im Vergleich zu UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{pc-scr} signifikant weniger γ H2A.X mit steigender Strahlendosis.

Sowohl bei der Behandlung mit YM155, als auch bei der Bestrahlung scheint der p53 Status der Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden eine Reihe an Viabilitätstests jeweils mit YM155-

4. Ergebnisse

Behandlung und Bestrahlung alleine, als auch in der Kombination beider Behandlungen durchgeführt (Abb. 46).

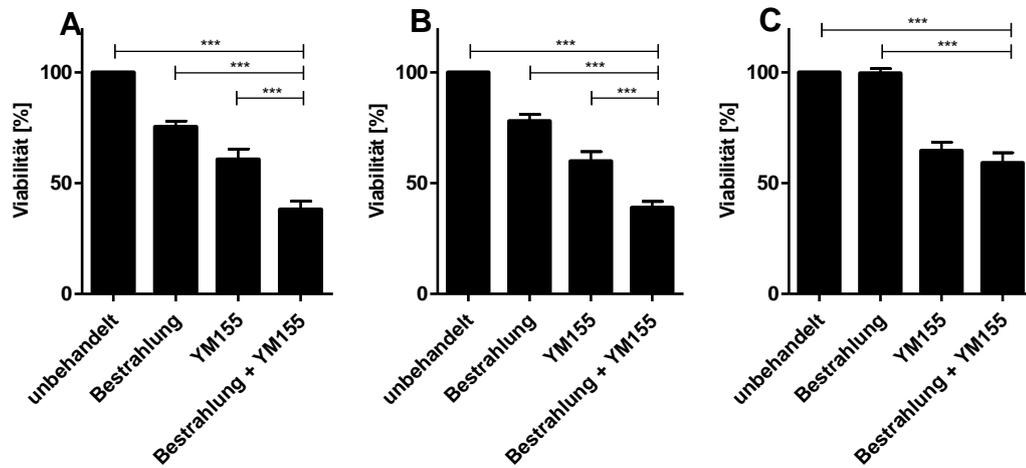


Abbildung 46 | Effekt von YM155 und Bestrahlung bei Wildtyp p53 Neuroblastomzellen. A) UKF-NB-3, B) UKF-NB-3^{pc-scr} und C) UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen wurden mit 0,625 nM YM155 und 1 Gy jeweils einzeln und in Kombination behandelt. Die Viabilität wurde mit Hilfe von MTT-Viabilitätstests ermittelt. ***P<0,001 im Vergleich untereinander.

Eine kombinierte Behandlung mit YM155 und Bestrahlung zeigt bei den p53 Wildtyp UKF-NB-3 Zellen (UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{pc-scr}) eine signifikant verstärkte Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. So zeigt UKF-NB-3 nach erfolgter Bestrahlung mit 1 Gy eine verbleibende Viabilität von 75,4 % und nach der Behandlung mit 0,625 nM YM155 eine Viabilität von 60,8 %, während eine Kombination beider Behandlungen diese auf 38,2 % herabsetzt. Ähnlich verhält es sich bei UKF-NB-3^{pc-scr} (Viabilität nach Bestrahlung mit 1 Gy 78,0 %; Viabilität nach YM155 Behandlung mit 0,625 nM 59,9 %; Kombination von Bestrahlung und YM155 Behandlung 38,9 %). Dagegen zeigt die p53-depletierte Zelle bei der Kombinationsbehandlung nur einen signifikanten Unterschied zur Bestrahlung (Bestrahlung mit 1 Gy 99,7 % Viabilität; Kombination aus Bestrahlung und YM155 mit 1 Gy bei 59,1 %), jedoch nicht im Vergleich zur YM155 Behandlung (64,7 %).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es durch die Induktion der DNA-Schadensantwort durch Bestrahlung ebenfalls zu einem Anstieg der Survivin Expression in UKF-NB-3 kommt und die an YM155 adaptierten UKF-NB-3^{rYM155}²⁰ Zellen hinsichtlich der Zellviabilität gleichermaßen sensibel auf die Bestrahlung reagieren. Des Weiteren zeigt sich, dass die Funktionalität von p53 eine entscheidende Rolle bei der YM155 Behandlung, als auch bei der Bestrahlung von Neuroblastomzellen spielt.

4.7 Charakterisierung von YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen

Wie bereits zuvor erwähnt, befindet sich YM155 in mehreren klinischen Phase II Studien hinsichtlich der Prostatakarzinom- und Mammakarzinom-Therapie. Darüber hinaus wurde neben dem Hauptfokus der Arbeit auf der Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3, auch eine Auswahl an Prostatakarzinom- (22RV1 und PC-3) und Mammakarzinom- (HCC-1806 und MDA-MB-231) Zelllinien an eine entsprechende YM155-Endkonzentration adaptiert. Um die erfolgreiche Adaptierung zu bestätigen, wurde zunächst die Sensitivität der Zellen gegenüber YM155 ermittelt (Tab. 14).

Tabelle 14 | IC₅₀ Werte gegen YM155 in chemosensitiven und an YM155-adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen. Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests wurden die IC₅₀ Werte der genannten Zellen ermittelt. Das Verhältnis zu der jeweiligen chemosensitiven, parentalen Zelle ist in der rechten Spalte dargestellt. *P<0,05 im Verhältnis zur jeweiligen parentale Zelllinie.

Zelllinie	IC ₅₀ YM155 [nM]	Verhältnis zur chemosensitiven Zelle
22RV1	3,41 ± 0,68	
22RV1^rYM155³⁰⁰	22787,00 ± 5308,96**	6682,4
PC-3	0,38 ± 0,13	
PC-3^rYM155²⁰	45,48 ± 6,29*	119,7
HCC-1806	1,70 ± 0,27	
HCC-1806^rYM155²⁰	49,84 ± 6,45*	29,3
MDA-MB-231	0,71 ± 0,23	
MDA-MB-231^rYM155²⁰	31,85 ± 4,99*	44,9

Die untersuchten Karzinomzellen zeigen IC₅₀-Wert gegen YM155 im Bereich zwischen 0,45 nM und 3,41 nM. PC-3, HCC-1806 und MDA-MB-231 wurden an eine YM155-Endkonzentration von 20 nM adaptiert, wobei die adaptierten Sublinien eine zwischen 29,3- und 119,7-fach signifikant geringere Sensitivität gegen YM155 aufweisen. Die Prostatakarzinomzelllinie 22RV1^rYM155³⁰⁰ wurde dagegen bis 300 nM adaptiert und zeigt im Vergleich zur parentalen Linie eine drastische Sensitivitätsminderung um den Faktor 6682,4. In weiteren Viabilitätstests ist bei den YM155 resistenten Sublinien ebenfalls eine Kreuzresistenz gegenüber der ABCB1 Substrate Docetaxel und Doxorubicin zu beobachten (Tab. 15), wobei PC-3^rYM155²⁰ eine Ausnahme darstellt. Diese Sublinie zeigt weder eine Kreuzresistenz gegen Docetaxel noch gegen Doxorubicin. Das Zytostatikum Cisplatin hingegen gilt nicht als ABCB1 Substrat und zeigt auch nur bei HCC-1806^rYM155²⁰ eine Kreuzresistenz.

4. Ergebnisse

Tabelle 15 | IC₅₀ Werte gegen Cisplatin, Docetaxel und Doxorubicin von chemosensitiven und an YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen. Die Ermittlung der IC₅₀ Werte wurde mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests durchgeführt. ***P<0,001; **P<0,01; *P<0,05 im Verhältnis zur jeweiligen parentalen Zelle. ¹Faktor der Sensitivitätsminderung der an YM155 adaptierten Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen chemosensitiven Linien.

Zelllinie	IC ₅₀		
	Cisplatin [ng/ml]	Docetaxel [ng/ml]	Doxorubicin [ng/ml]
22RV1	459,99 ± 17,76	0,22 ± 0,03	6,13 ± 0,29
22RV1^rYM155³⁰⁰	359,34 ± 41,11* (¹ 0,8)	24,86 ± 4,81* (¹ 113,0)	74,37 ± 9,78** (¹ 12,1)
PC-3	654,98 ± 21,26	0,08 ± 0,02	13,99 ± 2,23
PC-3^rYM155²⁰	280,49 ± 16,96* (¹ 0,4)	0,06 ± 0,00*** (¹ 0,8)	11,35 ± 1,21* (¹ 0,8)
HCC-1806	283,40 ± 6,23	0,11 ± 0,01	11,61 ± 0,08
HCC-1806^rYM155²⁰	688,78 ± 40,10* (¹ 2,4)	0,31 ± 0,07** (¹ 2,8)	29,84 ± 0,61* (¹ 2,6)
MDA-MB-231	2630,50 ± 28,80	0,15 ± 0,01	4,04 ± 0,06
MDA-MB-231^rYM155²⁰	1054,69 ± 74,76* (¹ 0,4)	26,22 ± 3,96** (¹ 174,8)	67,42 ± 5,99* (¹ 16,7)

Anhand der im MTT-Viabilitätstest ermittelten IC₅₀ Werten ist zu erkennen, dass sowohl bei der 22RV1^rYM155³⁰⁰, als auch bei MDA-MB-231^rYM155²⁰ Sublinie eine Kreuzresistenz gegenüber Docetaxel und Doxorubicin, jedoch nicht für Cisplatin vorliegt. Dabei zeigt sich in 22RV1^rYM155³⁰⁰ eine 113-fache Reduktion der Sensitivität gegenüber Docetaxel, während gegen Doxorubicin eine Reduktion um den Faktor 12,1 zu beobachten ist (jeweils gegen 22RV1). Ein ähnliches Bild zeigt die Mammakarzinomzelle MDA-MB-231^rYM155²⁰, auch hier wurde eine 174,8-fache Sensitivitätsminderung gegen Docetaxel, sowie eine 16,7-fache Minderung gegen Doxorubicin ermittelt, während sich gegen Cisplatin (Faktor 0,4) keine Kreuzresistenz ergibt (jeweils gegen MDA-MB-231). Dagegen zeigt HCC-1806^rYM155²⁰ bei allen drei getesteten Zytostatika nur eine leichte Kreuzresistenz um den Faktor 2,4 bis 2,8 im Vergleich zu HCC-1806. Für PC-3^rYM155²⁰ ergibt sich weder für Cisplatin (Faktor 0,4), noch für die beiden ABCB1 Substrate Docetaxel (Faktor 0,8) und Doxorubicin (Faktor 0,8) eine Kreuzresistenz gegenüber PC-3.

Um die Frage bezüglich des Resistenzmechanismus gegenüber YM155 beantworten zu können, wurden die beschriebenen Zellen auf ihre Expression der Transporter ABCB1 und SLC35F2 untersucht, wobei im Vorfeld weitere MTT-Viabilitätstests mit

4. Ergebnisse

YM155 in Kombination mit den ABCB1 Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar durchgeführt wurden (Tab. 16).

Tabelle 16 | Einfluss des ABC-Transporters ABCB1 auf die Zellviabilität von chemosensitiven und YM155-resistenten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen. Mit Hilfe des MTT-Viabilitätstests wurde durch den kombinierten Einsatz mit den ABCB1 Inhibitoren Verapamil (10 µM) und Zosuquidar (1,25 µM) der IC₅₀ Wert gegen YM155 ermittelt. **P<0,01; *P<0,05 im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. ²Faktor um den der IC₅₀ Wert durch die Inhibitor Zugabe verringert wird.

Zelllinie	IC ₅₀ YM155 [nM]		
	--	+ Verapamil (10 µM)	+ Zosuquidar (1,25 µM)
22RV1	3,41 ± 0,68	3,39 ± 0,35*	3,67 ± 0,26*
22RV1^rYM155³⁰⁰	22787,00 ± 5308,96	715,42 ± 159,82* (² 31,9)	8,92 ± 1,46** (² 2554,6)
PC-3	0,38 ± 0,13	0,36 ± 0,05*	0,33 ± 0,11*
PC-3^rYM155²⁰	45,48 ± 6,29	41,73 ± 2,65* (² 1,1)	90,39 ± 0,02* (² 0,5)
HCC-1806	1,70 ± 0,27	1,50 ± 0,02**	1,54 ± 0,07**
HCC-1806^rYM155²⁰	49,84 ± 6,45	46,03 ± 10,62* (² 1,1)	85,04 ± 14,44* (² 0,6)
MDA-MB-231	0,71 ± 0,23	0,96 ± 0,18*	0,63 ± 0,11*
MDA-MB-231^rYM155²⁰	31,85 ± 4,99	2,20 ± 0,34* (² 14,5)	0,36 ± 0,11** (² 88,5)

Die Zugabe der ABCB1 Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar führt bei 22RV1^rYM155³⁰⁰ und MDA-MB-231^rYM155²⁰ zu einer deutlichen Verringerung des IC₅₀ Wertes. Ein starker Effekt ist bei der an 300 nM YM155 adaptierten 22RV1 Zelllinie zu beobachten, hier kommt es durch die Kombinationsbehandlung mit Zosuquidar zu einer Reduktion des IC₅₀ Wertes um den Faktor 2554,6. Bei MDA-MB-231^rYM155²⁰ ist ebenfalls eine Reduktion zu erkennen (mit Verapamil eine Verringerung des IC₅₀ um das 14,5-Fache und mit Zosuquidar um den Faktor 88,5). Bei PC-3^rYM155²⁰ und HCC-1806^rYM155²⁰ zeigt sich durch die Inhibitor-Zugabe keine Resensitivierung der Zellen gegenüber YM155. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Zellen keine ausgeprägte ABCB1 Expression im Laufe des Adaptierungsprozesses ausbilden und auf einem anderen Weg die Resistenz gegen YM155 entwickelt haben. Diese Daten entsprechen auch den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse bezüglich der ABCB1 Expression (Abb. 47). Dabei zeigen sowohl 22RV1^rYM155³⁰⁰ und MDA-MB-231^rYM155²⁰ im Vergleich zu der jeweiligen chemosensitiven Zelllinie eine signifikante Erhöhung der ABCB1 Expression, während bei den PC-3 und HCC-1806

Zellen keine Erhöhung der ABCB1 Expression in den YM155-adaptierten Sublinien zu beobachten ist.

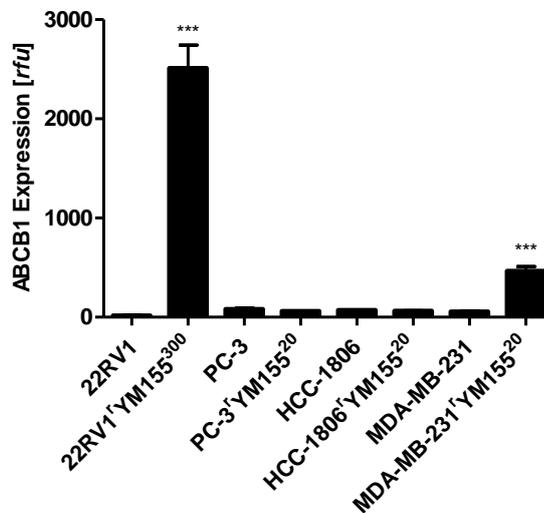


Abbildung 47 | ABCB1 Expression der chemosensitiven, parentalen und die an YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen. Mit Hilfe durchflusszytometrischen Analysen wurde die ABCB1 Expression der zu untersuchenden Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen bestimmt. ***P<0,001 Erhöhung der Expression im Verhältnis zu der jeweiligen parentalen Zelllinie.

Inwiefern dieser Adaptierungsprozess einen Einfluss auf die basale Expression der Proteine ABCB1, SLC35F2, γ H2A.X, H2A.X, Mcl-1 und Survivin ausübt, ist anhand der folgenden Western-Blot Analysen zu erkennen (Abb. 48).

Die graphische Ausarbeitung der im Western-Blot erhaltenen Quantifizierung (Abb. 49) zeigt, dass nicht nur bei den untersuchten Neuroblastomzellen (Abb. 16 und 17) eine verstärkte ABCB1 Expression hinsichtlich des Adaptierungsprozesses gegen YM155 festzustellen ist, sondern ebenfalls bei 22RV1^{rYM155}³⁰⁰ und MDA-MB-231^{rYM155}²⁰ sehr stark ausgeprägt vorliegt (Abb. 49 A). Gleichzeitig reduzieren PC-3^{rYM155}²⁰ und HCC-1806^{rYM155}²⁰ die Expression des ‚solute carrier‘ Proteins SLC35F2 (Abb. 49 B).

Eine signifikante Erhöhung der DNA-Schadensantwort konnte bei allen Zellen weder im Verhältnis der chemosensitiven zur YM155 resistenten Zelllinie, noch im Verhältnis zur nicht phosphorylierten H2A.X Form ermittelt werden (Abb. 49 C). Auch die Mcl-1 Expression zeigt durch den Adaptierungsprozess keine Veränderung der untersuchten Zelllinien (Abb. 49 D). Lediglich bei MDA-MB-231^{rYM155}²⁰ zeigt sich bei der Survivin Expression im Vergleich zur parentalen MDA-MB-231 eine reduzierte Expression von 50 % (Abb. 49 E).

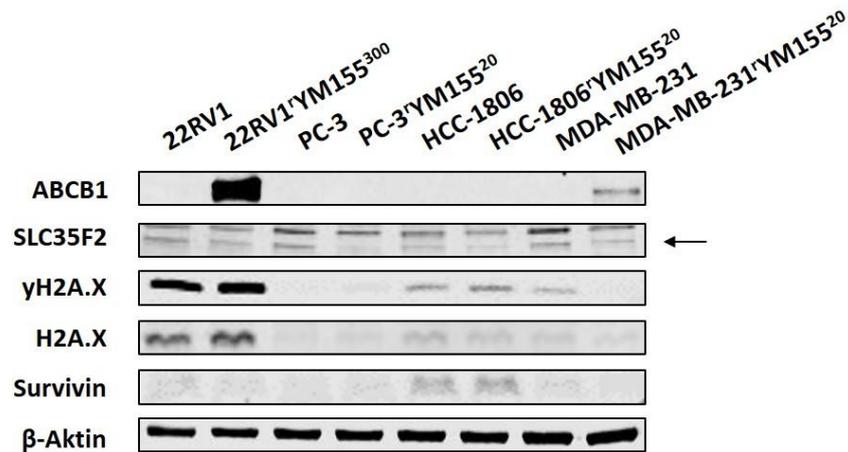


Abbildung 48 | Proteinexpression von chemosensitiven und YM155-resistenten Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen. Dabei wurde untersucht wie sich die Proteine γ H2A.X, H2A.X und Survivin, als auch die Transporter ABCB1 und SLC35F2 (Pfeil) in ihrer Expression als Folge des Adaptierungsprozesses verändern. Auch hier dient β -Aktin als Ladekontrolle und wurde bei der nachfolgenden Quantifizierung berücksichtigt.

Die Daten der Quantifizierung des Western-Blots zeigen, dass lediglich die YM155-resistenten 22RV1 und MDA-MB-231 Sublinien eine ABCB1 Expression entwickeln, wohingegen die Linien HCC-1806'YM155²⁰ und PC-3'YM155²⁰ keinerlei ABCB1-Expression aufweisen. Dies stützt sowohl die mittels dem Durchflusszytometer erhobenen Daten (Abb.47), als auch die im MTT Viabilitätstest erhaltenen IC₅₀ Werte gegen YM155 mit Kombination der Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar (Tab. 16), wobei lediglich 22RV1'YM155³⁰⁰ und MDA-MB-231'YM155²⁰ bei Zugabe der ABCB1-Inhibitoren gegen YM155 sensibilisiert werden konnten. Die Zelllinien HCC-1806'YM155²⁰ und PC-3'YM155²⁰ zeigen jedoch folglich der YM155 Adaptierung eine Änderung in der SLC35F2 Expression, wobei im Vergleich zu den chemosensitiven Ausgangszellen eine verminderte Expression dieses Transporters zu detektieren ist. Bei HCC-1806'YM155²⁰ ist bei der Quantifizierung des Western-Blots eine Reduktion der SLC35F2 Proteinexpression von 40 % zu beobachten, bei PC-3'YM155²⁰ sind es nahezu 90 %.

4. Ergebnisse

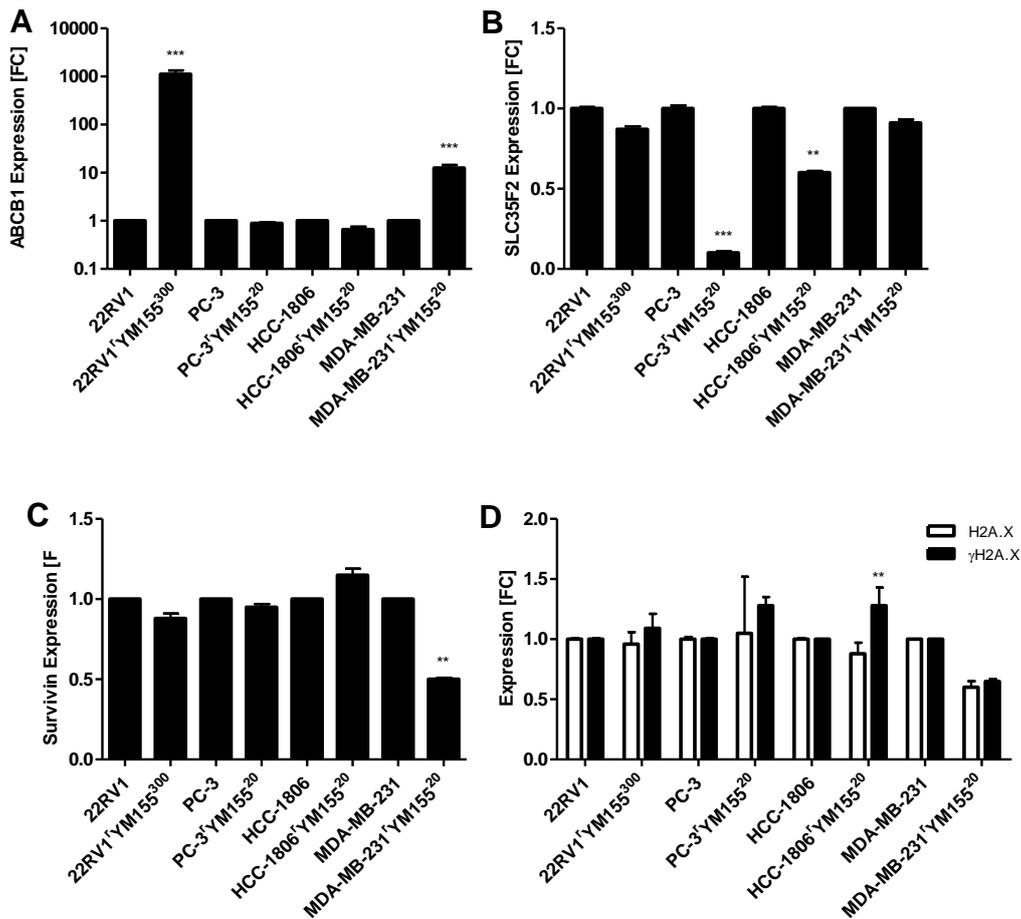


Abbildung 49 | Quantifizierung der Proteinexpression in chemosensitiven und an YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des Gerätes *Odyssey* der Firma Li-Cor erstellt und berechnet. In den zuvor genannten Zellen wurde die basale Expression der Proteine **A)** ABCB1, **B)** SLC35F2, **C)** Survivin und **D)** H2A.X und der phosphorylierten Form – γ H2A.X überprüft. Dabei wurde die Messung auf die jeweilige chemosensitive, parentale Zelllinie bezogen. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ im Verhältnis zu der parentalen Zelllinie. Für D) ** $P < 0,01$ im Verhältnis zu unphosphoryliertem H2A.X.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine entwickelte YM155 Resistenz in Tumorzellen nicht pauschal durch eine erhöhte ABCB1 und eine verminderte SLC35F2 Expression erklärt werden kann. Wie anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit YM155-resistenten Neuroblastom-, Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen zu erkennen ist, kann entweder eine erhöhte ABCB1- bzw. eine erniedrigte SLC35F2-Expression oder auch ein Zusammenspiel dieser beiden Transporter für die entwickelte Chemoresistenz gegen YM155 verantwortlich sein. Dabei zeigt sich selbst bei gleicher Tumorentität eine unterschiedliche Expression von ABCB1 und/oder SLC35F2 bezüglich der Resistenzentwicklung gegenüber YM155.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die antitumorale Wirkung des Survivin-Inhibitors YM155 an Neuroblastomzellen untersucht. Der Wirkmechanismus von YM155 ist zurzeit umstritten, dabei wird die vom Hersteller beschriebene Survivin inhibierende Wirkung (99) von einigen Studien mit Prostatakarzinomzellen hinterfragt (97, 146). Demnach soll YM155 primär die DNA-Schadensantwort induzieren, wobei die Survivin-Inhibierung lediglich als Konsequenz daraus folgt. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit in Neuroblastomzellen untersucht. Des Weiteren wurde anhand chemosensitiver und chemoresistenter UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Neuroblastomzelllinien der Einfluss des ABC-Transporters ABCB1, des ‚*solute carrier*‘ Proteins SLC35F2 und des p53 Status dieser Zellen auf die Wirksamkeit von YM155 analysiert. Darüber hinaus wurde erstmals in YM155 adaptierten Neuroblastomzellen der Resistenzmechanismus gegen YM155 untersucht.

YM155, auch als Sepantronium Bromid bezeichnet, wird vom japanischen Hersteller Astellas Pharma Inc. als primärer Survivin-Inhibitor betrieben (99). Survivin stellt in der Tumortherapie ein attraktives Ziel dar, da dieses Protein im differenzierten Gewebe nur selten vorzufinden ist (Ausnahmen sind embryonale und sich schnell teilende Zellen, wie CD34⁺ Stammzellen, Plazenta-, Thymus-, Magen- und Kolonepithelzellen (60), (61)), jedoch in nahezu jeder Tumorentität überexprimiert vorliegt (55, 56, 57, 58, 59). Die Wirksamkeit von YM155 wurde bereits in verschiedenen klinischen Studien untersucht. Beispiele hierzu sind abgeschlossene Phase II Studien an Patienten mit Prostatakarzinom, Melanoma und Non-Hodgkin's Lymphoma¹¹ oder eine ebenfalls abgeschlossene Phase II Studie an Brustkrebs Patienten¹².

Die Chemotherapie stellt eine der häufigsten Behandlungsmethoden in der Krebstherapie dar. Dabei ist eine erworbene oder auch bereits bestehende Chemoresistenz der Tumorzellen des Patienten ein großes Problem während der Behandlung und häufig für ein Therapieversagen verantwortlich. Im Falle der erworbenen Chemoresistenz ist es zudem möglich, dass die Tumore eine ‚*multidrug*‘-Resistenz (MDR) entwickeln, wobei die Tumorzellen gegen weitere Zytostatika, neben den eingesetzten, eine Resistenz ausbilden (147). Hinzu kommt, dass neu entwickelte Wirkstoffe gewöhnlich in Kombination mit bereits bestehenden Therapeutika in klinischen Studien getestet werden (148, 149, 150). Aufgrund dessen ist es von großer

¹¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00818480?term=YM-155&rank=2>

¹² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01038804?term=YM-155&rank=5>

Bedeutung neu entwickelte antitumorale Wirkstoffe bei bereits resistenten Tumorzellen zu testen, um so Therapieansätze optimieren zu können.

Einen möglichen Auslöser für Chemoresistenzen stellt die Überexpression von ABC-Transportern dar. Dieser Transportergruppe ist es möglich unter ATP-Verbrauch strukturell unterschiedliche Zytostatika aus den Zellen heraus zu transportieren (Efflux). Diese Stoffe können somit ihre Wirkung in den behandelten Zellen nicht mehr ausüben und die Tumorzellen überleben eine Behandlung. YM155 wird ebenfalls als ein Substrat des ABC-Transporters ABCB1 beschrieben (102). Ein weiterer Faktor bei der Resistenzentwicklung von Tumorzellen stellt der Influx (Transport in die Zellen) von Chemotherapeutika dar. Daran beteiligt zeigt sich eine große Transporter-Superfamilie der ‚*solute carrier*‘ (SLC) Proteine. Diese Transporter sorgen gewöhnlich für die Nährstoff- und Mineralstoffversorgung der Zellen (52), sind jedoch ebenfalls in der Lage andere Stoffe, wie niedermolekulare Substanzen, in die Zellen zu transportieren (51).

Um den Einfluss bereits erworbener Resistenzen auf die Wirksamkeit von YM155 in Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 113 Neuroblastomzellen, darunter 19 chemosensitive parentale Zelllinien und 94 chemoresistente Sublinien, auf ihre Sensitivität gegenüber YM155 mittels MTT-Viabilitätstest untersucht. Alle resistenten Neuroblastomzellen stammen aus der RCCL Sammlung (*Resistant Cancer Cell Line Collection*)¹³. Insgesamt lagen die YM155 Konzentrationen, bei welchen das Zellwachstum um 50 % gehemmt wird (IC_{50} Werte), bei allen untersuchten Zellen zwischen 0,35 nM bis 21548,85 nM. In der Literatur ist ein therapeutisch erreichbares Plasmalevel von 50 nM beschrieben (151, 152, 153), während verschiedene Tierversuche darauf hinweisen, dass die YM155 Konzentration im Gewebe einen höheren Wert von 78,2 bis 89,6 nM aufweisen könnte (99, 154). Dabei lagen 89,5 % der hier untersuchten parentalen und 68,1 % der chemoresistenten Neuroblastomzellen, bezüglich des ermittelten IC_{50} Wertes gegen YM155 unterhalb des Levels von 50 nM. In voran gegangenen Studien wurde gezeigt, dass in Melanomzellen der IC_{50} gegen YM155 im Bereich von 3,2 nM bis 11 nM (155) und von 2 nM bis 50 nM bei Myelomzellen (156) liegt. Diese Erkenntnisse und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass es innerhalb einer Tumorentität bereits zu einer starken Heterogenität bei der YM155 Sensitivität kommen kann. Dies zeigt wie wichtig es ist, neue antitumorale Wirkstoffe an einer Vielzahl von Zelllinien sowohl gleicher, als

¹³ www.kent.ac.uk/stms/cmp/RCCL/RCCLabout.html

auch unterschiedlicher Tumorentität zu testen, um somit das therapeutische Potential einschätzen zu können (157).

Anhand des ‚Screenings‘ der Neuroblastomzellen, zeigte sich, dass Zellen mit einer erworbenen Resistenz gegen die Gruppe der Taxane und der Vincaalkaloide, sowie gegen das Platinderivat Cisplatin und den Topoisomerasehemmer Doxorubicin eine verringerte Sensitivität gegen YM155 zeigten. Diese Effekte waren dabei unabhängig von den parental Ausgangs-Zelllinien. Bei näherem Betrachten der Daten fällt auf, dass viele der Zellen, die kreuzresistent gegen YM155 waren, gegen bekannte ABCB1 Substrate adaptiert sind (Vincaalkaloide, Taxane und Doxorubicin) (129, 158). Cisplatin zählt nicht zu den ABCB1 Substraten und stellt als Platinderivat eine Ausnahme dar, hierzu schlagen einige Studien einen Transporter der SLC-Familie (CTR1; ‚copper transporter 1‘; SLC31A1) als möglichen Resistenzmechanismus vor (159, 160).

5.1 Resistenzmechanismus gegen YM155

Um den Resistenzmechanismus gegen YM155 in Neuroblastomzellen genauer untersuchen zu können, wurden für diese Arbeit die Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-6 an eine klinisch erreichbare YM155 Konzentration adaptiert. Es zeigte sich wie erwartet, dass UKF-NB-3^{YM155²⁰} und UKF-NB-6^{YM155²⁰} eine starke Reduktion der Sensitivität gegen YM155 im Verhältnis zu der jeweiligen chemosensitiven Zelle aufweisen. Nachdem innerhalb des ‚Screenings‘ gegen YM155 hinsichtlich der Kreuzresistenzen eine mögliche Verbindung zu ABCB1 auffiel, wurde überprüft inwieweit sich die ABCB1 Expression durch eine Adaptierung gegen YM155 verändert. Zusätzlich wurde hinsichtlich einer zuvor veröffentlichten Studie die Expression des ‚solute carrier‘ Proteins SLC35F2 untersucht (54). In der genannten Arbeit wurde in KBM-7 (myeloide Leukämie) Zellen gezeigt, dass SLC35F2 in der Lage ist YM155 in die Zellen hinein zu transportieren. In Western-Blot- und durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich, dass in UKF-NB-3^{YM155²⁰} Zellen durch den Adaptierungsprozess gegen YM155 eine signifikante Erhöhung in der ABCB1 Expression und eine Verringerung in der SLC35F2 Expression ausgelöst wurde. In UKF-NB-6^{YM155²⁰} konnte keine signifikante Erhöhung in der der ABCB1 Expression ermittelt werden, wobei hier schon die Ausgangszelle UKF-NB-6 eine leicht erhöhte ABCB1 Expression zeigte. Dies wurde in MTT-Viabilitätstests gegen YM155 in Kombination mit dem spezifischen ABCB1-Inhibitor Zosuquidar bestätigt. Hier kam es durch den kombinierten Einsatz mit Zosuquidar zu einer Resensitivierung der Zellen (UKF-NB-6 und UKF-NB-6^{YM155²⁰}). Darüber hinaus wurde keine Änderung in der

SLC35F2 Expression bezüglich der Adaptierung von UKF-NB-6^{YM155}²⁰ beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass in dieser Zelllinie (UKF-NB-6) andere Faktoren für die Resistenzentstehung gegenüber YM155 entscheidend sind. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Expression eines anderen Transporters (beispielsweise der SLC-Familie), wobei in dieser Arbeit eine Expressionserhöhung der ABCB-Transporter ABCG2 und ABCC1, welche eine überlappende Substratspezifität mit ABCB1 haben, ausgeschlossen wurde (181).

In weiteren MTT-Viabilitätstests, Western-Blot- und durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich an einer Auswahl an chemoresistenten Neuroblastomzellen, dass diese hinsichtlich der Resistenz gegen YM155 entweder eine erhöhte ABCB1 Expression (UKF-NB-3^{VCR}¹⁰) oder eine verringerte SLC35F2 Expression (UKF-NB-3^{CDDP}¹⁰⁰⁰) aufwiesen. Zudem zeigten jeweils zwei UKF-NB-3 (UKF-NB-3^{DOX}²⁰ und UKF-NB-3^{YM155}²⁰) und UKF-NB-6 Zelllinien (UKF-NB-6^{VCR}¹⁰ und UKF-NB-6^{DOX}²⁰) eine Kombination beider Expressionsänderungen (ABCB1 hochreguliert und SLC35F2 runterreguliert). Diese Zelllinien wiesen in den Viabilitätstests die größte Resistenz gegenüber YM155 auf, der IC₅₀ Wert für UKF-NB-3^{DOX}²⁰ war 25927-fach im Vergleich zu UKF-NB-3 erhöht, während für UKF-NB-3^{YM155}²⁰ dieser 501-fach gesteigert wurde (während die anderen UKF-NB-3 Sublinien eine Resistenzhöhung im Bereich von 8- bis 31-fach zeigten). Bei den ABCB1 Überexpressionszellen UKF-NB-3^{ABCB1} und UKF-NB-6^{ABCB1} (161) war durch die kombinierte Behandlung von YM155 mit Zosuquidar eine Sensibilisierung auf nahezu parentalen IC₅₀ zu beobachten. Im Fall von UKF-NB-6^{ABCB1} ist durch den Einsatz von Zosuquidar darüber hinaus eine Hypersensitivität zu beobachten, hier fällt der IC₅₀ Wert durch die kombinierte Behandlung deutlich unter den Wert für die parentale UKF-NB-6 Zelllinie. Dies ist insofern schlüssig, da diese Zellen als Folge der ABCB1 Überexpression (140) von vornherein eine verringerte Sensitivität gegenüber entsprechenden ABCB1-Substraten aufwiesen. Zusätzlich ergab sich für UKF-NB-6^{ABCB1} keine Änderung der SLC35F2 Expression in Relation zur parentalen Zelle. Die Daten der hier verwendeten Zellen zeigten, dass die ABCB1 Expression und die YM155 Sensitivität signifikant korrelieren. Auch mittels siRNA Experimenten wurde die Bedeutsamkeit dieses Transporters in der YM155 Resistenz dargelegt. Dabei konnte in UKF-NB-3^{ABCB1} Zellen durch die siRNA-bedingte ABCB1-Depletierung eine Resensitivierung gegen YM155 auf den IC₅₀ Wert von UKF-NB-3 erlangt werden. Eine siRNA-vermittelte SLC35F2 Depletierung zeigte in UKF-NB-3 Zellen eine drastische Reduzierung der Sensitivität gegenüber YM155.

Da es sich bei der siRNA-vermittelten SLC35F2 Depletierung um einen transienten Zustand handelt, wurden UKF-NB-3 Zellen mit einem lentiviralen Konstrukt

transduziert, welches für eine shRNA kodiert, die wiederum spezifisch die mRNA für SLC35F2 für die Degradierung markiert und die Proteinexpression somit deutlich verringert. Insgesamt wurden drei verschiedene shRNAs mit unterschiedlichen Sequenzen gegen SLC35F2 konstruiert, um so die Effekte zu optimieren. Nach erfolgter Transduktion werden die Zellen mit Puromycin selektioniert. Da die eingebrachten Konstrukte neben den SLC35F2 shRNA Sequenzen ebenfalls ein Resistenz-Gen tragen, überleben lediglich die positiv transduzierten Zellen. Anschließend wurde mittels *real-time quantitative* PCR und in Western-Blot Analysen zum einen die reduzierte SLC35F2 mRNA Menge, als auch die verringerte Proteinexpression überprüft und bestätigt. Da eine Puromycin-Behandlung aufgrund des Selektionsdrucks eine erhöhte ABCB1 Expression induzieren kann (141), wurde diese bei den transduzierten Zellen durchflusszytometrisch eine Erhöhung der ABCB1 Expression ausgeschlossen. Bei den hier verwendeten transduzierten Zellen war die Minderung der Sensitivität gegenüber YM155 lediglich auf die reduzierte SLC35F2 Expression zurückzuführen.

Die Bedeutung des Zusammenspiels von ABCB1 und SLC35F2 für die Entwicklung einer Chemoresistenz gegen YM155 wurde in weiteren siRNA-Transfektions- und Transduktions-Experimenten gestärkt. Da ABCB1 für den Efflux und SLC35F2 für den Influx von YM155 verantwortlich ist, zeigte sich, dass die Zellen die eine negative ABCB1- und eine positive SLC35F2 Expression (kein Efflux, viel Influx) aufwiesen am empfindlichsten auf YM155 reagierten (z.B. UKF-NB-3). Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit einer verstärkten ABCB1 Expression und einer vergleichsweise geringen SLC35F2 Expression, wie es beispielsweise bei der Sublinie UKF-NB-3^{DOX}²⁰ (25927-fach erhöhter IC₅₀ Wert gegen YM155 im Vergleich zur parentalen Zelle) zu beobachten war, eine besonders stark ausgeprägte YM155 Resistenz. Gestärkt wurde diese Aussage durch die Charakterisierung von YM155-adaptierten Mammakarzinom- (HCC-1806 und MDA-MB-231) und Prostatakarzinomzellen (22RV1 und PC-3), welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden. Die Auswahl der zusätzlichen Tumorentitäten erfolgte aufgrund mehrerer abgeschlossener klinischer Phase II Studien^{14,15}. Diese Zellen zeigten, wie auch schon zwischen UKF-NB-3^{YM155}²⁰ und UKF-NB-6^{YM155}²⁰ zu beobachten war, eine starke Heterogenität des entwickelten Resistenzmechanismus gegen YM155 innerhalb der jeweiligen Tumorentität. So zeigte sich bei 22RV1^{YM155}³⁰⁰ eine dramatische Steigerung der ABCB1 Expression, jedoch keine Minderung in der SLC35F2 Proteinmenge im Verhältnis zu parentale 22RV1

¹⁴ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00818480?term=YM-155&rank=2>

¹⁵ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01038804?term=YM-155&rank=5>

Zelle aus. Auch bei der Mammakarzinomzelle MDA-MB-231^{rYM155²⁰}, wurde durch den Adaptierungsprozess lediglich eine signifikante ABCB1 Erhöhung ausgelöst, während die SLC35F2 Expression unverändert blieb. Eine gegensätzliche Resistenzentwicklung zeigten PC-3^{rYM155²⁰} und HCC-1806^{rYM155²⁰}. Bei diesen Sublinien wurde durch den Prozess der YM155 Adaptierung die ABCB1 Expression in Relation zu den parentalen Zellen nicht verändert, dafür das SLC35F2 Proteinlevel signifikant reduziert. Mit Hilfe der YM155-adaptierten Neuroblastom-, Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass unabhängig von der Tumorentität der durch den Adaptierungsprozess ausgelöste Resistenzmechanismus gegen YM155 variieren kann und zu einem großen Teil auf Expressionsänderungen der beiden Transporter, ABCB1 und SLC35F2 beruht. So kam es bei allen Zellen außer UKF-NB-6^{rYM155²⁰} zu einer verstärkten ABCB1 Expression, einer verringerten Expression von SLC35F2 oder der Regulation beider Proteine.

Bei einigen Zellen zeigte sich neben den veränderten Transportereigenschaften hinsichtlich des Adaptierungsprozess gegen YM155 eine Änderung der Survivin Expression. Dabei war im Vergleich zu den parentalen Zellen bei UKF-NB-3^{rYM155²⁰} und MDA-MB-231^{rYM155²⁰} eine reduzierten Survivin Expression zu beobachten. Dies könnte die Vermutung nahelegen, dass durch die schrittweise Adaptierung von UKF-NB-3 und MDA-MB-231 an eine steigende YM155 Konzentration, die Zellen mit einer geringeren Survivin Menge überleben und so einen weiteren Resistenzmechanismus gegen YM155 ausbilden. Dies könnte ebenfalls erklären, weshalb bei den UKF-NB-3^{rYM155²⁰} Zellen nach Survivin Depletierung mit siRNA ein kleiner Prozentsatz der Zellen am Leben bleibt, wohingegen bei den chemosensitiven UKF-NB-3 Zellen durch die siRNA-vermittelte Survivin Reduktion keine lebenden Zellen detektiert werden können. Diese verbleibenden UKF-NB-3^{rYM155²⁰} Zellen könnten eine kleine Population von Zellen sein, die vollkommen ohne eine Survivin Expression lebensfähig bleiben. Diese erhaltenen Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die Wirkung von YM155 in Neuroblastomzellen primär über die Survivin-Inhibierung erfolgt. Dies ist dahingehend interessant, da die vom Hersteller beschriebene Wirkung von YM155 als primärer Survivin-Inhibitor (164) bei Prostatakarzinomzellen in Frage gestellt wurde, und stattdessen eine primäre Induktion der DNA-Schadensantwort erfolgen soll (97, 146).

5.2 Was tritt durch die YM155 Behandlung zuerst auf: DNA-Schadensantwort oder Survivin-Inhibierung?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eingehend untersucht, ob die zuvor genannte Hypothese, dass YM155 einen primären Einfluss auf die Survivin Expression ausübt, in dem verwendeten Neuroblastom-Zellmodell bestätigt werden konnte. Aufgrund dessen wurde die Survivin-inhibierende Wirkung mit Hilfe von siRNA-Experimenten simuliert. Dabei zeigten die Ergebnisse, dass UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{YM155}²⁰ Zellen ohne Survivin Expression abstarben. Dieser Effekt scheint abhängig von der Tumorentität zu erfolgen, da kürzlich gezeigt wurde, dass in AML- (akute myeloische Leukämie) (162) und Mammakarzinomzellen (163) als Folge der Survivin siRNA Behandlung die Zellproliferation der Zellen deutlich reduziert wird, der Effekt jedoch nicht letal ist. Für die Untersuchung der Proteinexpression nach der Survivin Depletierung wurde, neben den noch wenig adhärenenten Zellen, auch der Zellüberstand mit untersucht. Dies ergab Aufschluss darüber, welche Folgen die Survivin-Inhibierung auf die Proteinexpression der Zellen hatte. In Western-Blot Analysen zeigte sich in UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen neben der bestätigten siRNA-vermittelten Survivin-Inhibierung eine Steigerung der Expression von Proteinen der DNA-Schadensantwort im Gegensatz zu den beiden mitgeführten Kontrollen. Eine Änderung des Proteinlevels anderer IAPs konnte durch die Depletierung von Survivin nicht beobachtet werden, jedoch zeigte sich nach der verminderten Survivin Expression ein Anstieg in der Apoptose (in dieser Arbeit durch *cleaved* PARP dargestellt). Durch die Zunahme der γ H2A.X und pChk2 Expression, als Folge der siRNA-bedingten Survivin-Inhibierung, blieb zu klären, ob diese Erkenntnis auch auf die Wirkung von YM155 übertragbar war. Da die vom Hersteller beschriebene Wirkung von YM155 als primärer Survivin-Inhibitor (164) bei Prostatakarzinomzellen in Frage hinterfragt wurde, und anstelle der Survivin-Inhibierung eine primäre Induktion der DNA-Schadensantwort erfolgen soll (97, 146).

Um diese Frage näher zu untersuchen, wurde eine zeitliche und konzentrationsabhängige Kinetik der YM155 Behandlung mittels Western-Blot Analysen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Survivin-Inhibierung signifikant nach 14 Stunden ab einer YM155 Konzentration von 2,5 nM erfolgte. Die DNA-Schadensantwort wurde zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (nach 24 Stunden), sowie mit einer höheren YM155 Konzentration von 10 nM detektiert. Auch mit zwei weiteren unabhängigen Methoden wurde das spätere Auftreten von DNA-Schäden bestätigt. Im *Comet Assay* wurde am Fluoreszenzmikroskop die *Tail intensity* ermittelt, welche eine lineare Beziehung zur DNA-Bruch-Frequenz beschreibt und darüber eine quantitative Aussage getroffen werden kann. Für die *Tail intensity* zeigte

sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg von DNA-Schäden ab einer YM155 Konzentration von 10 nM nach 24-stündiger Behandlung. Eine signifikante Steigerung nach 14 Stunden konnte nicht detektiert werden. Bei dem ‚*Olive Tail moment*‘, welches das Produkt aus dem prozentualen Anteil der im Schweif enthaltenen, geschädigten DNA und der gemessenen Schweiflänge beschreibt, ergab sich eine signifikante Steigerung der DNA-Schadensantwort nach 24 Stunden Behandlung, ab einer YM155 Konzentration von 5 nM. Des Weiteren konnten diese Ergebnisse durch die Ermittlung von AP- (*apurinic/aprimidinic*-) Stellen in der DNA mit Hilfe des ‚*DNA Damage Detection Kits*‘ verifiziert werden. Hierbei zeigte sich wiederum erst nach einer 24-stündigen YM155 Behandlung mit 10 nM ein signifikanter Anstieg der AP-Stellen und somit des DNA-Schadens. Während der Zeitpunkt der DNA-Schadensantwort bei allen drei Experimenten mit 24 Stunden übereinstimmt, zeigte sich bezüglich der YM155 Konzentration eine leichte Diskrepanz. Da im Western-Blot, anhand des ‚*DNA Damage Detection*‘ Kits und der Ermittlung der ‚*Tail intensity*‘ im ‚*Comet Assay*‘ die DNA-Schäden bei 10 nM YM155 ermittelt wurde, zeigte sich bei der Berechnung des ‚*Olive Tail moment*‘ im ‚*Comet Assay*‘ ein signifikanter Anstieg von Doppelstrangbrüche nach bereits 5 nM YM155 Behandlung. Vermutlich handelte es sich bei diesen Konzentrationen (5 und 10 nM YM155) um eine Art Grenzbereich, dabei kommt es zu ersten Doppelstrangbrüchen in den Zellen, welche mit der Bestimmung des ‚*Olive Tail moments*‘ bei einer niedrigeren YM155 Konzentration sichtbar werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in UKF-NB-3 Zellen durch die YM155 Behandlung die Survivin-Inhibierung zuerst auftritt und die DNA-Schadensantwort als Folge dieser zu betrachten ist.

5.3 Einfluss von Bestrahlung und p53 auf die Wirkung von YM155

Da in der Tumorthherapie neben der Behandlung mit Chemotherapeutika, auch die Bestrahlungstherapie als Auslöser der DNA-Schadensantwort verantwortlich sein kann, wurden für weitere Untersuchungen zur DNA-Schadensantwort die Neuroblastomzellen UKF-NB-3, UKF-NB-3^{YM155}²⁰, UKF-NB-3^{pc-p53} und UKF-NB-3^{pc-scr} mit den Strahlendosen 1 Gy, 3 Gy und 5 Gy behandelt. Vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen auf ihre Viabilität und ihre Proteinexpression hin untersucht. Es ist bekannt, dass Zellen mit einer erworbenen Resistenz gegen diverse Zytostatika, ebenfalls eine verminderte Sensitivität gegenüber der Bestrahlung entwickeln (165). Da es in den Zellen durch die Adaptierung unter Umständen zu drastischen Veränderungen kommen kann und entstandene Mutationen beispielsweise

zu einer veränderten Proteinexpression führen. Ein Beispiel hierfür sind die p53 depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen, die bei der höchsten Strahlendosis von 5 Gy weiterhin lebensfähig bleiben. Dies rührt daher, dass durch das Fehlen von p53 die Zellen nicht mehr dazu in der Lage sind, trotz der vorhandenen DNA-Schäden den Zellzyklus zu stoppen und die p53-induzierte Apoptose einzuleiten (166). Interessanterweise reagierten die an YM155 adaptierten UKF-NB-3^{YM155} Zellen in gleicher Weise sensibel auf die Bestrahlung wie es bei UKF-NB-3 der Fall war. Eine wie zuvor beschriebene Veränderung der Zellen die zu einer Resistenz gegen Bestrahlung führt, scheint in diesem Zell-Modell durch eine YM155 Adaptierung nicht ausgelöst zu werden. Sollten sich diese Ergebnisse in weiteren Neuroblastomzelllinien bestätigen, wäre dies ein Hinweis darauf, dass der Patient in der Tumorthherapie trotz einer entwickelten YM155 Resistenz weiterhin erfolgreich auf die Strahlentherapie ansprechen könnte.

Des Weiteren wurde die antitumorale Wirkung von YM155 bezüglich der Funktionalität des Tumorsuppressors p53 untersucht. Dieses Protein agiert als Transkriptionsfaktor und induziert bzw. reprimiert die Expression einer Vielzahl von Proteinen, die an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind. Darunter zählen Regulierung der Apoptose, Differenzierung oder die DNA-Reparatur (167) und wird somit nicht ohne Grund als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (142). p53 liegt bei vielen Tumorentitäten mutiert vor oder ist in seiner regulierenden Funktion gestört (168). Im Allgemeinen sind p53 Mutationen bei Neuroblastom Patienten bei der Diagnose nur selten vorzufinden (etwa 3 %) (167), während bei einem Rezidiv die Zahl deutlich steigt (circa 15%) (169, 170). Einige Studien weisen ebenfalls darauf hin, dass Mutationen im p53-Gen als prognostischer Marker im Neuroblastom fungieren können (171). Es wird beschrieben, dass ein Verlust von funktionalem p53 mit einer verminderten Sensitivität gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapeutika, sowie der Strahlentherapie einhergeht (129), (172, 173). Zusätzlich konnte eine Störung des p53/MDM2/p14ARF Signalweges in etwa 35 % der mit Chemotherapeutika behandelten Neuroblastomproben nachgewiesen werden (167, 169). Dies würde therapeutisch gesehen bedeuten, dass Tumorzellen die kein funktionales p53 exprimieren, nicht mehr auf die klassische Therapie ansprechen und somit eine schlechte Prognose für den Patienten darstellen.

Folglich wurden p53-depletierte UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Neuroblastomzellen für die Untersuchung der Rolle von p53 verwendet. Zunächst wurde in Western-Blot Analysen die p53 Depletierung der verwendeten Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen bestätigt. Im direkten Vergleich der p53-depletierten zu den ‚scrambled‘ Kontrollzellen, zeigt sich durch die Abwesenheit des Tumorsuppressors eine erniedrigte Sensitivität

gegen YM155 (8-fach). Zusätzlich zeigte sich in den p53 depletierten Zellen kein Unterschied zu den parentalen und ‚scrambled‘ Kontrollzellen bei der Survivin Expression. Wodurch bestätigt wurde, dass der p53 Status der untersuchten Zellen initial keinen Einfluss auf die Survivin Expression ausübt. In Western-Blot Untersuchungen wurde die Expression verschiedener Proteine der DNA-Schadensantwort und der Induktion bzw. Inhibierung der Apoptose geprüft, ob eine p53 Depletierung einen Einfluss auf deren Expression ausübt. Dabei zeigte sich sowohl in den parentalen und ‚scrambled‘ Kontrollzellen, als auch in den p53-depletierten Zellen nach einer vierundzwanzigstündigen YM155 Behandlung mit 25 nM, dass bei anderen anti-apoptotischen Proteinen wie cIAP-1, cIAP-2 und XIAP keine Veränderung in der Expression zu beobachten war. Obwohl in einer kürzlich erschienen Arbeit angedeutet wurde, dass YM155 zur Degradierung von XIAP in Mammakarzinomzellen beitragen soll (174). Dies konnte in den hier untersuchten Neuroblastomzellen nicht bestätigt werden. Die YM155 Behandlung führte in den p53 Wildtyp Zellen UKF-NB-3, UKF-NB-3^{pc-scr}, UKF-NB-6 und UKF-NB-6^{pc-scr} zu einer p53 Akkumulierung, was wiederum in einer Induktion von p21 resultiert. Interessanterweise kommt es bei den p53-depletierten Zellen durch die YM155 Behandlung zu keiner starken Induktion von γ H2A.X, und zudem fiel die Survivin-Inhibierung im Vergleich zu den parentalen und ‚scrambled‘ Kontrollzellen geringer aus. Daraufhin wurden UKF-NB-3 und UKF-NB-3^{pc-p53} mit verschiedenen YM155 Konzentration und unterschiedlichen Inkubationszeiten in Western-Blot Analysen untersucht. Dabei zeigten die p53-depletierten UKF-NB-3^{pc-p53} Zellen im direkten Vergleich zu UKF-NB-3 eine zeitlich nach hinten versetzte Survivin-Inhibierung, sowie eine verspätete Induktion der DNA-Schadensantwort. So ist bei UKF-NB-3 eine Survivin-Inhibierung nach 14 Stunden mit 2,5 nM YM155 und eine γ H2A.X Induktion nach 24 Stunden mit 10 nM YM155 zu beobachten, während die p53-depletierte UKF-NB-3^{pc-p53} Zelle eine zeitlich nach hinten versetzte Survivin-Inhibierung nach 48 Stunden, jedoch bereits ab einer YM155 Konzentration von 0,5 nM zeigte. Die DNA-Schadensantwort konnte ebenfalls erst nach 48 Stunden ab einer YM155 Konzentration von 10 nM beobachtet werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Wirkung von YM155 zu einem gewissen Teil vom p53 Status der Zellen abhängig ist. Dadurch könnte die erniedrigte Sensitivität der UKF-NB-3^{VCR}¹⁰ Zellen gegen YM155 erklärt werden, da UKF-NB-3^{VCR}¹⁰ eine C135F ‚loss-of-function‘ p53 Mutation trägt (129, 144). Durch den kombinierten Einsatz von YM155 und den ABCB1 Inhibitor Zosuquidar konnten UKF-NB-3^{VCR}¹⁰ nicht auf den IC₅₀ Wert der parentalen UKF-NB-3 Zellen resensitiviert werden. Auch eine erniedrigte SLC35F2 Expression, welche wiederum bei anderen chemoresistenten

Zelllinien die verbleibende Resistenz erklärt, konnte in diesen Zellen nicht ermittelt werden. Dies würde die Vermutung stützen, dass ein Verlust von funktionalem p53, bei den entsprechenden Zellen eine verminderte Sensitivität gegenüber YM155 hervorruft und somit einen weiteren Resistenzmechanismus in Neuroblastomzellen gegen YM155 darstellt. Interessant sind in diesem Zusammenhang, dass das in dieser Arbeit verwendete Neuroblastom-Modell zeigte, dass es bei den YM155 adaptierten UKF-NB-3^{YM155}²⁰ durch den Adaptierungsprozess zu einer leichten jedoch nicht signifikanten Steigerung in der p53 Expression kam. Andere Studien jedoch haben eine vom p53 Status unabhängige Wirkung von YM155 in den untersuchten Zellen vorgeschlagen (164, 175, 176). Dabei ist die Relevanz des p53 Status auf die Sensitivität gegenüber YM155 vermutlich wiederum bezüglich des zellulären Kontexts, sowie der entsprechenden Tumorentität zu berücksichtigen.

Da das Fehlen von funktionalem p53 in den untersuchten Neuroblastomzellen zu einer reduzierten Wirksamkeit von YM155 führte, wurde im Folgenden mit dem MDM2-Inhibitor und p53-Aktivator Nutlin-3 gearbeitet, um den Einfluss einer p53-Aktivierung auf die Wirkung von YM155 genauer untersuchen zu können. Da das *cis*-Imidazol Nutlin-3 die Interaktion zwischen p53 und seinem negativem Regulator MDM2 inhibiert, kommt es zur Aktivierung und Akkumulierung von p53 (173). Auch die Zugabe von Nutlin-3 bestätigte die Abhängigkeit der p53 Expression bezüglich der YM155 Sensitivität der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Neuroblastomzellen. In der kombinierten Behandlung von YM155 mit Nutlin-3 ist sowohl bei UKF-NB-3, als auch bei UKF-NB-6 Zellen ein verstärkenden Effekt dieser beiden Stoffe zu beobachten. So zeigt sich im MTT-Viabilitätstest durch die Kombination beider Stoffe (0,625 nM YM155 und 1 µM Nutlin-3) eine verstärkte Sensitivität der untersuchten Zellen, im Vergleich zu den Einzelbehandlungen gegen YM155 oder Nutlin-3. Zusätzlich wurde im Western-Blot der Einfluss beider Stoffe auf die Expression von p53, p21, H2A.X, γH2A.X, *cleaved* PARP und Survivin untersucht. Dafür wurden UKF-NB-3 und UKF-NB-6 für 24 Stunden mit 1 nM bzw. 10 nM YM155 und 1 µM Nutlin-3 behandelt. Wie anhand der Western-Blot Analysen zu erkennen ist, kommt es sowohl durch die Nutlin-3, als auch durch die YM155 Behandlung, zu einer signifikanten p53 Akkumulierung, wobei die Kombination dieser beiden Stoffe diese Expression nochmals verstärkt. Gleichermaßen verstärkend war eine Zunahme der γH2A.X Expression zu beobachten und bestätigt die DNA-Schadensantwort. Ebenfalls zeigte sich eine Verstärkung der Survivin Inhibierung, wobei die Kombination aus 1 µM Nutlin-3 und 10 nM YM155 in beiden Zelllinien nahezu keine Survivin Expression mehr aufzeigt. Bezüglich dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass durch die Nutlin-3 induzierte p53 Akkumulierung der Survivin inhibierenden Effekt von YM155 in den untersuchten Neuroblastomzellen verstärkt

wird. Dabei ist in vorangegangenen Studien ein Zusammenspiel zwischen p53 und Survivin beschrieben (146), während in einer anderen Studie in Neuroblastomzellen ebenfalls eine p53 Akkumulierung hinsichtlich der Survivin Inhibierung gezeigt wird (80).

Die verminderte Sensitivität der p53-depletierten Neuroblastomzellen könnte eventuell auf dem Wechselspiel von Survivin mit p53 beruhen, da p53 sowohl als positiver, als auch negativer Transkriptionsfaktor von Survivin fungieren kann (146, 177). Im Falle einer verminderten Survivin Transkription würde die YM155 Wirkung verstärkt werden, während eine andere Annahme hinsichtlich der Abhängigkeit der YM155 Wirkung von p53, ein Zusammenspiel von p53 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 erklären könnte. Diese Theorie des Wirkmechanismus von YM155 zeigt Sp1 als notwendigen Transkriptionsfaktor, da dem Survivin Promotor eine typische TATA- oder CCAAT-Box fehlt, bindet und markiert Sp1 diese Region für die Transkription und Survivin wird exprimiert (107). YM155 soll laut dieser Hypothese die Survivin Expression inhibieren, indem es die Bindung von Sp1 an die Survivin-Promotorregion unterbindet (106). Falls p53 einen negativen Einfluss auf die Sp1 Expression, und somit auch auf die Expression von Survivin, in den hier verwendeten Neuroblastomzellen ausüben würde, wie es einige Studien vermuten lassen (146, 178, 179), würde dies die verstärkte YM155 Wirkung in Wildtyp und die reduzierte Wirkung in p53-depletierten Neuroblastomzellen zum Teil erklären (180).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen bezüglich des Resistenzmechanismus von Neuroblastomzellen gegen YM155, dass zum einen eine verstärkte ABCB1 Expression, sowie eine reduzierte SLC35F2 Expression und der p53 Status entscheidend sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Neuroblastomzellen die Wirkung von YM155 primär auf der Survivin Inhibierung beruht und die DNA-Schadensantwort als Konsequenz der reduzierten Survivin Expression eingeleitet wird. Nach einigen abgeschlossenen klinischen Phase II Studien bleibt YM155 weiterhin ein interessanter Wirkstoff und zeigt durch die hier gezeigte antitumorale Wirkung eine vielversprechende Therapiestrategie auch zur Behandlung von Neuroblastomen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktureller Aufbau von ABC-Transportern.....	8
Abbildung 2 Überblick zu membrangebundenen Transportern	9
Abbildung 3 Übersicht der strukturellen Unterschiede zwischen den bekannten ‚Inhibitor of Apoptosis‘ Proteinen (IAPs).....	11
Abbildung 4 Proteinstruktur von Survivin.	12
Abbildung 5 Spleißvarianten von Survivin.....	14
Abbildung 6 YM155	16
Abbildung 7 Überblick Zellzyklus.	18
Abbildung 8 Überblick über DNA-Schadensantwort.....	20
Abbildung 9 Reduktion von MTT zu Formazan.	38
Abbildung 10 Pipettierschema beim MTT-Viabilitätstest	39
Abbildung 11 Auswertung des ‚Comet Assay‘ mit Hilfe des Programms Comet Assay IV	43
Abbildung 12 ABCB1, ABCC1 und ABCG2 Expression in YM155 adaptierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen im Vergleich zu den parentalen, chemosensitiven Linien.	59
Abbildung 13 Der Adaptierungsprozess an YM155 zeigt in UKF-NB-3 einen Einfluss auf die basale Expression ausgewählter Proteine	61
Abbildung 14 Einfluss der siRNA-vermittelten Survivin Depletierung auf die Zellviabilität in UKF-NB-3 und UKF-NB-3 ^{YM155}	62
Abbildung 15 IC ₅₀ Werte der parentalen UKF-NB-3 und UKF-NB-6 sowie der ABCB1 überexprimierenden Zellen in Kombination mit den Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar	65
Abbildung 16 ABCB1 Expression in chemosensitiven und chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zelllinien.	66
Abbildung 17 Messung der ABCB1 Expression von UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen am Durchflusszytometer.	67
Abbildung 18 Korrelation von IC ₅₀ Werten gegen YM155 mit der ABCB1 Expression in Neuroblastomzellen.....	68
Abbildung 19 Resensitivierung von UKF-NB-3 ^{ABCB1} Zellen gegen YM155 nach ABCB1 siRNA Transfektion.....	68
Abbildung 20 SLC35F2 Expression in chemosensitiven und chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zelllinien	70
Abbildung 21 Verhältnis der Sensitivität der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Sublinien (IC ₅₀ Wert) zur jeweiligen SLC35F2 Expression	70

Abbildung 22 Die siRNA-vermittelte SLC35F2 Depletierung führt zu einer erhöhten Resistenz gegen YM155 in UKF-NB-3 Zellen.....	71
Abbildung 23 Depletierung von SLC35F2 und ABCB1 mittels siRNA Transfektion in UKF-NB-3 und UKF-NB-3 ^{ABCB1} Zellen.	72
Abbildung 24 SLC35F2 Expression in transduzierten UKF-NB-3 Zellen	74
Abbildung 25 SLC35F2 Expression auf mRNA Ebene nach lentiviraler Transduktion.....	78
Abbildung 26 Einfluss der siRNA-vermittelten verminderten Survivin Expression auf andere Proteine in UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen	77
Abbildung 27 Einfluss auf die Zellviabilität in UKF-NB-3 Zellen nach siRNA-vermittelter Survivin Hemmung	78
Abbildung 28 Zeitliche und konzentrationsabhängige Kinetik der YM155 Behandlung in UKF-NB-3 Zellen	79
Abbildung 29 Quantifizierung der Survivin und γ H2A.X Expression nach YM155 Behandlung.....	80
Abbildung 30 Untersuchung der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) nach YM155 Behandlung bei UKF-NB-3 Zellen im ‚Comet Assay‘	81
Abbildung 31 Ermittlung der ‚Tail intensity‘ und dem ‚Olive Tail Moment‘ nach YM155 Behandlung von UKF-NB-3 Zellen mit Hilfe des ‚Comet Assays‘.....	82
Abbildung 32 Ermittlung der DNA-Schadensantwort mittels des ‚DNA Damage Detection‘ Kit.....	83
Abbildung 33 Western-Blot der p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen..	84
Abbildung 34 Einfluss der p53 Depletierung auf die Sensitivität der UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen gegenüber YM155.....	85
Abbildung 35 Einfluss der YM155 Behandlung auf UKF-NB-3 und UKF-NB-3 ^{pc-p53} Zellen	85
Abbildung 36 Western-Blot nach YM155 Behandlung in parentalen, ‚scrambled‘ und p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen.	86
Abbildung 37 Einfluss der YM155 Wirkung auf die Survivin und γ H2A.X Expression hinsichtlich des p53-Status der untersuchten Zellen.....	87
Abbildung 38 Western-Blot mit p53-depletierten UKF-NB-3 Zellen nach YM155 Behandlung für 48 Stunden.....	88
Abbildung 39 Kombiniertes Effekt von YM155 und Nutlin-3 auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen.....	89
Abbildung 40 Effekte von YM155, Nutlin-3 und deren Kombination auf die Proteinexpression von UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen	90

Abbildung 41 Quantifizierung zum Western-Blot nach YM155 und Nutlin-3 Behandlung in UKF-NB-3 Zellen	91
Abbildung 42 Quantifizierung zum Western-Blot nach YM155 und Nutlin-3 Behandlung in UKF-NB-6 Zellen	92
Abbildung 43 Einfluss der Bestrahlung auf die Zellviabilität von UKF-NB-3 Zellen...	94
Abbildung 44 Einfluss der Bestrahlung auf die Expression von γ H2A.X und Survivin auf UKF-NB-3 und UKF-NB-3 ^{YM155²⁰} Zellen	94
Abbildung 45 Survivin und γ H2A.X Expression 24 Stunden nach Bestrahlung von UKF-NB-3, UKF-NB-3 ^{pc-scr} und UKF-NB-3 ^{pc-p53}	95
Abbildung 46 Effekt von YM155 und Bestrahlung bei Wildtyp p53 Neuroblastomzellen.....	96
Abbildung 47 ABCB1 Expression der chemosensitiven, parentalen und die an YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen	100
Abbildung 48 Proteinexpression von chemosensitiven und YM155-resistenten Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen	101
Abbildung 49 Quantifizierung der Proteinexpression in chemosensitiven und an YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 ‚International Neuroblastoma Staging System‘ (INSS).....	3
Tabelle 2 Survivin Isoformen mit ihrer entsprechenden Funktion und die für ihre Expression bekannten Tumorentitäten.	14
Tabelle 3 Zusammenfassung der verwendeten Zytostatika und deren Wirkmechanismus.....	33
Tabelle 4 Aufstellung der verwendeten transduzierten Zelllinien.....	34
Tabelle 5 Auflistung der getesteten Zelllinien.....	35
Tabelle 6 Aufstellung der gegen YM155 adaptierten Zelllinien.....	36
Tabelle 7 Antitumorale Wirkung von YM155 auf die Zellviabilität von Neuroblastomzellen.....	52
Tabelle 8 IC ₅₀ Wert der parentalen und YM155 resistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen gegen YM155 in Kombination mit 10 µM Verapamil oder 1,25 µM Zosuquidar.	57
Tabelle 9 Kreuzresistenzen der an YM155 adaptierte UKF-NB-3 ^{YM155²⁰} Zelle.....	63
Tabelle 10 IC ₅₀ Werte von chemosensitiven und chemoresistenten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen gegen YM155 in Kombination mit Verapamil und Zosuquidar.....	63
Tabelle 11 IC ₅₀ nach Transduktion eines lentiviralen Vektors mit einer für SLC35F2 kodierenden shRNA Sequenz in UKF-NB-3 Zellen.....	74
Tabelle 12 IC ₅₀ Werte der ABCB1 überexprimierenden UKF-NB-3 ^{ABCB1} Zellen nach erfolgter SLC35F2 shRNA Transduktion.	75
Tabelle 13 Nutlin-3 Behandlung der p53-depletierten UKF-NB-3 und UKF-NB-6 Zellen.....	89
Tabelle 14 IC ₅₀ Werte gegen YM155 in chemosensitiven und an YM155-adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen.	97
Tabelle 15 IC ₅₀ Werte gegen Cisplatin, Docetaxel und Doxorubicin von chemosensitiven und an YM155 adaptierten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen.	98
Tabelle 16 Einfluss des ABC-Transporters ABCB1 auf die Zellviabilität von chemosensitiven und YM155-resistenten Prostatakarzinom- und Mammakarzinomzellen.	99

Literaturverzeichnis

1. Perkins SM, Shinohara ET, DeWees T, Frangoul H. Outcome for children with metastatic solid tumors over the last four decades. *PLoS One*. 2014;9(7):e100396.
2. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6459-65.
3. Hero B, Simon T, Spitz R, Ernestus K, Gnekow AK, Scheel-Walter H-G, et al. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(9):1504-10.
4. 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;224(4653):1121-4.
5. Hughes M, Marsden HB, Palmer MK. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer*. 1974;34(5):1706-11.
6. Castleberry RP, Pritchard J, Ambros P, Berthold F, Brodeur GM, Castel V, et al. The International Neuroblastoma Risk Groups (INRG): a preliminary report. *Eur J Cancer*. 1997;33(12):2113-6.
7. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*. 2003;4(8):472-80.
8. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):289-97.
9. Hallbook F, Backstrom A, Kullander K, Kylberg A, Williams R, Ebendal T. Neurotrophins and their receptors in chicken neuronal development. *Int J Dev Biol*. 1995;39(5):855-68.
10. Svensson T, Ryden M, Schilling FH, Dominici C, Sehgal R, Ibanez CF, et al. Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997;33(12):2058-63.
11. Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschella 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;53(9):2044-50.
12. 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.
13. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-8.
14. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. Myc Function and Regulation. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:809-60.

15. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1999;17(7):2264-79.
16. Lundberg G, Rosengren AH, Hakanson U, Stewenius H, Jin YS, Stewenius Y, et al. Binomial Mitotic Segregation of MYCN-Carrying Double Minutes in Neuroblastoma Illustrates the Role of Randomness in Oncogene Amplification. *Plos One*. 2008;3(8).
17. Spix C, Pastore G, Sankila R, Stiller CA, Steliarova-Foucher E. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2006;42(13):2081-91.
18. Mugishima H. Current status of molecular biology and treatment strategy for neuroblastoma. *Int J Clin Oncol*. 2012;17(3):189.
19. Brodeur GM. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(3):203-16.
20. Fong CT, Dracopoli NC, White PS, Merrill PT, Griffith RC, Housman DE, et al. Loss of Heterozygosity for the Short Arm of Chromosome-1 in Human Neuroblastomas - Correlation with N-Myc Amplification. *P Natl Acad Sci USA*. 1989;86(10):3753-7.
21. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(1):52-8.
22. Friedman DL, Kadan-Lottick NS, Whitton J, Mertens AC, Yasui Y, Liu Y, et al. Increased risk of cancer among siblings of long-term childhood cancer survivors: a report from the childhood cancer survivor study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(8):1922-7.
23. Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, et al. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*. 1983;35(2 Pt 1):359-67.
24. Tonini GP, Longo L, Coco S, Perri P. Familial neuroblastoma: a complex heritable disease. *Cancer Lett*. 2003;197(1-2):41-5.
25. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008;455(7215):930-5.
26. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;362(23):2202-11.
27. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):967-70.
28. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004;75(4):727-30.

29. Bourdeaut F, Trochet D, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Deville A, Coz C, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005;228(1-2):51-8.
30. Wang K, Diskin SJ, Zhang H, Attiyeh EF, Winter C, Hou C, et al. Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature.* 2011;469(7329):216-20.
31. Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, et al. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2005;65(11):4587-97.
32. Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsiatis AA. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res.* 1981;41(11 Pt 1):4678-86.
33. 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;55(22):5366-9.
34. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bokkerink J, Egeler M, Laureys G, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1996;334(4):225-30.
35. Bogen D, Brunner C, Walder D, Ziegler A, Abbasi R, Ladenstein RL, et al. The genetic tumor background is an important determinant for heterogeneous MYCN-amplified neuroblastoma. *Int J Cancer.* 2016;139(1):153-63.
36. Maris JM, Guo C, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, et al. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Medical and pediatric oncology.* 2001;36(1):24-7.
37. 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. *The American journal of pathology.* 1997;150(1):81-9.
38. O'Neill S, Ekstrom L, Lastowska M, Roberts P, Brodeur GM, Kees UR, et al. MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001;30(1):87-90.
39. Kuzyk A, Booth S, Righolt C, Mathur S, Gartner J, Mai S. MYCN overexpression is associated with unbalanced copy number gain, altered nuclear location, and overexpression of chromosome arm 17q genes in neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015;54(10):616-28.
40. Speleman F, Park JR, Henderson TO. Neuroblastoma: A Tough Nut to Crack. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2016;35:e548-57.
41. Haas-Kogan DA, Swift PS, Selch M, Haase GM, Seeger RC, Gerbing RB, et al. Impact of radiotherapy for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56(1):28-39.

42. 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;58(23):5396-405.
43. Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets.* 2006;7(7):861-79.
44. Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol.* 2006;17 Suppl 10:x315-24.
45. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 2016;370(1):153-64.
46. Huang Y, Sadee W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.* 2006;239(2):168-82.
47. Franke RM, Gardner ER, Sparreboom A. Pharmacogenetics of drug transporters. *Curr Pharm Des.* 2010;16(2):220-30.
48. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53:615-27.
49. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):48-58.
50. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):219-34.
51. Hong M. Biochemical studies on the structure-function relationship of major drug transporters in the ATP-binding cassette family and solute carrier family. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016.
52. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(8):543-60.
53. Ishida N, Kawakita M. Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Pflugers Arch.* 2004;447(5):768-75.
54. Winter GE, Radic B, Mayor-Ruiz C, Blomen VA, Trefzer C, Kandasamy RK, et al. The solute carrier SLC35F2 enables YM155-mediated DNA damage toxicity. *Nat Chem Biol.* 2014;10(9):768-73.
55. Waligorska-Stachura J, Jankowska A, Wasko R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, et al. Survivin - prognostic tumor biomarker in human neoplasms - review. *Ginekol Pol.* 2012;83(7):537-40.
56. Farnebo L, Tiefenbock K, Ansell A, Thunell LK, Garvin S, Roberg K. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int J Cancer.* 2013;133(8):1994-2003.
57. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1998;58(9):1808-12.

58. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2000;96(5):1921-5.
59. Poomsawat S, Punyasingh J, Vejchapipat P. Overexpression of survivin and caspase 3 in oral carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(1):65-71.
60. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol*. 1998;152(1):43-9.
61. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3(8):917-21.
62. Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res*. 2007;67(13):5999-6002.
63. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(7):553-62.
64. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5000-5.
65. Singh N, Krishnakumar S, Kanwar RK, Cheung CH, Kanwar JR. Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers. *Drug Discov Today*. 2015;20(5):578-87.
66. Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell*. 2000;6(1):183-9.
67. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Mol Cell*. 2008;30(2):123-35.
68. Blankenship JW, Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Kirkpatrick DS, Izrael-Tomasevic A, et al. Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J*. 2009;417(1):149-60.
69. Gyrd-Hansen M, Darding M, Miasari M, Santoro MM, Zender L, Xue W, et al. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol*. 2008;10(11):1309-17.
70. Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *The Journal of cell biology*. 1998;141(6):1415-22.
71. Beug ST, Cheung HH, LaCasse EC, Korneluk RG. Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis. *Trends Immunol*. 2012;33(11):535-45.
72. Li FZ, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J*. 1999;344:305-11.

73. Xu R, Zhang P, Huang H, Ge SF, Lu H, Qian GX. Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochem Bioph Res Co.* 2007;356(1):286-92.
74. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(1):61-70.
75. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell.* 2007;131(2):230-1.
76. Du J, Kelly AE, Funabiki H, Patel DJ. Structural basis for recognition of H3T3ph and Smac/DIABLO N-terminal peptides by human Survivin. *Structure.* 2012;20(1):185-95.
77. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(33):21777-81.
78. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 2006;7(10):988-94.
79. Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278(25):23130-40.
80. Lamers F, van der Ploeg I, Schild L, Ebus ME, Koster J, Hansen BR, et al. Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(6):657-68.
81. Khan S, Ferguson Bennit H, Asuncion Valenzuela MM, Turay D, Diaz Osterman CJ, Moyron RB, et al. Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a clinical perspective. *Biologics.* 2015;9:57-67.
82. Pavlyukov MS, Antipova NV, Balashova MV, Vinogradova TV, Kopantzev EP, Shakhparonov MI. Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *J Biol Chem.* 2011;286(26):23296-307.
83. Engelsma D, Rodriguez JA, Fish A, Giaccone G, Fornerod M. Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin. *Traffic.* 2007;8(11):1495-502.
84. Jeyaprakash AA, Klein UR, Lindner D, Ebert J, Nigg EA, Conti E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell.* 2007;131(2):271-85.
85. Tazo Y, Hara A, Onda T, Saegusa M. Bifunctional roles of survivin-DeltaEx3 and survivin-2B for susceptibility to apoptosis in endometrial carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014.
86. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2005;92(2):212-6.
87. Sampath J, Pelus LM. Alternative splice variants of survivin as potential targets in cancer. *Curr Drug Discov Technol.* 2007;4(3):174-91.
88. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer.* 2005;4(1):11.

89. Sah NK, Seniya C. Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumour Biol.* 2015;36(9):6623-31.
90. Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A. Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Med Pediatr Oncol.* 2000;35(6):550-3.
91. Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene.* 2005;24(12):1994-2007.
92. Vivas-Mejia PE, Rodriguez-Aguayo C, Han HD, Shahzad MM, Valiyeva F, Shibayama M, et al. Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane--resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3716-26.
93. Ling X, Cheng Q, Black JD, Li F. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin. *J Biol Chem.* 2007;282(37):27204-14.
94. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer. *Cancer Detect Prev.* 2009;32(4):308-13.
95. Li FZ. Anticancer drug FL118 is more than a survivin inhibitor: where is the Achilles' heel of cancer? *Am J Cancer Res.* 2014;4(3):304-11.
96. Ling X, Cao SS, Cheng QY, Keefe JT, Rustum YM, Li FZ. A Novel Small Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner, Shows Superior Antitumor Activity. *Plos One.* 2012;7(9).
97. Glaros TG, Stockwin LH, Mullendore ME, Smith B, Morrison BL, Newton DL. The "survivin suppressants" NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response (vol 70, pg 207, 2012). *Cancer Chemoth Pharm.* 2012;70(5):763-4.
98. Hansen JB, Fisker N, Westergaard M, Kjaerulff LS, Hansen HF, Thruue CA, et al. SPC3042: a proapoptotic survivin inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9):2736-45.
99. Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A, et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* 2007;67(17):8014-21.
100. Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, et al. YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, Induces Regression of Established Human Hormone-Refractory Prostate Tumor Xenografts (vol 67, pg 8014, 2007). *Cancer Res.* 2012;72(15):3886-.
101. Iwasa T, Okamoto I, Takezawa K, Yamanaka K, Nakahara T, Kita A, et al. Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. *Br J Cancer.* 2010;103(1):36-42.

102. 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. *European Journal of Cancer*. 2012;48(5):763-71.
103. Iwai M, Minematsu T, Li Q, Iwatsubo T, Usui T. Utility of P-Glycoprotein and Organic Cation Transporter 1 Double-Transfected LLC-PK1 Cells for Studying the Interaction of YM155 Monobromide, Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, with P-Glycoprotein. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(12):2314-20.
104. Yamauchi T, Nakamura N, Hiramoto M, Yuri M, Yokota H, Naitou M, et al. Sepantronium Bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54(nrb) complex, which is required for survivin expression. *Biochem Bioph Res Co*. 2012;425(4):711-6.
105. Nakamura N, Yamauchi T, Hiramoto M, Yuri M, Naito M, Takeuchi M, et al. Interleukin Enhancer-binding Factor 3/NF110 Is a Target of YM155, a Suppressant of Survivin. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(7).
106. Sachita K, Yu HJ, Yun JW, Lee JS, Cho SD. YM155 induces apoptosis through downregulation of specificity protein 1 and myeloid cell leukemia-1 in human oral cancer cell lines. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(10):785-91.
107. Cheng Q, Ling X, Haller A, Nakahara T, Yamanaka K, Kita A, et al. Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(2):179-97.
108. Ferrari S, Gentili C. Maintaining Genome Stability in Defiance of Mitotic DNA Damage. *Front Genet*. 2016;7:128.
109. Jia P, Her C, Chai W. DNA excision repair at telomeres. *DNA Repair (Amst)*. 2015;36:137-45.
110. Yang K, Guo R, Xu D. Non-homologous end joining: advances and frontiers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016;48(7):632-40.
111. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):7-18.
112. Zhang D, Tang B, Xie X, Xiao Y-F, Yang S-M, Zhang J-W. The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(7):1005-13.
113. Lou ZK, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*. 2006;21(2):187-200.
114. Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, et al. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *Embo J*. 2004;23(13):2674-83.
115. Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(6):738-47.

116. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(45):42462-7.
117. Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, et al. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*. 2003;114(3):371-83.
118. White D, Rafalska-Metcalf IU, Ivanov AV, Corsinotti A, Peng H, Lee S-C, et al. The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation. *Mol Cancer Res*. 2012;10(3):401-14.
119. Hu C, Zhang S, Gao X, Gao X, Xu X, Lv Y, et al. Roles of Kruppel-associated Box (KRAB)-associated Co-repressor KAP1 Ser-473 Phosphorylation in DNA Damage Response. *J Biol Chem*. 2012;287(23):18937-52.
120. Addison JB, Koontz C, Fugett JH, Creighton CJ, Chen DQ, Farrugia MK, et al. KAP1 Promotes Proliferation and Metastatic Progression of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2015;75(2):344-55.
121. Iyengar S, Farnham PJ. KAP1 Protein: An Enigmatic Master Regulator of the Genome. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(30):26267-76.
122. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*. 1999;286(5442):1162-6.
123. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci*. 2000;113(23):4363-71.
124. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1039-47.
125. Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol*. 2003;5(3):255-60.
126. Manic G, Obrist F, Sistigu A, Vitale I. Trial Watch: Targeting ATM-CHEK2 and ATR-CHEK1 pathways for anticancer therapy. *Mol Cell Oncol*. 2015;2(4):e1012976.
127. Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001;21(13):4129-39.
128. 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(12):1023-U94.
129. 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(4):1029-37.

130. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
131. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. 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;48(17):4827-33.
132. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
133. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Co*. 1984;123(1):291-8.
134. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther*. 2008;16(4):698-706.
135. Donnet A, Valade D, Fontaine D. Cluster headache treatment. *Presse Med*. 2015;44(11):1188-92.
136. Tfelt-Hansen PC, Jensen RH. Management of cluster headache. *CNS Drugs*. 2012;26(7):571-80.
137. Choi YH, Yu AM. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Curr Pharm Design*. 2014;20(5):793-807.
138. Issa ME, Hall SR, Dupuis SN, Graham CL, Jakeman DL, Goralski KB. Jademycins are cytotoxic to ABCB1-, ABCC1-, and ABCG2-overexpressing MCF7 breast cancer cells. *Anti-Cancer Drug*. 2014;25(3):255-69.
139. Lancet JE, Baer MR, Duran GE, List AF, Fielding R, Marcelletti JF, et al. A phase I trial of continuous infusion of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar with daunorubicin and cytarabine in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2009;33(8):1055-61.
140. Loschmann N, Michaelis M, Rothweiler F, Zehner R, Cinatl J, Voges Y, et al. Testing of SNS-032 in a Panel of Human Neuroblastoma Cell Lines with Acquired Resistance to a Broad Range of Drugs. *Transl Oncol*. 2013;6(6):685-96.
141. Theile D, Staffen B, Weiss J. ATP-binding cassette transporters as pitfalls in selection of transgenic cells. *Anal Biochem*. 2010;399(2):246-50.
142. Lane DP. Cancer - P53, Guardian of the Genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
143. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(10):714-23.
144. Michaelis M, Rothweiler F, Klassert D, von Deimling A, Weber K, Fehse B, et al. Reversal of P-glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance by the Murine Double Minute 2 Antagonist Nutlin-3. *Cancer Res*. 2009;69(2):416-21.

145. Gains J, Mandeville H, Cork N, Brock P, Gaze M. Ten challenges in the management of neuroblastoma. *Future Oncol.* 2012;8(7):839-58.
146. Rauch A, Hennig D, Schafer C, Wirth M, Marx C, Heinzl T, et al. Survivin and YM155: How faithful is the liaison? *Bba-Rev Cancer.* 2014;1845(2):202-20.
147. 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(2):130-6.
148. Morgenstern DA, Marzouki M, Bartels U, Irwin MS, Sholler GLS, Gammon J, et al. Phase I study of vinblastine and sirolimus in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors. *Pediatric blood & cancer.* 2014;61(1):128-33.
149. 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;35(5):337-47.
150. 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. *Pediatric blood & cancer.* 2013;60(9):1447-51.
151. Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of YM155, a Small-Molecule Inhibitor of Survivin. *Journal of Clinical Oncology.* 2008;26(32):5198-203.
152. Aoyama Y, Kaibara A, Takada A, Nishimura T, Katashima M, Sawamoto T. Population pharmacokinetic modeling of sepantronium bromide (YM155), a small molecule survivin suppressant, in patients with non-small cell lung cancer, hormone refractory prostate cancer, or unresectable stage III or IV melanoma. *Invest New Drugs.* 2013;31(2):443-51.
153. Satoh T, Okamoto I, Miyazaki M, Morinaga R, Tsuya A, Hasegawa Y, et al. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2009;15(11):3872-80.
154. Murakami Y, Matsuya T, Kita A, Yamanaka K, Noda A, Mitsuoka K, et al. Radiosynthesis, biodistribution and imaging of [11C]YM155, a novel survivin suppressant, in a human prostate tumor-xenograft mouse model. *Nucl Med Biol.* 2013;40(2):221-6.
155. Yamanaka K, Nakahara T, Yamauchi T, Kita A, Takeuchi M, Kiyonaga F, et al. Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. *Clin Cancer Res.* 2011;17(16):5423-31.
156. Wagner V, Hose D, Seckinger A, Weiz L, Meissner T, Reme T, et al. Preclinical efficacy of sepantronium bromide (YM155) in multiple myeloma is conferred by down regulation of Mcl-1. *Oncotarget.* 2014;5(21):10237-50.
157. Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature reviews Cancer.* 2010;10(4):241-53.

158. Murakami T, Takano M. Intestinal efflux transporters and drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(7):923-39.
159. Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:495-535.
160. Ho GY, Woodward N, Coward JI. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;102:37-46.
161. Michaelis M, Rothweiler F, Loschmann N, Sharifi M, Ghafourian T, Cinatl J, Jr. Enzastaurin inhibits ABCB1-mediated drug efflux independently of effects on protein kinase C signalling and the cellular p53 status. *Oncotarget*. 2015;6(19):17605-20.
162. Jafarlou M, Baradaran B, Shanebandi D, Saedi TA, Jafarlou V, Ismail P, et al. siRNA-mediated inhibition of survivin gene enhances the anti-cancer effect of etoposide in U-937 acute myeloid leukemia cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016;62(6):44-9.
163. Li Y, Liu D, Zhou Y, Li Y, Xie J, Lee RJ, et al. Silencing of Survivin Expression Leads to Reduced Proliferation and Cell Cycle Arrest in Cancer Cells. *J Cancer*. 2015;6(11):1187-94.
164. Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, et al. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci*. 2011;102(3):614-21.
165. Yu Z, Hartel C, Pignalosa D, Kraft-Weyrather W, Jiang GL, Diaz-Carballo D, et al. The Effect of X-Ray and Heavy Ions Radiations on Chemotherapy Refractory Tumor Cells. *Front Oncol*. 2016;6:64.
166. Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(4):603-19.
167. Chen L, Tweddle DA. p53, SKP2, and DKK3 as MYCN Target Genes and Their Potential Therapeutic Significance. *Front Oncol*. 2012;2:173.
168. Calin G, Ivan M, Stefanescu D. The difference between p53 mutation frequency in haematological and non-haematological malignancies: possible explanations. *Med Hypotheses*. 1999;53(4):326-8.
169. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(4):1108-18.
170. Tweddle DA, Pearson ADJ, Haber M, Norris MD, Xue C, Flemming C, et al. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2003;197(1-2):93-8.

171. Seidinger AL, Fortes FP, Mastellaro MJ, Cardinali IA, Zambaldi LG, Aguiar SS, et al. Occurrence of Neuroblastoma among TP53 p.R337H Carriers. *PLoS one*. 2015;10(10):e0140356.
172. Michaelis M, Rothweiler F, Agha B, Barth S, Voges Y, Loschmann 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 & disease*. 2012;3:e294.
173. Michaelis M, Rothweiler F, Barth S, Cinatl J, van Rikxoort M, Loschmann 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 & disease*. 2011;2:e243.
174. Cheng SM, Chang YC, Liu CY, Lee JY, Chan HH, Kuo CW, et al. YM155 down-regulates survivin and XIAP, modulates autophagy and induces autophagy-dependent DNA damage in breast cancer cells. *Br J Pharmacol*. 2015;172(1):214-34.
175. Vequaud E, Seveno C, Lousouarn D, Engelhart L, Campone M, Juin P, et al. YM155 potently triggers cell death in breast cancer cells through an autophagy-NF- κ B network. *Oncotarget*. 2015;6(15):13476-86.
176. Mir R, Stanzani E, Martinez-Soler F, Villanueva A, Vidal A, Condom E, et al. YM155 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin inducing apoptosis and tumor regression. *Gynecol Oncol*. 2014;132(1):211-20.
177. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 2002;21(17):2613-22.
178. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3247-57.
179. Esteve P-O, Chin HG, Pradhan S. Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *P Natl Acad Sci USA*. 2005;102(4):1000-5.
180. Fischer M, Quaas M, Nickel A, Engeland K. Indirect p53-dependent transcriptional repression of Survivin, CDC25C, and PLK1 genes requires the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/CDKN1A and CDE/CHR promoter sites binding the DREAM complex. *Oncotarget*. 2015;6(39):41402-17.
181. Sharom, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem*. 2011; **50**(1): 161-178.

Anhang A.1: siRNA Sequenzen

ON-TARGETplus non targeting Pool siRNA

UGGUUUACAUGUCGACUAA
UGGUUUACAUGUUGUGUGA
UGGUUUACAUGUUUUCUGA
UGGUUUACAUGUUUUCUA

ON-TARGETplus SMARTpool – human ABCB1 siRNA

CCAGGUAUGCCUAUUUUA
GACCAUAAAUGUMGGUUU
GAAAGUAUACCUCCAGUUU
GAGCUUMCACCCGACUUA

ON-TARGETplus SMARTpool – human BIRC5 (Survivin) siRNA

GCAAAGGAAACCAACAAUA
GGAAAGGAGAUCAACAUUU
CACCGCAUCUCUACAUUCA
CCACUGAGAACGAGCCAGA

ON-TARGETplus SMARTpool – human MCL 1 siRNA

GGUUUGGCAUAUCUAAUAA
GAAGGUGGCAUCAGGAAUG
GAUUAUCUCUCGGUACCUU
CGAAGGAAGUAUCGAAUUU

ON-TARGETplus SMARTpool – human SLC35F2 siRNA

GCUAAUUAUGUGAUCGUCA
GUGAGGAAUACAUCGUGAA
GGGGACACUUGGGGAAUA
CAUGGUUGGUGCAGACAU

Wissenschaftliche Publikationen

Projektrelevante Publikation:

Yvonne Voges, Martin Michaelis, Florian Rothweiler, Torsten Schaller, Constanze Schneider, Katharina Politt, Marco Mernberger, Andrea Nist, Thorsten Stiewe, Mark N. Wass, Franz Rödel, Jindrich Cinatl jr.

“Effects of YM155 on survivin levels and viability in neuroblastoma cells with acquired drug resistance”

Cell death and disease, 2016

Weitere Publikationen:

Nadine Löschmann, Martin Michaelis, Florian Rothweiler, **Yvonne Voges**, Barbora Balónová, Barry A. Blight, Jindrich Cinatl jr.

“ABCB1 as predominant resistance mechanism in cells with acquired SNS-032 resistance”

Oncotarget, 2016

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

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”

Scientific Report, 2015

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 acquired resistance to the p53 activator RITA retain functional p53 and sensitivity to other p53 activating agents”

Cell Death and Disease, 2012

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

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....

.....

Unterschrift

Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

Untersuchung eines Survivin-Inhibitors an chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen und nähere Charakterisierung des Wirkmechanismus

Selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den.....

.....

Unterschrift