

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Hygiene
Institut für Medizinische Virologie
Direktorin: Prof. Dr. Sandra Ciesek

**Bedeutung von SAMHD1 als Resistenzfaktor im humanen
Neuroblastom**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Lukas Engl

aus Aichach

Frankfurt am Main, 2022

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	12
1.1 Das Neuroblastom	12
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	12
1.1.2 Risikostratifizierung und Einteilung nach INSS und INRGS	12
1.1.3 Therapieoptionen des Neuroblastoms	14
1.2 Multidrug Resistance in Neuroblastomen	16
1.2.1 Resistenzentwicklung durch ABC-Transporter	16
1.2.2 Einfluss von p53 als Resistenzfaktor im Neuroblastom	18
1.3 Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) Inhibitoren als Therapieoption	19
1.3.1 DNA-Reparatur und Wirkmechanismen von PARP-Inhibitoren	19
1.3.2 Anwendung von PARP-Inhibitoren in der Chemotherapie	21
1.4 SAMHD1 und VLPs	23
1.5 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Verbrauchsmaterialien	27
2.2 Geräte und Software	28
2.3 Chemikalien und Substanzen	29
2.4 Cytostatika und Inhibitoren	31
2.5 Antikörper	32
2.6 Puffer, Lösungen	34
2.6.1 Zellkultur	34

2.6.2	Immunhistochemischer Proteinnachweis	35
2.6.3	MTT-Viabilitätsassays	38
2.6.4	Durchflusszytometrie.....	39
2.7	Zellbiologische Methoden.....	39
2.7.1	Verwendete Zelllinien	39
2.7.2	Zellkultivierung und Passagieren	40
2.7.3	Etablierung der Olaparib-resistenten Zelle IMR5 ^{OLAPARIB} ²⁰	41
2.7.4	Bestimmung der Zellzahl.....	41
2.8	Immunhistochemischer Proteinnachweis	41
2.8.1	Proteinextraktion und Einstellung der Gesamtkonzentration.....	41
2.8.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.8.3	Protein Transfer (Western Blot)	43
2.8.4	Nachweis von Proteinen	44
2.9	MTT-Zellviabilitätsassays.....	44
2.10	VLP Arbeiten.....	47
2.11	MDR1-Nachweis mit Durchflusszytometrie	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Charakterisierung IMR5 und resistenter Sublinien.....	49
3.1.1	Adaptierte Cytostatika und Kreuzresistenzen	49
3.1.2	Proteinexpression der IMR5-Sublinien	51
3.1.3	Untersuchung von p53 in MTT-Tests mit Nutlin-3 und Ergebnisse der TP53-Gensequenzierung	52
3.2	Einfluss von MDR1 an der Entstehung von Chemoresistenz in IMR5.....	55
3.2.1	Nachweis von MDR1 mit Durchflusszytometrie	55
3.2.2	Beurteilung der Funktionalität von MDR1 im MTT Assay	56
3.3	Einfluss von SAMHD1 auf Resistenz	61
3.4	PARP1-Inhibitoren und Anwendung in IMR5.....	65
3.4.1	Einfluss von ABC-Transportern auf PARP-Inhibitoren.....	65
3.4.2	Einfluss von Verapamil und VLPs in IMR5 ^{OLAPARIB} ²⁰	71

4	Diskussion	81
4.1	Entwicklung von Kreuzresistenzen in IMR5 durch MDR1	81
4.2	Keine Beteiligung von p53 an der Entstehung von Chemoresistenz in IMR5.	84
4.3	SAMHD1 als Resistenzfaktor in IMR5.....	85
4.4	Anwendung von PARP-Inhibitoren in IMR5.....	87
4.5	Etablierung und Charakterisierung von IMR5 ^{OLAPARIB} ²⁰	90
	Zusammenfassung	95
	Summary.....	97
	Literatur	99
	Anhang	108
	Danksagung	109
	Lebenslauf	110
	Schriftliche Erklärung.....	112