

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)

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
4.4.2 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