

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

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

**Charakterisierung von Neuroblastomzelllinien und ihrer  
platinresistenten Sublinien und Möglichkeit der  
Resistenzüberwindung mittels ausgewählter Substanzen der  
Connectivity Map**

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

vorgelegt von  
Ricarda Elisa Theis-Hubener  
geb. Theis

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Jindrich Cinatl
Korreferentin:	Prof. Dr. Simone Fulda
Tag der mündlichen Prüfung:	25. August 2020

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Das Neuroblastom</b>	<b>7</b>
1.1.1 Definition .....	7
1.1.2 Genetik und Biologie des Neuroblastoms .....	7
1.1.3 Klinische Präsentation und Symptomatik .....	8
1.1.4 Diagnostik .....	8
1.1.5 Therapie .....	10
1.1.6 Prognose .....	11
<b>1.2 Zelldifferenzierung</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Anoikis</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Platinbasierte Chemotherapie</b>	<b>12</b>
1.4.1 Wirkmechanismus von Cisplatin .....	12
1.4.2 Cisplatinresistenz .....	13
<b>1.5 Strategien zur Überwindung der Cisplatinresistenz</b>	<b>14</b>
1.5.1 Modifikation der Chemotherapeutika und Einsatz von Adjuvantien .....	14
1.5.2 Genetische Selektion und epigenetische Modifikation .....	15
<b>1.6. Connectivity Map</b>	<b>15</b>
1.6.1 Potentielle Resensitizer und ihre pharmakologischen Eigenschaften .....	16
<b>1.7 Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Laborgeräte</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Chemikalien und Wirkstoffe</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Lösungen</b>	<b>23</b>
2.4.1 Zellkultur .....	23
2.4.2 MTT .....	23
<b>2.5 Antikörper (Durchflusszytometer)</b>	<b>24</b>
<b>2.6 Quantitative Real-time PCR</b>	<b>25</b>
2.6.1 RNA-Isolation .....	25
2.6.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	25
2.6.3 PCR-Lösungen .....	25
2.6.4 Primer .....	26
<b>2.7 Zelllinien</b>	<b>27</b>
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Zellkultivierung</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Zellviabilitätsbestimmung (MTT-Test)</b>	<b>30</b>

3.2.1 Grundlagen & Durchführung .....	30
3.2.2 Testung der potentiellen Resensitizer der Connectivity Map .....	31
3.2.3 Anoikis-Testung mit PolyHEMA.....	32
<b>3.3 Durchflusszytometrie</b> .....	<b>33</b>
3.3.1 Prinzip & Durchführung .....	33
3.3.1.1 Färbung auf CD133 & NCAM.....	34
3.3.1.2 Färbung auf EGF-R.....	34
3.3.1.3 Färbung auf c-Kit.....	34
<b>3.4 Quantitative Real-Time PCR</b> .....	<b>35</b>
3.4.1 Prinzip .....	35
3.4.2 Probenextraktion.....	36
3.4.3 RNA-Isolierung .....	36
3.4.4 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	36
3.4.5 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (cDNA-Synthese).....	37
3.4.6 Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR.....	38
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Morphologie der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB -3 und UKF-NB -6 und ihrer Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 Expression von EGF-R, N-CAM, CD133 und c-Kit in parentalen und platinresistenten Neuroblastomzelllinien</b> .....	<b>41</b>
4.2.1 EGF-R.....	41
4.2.2 N-CAM .....	42
4.2.3 CD133.....	43
4.2.4 c-Kit.....	44
<b>4.3 Einfluss von Cisplatin und Carboplatin auf die Genexpression von Neural cell adhesion molecule, Tyrosinhydroxylase, Neurofilament-L, -M und -H in parentalen und platinresistenten Neuroblastomzelllinien</b> .....	<b>45</b>
4.3.1 Neural cell adhesion molecule (N-CAM)-Genexpression .....	46
4.3.2 Tyrosinhydroxylase (TH)-Genexpression .....	48
4.3.3 Neurofilament-L (NF-L) -Genexpression .....	50
4.3.4 Neurofilament-M (NF-M) -Genexpression.....	52
4.3.5 Neurofilament-H (NF-H) -Genexpression.....	54
<b>4.4 Induktion von Anoikis durch Kultivierung auf PolyHEMA</b> .....	<b>56</b>
4.4.1 Vergleich der Zellviabilität unter adhärenen und nicht-adhärenen Bedingungen.....	56
4.4.2 Einfluß von Cisplatin und Carboplatin auf die Zellviabilität unter nicht-adhärenen Bedingungen .....	57
<b>4.5 Untersuchungen des Einflusses ausgewählter Stoffe der Connectivity Map auf die Cisplatinresistenz verschiedener Neuroblastomzelllinien</b> .....	<b>62</b>

4.5.1. Toxizität der potentiellen Resensitizer Pararosanilin, Tolbutamid, Topiramamat, Fludrocortison und 12, 13-EODE.....	62
4.5.2 Einfluss potentieller Resensitizer auf die Cisplatinwirkung in Cisplatin-resistenten Sublinien .....	65
4.5.2.1 Pararosanilin.....	65
4.5.2.2 Tolbutamid.....	65
4.5.2.3 Topiramamat.....	66
4.5.2.4 12, 13-EODE .....	67
4.5.2.5 Fludrocortison.....	67
4.5.3 Einfluss potentieller Resensitizer auf die Cisplatinwirkung in parentalen Neuroblastomzelllinien.....	68
4.5.3.1 Topiramamat.....	68
4.5.3.2 12, 13-EODE .....	68
4.5.3.3 Fludrocortison.....	69
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1 Charakterisierung der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB -6 und ihrer Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien</b>	<b>70</b>
5.1.1. Die Expression der Stammzellmarker CD133 und c-Kit ist gering.....	71
5.1.2. Keine Überexpression von EGF-R in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien .....	72
5.1.3. Reduzierte Expression des neuronalen Marker N-CAM in den Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien.....	73
5.1.4 Vergleich der Genexpression von N-CAM, Tyrosinhydroxylase, Neurofilament-L, -M und -H in parentalen und Platin-resistenten Zellen .....	73
5.1.5 Temporäre Platinkarenz hat wenig Einfluss auf die Genexpression .....	74
5.1.6 Klassifizierung der Zelllinien nach Phänotyp und Differenzierungsgrad .....	75
<b>5.2 Anoikis-Induktion durch Poly-HEMA</b>	<b>76</b>
<b>5.3 Wirkungen der ausgewählten Substanzen der Connectivity Map auf die Cisplatin-Resistenz</b>	<b>78</b>
5.3.1 Pararosanilin und Tolbutamid wirken als Resensitizer .....	79
5.3.2 Fludrocortison verstärkt die Cisplatin-Resistenz und desensibilisiert Zellen für Cisplatin .80	
5.3.3 12,13-EODE führt zu keiner signifikanten Veränderung des IC <sub>50</sub> -Wertes von Cisplatin in resistenten Sublinien.....	81
5.3.4 Topiramamat erhöht den IC <sub>50</sub> von Cisplatin in resistenten Sublinien .....	81
5.3.5 Wertung der Ergebnisse zur Connectivity Map .....	82
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>

<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>86</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>98</b>
<b>10. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....</b>	<b>101</b>
<b>10.1 Datenauswertung und Statistik der Connectivity Map-Versuche</b>	<b>101</b>
<b>10.2 Statistische Auswertung der Versuche zur Zellcharakterisierung</b>	<b>105</b>
<b>11. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>106</b>
<b>12. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>108</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>112</b>
<b>SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>113</b>

### 1. Einleitung

#### 1.1 Das Neuroblastom

##### 1.1.1 Definition

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor des autonomen Nervensystems. Ausgehend von sympathiko-adrenalen unreifen Nervenzellen (Neuroblasten) der Neuralleiste findet sich der Primärtumor am häufigsten im Nebennierenmark und entlang des sympathischen Grenzstrangs in Hals, Thorax, Abdomen und Becken (Maris, 2010). Mit einer Inzidenz von 1,1 Erkrankungen auf 100.000 Kinder <15 Jahren ist es der häufigste solide extrakranielle Tumor des Kindesalters und stellt etwa 10% aller kindlichen Krebserkrankungen. Bis zum Ende des ersten Lebensjahres werden 40%, bis zum Alter von 6 Jahren mehr als 90% aller Neuroblastome diagnostiziert. In seltenen Fällen (ca. 1,3%) finden sich auch Patienten im Adoleszenten- oder Erwachsenenalter (Gadner et al., 2006). Das Neuroblastom ist keine homogene klinisch-biologische Entität, sondern eine Tumorgruppe mit völlig unterschiedlichem klinischem Verhalten; auch die genetischen Veränderungen sind sehr heterogen. Die Ätiologie des Neuroblastoms ist nach wie vor weitgehend unklar.

##### 1.1.2 Genetik und Biologie des Neuroblastoms

Neuroblastome weisen eine Vielzahl genetischer Veränderungen auf. Als verlässlichste chromosomale Aberration zur Dignitätsbeurteilung eines Neuroblastoms hat sich die Amplifikation des MYCN-Protoonkogens bewährt. Sie findet sich in etwa 20% der Primärtumore und ist mit einer schlechten Prognose bedingt durch rasche Tumorprogression und Therapieversagen assoziiert (Maris et al., 2007). Auch segmentale chromosomale Veränderungen finden sich in vielen Neuroblastomen. Dazu gehören Deletionen an mutmaßlichen Tumorsuppressorgenen (Chromosom 1p, 3p, 4p und 11q) sowie Zugewinne an mutmaßlichen Onkogenen (Chromosom 1q, 2p und 17q) (Schleiermacher et al., 2012). Die Verlängerung am langen Arm des Chromosom 17 ist die häufigste genetische Veränderung in Neuroblastomen (66-69% der Fälle) (Bown et al., 1999). Es handelt sich dabei meist um eine unbalancierte Translokation mit Deletionen an den Chromosomen 1p oder 11q. Der prognostische Wert dieser Aberrationen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Maris et al., 2007).

## 1. Einleitung

### 1.1.3 Klinische Präsentation und Symptomatik

Etwa die Hälfte aller Primärtumoren entstehen in den Nebennieren, ungefähr 25-30% entlang des abdominellen und etwa 15-20% entlang des thorakalen oder zervikalen Grenzstrangs. Metastasen treten vor allem im Knochenmark (80-90%) und den Knochen (50-70%) sowie in lokoregionären Lymphknoten auf. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weisen ungefähr 40% der Patienten eine lokalisierte Erkrankung auf. Die initiale Symptomatik ist dabei sehr unterschiedlich und wird beeinflusst durch Lage und Größe des Primärtumors, vorhandene Metastasen und paraneoplastische Syndrome (z. B. das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom). Primär hämatogen oder lymphogen metastasierte Neuroblastome führen häufiger zu Allgemeinsymptomen wie Schmerzen (33%), Fieber (26%) und Gewichtsverlust (12%). Ein ein- oder beidseitiges Brillenhämatom ist charakteristisch für ein metastasiertes Neuroblastom. Säuglinge im metastasierten Stadium (Stadium 4S, 5% der Fälle) haben kleine Primärtumore mit Metastasen in Leber, Haut oder Knochenmark, welche sich fast immer spontan zurückbilden (Gadner et al., 2006; Maris et al., 2007).

### 1.1.4 Diagnostik

Zur Diagnose und zum prätherapeutischen Staging des Neuroblastoms gehören, neben einer ausführlichen klinischen Untersuchung, die Bestimmung verschiedener laborchemischer Parameter, verschiedene Verfahren der Bildgebung sowie die histopathologische und molekulargenetische Untersuchung von Tumorgewebe und Knochenmark. Die laborchemische Diagnostik dient dem Nachweis von Katecholaminmetaboliten (Homovanillinmandelsäure, Vanillinmandelsäure) in Serum und Urin. Ebenso wie die neuronenspezifische Enolase (NSE) können sie als Tumormarker bei Diagnosestellung und im Verlauf eingesetzt werden. Die histopathologische Einteilung erfolgt nach der internationalen INPC-Klassifizierung (International Neuroblastoma Pathology Committee). In Deutschland wird häufig auch das Grading-System nach Hughes (Hughes et al., 1974) angewandt. Da über 80% aller metastasierten Neuroblastome eine Metastasierung ins Knochenmark zeigen, ist eine histopathologische Untersuchung des Knochenmarks notwendig. Molekulargenetische Untersuchungen dienen der Prognoseabschätzung und Therapieplanung. Eine Szintigraphie mit Metajodobenzylguanidin (MIBG) ist zur spezifischen Darstellung von



## 1. Einleitung

Primärtumor und Fernmetastasen bei Diagnosestellung unerlässlich, ergänzt wird sie durch Sonographie und Kernspintomographie (S1-Leitlinie Neuroblastom der Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH, Stand 2011)). Die Stadieneinteilung erfolgt nach INSS-Kriterien (International Neuroblastoma Staging System), diese Einteilung beruht sowohl auf klinisch-radiologischen als auch auf chirurgischen und histopathologischen Kriterien (Brodeur et al., 1993).

1	Lokalierter Tumor makroskopisch vollständig entfernt, mit oder ohne mikroskopischen Resttumor; repräsentative ipsilaterale Lymphknoten sind mikroskopisch negativ (dem Primärtumor anhängende/benachbarte Lymphknoten können positiv sein)
2A	Lokalierter Tumor makroskopisch unvollständig entfernt; repräsentative ipsilaterale nicht-adhärente Lymphknoten sind mikroskopisch negativ
2B	Lokalierter Tumor makroskopisch vollständig oder unvollständig entfernt; ipsilaterale nicht-adhärente Lymphknoten sind mikroskopisch positiv. Vergrößerte kontralaterale Lymphknoten sollten mikroskopisch negativ sein.
3	Nicht-resektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie, mit oder ohne regionalen Lymphknotenbefall; oder lokalierter unilateraler Tumor mit kontralateralem regionalen Lymphknotenbefall; oder Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch (unresektable) Infiltration oder durch Lymphknotenbefall.
4	Jeder Primärtumor mit Befall von Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut oder anderen Organen.
4S	Lokalierter Primärtumor bei Kinder jünger 1 Jahr (entsprechend der Definition von Stadium 1, 2a oder 2b) mit Metastasierung, die auf Leber, Haut oder Knochenmark beschränkt ist. Die Infiltration des Knochenmarks ist dabei gering (<10% maligne Zellen).

**Tabelle 1-1:** International Neuroblastoma Staging System (INSS) nach Maris et al., 2007

Das International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) soll hingegen eine prätherapeutische Stadieneinteilung anhand der Bildgebung ermöglichen und die Resektabilität des Tumors einschätzen.

## 1. Einleitung

L1	Lokalisierter Tumor ohne Befall vitaler Strukturen wie in der Liste der image defined risk factors definiert und mit Beschränkung auf einen Körperteil.
L2	Locoregionaler Tumor mit einem oder mehreren image defined risk factors
M	Fernmetastasierung (ausgenommen Stadium MS)
MS	Fernmetastasierung bei Kindern unter 18 Monaten mit Metastasen beschränkt auf Haut, Leber, und/oder Knochenmark.

**Tabelle 1-2:** The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System nach Monclair et al., 2009

Die Image-Defined Risk Factors beschreiben dabei u. a. die Invasion des Tumors in verschiedene vitale Strukturen oder ein grenzüberschreitendes Wachstum des Tumors (Monclair et al., 2009).

Die Risikoeinteilung entsprechend der Children's Oncology Group (COG) beinhaltet das Alter des Patienten bei Diagnose, das INSS-Stadium sowie die Tumorphistopathologie, den DNA-Index und den MYCN-Amplifikationsstatus. Nach diesen Faktoren erfolgt die Zuordnung zu einer von drei Risikogruppen (low-risk, intermediate-risk, high-risk) und einem entsprechenden Therapieregime.

### 1.1.5 Therapie

Das Behandlungsspektrum des Neuroblastoms reicht risikoadaptiert von alleiniger Beobachtung, z. B. im Stadium 4S, bis zur Maximaltherapie bei Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastomen. Diese setzt sich zusammen aus intensiver Polychemotherapie, Operation, autologer Stammzelltransplantation sowie ggf. Radiotherapie bzw. MIBG-Therapie. Im Anschluss an die intensive Therapiephase können konsolidierende Therapien (z. B. Retinsäure) eingesetzt werden. Bei Niedrigrisiko-Patienten kann eine Chemotherapie zur Induktion der Regression bei Beeinträchtigung von Organen oder rapider Progression indiziert sein (S1-Leitlinie Neuroblastom der GPOH, Stand 2011).

## 1. Einleitung

### 1.1.6 Prognose

Die Prognose ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Stadium, Alter und molekulargenetischen Veränderungen. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Niedrigrisiko-Patienten liegt bei über 95%, die von Hochrisiko-Patienten nur bei 30% bis 40% (S1-Leitlinie Neuroblastom der GPOH, Stand 2011).

### 1.2 Zelldifferenzierung

Die zelluläre Heterogenität ist ein typisches Merkmal des Neuroblastoms. Auch bei der Kultivierung von Neuroblastomzellen in vitro zeigen sich verschiedene Phänotypen. Drei davon wurden u. A. von Ross et al. (2003; 2007) genauer untersucht und charakterisiert. Hierbei handelt es sich um die neuroblastischen Zellen (N-Typ), die intermediären Zellen (I-Typ) und die Substrat-adhärenenten Zellen (S-Typ). Zellen des I-Typs kommen einer sogenannten „Krebsstammzelle“ (im weiteren CSC für cancer stem cells genannt) am nächsten. Die Krebsstammzell-Hypothese besagt, dass eine kleine Population an Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften, die Krebsstammzellen, für das Tumorwachstum und die Progression verantwortlich ist. Ob diese Zellen aus Stammzellen entstanden sind oder sich nur Stammzeleigenschaften angeeignet haben, ist zurzeit noch nicht geklärt. CSC können sich in weitere CSC oder in ausreifende, nur schwach tumorigene Zellen teilen und führen zu einem zellulär heterogenen Tumor. Zellen des I-Typs exprimieren verschiedene Stammzellmarker (CD133, c-Kit) und können sich bidirektional, zu N- oder S-Typ Zellen, entwickeln. Ihr verstärktes Auftreten in einem Tumor wird mit einer schlechten Prognose assoziiert (Han et al., 2011).

### 1.3 Anoikis

Ein weiterer prognosebestimmender Faktor des Neuroblastoms ist eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber Anoikis (griech. Heimatlosigkeit), dem programmierten Zelltod ausgelöst durch Verlust des Zell-Matrix-Kontakts oder inadäquatem Zell-Matrix-Kontakt. Unter physiologischen Bedingungen dient Anoikis der Eliminierung deplatzierte Zellen sowie Involutionsprozessen. Die Anoikis-Resistenz gilt als eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen. Tumorzellen haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um Anoikis zu verhindern oder zu umgehen. Dazu

## 1. Einleitung

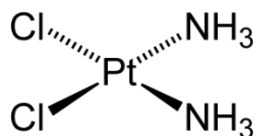
gehören neben der Adaptation an die neue Umgebung auch die Hyperaktivierung von Überlebens- und Proliferationskaskaden (Guadamillas et al., 2011). Das Resultat ist die Fähigkeit des Tumors, unabhängig von seiner Umgebung zu wachsen und zu metastasieren.

### 1.4 Platinbasierte Chemotherapie

Platinbasierte Chemotherapeutika gehören zu den am häufigsten eingesetzten Wirkstoffen in der Therapie maligner Tumore. Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin) ist das am längsten eingesetzte und am weitesten verbreitete Platinderivat. Carboplatin (Diamminplatin(II)-cyclobutan-1,1-dicarboxylat) entspricht in seinem Wirkungsspektrum Cisplatin; einige Tumore, darunter das kleinzellige Bronchialkarzinom, zeigen jedoch ein vermindertes Ansprechen auf Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin. Ein weiteres Platinderivat Oxaliplatin wird u. a. in der Therapie des metastasierten Colonkarzinoms eingesetzt, einem Tumor, der nicht auf eine Behandlung mit Cis- oder Carboplatin anspricht (Sprowl et al., 2013).

#### 1.4.1 Wirkmechanismus von Cisplatin

Der neutrale, noch nicht zytotoxisch wirksame Cisplatinkomplex ist ein planares Molekül bestehend aus je zwei Chlorid- und zwei Amminliganden, welche in cis-Stellung an ein Platin-Ion gebunden sind.



**Abbildung 1-1:** Molekulare Struktur von Cisplatin

In chloridreichen wässrigen Medien (Blutserum) ist der Komplex stabil. Nach passiver Diffusion des Platinkomplexes durch die Zellmembran kommt es bedingt durch den geringeren Chloridgehalt des Zytoplasmas zu einer Hydrolyse. Die Chlorliganden werden hierbei in mehreren Schritten durch Wassermoleküle substituiert. Cisplatin entwickelt nun seine zytotoxische Wirkung durch Bindung an alle DNA-Basen, wobei es die N-7 Position des Guanins und des Adenins bevorzugt. Dadurch kommt es zur Ausbildung von Monoaddukten, Intrastrangaddukten und Interstrang-Vernetzungen

## 1. Einleitung

der DNA und einer Distorsion der Doppelhelix. Die Interstrang-Vernetzungen, auch interstrand cross-links genannt, machen dabei nur 5-10% der DNA-Schäden aus, sind aber maßgeblich für die zytotoxische Wirkung der Platinderivate verantwortlich. Alle diese Veränderungen führen zu einer Störung der DNA-Replikation und -Transkription und lösen eine Reihe von Signalkaskaden aus, welche entweder zur DNA-Reparatur oder zur Apoptose der Zelle führen (Siddik, 2003; Kothandapani et al., 2011).

### 1.4.2 Cisplatinresistenz

Der häufigste Grund eines Therapieversagens bei der Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen ist die Entwicklung einer Chemoresistenz des Tumorgewebes (Brodeur, 2011).

Viele verschiedene Mechanismen tragen zur Cisplatinresistenz bei, die gesteigerte DNA-Reparatur wird aber als Hauptursache für eine Resistenzentwicklung angenommen (McGurk et al., 2006). Die verschiedenen durch Cisplatin ausgelösten DNA-Läsionen werden durch verschiedene Mechanismen erkannt und repariert. Die Monoaddukte und Intrastrang-Verbindungen werden durch den nucleotide excision repair pathway (NER) repariert. NER durchläuft mehrere Schritte, an denen mehrere Gene beteiligt sind. Die wichtigsten hierbei sind ERCC1 (excision repair cross-complementing group 1 protein) und die sieben XP (Xeroderma pigmentosum)-Gene (XPA-XPG) (Graf et al., 2011). Der kritischste Schritt im NER-pathway fällt der Struktur-spezifischen Endonuklease ERCC1-XPF, einem Heterodimer der Proteine ERCC1 und XPF, zu (Arora et al., 2010). Tumore, die wie die Keimzelltumore des Hodens einen niedrigen Gehalt an NER-Proteinen, insbesondere ERCC1-XPF und XPA, aufweisen, zeigen ein gutes Ansprechen auf eine platin-basierte Chemotherapie (Köberle et al., 2010). Im Kontrast dazu führt eine Überexpression des ERCC1-Gens in vielen Tumoren zu einer Platin-Resistenz (Köberle et al., 2010; Arora et al. 2010).

Die Reparatur der Interstrang-Verbindungen (interstrand cross-links) konnte noch nicht vollständig nachvollzogen werden. ERCC1-XPF spielt hier, unabhängig von NER, aber auch eine wichtige Rolle (Kirschner & Melton, 2010; Graf et al., 2011). Nach aktuellen Studien ist auch der base excision repair pathway (BER) an der Reparatur beteiligt (Kothandapani et al., 2013). Auch zum Einfluss des DNA-mismatch repair

## 1. Einleitung

pathway (MMR) gibt es verschiedene Hypothesen (Kothandapani et al., 2013). MMR-Proteine sind u. a. notwendig für die Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten und pro-apoptotischen Signalen in Folge einer spezifischen DNA-Schädigung (Li, 2008). Inaktivierung des MMR-Signalwegs führt zu einer Cisplatin-Resistenz (Kartalou & Essigmann, 2001).

Zu den weiteren Resistenzmechanismen Cisplatin-resistenter Zellen gehört die vermehrte Expression des ABC-Transporters ABCC2. Dieser soll Glutathion-konjugierte und dadurch inaktivierte Platinderivate aus der Zelle transportieren (Taniguchi et al., 1996). Verschiedene Proteine des zellulären Kupfertransports, insbesondere die Kupfertransporter CTR1 (Influx) sowie ATP7A und ATP7B (Efflux) können ebenfalls die intrazelluläre Cisplatinkonzentration beeinflussen (Safaei, 2006; Howell et al., 2010; Sprowl et al., 2013). Auch Veränderungen in der Struktur der extrazellulären Matrix von Tumorzellen beeinflussen den Influx von Cisplatin (Sherman-Baust et al., 2003).

### **1.5 Strategien zur Überwindung der Cisplatinresistenz**

#### **1.5.1 Modifikation der Chemotherapeutika und Einsatz von Adjuvantien**

Der Einsatz neuer Platinanaloge bietet eine Möglichkeit, eine bestehende Platinresistenz zu umgehen oder ein Ansprechen auf eine platinbasierte Therapie überhaupt erst zu ermöglichen. Ein Beispiel dafür ist Oxaliplatin, im Gegensatz zu Cis- und Carboplatin ist seine intrazelluläre Akkumulation weniger von dem Kupfertransporter CTR1 abhängig (Holzer et al., 2006) und seine DNA-Addukte werden von MMR-Proteinen nicht erkannt (Fink et al., 1996). Es wird daher als einziges Platinderivat erfolgreich in der Therapie des metastasierten Colonkarzinoms eingesetzt (Sprowl et al., 2013).

Weitere Ansätze zur Überwindung der Platinresistenz zielen z. B. auf eine verbesserte Aufnahme der Platinderivate mittels Transportern aus Hydroxypropylmethacrylamid (Gianasi et al., 1999) oder eine geringere zelluläre Entgiftung durch Inhibition der Glutathion-Synthese durch Buthionin-Sulfoximin ab (Tai et al., 2012).

## 1. Einleitung

### **1.5.2 Genetische Selektion und epigenetische Modifikation**

Auch die genetischen und epigenetischen Veränderungen resistenter Zellen sind Ziel neuer Behandlungsstrategien. Epigenetische Veränderung in Form von DNA- und Histon-Methylierung sowie Histon-Acetylierung spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Neuroblastome (Charlet et al., 2012). So ist die DNA-Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen wie Caspase 8 (CASP8) mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Yang et al., 2007). Der Einsatz demethylierender Agenzien wie 5-Aza-2'-deoxycytidine in chemoresistenten Neuroblastomzellen zeigt eine vielversprechende Steigerung der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika (Charlet et al., 2012). Auch Histondeacetylase-Inhibitoren wie Vorinostat (Lautz et al., 2012) oder Valproat (Groh et al., 2012) können die Chemosensitivität von Neuroblastomzellen steigern.

Epigenetische Veränderungen lassen sich durch Einsatz verschiedener Stoffe direkt beeinflussen und bieten somit einen direkten therapeutischen Angriffspunkt. Ziel des Nachweises bestimmter genetischer Veränderungen ist es, die richtige Therapie für eine bestimmte Tumormodifikation zu finden, um ein bestmögliches Therapieansprechen zu ermöglichen.

### **1.6. Connectivity Map**

Die Connectivity Map des Broad Institute ist eine Datenbank von Genexpressionsprofilen verschiedener mit diversen Wirkstoffen behandelter Tumorzelllinien. Die erste Generation der Connectivity Map (build 01) enthielt 453 Genexpressionsprofile, gewonnen aus zwei epithelialen Tumorzelllinien (Mammakarzinom MCF7, Prostatakarzinom PC3) und zwei non-epithelialen Tumorzelllinien (Leukämie HL60, Melanom SKMEL5), welche mit 164 Wirkstoffen behandelt wurden. Die zweite Version (build 02) enthält bereits 7000 Genexpressionsprofile von 1309 Wirkstoffen (Lamb et al., 2006; Lamb, 2007).

Bei Eingabe eines zu untersuchenden Genexpressionsprofils in die Connectivity Map vergleicht die Software mit Hilfe eines pattern-matching-Algorithmus das eingegebene Genexpressionprofil mit den gespeicherten wirkstoffinduzierten Genexpressionprofilen und berechnet einen connectivity score. Dieser ist ein Maß für

## 1. Einleitung

die Ähnlichkeit der beiden Profile und kann einen Wert zwischen +1 bei starker Ähnlichkeit (positive connectivity) und -1 bei entgegengesetztem Expressionsprofil (negative connectivity) annehmen (Lamb et al., 2006; Lamb, 2007).

In Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit bedeutet dies: Die Wirkstoffe der Genexpressionsprofile, die im Vergleich mit einer zu untersuchenden Resistenz-assoziierten Gensignatur einer Tumorzelle eine negative connectivity aufweisen, könnten über ein mögliches therapeutisches Potential verfügen, welches die Resistenz aufhebt.

Die in dieser Arbeit untersuchten parentalen, chemosensitiven Neuroblastomzelllinien (UKF-NB-2, UKF-NB-3, UKF-NB-6, NGP, SK-N-AS, IMR-5) und ihre Cisplatin-resistenten Sublinien wurden im Vorfeld per genomweiter Analyse (mit Hilfe des AB1700 Human Genome Survey Microarray V2.0 der Firma Applied Biosystems) auf Resistenz-spezifische Genexpressionsprofile untersucht; anschließend erfolgte eine zusätzliche Überprüfung der Ergebnisse mittels RT-PCR. Die Resistenz-spezifischen Genexpressionsprofile wurden dann in die Connectivity Map eingegeben und verglichen. Die Wirkstoffe der Genexpressionsprofile mit den negativsten connectivity scores wurden als mögliche „Resensitizer“ der Cisplatin-resistenten Zellen ausgewählt und in den folgenden Versuchen per MTT-Viabilitätstest auf ihre Wirkung untersucht.

### **1.6.1 Potentielle Resensitizer und ihre pharmakologischen Eigenschaften**

Aus einer Vielzahl in Frage kommender Substanzen wurden die ausgewählt, die für alle zu untersuchenden Zelllinien eine hohe negative Konnektivität aufweisen. Die folgenden 5 Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirkung als Resensitizer zur Cisplatinresistenz untersucht.

12, 13-EODE: auch 12(13)-EpOME genannt, ist das 12,13-cis Epoxid der Linolsäure und wird, ebenso wie 9(10)-EpOME, von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Rahmen des oxidativen Bursts freigesetzt. Ihm wird eine antibakterielle und antimykotische Wirkung zugeschrieben (Thompson et al., 2007; Hayakawa et al., 1986). Weitere Synonyme für 12, 13-EODE sind iso-Leukotoxin und Leukotoxin B.



## 1. Einleitung

Fludrocortison: Fludrocortison ist ein synthetisches Aldosteronanalogon, das zu den Mineralokortikoiden zählt. Es wird vor allem zur Behandlung des Aldosteronmangels bei Morbus Addison und bei orthostatischer Hypotension eingesetzt (Tiede et al., 2010; Arnold et al., 2013).

Pararosanilin: Pararosanilin, auch Pararosanilinhydrochlorid oder Parafuchsin genannt, ist, wie Rosanilin oder Fuchsin, ein roter Triphenylmethanfarbstoff. In Ethanol gelöst wird er in der Mikroskopie und Histologie zum Färben, insbesondere von Inselzellen des Pankreas, verwendet (Mowry, 1978).

Tolbutamid: Tolbutamid ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe und wird in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ-2 eingesetzt.

Topiramat: Topiramat ist ein Arzneimittel gegen Epilepsie und Migräne. Es inhibiert Glycin-Bindungsstelle an erregenden, glutamatergen AMPA-Rezeptoren und verstärkt durch Bindung an GABA-Rezeptoren deren hemmenden Effekt. Des Weiteren inaktiviert es spannungsabhängige Natriumkanäle und verhindert dadurch die Auslösung schnell aufeinanderfolgender Aktionspotentiale (Lüllmann et al., 2006).

## 1. Einleitung

### 1.7 Zielsetzung

Das Neuroblastom ist einer der aggressivsten soliden Tumore des Kindesalters, trotz intensiver multimodaler Therapie überleben nur 30-40% der Hochrisikopatienten die Erkrankung (Gheeya et al., 2010). Ursache eines Therapieversagens ist in den meisten Fällen eine Resistenzentwicklung des Tumors gegenüber den Chemotherapeutika (D'Aguanno et al., 2010). Die Überwindung der Chemoresistenz und die Resensibilisierung der Tumorzellen ist daher ein dringendes Forschungsanliegen.

Ein Ansatz zur Therapieverbesserung bei Neuroblastomerkrankungen ist die Identifizierung von Krebsstammzellen im Tumorgewebe. Krebsstammzellen wurden bereits in verschiedenen Tumoren nachgewiesen (Shackleton et al., 2009). Da sie sich oft resistent gegenüber Chemo- und Radiotherapie zeigen, sind sie Ursache von Rezidiven (Eyler & Rich, 2008). Ihre Charakterisierung und Eliminierung ist Gegenstand intensiver Forschung (Shackleton et al., 2009; Magee et al., 2012). Das sowohl klinisch als auch biologisch heterogene Neuroblastom zeigt auch in der Zellkultur verschiedene Phänotypen. Drei konstant vertretene Zelltypen (N-Typ, I-Typ und S-Typ) wurden bereits ausführlich u. a. durch Ross et al. (1995; 2003; 2007) charakterisiert. Die Zellen des I-Typ zeigen dabei CSC-Eigenschaften und ein CSC-typisches Malignitätspotential (Walton et al., 2004; Ross & Spengler, 2007). Die Untersuchungen zur Zellcharakterisierung in dieser Arbeit sollen zeigen, in wie weit die am Universitätsklinikum Frankfurt etablierten Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, -3 und -6 sowie ihre Cis- und Carboplatin-resistenten Sublinien diesen Zelltypen zuzuordnen sind und ob sich unter ihnen Zellen mit dem Potential einer CSC befinden.

Ein weiterer prognosebestimmender Faktor des Neuroblastoms ist die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Anoikis, dem programmierten Zelltod ausgelöst durch Störung oder Verlust des Zell-Matrix-Kontakts. Die Anoikis-Resistenz gilt als eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen. Die Kultivierung der Neuroblastomzelllinien und ihrer Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien unter nicht adhären Bedingungen, durch Beschichtung der Kulturplatten mit PolyHEMA, soll zeigen, ob eine Anoikis-Resistenz besteht und ob diese in Abhängigkeit vom Resistenzstatus der Neuroblastomzellen unterschiedlich ausgeprägt ist.

## 1. Einleitung

Verschiedene Verfahren der Genexpressionsanalyse wie das Hochdurchsatz-Screening- und Microarray-Verfahren sowie die Verwendung bioinformatischer Programme ermöglichen die Erstellung und Nutzung von Genexpressionsdatenbanken wie der Connectivity Map. Durch spezielle Mustererkennungsalgorithmen ermöglicht sie eine Verknüpfung von Gensignaturen, Wirkstoffen und Krankheitsbildern. Mit ihrer Hilfe konnte der mTOR-Inhibitor Sirolimus als Resensitizer für Dexamethason-resistente ALL-Zellen identifiziert werden (Lamb et al., 2006). Nach diesem Prinzip sollen in dieser Arbeit neue Wirkstoffe ermittelt werden, welche zum einen eine Verringerung der Cisplatinresistenz in Neuroblastomzellen erreichen, zum anderen (als bereits zugelassene Medikamente wie Fludrocortison, Tolbutamid, Topiramid) ein kalkulierbares Nebenwirkungsprofil besitzen. Dazu wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine genomweite Expressionsanalyse von 6 Cisplatin-sensiblen und -resistenten Zellen per Gene Microarray durchgeführt und resistenzspezifische Gensignaturen identifiziert. Zehn zufällig ausgewählte Signaturen wurden anschließend, nach Bestätigung durch die RT-PCR, in die Connectivity Map eingegeben. Von den durch die Connectivity Map ermittelten möglichen resensibilisierenden Wirkstoffen wurden 5 (12,13-EODE, Fludrocortison, Tolbutamid, Topiramid, Pararosanilin) für die weitere Testung in dieser Arbeit ausgewählt.

## 2. Material

### 2. Material

#### 2.1 Laborgeräte

Durchflusszytometer	FACSCalibur, BD Bioscience, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Mailand, Italien
Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Inkubatoren	Inkubator, Binder, Tuttlingen CO <sub>2</sub> -Inkubator, Heraeus, Hanau
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer	„Assistent“-Magnetmix Hecht, Sondheim/Rhön
Mikroskop	Zeiss; Olympus, Hamburg
Millipore H <sub>2</sub> O-Anlage	Millipore, Eschborn
PCR-Cycler	TaqMan Cycler PRISM 7900HT, Applied Biosystems, Darmstadt
pH-Meter	Schott, Mainz
Pipetten und Pipettierhilfen	Research Pipette 10, 100, 200, 1000 µl; Multipette, Eppendorf, Hamburg MultiChannel Pipette, Hamilton, Gräfelfing Pipetboy, Integra Biosciences, Fernwald
Plattenphotometer	Tecan GENios, Tecan, Crailsheim
Spektrophotometer	GeneQuant II, Pharmacia, via Amersham GmbH, Freiburg
Sterilwerkbänke	HERA safe, Heraeus, Hanau Gelaire laminar flow, Gelaire, Sydney, Australien
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach

## 2. Material

Waagen	Analysenwaage, Sartorius, Göttingen Waage PM 4600 Mettler, Gießen
Zentrifuge	Heraeus; Hettich; Eppendorf, Hamburg

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

96-Lochplatten	Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen
Cryotubes	Nunc, Wiesbaden
Rundbodenröhrchen 5ml (FACS-Röhrchen)	BD Biosciences, Heidelberg
Glasflaschen	Schott, Mainz
Handschuhe	Ansell, München
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen; Starlab, Ahrensburg; Combitipps, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen	Eppendorf, Hamburg; Greiner, Frickenhausen; Sarstedt, Nümbrecht
Serolog. Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Costar Stripette, Corning Inc., New York, USA
Sterilfilter 0,22 µM	Millipore, Eschborn
Verschlussfolie Parafilm	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg

## 2. Material

### 2.3 Chemikalien und Wirkstoffe

12,13-EODE	Biomol, Hamburg
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Carboplatin	NeoCorp AG, Weilheim
Cisplatin	NeoCorp AG, Weilheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol puriss.	Sigma-Aldrich, München
Fludrocortison	Sigma-Aldrich, München
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, München
Glutamin (L-Glutamin)	Sigma-Aldrich, München
IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium)	Biochrom, Berlin
MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, München
Pararosanilin	Sigma-Aldrich, München
PBS (Phosphate buffered Saline)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Grünenthal, Stolberg Sigma-Aldrich, München
Poly-HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate)	Sigma-Aldrich, München
SDS (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem, Darmstadt
Tolbutamid	Sigma-Aldrich, München
Topiramat	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Sigma-Aldrich, München

## 2. Material

### 2.4 Lösungen

#### 2.4.1 Zellkultur

Pen/Strep-Lösung (Penicillin/Streptomycin)	10 <sup>6</sup> IE Penicillin, 10 g Streptomycinsulfat, 1000 ml Aqua dest., steril filtrieren Lagerung bei -20 °C
L-Glutamin-Lösung	29,2 g L-Glutamin mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen und steril filtrieren; Lagerung bei -20 °C
Natriumbicarbonatlösung	75 g NaHCO <sub>3</sub> , 1000 ml Aqua dest., steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C
IMDM („Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium – Iscove Basal Medium”)-Lösung	17,26 g Trockenmedium, 1000 ml Aqua dest. steril filtrieren Lagerung bei 4 °C
Trypsin-Lösung	2,0 g Trypsin, 0,6 g EDTA, 1000 ml PBS, steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C
PBS 10x Konzentrat	95,5 g PBS-Trockenmedium, 1000 ml Aqua ad injectabilia, autoklavieren, Lagerung bei RT Für 1xPBS 100ml des PBS 10x Konzentrat mit 900 ml Aqua ad iniectionabilia auffüllen

#### 2.4.2 MTT

MTT-Lösung 0,2 %	1 g MTT, 500 ml PBS, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C
SDS-Lösung 20%	400g SDS, 2l Dimethylformamid/Aqua dest. (im 1:1 Verhältnis), pH 4,7 einstellen Lagerung bei RT

## 2. Material

### 2.5 Antikörper (Durchflusszytometer)

Anti-CD133/1 (AC133), Phycoerythrin-konjugiert (mouse)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Anti-c-Kit, unkonjugiert (rabbit IgG)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-hEGF-R, unkonjugiert (mouse IgG <sub>2B</sub> )	Abcam, Cambridge, UK
Anti-hNCAM (CD56), Phycoerythrin-konjugiert (mouse)	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-mouse IgG (goat F(ab') <sup>2</sup> ), Phycoerythrin-konjugiert	Abcam, Cambridge, UK
Anti-rabbit IgG (goat IgG), Phycoerythrin-konjugiert	Abcam, Cambridge, UK
Isotyp mouse IgG <sub>1</sub> Phycoerythrin	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Isotyp mouse IgG <sub>2B</sub> Phycoerythrin	R&D Systems, Wiesbaden
Isotyp rabbit IgG Phycoerythrin	Abcam, Cambridge, UK



## 2. Material

### 2.6 Quantitative Real-time PCR

#### 2.6.1 RNA-Isolation

Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	AppliChem, Darmstadt
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze

#### 2.6.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Polymerization Mix 20 (dNTP)	Pharmacia, Ratingen
GeneAmp 10x PCR Buffer II & MgCl <sub>2</sub> Solution Pack	Applied Biosystems, Darmstadt
MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt
Random Hexamers	Applied Biosystems, Darmstadt
DEPC	AppliChem, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

#### 2.6.3 PCR-Lösungen

Master Mix: Lagerung bei -20°C

10x PCR Buffer II	100µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	350µl
MgCl <sub>2</sub>	200µl
Random Hexamers	50µl
dNTP	50µl

## 2. Material

### Reverse Transkriptase-Mix (für eine Probe):

Master Mix	30µl
Reverse Transkriptase	2µl
RNase Inhibitor	2µl
RNA-Probe	6µl

### RTA-Mix: Lagerung bei 2-4°C

dNTP	40µl
Buffer II	400µl
MgCl <sub>2</sub>	800µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	2760µl

### 2.6.4 Primer

NCAM	5'-GTCCTGCTCCTGGTGGTTGT-3' 5'-TGACCGCAATGCACATGAA-3'	Applied Biosystems, Darmstadt
NF-H	5'-CAAGGAACCCAGCAAACCA-3' 5'-GGCCTCTGTCTTGGGTTTCTC-3'	Applied Biosystems, Darmstadt
NF-M	5'-CCGTCACTCAAAGGTTGAA-3' 5'-TGGCGTGTGAAGTGACTTTT-3'	Applied Biosystems, Darmstadt
NF-L	5'-GTGACCAAGCCCGACCTTT-3' 5'-ATTCCTCAGCGTTCTGCATGT-3'	Applied Biosystems, Darmstadt
TH	5'-GCACCTTCGCGCAGTTCT-3' 5'-ACAGCGTGGACAGCTTCTCA-3'	Applied Biosystems, Darmstadt
18S	5'-GTGAAACTGCGAATGGCTCAT-3' 5'-CTGACCGGGTTGGTTTTGAT-3'	Operon, Köln

Forward Primer (3'-5')/ Reverse Primer (5'-3')

Als endogene Kontrolle (Referenzgen) wurde eukaryotische 18S rRNA (18S) verwendet.

Die Quantifizierung erfolgte mittels SYBR-Green.

## 2. Material

### 2.7 Zelllinien

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt. Gearbeitet wurde mit humanen chemosensitiven (parentalen) Neuroblastomzelllinien und ihren Platinderivat-resistenten Sublinien. Die Chemoresistenz der Sublinien wurde durch schrittweise Adaptation der Zellen an das entsprechende Zytostatikum erreicht. Bei den verwendeten Zytostatika handelt es sich um die Platinderivate Cisplatin (CDDP) und Carboplatin (Carbo). Die Platinderivat-resistenten Sublinien werden durch ein hochgestelltes „r“ für resistent, den Namen der adaptierten Substanz als Abkürzung sowie die Dosisangabe (in ng/ml) in ihrem Namen kenntlich gemacht. Zum Beispiel wird die an 500ng/ml Cisplatin adaptierte und damit resistente Sublinie von UKF-NB-2 als UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden jeweils zwei verschiedene Cisplatin-resistente Sublinien der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 verwendet, welche an zwei unterschiedliche Dosierungen von Cisplatin adaptiert waren (z. B. UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>). Dies lag zum einen an einem zeitlichen Abstand zwischen den Versuchen zur Zellcharakterisierung und zur Connectivity Map, zum anderen an bereits durchgeführten Versuchen mit den jeweiligen Zelllinien, welche miteinander verglichen werden sollten.

Eine stabile UKF-NB-2<sup>r</sup>Carbo-Zelllinie existierte zum Zeitpunkt der Versuche nicht.

Alle adaptierten chemoresistenten Sublinien sind Teil der Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection der AG Cinatl (<https://research.kent.ac.uk/ibc/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection/>).

## 2. Material

Zelllinie	Art	Herkunft
UKF-NB-2 UKF-NB-3 UKF-NB-6	Humane Neuroblastomzellen, Isolate aus Knochenmarksmetastasen	AG Cinatl, Virologie, Uniklinikum Goethe-Universität, Frankfurt/Main
UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>500/1000</sup> (500ng/ml, 1000ng/ml) UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>500/1000</sup> (500ng/ml, 1000ng/ml) UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000/2000</sup> (1000ng/ml, 2000ng/ml)	Humane Neuroblastomzellen, Isolate aus Knochenmarksmetastasen; adaptiert an Cisplatin	Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection der AG Cinatl, Frankfurt/Main
UKF-NB-3 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup> (1000ng/ml) UKF-NB-6 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup> (1000ng/ml)	Humane Neuroblastomzellen, Isolate aus Knochenmarksmetastasen; adaptiert an Carboplatin	Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection der AG Cinatl, Frankfurt/Main
NGP	Humane Neuroblastomzellen, Isolat aus Lungenmetastase	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
NGP <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup> (1000ng/ml)	Humane Neuroblastomzellen, Isolat aus Lungenmetastase, adaptiert an 1000ng/ml Cisplatin	Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection der AG Cinatl, Frankfurt/Main
SK-N-AS	Humane Neuroblastomzellen, Isolat aus Knochenmarksmetastase	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas/USA
SK-N-AS <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup> (500ng/ml)	Humane Neuroblastomzellen, Isolat aus Knochenmarksmetastase, adaptiert an 500ng/ml Cisplatin	Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection der AG Cinatl, Frankfurt/Main
IMR-5	Humane Neuroblastomzellen, Klon von IMR-32 (Isolat aus Primärtumor)	Dr. Angelika Eggert, Universität Duisburg-Essen
IMR-5 CDDP (1000ng/ml)	Humane Neuroblastomzellen, Isolat aus Primärtumor, adaptiert an 1000ng/ml Cisplatin	Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection der AG Cinatl, Frankfurt/Main

**Tabelle 2-1:** In dieser Arbeit verwendete Neuroblastomzelllinien

## 3. Methoden

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in supplementiertem IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) bei 37°C.

Supplementiertes IMDM:

10% Fötale Kälberserum
4% Natriumhydrogencarbonat
2% Glutamin-Lösung
1% Penicillin/Streptomycin

Das Zellwachstum wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Ein Phenolrot-Indikator im Medium diente zur Überwachung des pH-Werts. Ein niedriger pH-Wert, bedingt durch den Verbrauch des Mediums durch die Zellen bzw. deren Stoffwechselprodukte, äußert sich in einem Farbumschlag von rot nach gelb. Ist dies der Fall, ist ein Wechsel des Mediums indiziert.

Sobald die adhärent wachsenden Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie unter sterilen Bedingungen passagiert. Das verbrauchte Medium wurde entfernt und die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin und unter leichten Schwenkbewegungen wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst.

Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Dies geschah in individuellem Verhältnis, z.B. 1:20 bei UKF-NB2'CDDP<sup>500</sup>, um eine erneute Konfluenz nach ca. 7 Tagen zu erreichen. Dem Medium der resistenten Zelllinien wurde nach dem Umsetzen der Zellen die entsprechende Konzentration Zytostatika zugegeben. Bei der nicht adhären Zelle UKF-NB2'CDDP<sup>500</sup> wurde in gleicher Weise verfahren, nur wurden die schwimmenden Zellen zuerst abzentrifugiert und dann im neuen Medium resuspendiert.

## 3. Methoden

### 3.2 Zellviabilitätsbestimmung (MTT-Test)

#### 3.2.1 Grundlagen & Durchführung

Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Test zur Bestimmung der Zellviabilität. Die Zellen werden *in vitro* mit dem gelben Tetrazoliumsalz [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] (MTT) behandelt. Die Reduktion zu blau-violetten, wasserunlöslichen Formazankristallen erfolgt durch NADH und NADPH in Abhängigkeit von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums und durch mitochondriale Dehydrogenasen. Da beide Reaktionen nur in lebenden Zellen ablaufen, kann durch die Farbreaktion die Zellviabilität bestimmt werden. Durch Zugabe von SDS werden die Kristalle gelöst, die Absorption der Lösung kann nun im Photometer gemessen werden. Die Höhe der Absorption ist proportional zur Stoffwechselaktivität der Zellen (Berridge und Tan, 1993).

Der Test erfolgte in einer 96-Lochplatte. Die ersten beiden Spalten der Platte dienten als Zellkontrolle, die letzten beiden Spalten als Mediumkontrolle. Dazwischen wurde in 8 Verdünnungsschritten der zu testende Stoff im Medium vorgelegt (je 50µl). Die Verdünnung erfolgte im Verhältnis 1:2. Die Zellkontrollen erhielten je 50µl reines Medium, die Mediumkontrollen je 100µl. Anschließend wurde in alle Spalten, mit Ausnahme der Mediumkontrolle, die Zellsuspension (je 50µl) hinzugegeben, welche im Mittel ca. 400.000 Zellen/ml enthielt. Jeder Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 100µl.

Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurden in jedes Loch 25µl MTT-Lösung gegeben und erneut bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 4 Stunden inkubiert. Die Zugabe von 100µl SDS-Lösung pro Loch lysierte die Zellen und löste die gebildeten Formazankristalle. Nach einer weiteren Inkubation unter gleichen Bedingungen über Nacht konnten die Platten im Photometer bei 560/620nm ausgemessen und die optische Dichte bestimmt werden. Hohe Messwerte stehen für einen hohen Gehalt an Formazan und somit für einen großen Anteil lebender Zellen.

Für die Auswertung wurden zunächst alle Werte eines Ansatzes gemittelt, dann der Leerwert der Mediumkontrolle von den restlichen Messwerten subtrahiert. Der Mittelwert der Zellkontrolle wurde mit einer 100%igen Zellviabilität gleichgesetzt und

### 3. Methoden

die Viabilität der Zellen in den Spalten der Verdünnungsreihe in prozentualer Abhängigkeit bestimmt.

#### **3.2.2 Testung der potentiellen Resensitizer der Connectivity Map**

Die als potentielle Resensitizer ausgesuchten Stoffe lagen bis auf 12,13-EODE als Feststoffe vor und wurden zunächst entsprechend der Herstellerangaben in Lösungsmitteln (Fludrocortison, Pararosanilin und Topiramid in DMSO, Tolbutamid in Ethanol) gelöst und verdünnt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der DMSO-Gehalt in der Zellkultur weniger als 1 Promille betrug, um eine zelltoxische Wirkung auszuschließen.

Die Wirkung der ausgesuchten Stoffe der Connectivity Map in Kombination mit Cisplatin auf die Viabilität der Neuroblastomzelllinien wurde mittels MTT-Test untersucht. Ziel war der Nachweis einer signifikanten Verminderung des  $IC_{50}$ -Werts von Cisplatin durch Kombination mit einem potentiellen Resensitizer der Connectivity Map. Dafür wurde zuerst, nach dem Prinzip des MTT-Tests (s. 3.2.2), eine Verdünnungsreihe von Cisplatin pipettiert und zunächst auf die obere Hälfte einer 96-Lochplatte im 3-fach Ansatz aufgetragen. Die Startkonzentration der Verdünnungsreihe der Cisplatin-resistenten Zellen betrug  $50\mu\text{g/ml}$ , die der parentalen Zellen  $1\mu\text{g/ml}$ . Ebenfalls im 3-fach Ansatz erfolgte das Auftragen der Zell- und Mediumkontrolle. Danach wurde der zu testende potentielle Resensitizer aus der Connectivity Map in einer festen Konzentration der Zellkontrolle und jedem Schritt der vorher angesetzten Cisplatin-Verdünnungsreihe zugegeben und im 3-fach Ansatz auf die untere Hälfte der Platte aufgetragen. Die Mediumkontrolle wurde nur im Falle von Pararosanilin, bedingt durch dessen Eigenfärbung, mit dem Resensitizer versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Zellsuspension zu den Zellkontrollen und Verdünnungsreihen der ganzen Platte.

Der weitere Verlauf (Inkubation, Aufbringen von MTT und SDS, sowie die photometrische Messung der Platte) und die Auswertung erfolgten wie unter 3.2.1 beschrieben.

### 3. Methoden

Zellkontrolle	Verdünnungsreihe CDDP, 1:2 verdünnt	Mediumkontrolle
Zellkontrolle + Resensitizer	Verdünnungsreihe CDDP, 1:2 verdünnt + Resensitizer in fester Konzentration	Mediumkontrolle*

**Tabelle 3-1:** Plattenschema zur Testung der Resensitizer. Messung im 3-fach Ansatz, \*im Versuch mit Pararosanilin ebenfalls Zusatz von Pararosanilin zur Mediumkontrolle

Die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Konzentration (inhibitory concentration 50; die Konzentration eines Stoffes, bei der 50% der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind) erfolgte auf Basis einer Modifikation (s. Kapitel 10.1) des Median Effect Principle von Chou et al. (1984).

#### 3.2.3 Anoikis-Testung mit PolyHEMA

Um die Anoikis-Sensitivität der parentalen und resistenten Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurde die Zellviabilität bei Kultivierung unter nicht-adhärenenten Bedingungen bestimmt. Dazu wurden 96-Lochplatten zur Hälfte mit Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), im weiteren Text PolyHEMA genannt, beschichtet, welches eine Adhäsion verhindert; die andere Hälfte blieb unbehandelt. Um den zusätzlichen Einfluß von Cis- und Carboplatin auf die Zellviabilität unter nicht-adhärenenten Bedingungen zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen der Zytostatika auf die Platten aufgetragen und anschließend zur Viabilitätsbestimmung ein MTT-Test durchgeführt wie unter 3.2.1 beschrieben. Die Startdosis der Verdünnungsreihe für Cis- und Carboplatin betrug bei den parentalen Zellen 1µg/ml, bei den resistenten Zellen 20µg/ml des jeweiligen Stoffes.

Zur Beschichtung der 96-Lochplatten wurde PolyHEMA in 95% Ethanol gelöst und auf eine Konzentration von 12mg/ml verdünnt. Danach wurde in jedes Loch der zu beschichtenden Hälfte der Platte 50µl der PolyHEMA-Lösung gegeben. Die Platten wurden bei Raumtemperatur über Nacht in einer Sterilwerkbank unter UV-Licht getrocknet. Vor Gebrauch wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen.



## 3. Methoden

### 3.3 Durchflusszytometrie

#### 3.3.1 Prinzip & Durchführung

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Zellen in Suspension, beruhend auf der Emission von Streulicht oder Fluoreszenzsignalen. Die Zellen passieren dazu einzeln eine Lichtquelle; über die dabei entstehende Lichtstreuung und -brechung lassen sich Zellgröße und -granularität bestimmen. Der Einsatz von fluoreszierenden Antikörpern ermöglicht darüber hinaus den Nachweis spezieller zellulärer Strukturen. Da die Fluoreszenz proportional zu der Zahl der durch die Antikörper markierten Antigene ist, lässt sich sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage zur Expression des zu untersuchenden Antigens machen.

Die Expression von CD133, NCAM, EGF-R und c-Kit wurde mittels Phycoerythrin (PE)-markierter Antikörper untersucht. Neben der Probe mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden eine Isotypenkontrolle und eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt. Erstere stellt die Fluoreszenz bei unspezifischer Bindung des Antikörpers dar (hat die gleiche Immunglobulinklasse wie der jeweils verwendete Erstantikörper) und wurde daher bei der Auswertung vom Wert der gefärbten Probe subtrahiert, letztere die Eigenfluoreszenz der Zellen und diente der Justierung der Messung. Pro Versuch wurde eine Zellkulturflasche (25cm<sup>2</sup>) konfluent gewachsener Zellen benötigt. Die Zellen wurden zweimalig in PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst, in einer Lösung aus 90% PBS/10%FCS-Puffer aufgenommen und auf je 3 Röhrchen pro Zelle verteilt. Anschließend wurden diese bei 1.700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nicht adhärent wachsende Zellen (UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>) wurden direkt aus der Zellsuspension zentrifugiert und anschließend mit PBS gewaschen, das vorherige Trypsinieren entfiel. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Zellen zweimal in PBS gewaschen, zentrifugiert und die Überstände jeweils verworfen.

### 3. Methoden

Typ	1.AK	2.AK	Isotyp
CD 133	CD133/1((AC133) PE		Mouse IgG <sub>1</sub> PE
NCAM	Anti- hNCAM/CD56 PE		Mouse IgG <sub>2B</sub> PE
EGF-R	Anti-hEGFR Mouse IgG <sub>2B</sub>	Anti-mouse IgG (Goat F(ab') <sub>2</sub> PE	Mouse IgG <sub>2B</sub> PE
c-Kit	Rabbit pAB to c- Kit	Anti-rabbit IgG (Goat IgG PE)	Rabbit IgG PE

**Tabelle 3-2:** Zur Analyse verwendete Antikörper

#### 3.3.1.1 Färbung auf CD133 & NCAM

Die PE-konjugierten Antikörper von CD133 (20µl, 1:11 verdünnt) und NCAM (20µl) wurden direkt zu den Zellen der entsprechenden Probe gegeben, ebenso die Isotypkontrolle (20µl), und anschließend für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nach einem letzten Waschen in PBS wurden die Zellen in 300µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

#### 3.3.1.2 Färbung auf EGF-R

Für die Färbung mit EGF-R wurden die Zellen zuerst pro Röhrchen mit 200µl 4% Paraformaldehydlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Waschen mit PBS und der Resuspension der Zellen in 100µl PBS wurde der 1. Antikörper (20µl, 1:20 verdünnt) zur entsprechenden Probe hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Prozedere wurde anschließend mit dem 2. PE-konjugierten Antikörper (20µl) wiederholt, gleichzeitig erfolgte auch die Zugabe der Isotypenkontrolle (20µl). Die Inkubation fand in Dunkelheit statt. Nach einem letzten Waschen in PBS wurden die Zellen in 300µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

#### 3.3.1.3 Färbung auf c-Kit

Da der Antikörper gegen c-Kit an ein intrazelluläres Epitop bindet, müssen die Zellen vor der Färbung fixiert und permeabilisiert werden. Dazu wurden die Zellen zuerst, wie unter 3.3.1.2 beschrieben, mit 100µl einer 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Nach einer Waschung mit PBS, Zentrifugieren und Verwerfen des Überstands wurden

### 3. Methoden

die Zellen mit 100 µl Perm/Wash-Lösung für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen mit PBS und der Resuspension der Zellen in 100µl PBS wurde der 1. Antikörper (20µl) zur entsprechenden Probe hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Prozedere wurde anschließend mit dem 2. PE-konjugierten Antikörper (20µl) wiederholt, gleichzeitig erfolgte auch die Zugabe der Isotypenkontrolle (20µl). Die Inkubation fand in Dunkelheit statt. Nach einem letzten Waschen in PBS wurden die Zellen in 300µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

#### **3.4 Quantitative Real-Time PCR**

##### **3.4.1 Prinzip**

Die quantitative Real-Time PCR ermöglicht die Untersuchung der Transkription bestimmter Gene. Ihr Prinzip entspricht der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der zusätzlichen Möglichkeit einer zeitgleichen quantitativen Bestimmung der entstehenden PCR-Produkte via Fluoreszenzmessung. Der Ablauf der quantitativen Real-Time PCR erfolgt in 3 Reaktionsschritten: der Denaturierung (Auftrennung der DNA in Einzelstränge), der Anlagerung von Primern an die Einzelstränge und die Elongation (Vervollständigung der 2 Einzelstränge zu 2 Doppelsträngen mit Hilfe von Nukleotiden unter Einsatz der DNA-Polymerase). Um die entstehenden PCR-Produkte in Echtzeit („real-time“) messen zu können, werden sie mit einem fluoreszierenden Farbstoff (SYBR-Green) markiert. Dieser bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Laseranregung bei einer Wellenlänge von 521 nm. Je mehr PCR-Produkt gebildet wird, umso stärker ist die Fluoreszenz. Bei der quantitativen Real-Time PCR gibt es die Möglichkeit der absoluten und der relativen Quantifizierung. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung verwendet. Dabei wird das Verhältnis des zu untersuchenden Zielgens zu einem Referenzgen bestimmt. Als Referenzgen wird ein konstitutiv exprimiertes Gen, in diesem Fall 18S-rRNA, verwendet. Das Verhältnis aus Ziel- und Referenzgen kann zwischen verschiedenen Proben verglichen werden, so kann die relative Änderung der Genexpression bestimmt werden.

### 3. Methoden

#### **3.4.2 Probenextraktion**

Das Nährmedium der Zellkulturen wurde entfernt und die Zellen unter Zugabe von 2ml TRI Reagent (bei 25cm<sup>2</sup> Zellkulturfläche) lysiert. Durch mehrfaches Resuspendieren wurde die Lösung homogenisiert und in ein steriles Röhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurde sie bei -80°C gelagert.

#### **3.4.3 RNA-Isolierung**

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987) wurden die Nukleinsäuren der Proben isoliert. Pro 1ml TRI Reagent wurden 0,22ml Chloroform zur Probe gegeben, gemischt und für 3min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (15min bei 4°C und 12.000rpm). Durch die Zentrifugation teilte sich die Lösung in drei Phasen: die untere rote Phenol-Chloroform-Phase enthält die DNA, die mittlere weiße Interphase die Proteine und die obere farblos-wässrige Phase die RNA. Nun wurden 500µl der oberen wässrigen Phase pro eingesetztem 1ml TRI Reagent entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 500µl Isopropanol wurde die RNA ausgefällt. Daraufhin wurde die Probe 10min bei RT inkubiert, nochmals gemischt und anschließend abzentrifugiert (10min bei 4°C und 12.000rpm). Das RNA-Präzipitat zeigte sich als weißes, gelartiges Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde nun abpipettiert und das Pellet mit 1ml 75% Ethanol (zur Verdünnung des Ethanols DEPC-H<sub>2</sub>O benutzen) gewaschen. Die Probe wurde nun wieder gemischt und abzentrifugiert (5min bei 4°C und 7.500rpm). Sie konnte nun bei -20°C gelagert werden. Das Ethanol wurde abpipettiert und das RNA-Pellet bei 55°C kurz getrocknet, bis es transparent wurde. Je nach Pelletgröße wurden nun 20 bis 60µl DEPC-H<sub>2</sub>O zugegeben und 5min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe gemischt und erneut für 5 min bei 55°C inkubiert. Danach wurde die Probe für die folgenden Arbeitsschritte auf Eis gegeben.

#### **3.4.4 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Quantität und Qualität der isolierten RNA wurden mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmt. Es misst die optische Dichte (OD) der Probe bei einer Wellenlänge von 260, 280 und 320nm und einem RNA-Faktor von 40. Zuvor wurde mit einer DEPC-H<sub>2</sub>O-gefüllten Messküvette der Leerwert am Gerät eingestellt und die zu messende Probe im Verhältnis 1:20 mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Reinheit der isolierten RNA ergibt sich

### 3. Methoden

aus dem Verhältnis der optischen Dichten bei 260 und 280nm. Die Ratio 260/280 sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit DEPC-H<sub>2</sub>O so verdünnt, dass 50µl Lösung eine Konzentration von 167µg/ml RNA enthalten. Die verdünnten Proben wurden 10min bei 70°C denaturiert, danach konnten sie bei -80°C gelagert werden.

#### **3.4.5 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (cDNA-Synthese)**

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wurde die RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Der Reaktionsansatz (s. a. Kapitel 2.6.3) bestand aus:

30 µl Master Mix

2µl Reverse Transkriptase

2µl RNase Inhibitor

6µl RNA-Probe

Der Ansatz wurde im Thermocycler nach folgendem Protokoll inkubiert: 25°C für 10min, dann 42°C für 15min, danach 96°C für 5min, abschließend herunterkühlen auf 4°C. Nach dem Umschreiben der Probe wurde das Amplifikat (40µl) 1:5 mit RTA-Mix (s. a. Kapitel 2.6.3) verdünnt und bei -20°C gelagert.

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR wurde mit jeder Probe (cDNA) ein Dreifachansatz angesetzt, welcher die jeweiligen Primer des nachzuweisenden Gens enthielt; dieser sah folgendermaßen aus:

25 µl SYBR Green

0,3 µl Forward Primer

0,3 µl Reverse Primer

19,4 µl DEPC-Wasser

5 µl Probe (cDNA)

### 3. Methoden

Die Ansätze wurden auf eine 96-Lochplatte aufgebracht und im TaqManCycler bei folgendem Programm inkubiert.

Stufe I: Initialaktivierung des Enzyms: 95 °C, 15 Minuten.

Stufe II: Annealing und Elongation: 60 °C, 1 Minute, 40 Zyklen.

Denaturierung: 94 °C, 15 Sekunden.

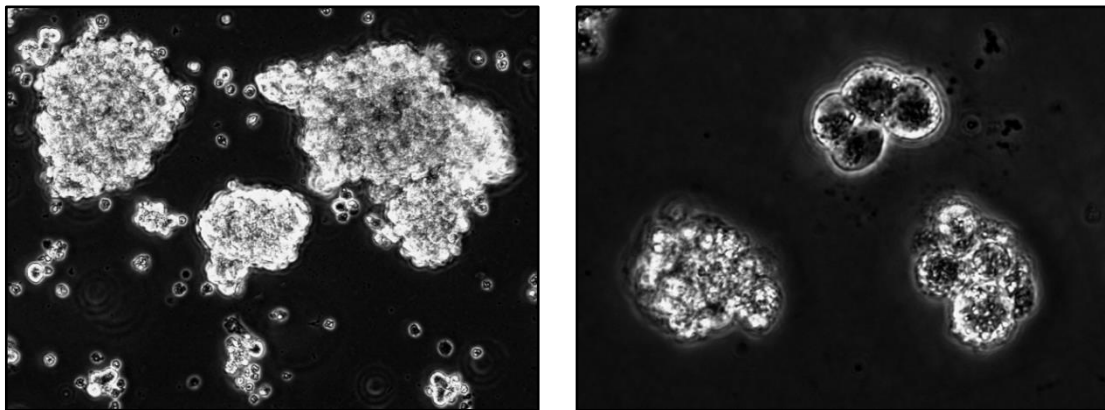
#### **3.4.6 Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR**

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der untersuchten Proben wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet (SDS2.1 Software, Fa. Applied Biosystems). Zur Normalisierung der Werte wurde die endogene Kontrolle 18S-rRNA verwendet. Innerhalb der untersuchten Zelllinien wurden einerseits die Platin-resistenten Sublinien mit ihren Platin-sensitiven parentalen Zellen verglichen, andererseits wurden die resistenten Sublinien, nach verschiedenen Zeiten der Platinkarenz, auch untereinander verglichen. Die Expressionsunterschiede wurden als x-fache Änderung (fold change) dargestellt.

### 4. Ergebnisse

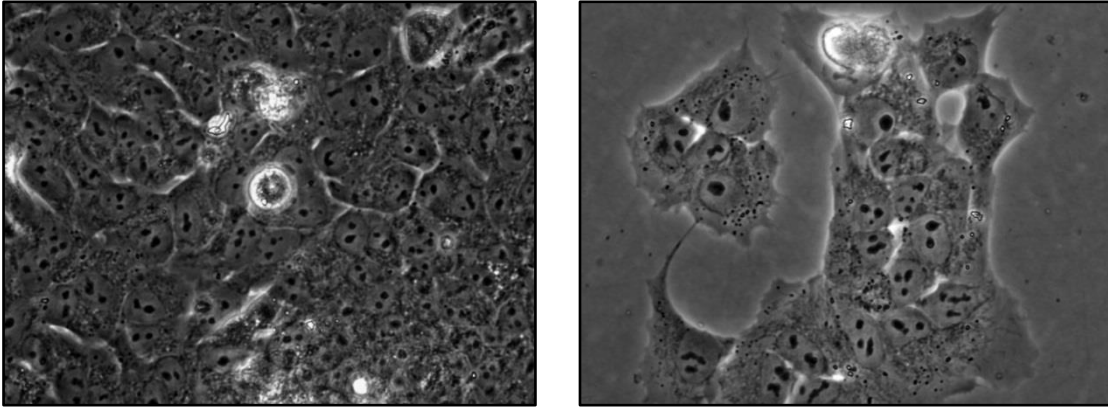
#### 4.1 Morphologie der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB -3 und UKF-NB -6 und ihrer Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien

Die drei verschiedenen Zelllinien sowie ihre resistenten Sublinien zeigen eine unterschiedliche Morphologie unter identischen Kulturbedingungen. Die rundlichen, zytoplasmaarmen UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>-Zellen zeigen eine stärkere Adhärenz untereinander als zum Substrat und sind überwiegend in Zellaggregaten freischwimmend. UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> dagegen wächst strikt als Monolayer und ist stark substratadhärent. Die Zellen selbst sind flach und reich an Zytoplasma; migrierende Zellen zeigen Filopodien, jedoch keine neuritenartigen Auswüchse. Die parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 sowie UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> und UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> unterscheiden sich morphologisch weniger. Sie alle wachsen sehr dicht, zum Teil als Multilayer und fokal in Aggregaten. Die Zellkörper sind rundlich, viele zeigen neben Filopodien auch neuritenartige Fortsätze.

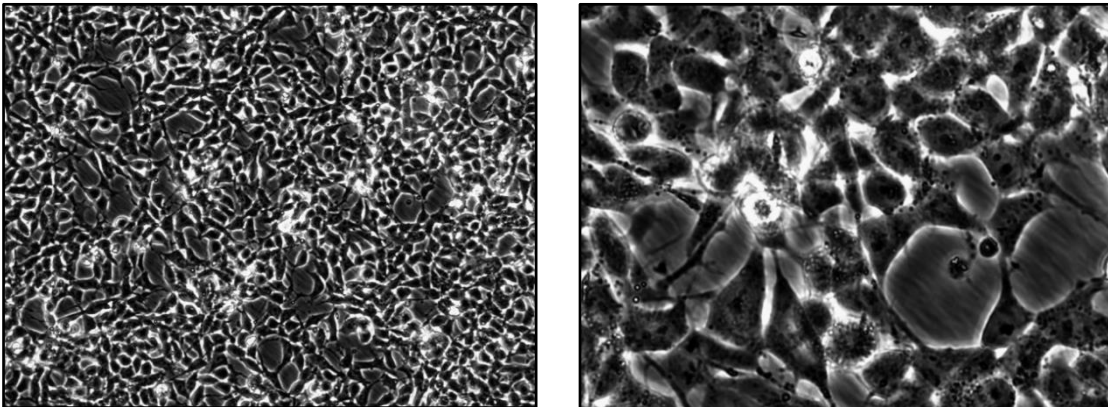


**Abbildung 4-1:** Phasenkontrastmikrofotografie von UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> in 10x (links) und 40x (rechts) Vergrößerung (eigene Aufnahme)

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 4-2:** Phasenkontrastmikrofotografie von UKF-NB-6'Carbo<sup>1000</sup> in 10x (links) und 40x (rechts) Vergrößerung (eigene Aufnahme)



**Abbildung 4-3:** Phasenkontrastmikrofotografie von UKF-NB-3 in 10x (links) und 40x (rechts) Vergrößerung (eigene Aufnahme)



## 4. Ergebnisse

### 4.2 Expression von EGF-R, N-CAM, CD133 und c-Kit in parentalen und platinresistenten Neuroblastomzelllinien

Die Expression der verschiedenen Marker wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. In den folgenden Tabellen wird die relative Expression (gemessen in relative fluorescent units, RFU) des jeweiligen Markers in den verschiedenen parentalen Zelllinien und ihren resistenten Sublinien betrachtet. Das Verhältnis zueinander soll zeigen, ob ein möglicher Einfluss der Chemoresistenz auf die Expression der verschiedenen Marker zu erkennen ist.

#### 4.2.1 EGF-R

Zelllinie	Fluoreszenz parentale Zelle (RFU)	Fluoreszenz resistente Sublinie (RFU)	relative Fluoreszenzänderung (Faktor)
UKF-NB-2 vs. UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	247,10 ± 86,95	134,41 ± 41,24	0,544*
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	227,89 ± 124,23	160,98 ± 234,00	0,706
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	227,89 ± 124,23	162,98 ± 104,19	0,715
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	95,60 ± 83,11	99,80 ± 40,77	1,044
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	95,60 ± 83,11	44,20 ± 54,85	0,462

Tabelle 4-1: Relative Expression von EGF-R in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Neuroblastomsublinien im Vergleich mit ihren parentalen Zelllinien. Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinie aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen Fluoreszenzänderung (RFU resistente Sublinie/RFU parentale Zelle).

\* signifikant:  $p < 0,05$

In allen untersuchten Zellen ist eine EGF-R-Expression nachweisbar (s. Tabelle 4-1). Mit Ausnahme von UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> ist sie in den resistenten Sublinien geringer ausgeprägt als in den parentalen Zellen. Aber nur der Vergleich von UKF-NB-2 und

## 4. Ergebnisse

UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> zeigt eine signifikant erniedrigte Expression in der Cisplatin-resistenten Sublinie ( $p < 0,01$ ). Zwischen den weiteren parentalen Zellen und ihren Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien besteht keine signifikante Expressionsänderung.

### 4.2.2 N-CAM

Bei N-CAM ist in allen resistenten Sublinien, verglichen mit den parentalen Zelllinien, die Expression vermindert. Dabei ist bei UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> die Expression im Verhältnis zu UKF-NB-3 signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). Die restlichen Zellen zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Zelllinie	Fluoreszenz parentale Zelle (RFU)	Fluoreszenz resistente Sublinie (RFU)	relative Fluoreszenzänderung (Faktor)
UKF-NB-2 vs. UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	102,82 ± 114,05	55,52 ± 61,53	0,540
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	205,31 ± 61,10	80,29 ± 32,24	0,391*
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	205,31 ± 61,10	32,28 ± 9,83	0,157*
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	52,14 ± 69,78	45,90 ± 62,87	0,880
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	52,14 ± 69,78	14,80 ± 6,27	0,284

**Tabelle 4-2: Relative Expression von N-CAM in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Neuroblastosublinien im Vergleich mit Ihren parentalen Zelllinien.** Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinie aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen Fluoreszenzänderung (RFU resistente Sublinie/RFU parentale Zelle).

\* signifikant:  $p < 0,05$

## 4. Ergebnisse

### 4.2.3 CD133

CD 133 wird von allen untersuchten Zelllinien nur sehr gering bis gar nicht exprimiert. Nur die parentalen Zellen UKF-NB-2 und UKF-NB-3 sowie UKF-NB-2<sup>r</sup> CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> zeigen eine geringe Expression. Die CD133-Expression von UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> ist im Vergleich mit UKF-NB-3 dabei auch signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Zelllinie	Fluoreszenz parentale Zelle (RFU)	Fluoreszenz resistente Sublinie (RFU)	relative Fluoreszenzänderung (Faktor)
UKF-NB-2 vs. UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	1,24 ± 1,52	2,38 ± 0,70	1,921
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	0,17 ± 0,15	4,41 ± 2,32	25,763*
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	0,17 ± 0,15	0,00 <sup>#</sup>	-
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	0,00 <sup>#</sup>	0,00 <sup>#</sup>	-
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	0,00 <sup>#</sup>	0,00 <sup>#</sup>	-

**Tabelle 4-3: Relative Expression von CD133 in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Neuroblastomsublinien im Vergleich mit Ihren parentalen Zelllinien.** Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinien aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen Fluoreszenzänderung (RFU resistente Sublinie/RFU parentale Zelle).

\* signifikant:  $p < 0,05$ , # keine Expression

## 4. Ergebnisse

### 4.2.4 c-Kit

Trotz Nachweis von c-Kit in allen untersuchten Zellen zeigten sich innerhalb der Zelllinien kaum Veränderungen zwischen parentalen und Cisplatin- bzw- Carboplatin-resistenten Sublinien. Allein in UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> ist die Expression von c-Kit im Vergleich zu UKF-NB-2 signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ).

Zelllinie	Fluoreszenz parentale Zelle (RFU)	Fluoreszenz resistente Sublinie (RFU)	relative Fluoreszenzänderung (Faktor)
UKF-NB-2 vs. UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	46,51 ± 19,37	26,60 ± 16,42	0,572*
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	41,15 ± 28,31	51,04 ± 18,86	1,240
UKF-NB-3 vs. UKF-NB-3 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	41,15 ± 28,31	40,98 ± 20,88	0,996
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	27,43 ± 7,77	20,04 ± 9,96	0,731
UKF-NB-6 vs. UKF-NB-6 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	27,43 ± 7,77	20,07 ± 5,42	0,731

**Tabelle 4-4: Relative Expression von c-Kit in Cisplatin-und Carboplatin-resistenten Neuroblastomsublinien im Vergleich mit Ihren parentalen Zelllinien.** Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinien aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen Fluoreszenzänderung (RFU resistente SublinieZelle/RFU parentale Zelle).

\* signifikant:  $p < 0,05$

## 4. Ergebnisse

### **4.3 Einfluss von Cisplatin und Carboplatin auf die Genexpression von Neural cell adhesion molecule, Tyrosinhydroxylase, Neurofilament-L, -M und -H in parentalen und platinresistenten Neuroblastomzelllinien**

Um den Einfluss der Platinderivate auf die Expression verschiedener Gene zu untersuchen, wurde mit 2 parallelen Ansätzen gearbeitet:

In einem Ansatz wurden die Platin-resistenten Sublinien 7, 14 und 21 Tage (entsprechen 1, 2 oder 3 Kultivierungspassagen) ohne Zusatz von Cisplatin oder Carboplatin im Medium kultiviert. Im parallelen Ansatz dazu erhielten die resistenten Sublinien weiterhin den Cisplatin- und Carboplatinzusatz. Am Ende des jeweiligen Zeitraums wurde die RNA gewonnen und dem PCR-Protokoll entsprechend weiterverarbeitet; anschließend wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Als Vergleichsprobe in diesem Versuch dienten die jeweiligen parentalen Zellen der gleichen Passagen.

Im Folgenden wird die Expression von Neural cell adhesion molecule (N-CAM), Tyrosinhydroxylase (TH) und der Neurofilamente (NF)-L, -M und -H in den resistenten Sublinien betrachtet und mit ihren parentalen Zellen verglichen. Die Veränderung der Expression wird als fold change dargestellt, für die Werte des fold change gelten:

- fold change von  $\geq 2$  entspricht einer Hochregulation des Gens
- fold change  $\leq -2$  entspricht einer Herunterregulation des Gens

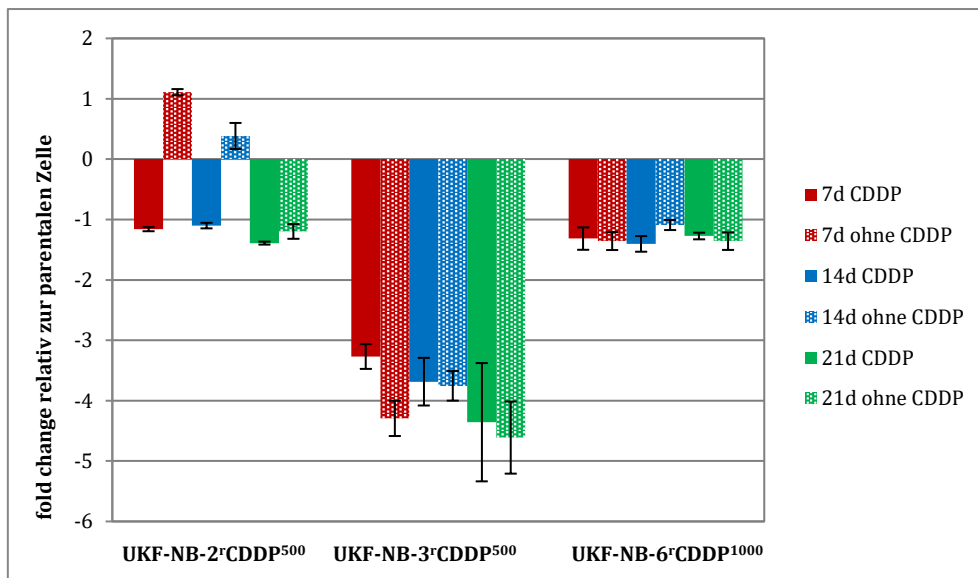
Eine Veränderung des fold change zwischen -2 und 2 wird als nicht-signifikante Veränderung definiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.1 Neural cell adhesion molecule (N-CAM)-Genexpression

Nur UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> weist in allen 3 Passagen, mit einem fold change von bis zu -4,6, eine signifikante Erniedrigung ( $p < 0,05$ ) der Expression von N-CAM im Vergleich zur parentalen Zelle auf (s. Abbildung 4-4). Die Kultivierung von UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> in Cisplatin-freiem Medium über bis zu 21 Tage führt zu keiner signifikanten Veränderung der Expression von N-CAM.

Die Expression von N-CAM in UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> war mit einem fold change  $< 2$  gegenüber der parentalen Zelle nicht signifikant verändert, unabhängig von der Zugabe von Cisplatin.



**Abbildung 4-4:** Relative Expression von Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = cisplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = cisplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

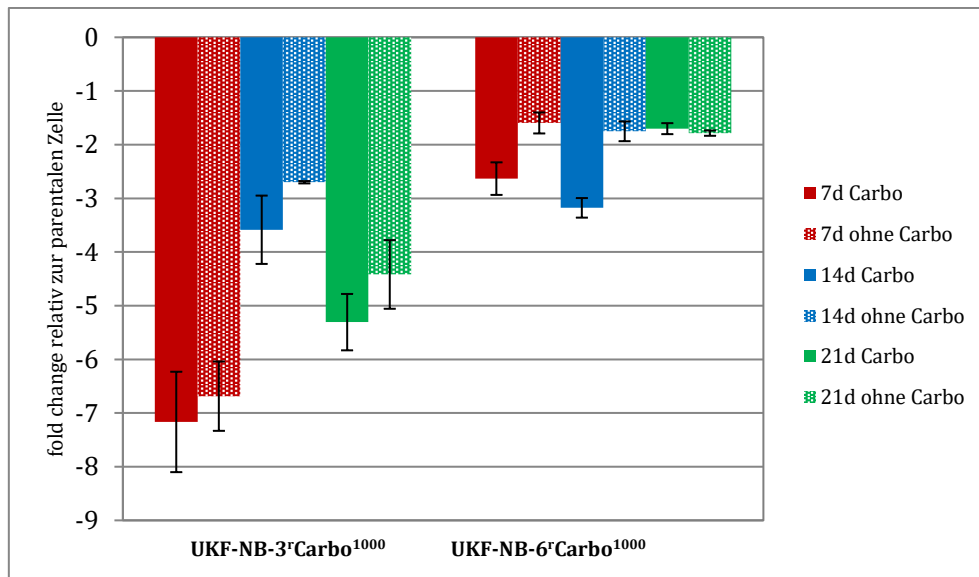
Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei den Carboplatin-resistenten Sublinien (s. Abbildung 4-5).

Hier zeigt nur UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> mit einem fold change von maximal -7,2 eine signifikant erniedrigte Expression von N-CAM ( $p < 0,05$ ). Dieser Effekt lässt im Carboplatin-freien Medium etwas nach, ist aber selbst dann noch signifikant. Die Expressionsminderung von N-CAM fällt bei UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> deutlich geringer aus, die Werte der 1. und 2. Passage mit Carboplatin liegen nah an der Nachweisgrenze mit

#### 4. Ergebnisse

einem fold change von -2,63 und -3,18, sind damit aber signifikant. In der 3. Passage liegt der Wert jedoch knapp unter der Nachweisgrenze mit einem fold change von -1,7.

Auch in den drei Kultivierungspassagen im Carboplatin-freien Medium kommt es zu keiner signifikanten Expressionsminderung.

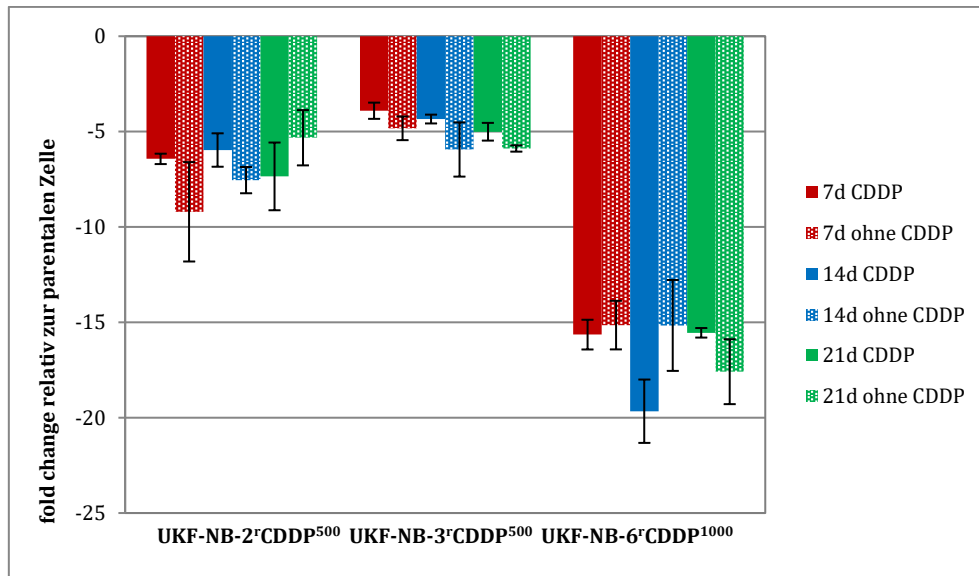


**Abbildung 4-5: Relative Expression von Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in den Sublinien UKF-NB-3'Carbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-6'Carbo<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parental Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6.** Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = carboplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = carboplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.2 Tyrosinhydroxylase (TH)-Genexpression

Die Expression der Tyrosinhydroxylase ist in allen Cisplatin-resistenten Sublinien (s. Abbildung 4-6), im Vergleich mit den parentalen Zellen, signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Eine signifikante Veränderung der Genexpression in Zusammenhang mit der Unterbrechung der Cisplatin-Exposition ist auch hier nicht zu erkennen.



**Abbildung 4-6:** Relative Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = cisplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = cisplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

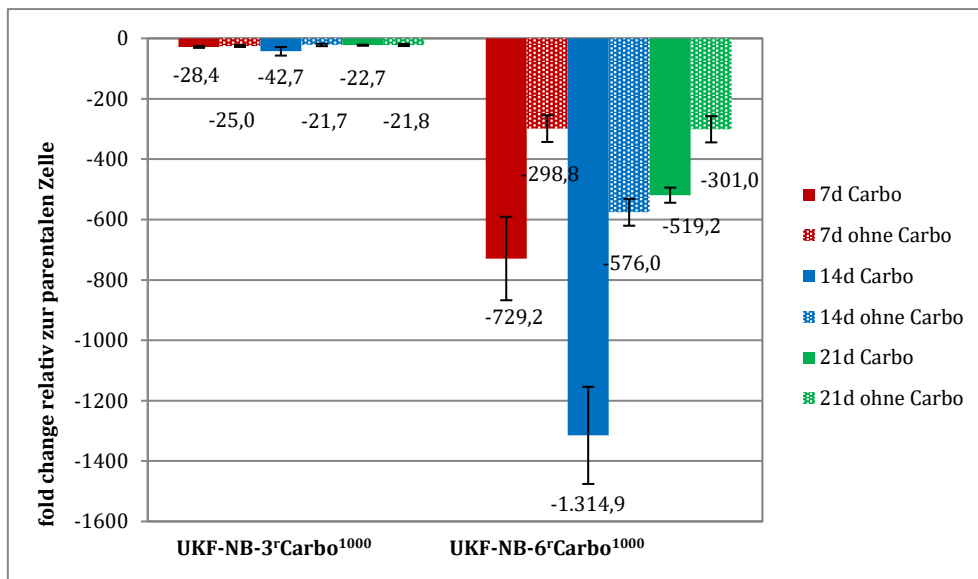
Die Carboplatin-resistenten Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> (s. Abbildung 4-7) zeigen eine deutlich geringere Tyrosinhydroxylase-Expression als die jeweiligen parentalen Zellen ( $p < 0,05$ ). Auch ist der fold change der TH-Expression in den Carboplatin-resistenten Sublinien von UKF-NB-3 und UKF-NB-6 sehr viel stärker ausgeprägt als in den entsprechenden Cisplatin-adaptierten Sublinien.

Bei UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> führt eine Unterbrechung der Carboplatin-Exposition zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Änderung der Tyrosinhydroxylase-Expression. Die Werte von UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> in den 3 Passagen schwanken erheblich (fold change von -1314,9 bis -298,8). Die Werte der einzelnen Passagen sind dabei jedoch



#### 4. Ergebnisse

immer signifikant; auch ist die Expression der Tyrosinhydroxylase in den Passagen mit Carboplatin immer signifikant niedriger als in den Passagen ohne Carboplatin ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4-7: Relative Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) in den Sublinien UKF-NB-3rCarbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-6rCarbo<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parental Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6.** Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = carboplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = carboplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

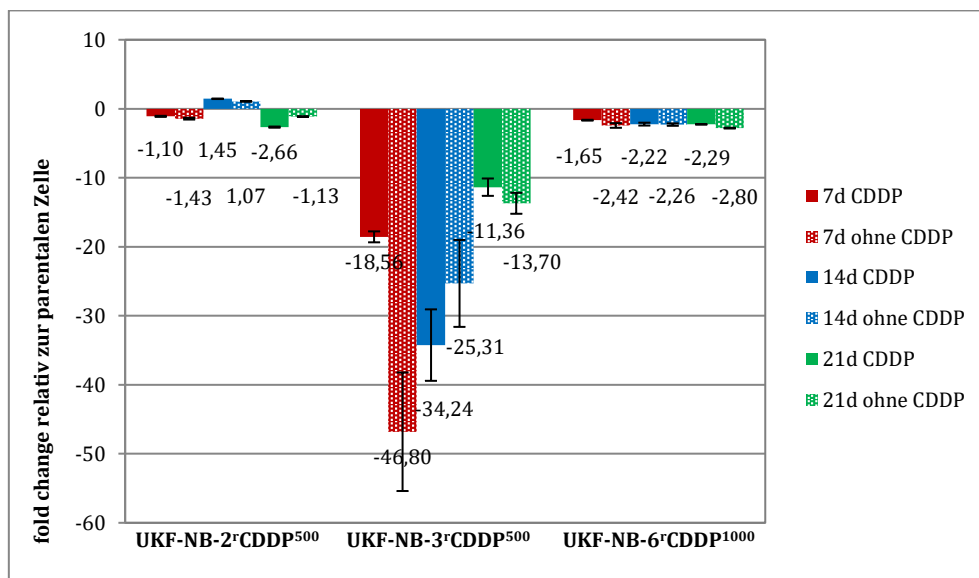
## 4. Ergebnisse

### 4.3.3 Neurofilament-L (NF-L) -Genexpression

Die Sublinie UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> exprimiert nur geringfügig weniger NF-L als ihre parentale Zelle; die Expression von NF-L in UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> schwankt zwischen geringfügiger Über- und Unterexpression in den drei Passagen (s. Abbildung 4-8).

Bei UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> hingegen ist die Expression signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). Bei Kultivierung von UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> in Cisplatin-freiem Medium zeigt sich nach 7 Tagen eine verminderte Expression von NF-L im Vergleich zu UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>, welche in Cisplatin-haltigem Medium kultiviert wurde. Nach einer Kultivierung von 14 Tagen in Cisplatin-freiem Medium ist der Effekt umgekehrt, die Expression von NF-L in UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> in Cisplatin-freiem Medium ist im Vergleich zum Cisplatin-haltigen Medium erhöht. Nach 21 Tagen zeigt sich jedoch wieder eine leicht verminderte Expression von NF-L bei den im Cisplatin-freien Medium kultivierten UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>.

Bei Kultivierung von UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> in Cisplatin-freiem Medium über bis zu 21 Tage zeigen sich also zu den einzelnen Messzeitpunkten verschiedene Expressionsmuster, eine dauerhafte signifikante Veränderung der Expression von NF-L zeigt sich nicht.



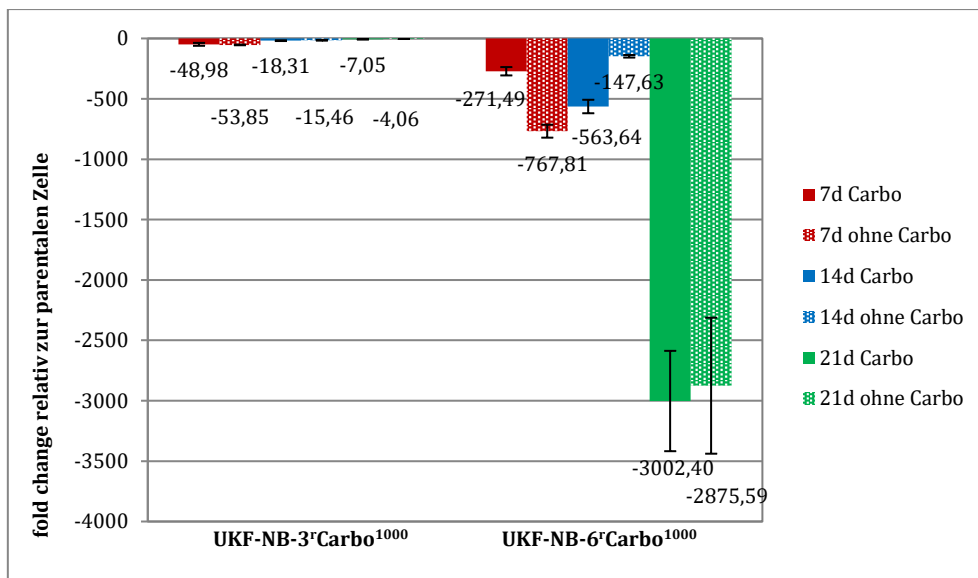
**Abbildung 4-8:** Relative Expression von Neurofilament-L (NF-L) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = cisplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = cisplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

#### 4. Ergebnisse

UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup> Carbo<sup>1000</sup> exprimieren beide signifikant weniger NF-L ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu ihren parentalen Zellen (s. Abbildung 4-9).

Dieser Effekt war bei UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> deutlich stärker ausgeprägt, auch gab es große Expressionsunterschiede zwischen den 3 Passagen. Die Werte innerhalb der einzelnen Passagen waren aber alle signifikant erniedrigt im Vergleich zur parentalen Zelle.

Eine Unterbrechung der Carboplatin-Exposition von bis zu 21 Tagen führt in keiner der beiden Sublinien zu einer dauerhaften signifikanten Änderung der Genexpression.



**Abbildung 4-9: Relative Expression von Neurofilament-L (NF-L) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6.** Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = carboplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = carboplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

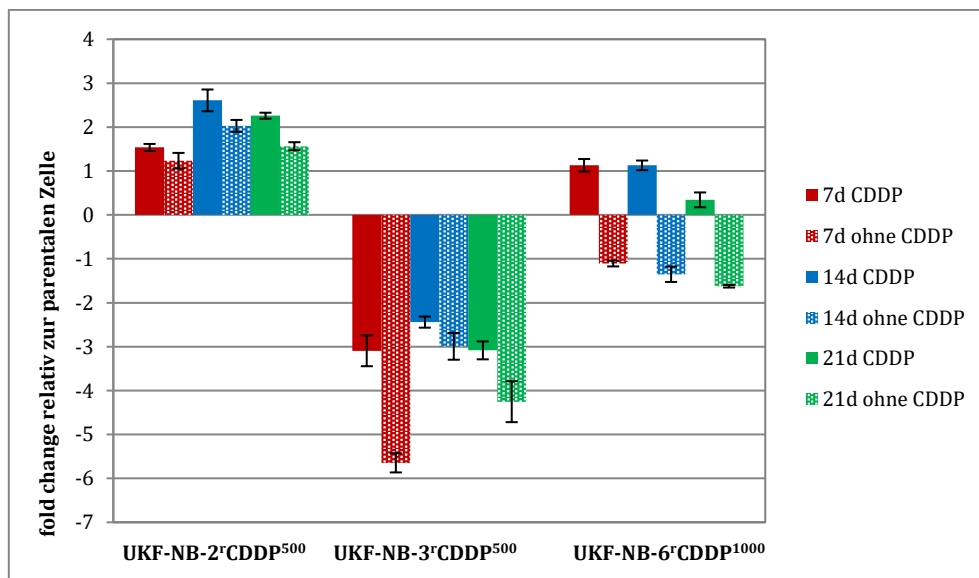
## 4. Ergebnisse

### 4.3.4 Neurofilament-M (NF-M) -Genexpression

UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> zeigen eine sehr geringe, insgesamt nicht signifikante veränderte Expression von NF-M gegenüber ihrer jeweiligen parentalen Zelle in allen drei Passagen.

Bei UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> ist dies unabhängig von der Exposition mit Cisplatin (s. Abbildung 4-10). Auffällig bei UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> ist jedoch die positive Genexpression von NF-M bei Zugabe von Cisplatin und die negative Genexpression von NF-M bei Cisplatin-karenz.

UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> exprimiert signifikant weniger NF-M als UKF-NB-3 ( $p < 0,05$ ). Ein Aussetzen der Cisplatin-Exposition über den Zeitraum von 7 Tagen senkt die NF-M-Expression signifikant ( $p < 0,05$ ). Eine Verstärkung dieses Effekts bei zunehmender Dauer der Cisplatin-karenz zeigt sich jedoch nicht.



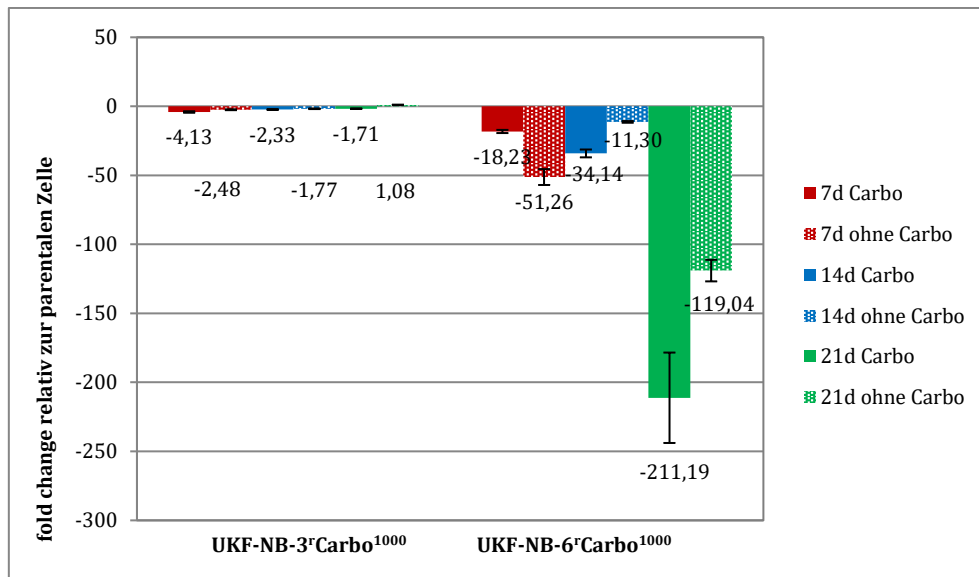
**Abbildung 4-10: Relative Expression von Neurofilament-M (NF-M) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6.** Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = cisplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = cisplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> zeigt eine geringe, nicht signifikante Abnahme der NF-M-Expression gegenüber der parentalen Zelle, gleich ob mit oder ohne Zugabe von Carboplatin (s. Abbildung 4-11).

#### 4. Ergebnisse

Die verringerte Expression von NF-M in UKF-NB-6<sup>Carbo</sup>1000 ist, sowohl mit als auch ohne Carboplatinzusatz, signifikant ( $p < 0,05$ ).

Eine Unterbrechung der Carboplatin-Exposition von bis zu 21 Tagen führt zu keiner dauerhaften signifikanten Änderung der Genexpression.



**Abbildung 4-11: Relative Expression von Neurofilament-M (NF-M) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>Carbo</sup>1000 und UKF-NB-6<sup>Carbo</sup>1000 im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6.** Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = carboplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = carboplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

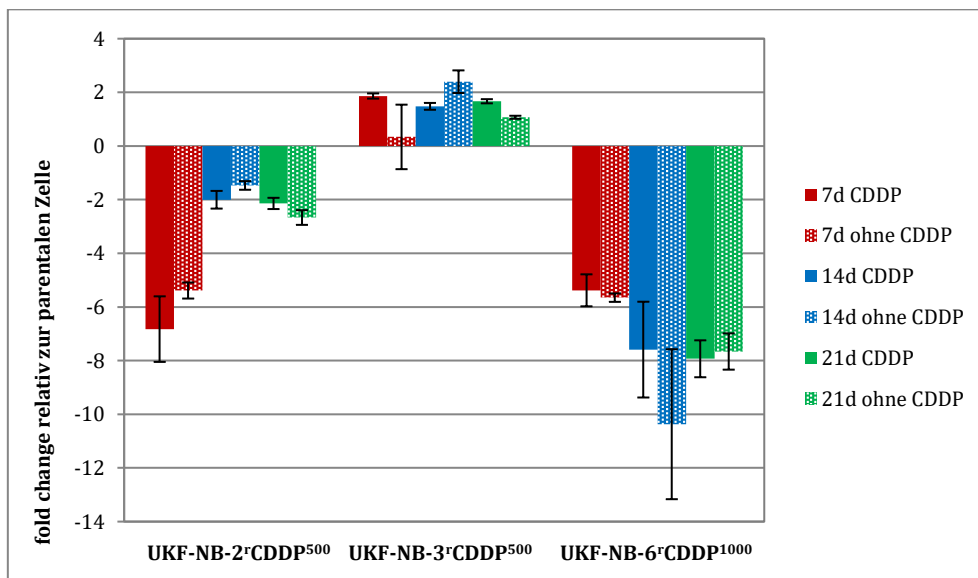
## 4. Ergebnisse

### 4.3.5 Neurofilament-H (NF-H) -Genexpression

UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> zeigt eine signifikante, wenn auch geringe Verminderung der Expression von NF-H ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu UKF-NB-2 (s. Abbildung 4-12). Eine Unterbrechung der Cisplatin-Exposition führt zu keiner signifikanten Veränderung.

Bei UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> besteht keine signifikant ausgeprägte Expressionsveränderung im Vergleich mit der parentalen Zelle, dies ändert auch eine Cisplatin-karenz nicht.

Die NF-H-Expression von UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> ist gegenüber der parentalen Zelle signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). Im Zusammenhang mit der Cisplatin-karenz über bis zu 21 Tage findet sich jedoch auch hier keine dauerhafte signifikante Expressionsänderung von NF-H.

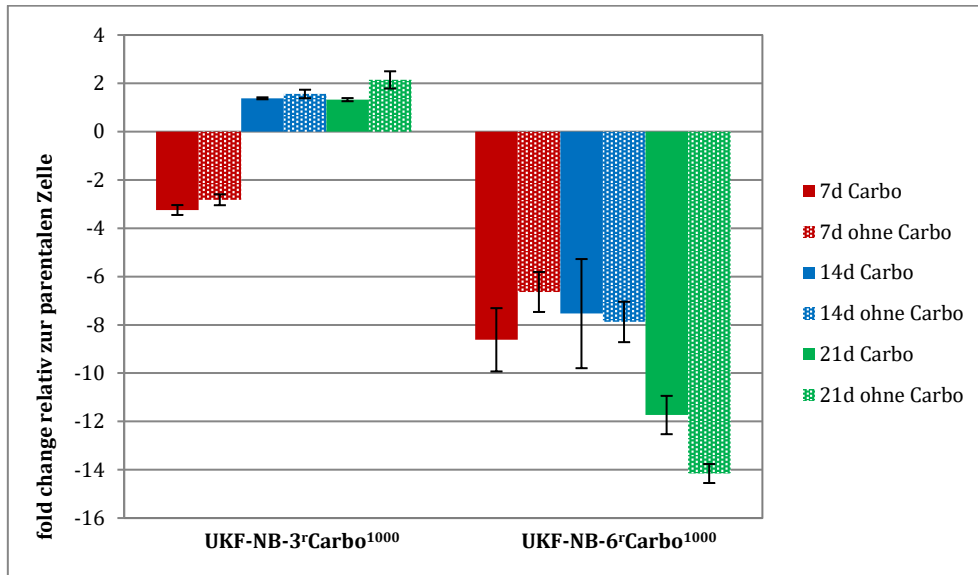


**Abbildung 4-12:** Relative Expression von Neurofilament-H (NF-H) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = cisplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = cisplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> zeigt keine signifikante Veränderung der Expression von NF-H gegenüber der parentalen Zelle UKF-NB-3 (s. Abbildung 4-13).

#### 4. Ergebnisse

UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> hingegen exprimiert signifikant weniger NF-H als UKF-NB-6 (p<0,05); eine Unterbrechung der Carboplatin-Exposition über bis zu 21 Tage führt zu keiner dauerhaften signifikanten Expressionsänderung von NF-H.



**Abbildung 4-13:** Relative Expression von Neurofilament-H (NF-H) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Mittelwert und Standardabweichung des fold change der resistenten Sublinien aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz. Gefüllte Balken = carboplatinhaltiges Medium, gepunktete Balken = carboplatinfreies Medium. Über 7 (rot), 14 (blau), 21 (grün) Tage (d) kultiviert.

## 4. Ergebnisse

### 4.4 Induktion von Anoikis durch Kultivierung auf PolyHEMA

#### 4.4.1 Vergleich der Zellviabilität unter adhärennten und nicht-adhärennten Bedingungen

Um die Anoikis-Sensitivität der parentalen und resistenten Neuroblastomzellen zu vergleichen, wurde die Zellviabilität bei Kultivierung unter adhärennten und nicht-adhärennten Bedingungen bestimmt. Dazu wurden 96-Lochplatten zu einer Hälfte mit PolyHEMA (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)) beschichtet, welches eine Adhäsion der Zellen verhindert; die andere Hälfte blieb unbehandelt. Anschließend wurde zur Viabilitätsbestimmung ein MTT-Test durchgeführt. Die Zellviabilität unter adhärennten Bedingungen wurde dabei gleich 100% gesetzt und in Abhängigkeit von ihr die relative Zellviabilität unter nicht-adhärennten Bedingungen bestimmt.

Zelllinie	Relative Zellviabilität (%) auf PolyHEMA
UKF-NB-2	81,97 ± 12,02
UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	80,74 ± 11,27
UKF-NB-3	54,36 ± 11,98*
UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	41,68 ± 4,10*
UKF-NB-3 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	52,49 ± 10,87*
UKF-NB-6	85,15 ± 12,11
UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	55,27 ± 3,23*#
UKF-NB-6 <sup>r</sup> Carbo <sup>1000</sup>	40,03 ± 4,16*#

**Tabelle 4-5: Vergleich der Zellviabilität (%) unter adhärennten (keine Beschichtung) und nicht adhärennten (PolyHEMA-Beschichtung) Bedingungen.** Zellviabilität unter adhärennten Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. MW±SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

\* signifikante Reduktion der Viabilität unter nicht adhärennten Bedingungen: p < 0,05; # signifikante Reduktion der Viabilität unter nicht adhärennten Bedingungen im Vergleich zur parentalen Zelle.

UKF-NB-2 und UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> zeigten keine signifikante Reduktion der Zellviabilität durch Kultivierung auf den PolyHEMA-beschichteten Platten.

UKF-NB-3 (54,36% ± 11,98) sowie die resistenten Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> (41,68% ± 4,10) und UKF-NB-3<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> (52,49% ± 10,87) zeigten alle jeweils eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bei Kultivierung auf PolyHEMA im Vergleich zu adhärennten Bedingungen (p<0,05).

UKF-NB-6 und die resistenten Sublinien reagierten unterschiedlich auf den Verlust des Zell-Matrix-Kontakts. Der Vergleich der Zellviabilität bei Kultivierung auf



## 4. Ergebnisse

unbeschichteten und PolyHEMA-beschichteten Platten zeigte bei UKF-NB-6 keine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Die Zellviabilität von UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> (40,03% ± 4,16) und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> (55,27% ± 3,32) war durch die PolyHEMA-Beschichtung jedoch signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ).

Vergleicht man nun die Viabilität auf PolyHEMA zwischen den jeweils parentalen Zelllinien und ihren resistenten Sublinien, ergeben sich bei den Linien UKF-NB-2 und UKF-NB-3 keine Unterschiede. Die Zellviabilität von UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> war dagegen im Vergleich zu UKF-NB-6 bei der Kultivierung auf PolyHEMA signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ).

### **4.4.2 Einfluß von Cisplatin und Carboplatin auf die Zellviabilität unter nicht-adhärennten Bedingungen**

Auch bei Kultivierung der Zellen mit Cisplatin und Carboplatin in verschiedenen Dosierungen zeigte sich die unterschiedliche Auswirkung der PolyHEMA-Beschichtung auf die Zellviabilität der Zelllinien. Die prägnantesten Beispiele sind in den Abbildung 4-14 bis 4-17 grafisch dargestellt.

Wie bereits die unbehandelten Zellen zeigten auch die mit einer Cisplatin-Verdünnungsreihe kultivierten Zellen UKF-NB-2 und UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> (Abb. 4-14 und 4-15) keinen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität beim Vergleich der Kultivierung mit und ohne PolyHEMA. Gleiches gilt für UKF-NB-6 (Abb. 4-16) bei Zusatz von Carboplatin. Die Zellviabilität dieser Zelllinien wurde nur durch die Platin-Konzentration beeinflusst, aber nicht durch die Beschichtung.

Im Gegensatz dazu ist bei UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> bereits durch die PolyHEMA-Beschichtung die Zellviabilität signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ) und der Einfluß der Carboplatin-Konzentration auf die Zellviabilität gering (Abb 4-17).

#### 4. Ergebnisse

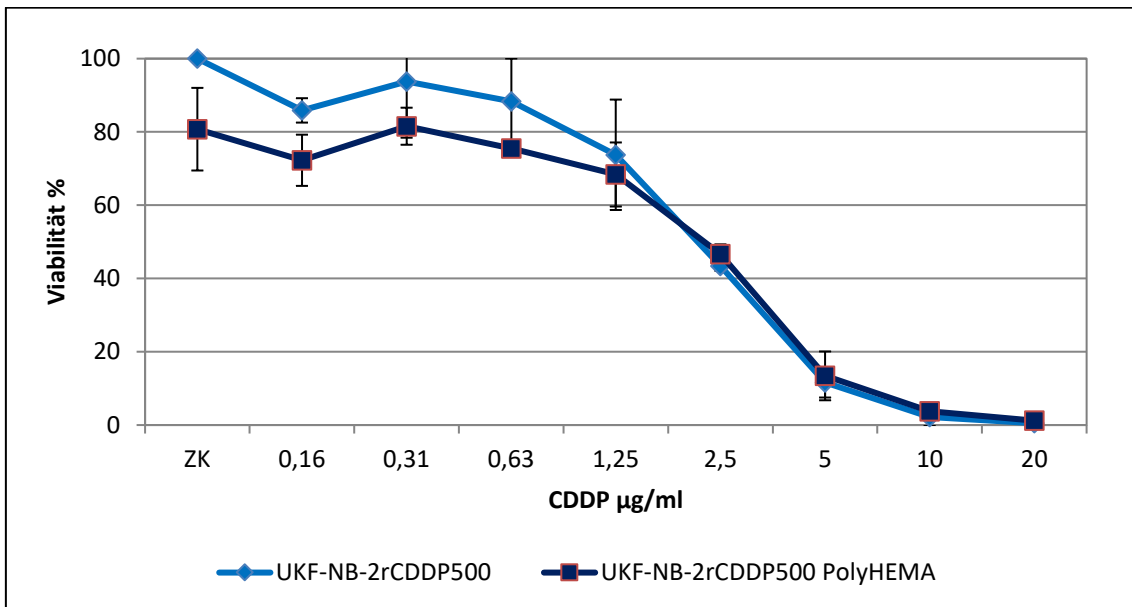
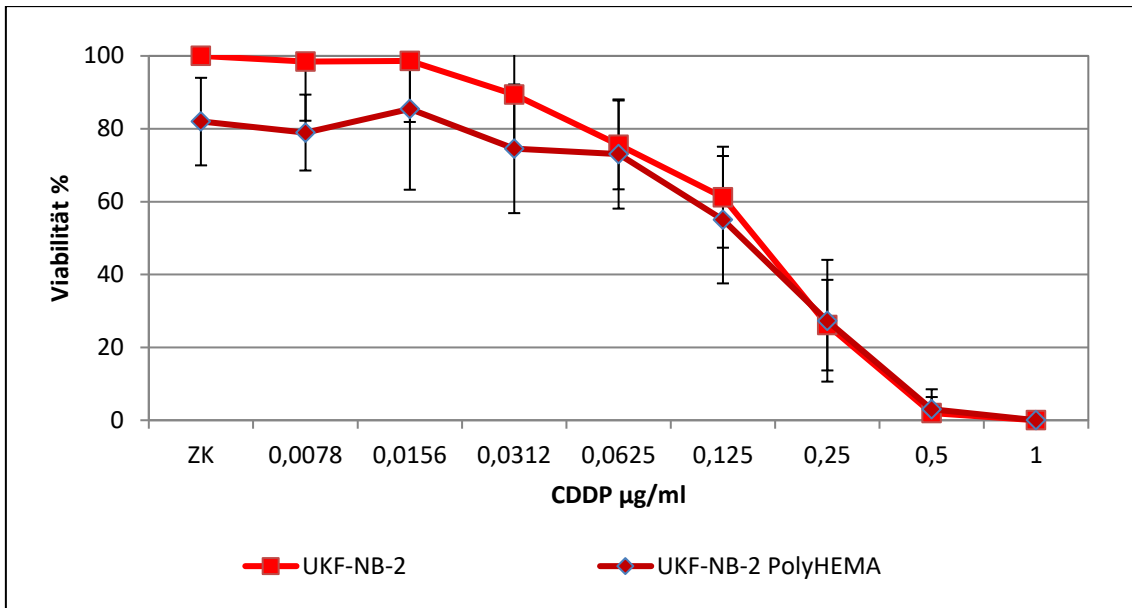


Abbildung 4-14 und 4-15: Cisplatinverdünnungsreihe mit und ohne PolyHEMA-Beschichtung. Relative Zellviabilität von UKF-NB-2 und UKF-NB-2r CDDP<sup>500</sup> (MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Mittelwert±Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 4. Ergebnisse

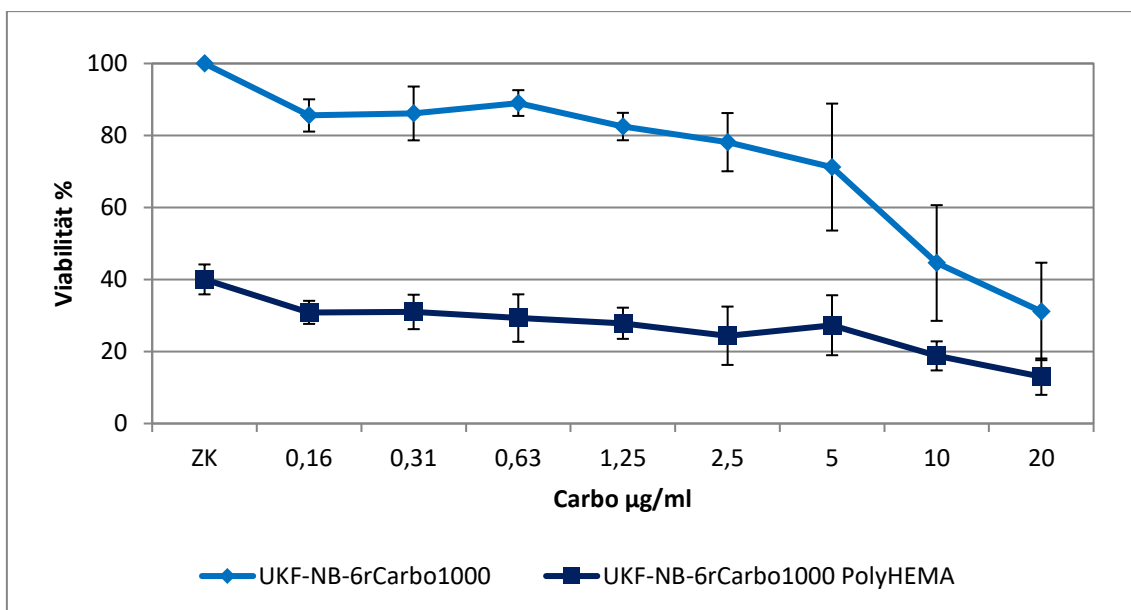
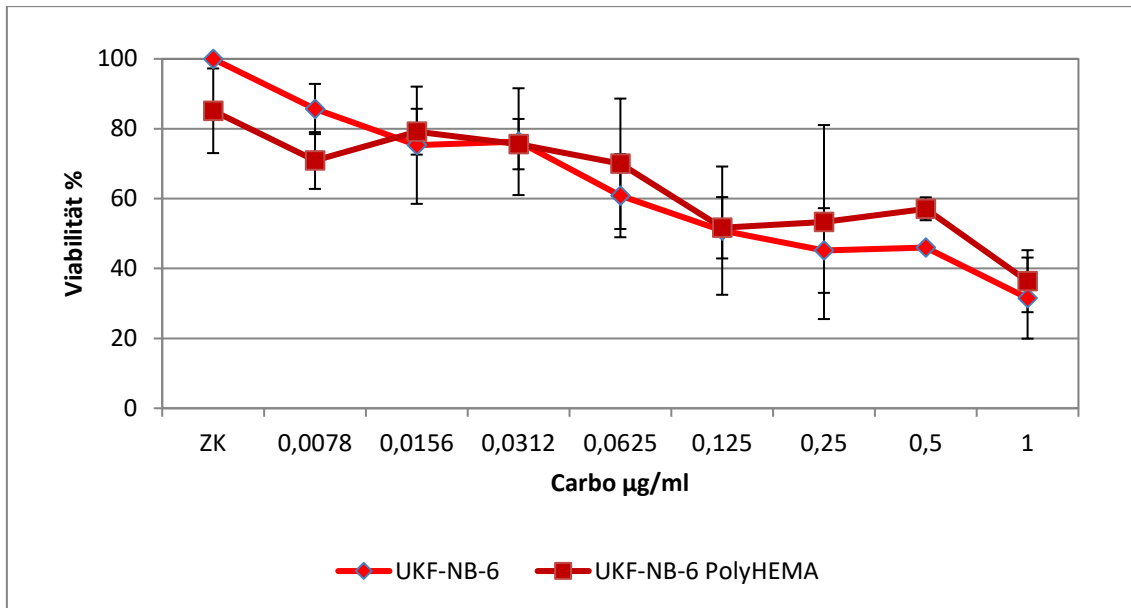


Abbildung 4-16 und 4-17: Carboplatinverdünnungsreihe mit und ohne PolyHEMA-Beschichtung. Relative Zellviabilität von UKF-NB-6 und UKF-NB-6rCarbo<sup>1000</sup> (MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Mittelwert±Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

Eine Übersicht über die Zellviabilitätstestung aller Zelllinien mit und ohne PolyHEMA-Beschichtung sowie unter Zugabe von Cisplatin und Carboplatin geben die folgenden Tabellen 4-6 bis 4-9.

#### 4. Ergebnisse

Cisplatin	ZK	0,008	0,016	0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1
UKF-NB-2	100	98,44 ± 16,24	98,64 ± 16,77	89,43 ± 15,17	75,57 ± 12,19	61,21 ± 13,86	26,10 ± 12,43	1,96 ± 4,41	0
UKF-NB-2 mit PH	81,97 ± 12,02	78,96 ± 10,42	85,45 ± 22,18	74,51 ± 17,66	73,07 ± 14,99	55,04 ± 17,48	27,31 ± 16,71	3,05 ± 5,46	0
UKF-NB-3	100	87,35 ± 7,38	87,07 ± 6,44	85,77 ± 5,58	79,13 ± 8,36	58,00 ± 2,60	15,88 ± 3,00	0	0
UKF-NB-3 mit PH	54,37 ± 11,98	46,92 ± 11,82	53,35 ± 3,46	48,79 ± 5,50	49,84 ± 4,80	39,03 ± 5,47	12,19 ±3,03	0	0
UKF-NB-6	100	97,20 ± 16,86	90,86 ± 15,20	81,55 ± 29,36	73,88 ± 19,17	61,46 ± 19,55	30,59 ± 7,76	1,19 ± 6,73	0
UKF-NB-6 mit PH	77,21 ± 27,39	81,72 ± 26,32	84,97 ±23,21	72,66 ± 32,68	70,06 ± 24,19	65,41 ± 23,69	43,12 ± 6,93	2,98 ± 4,17	0

**Tabelle 4-6: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der parentalen Zellen mit Cisplatinverdünnungsreihe unter adhärennten (keine Beschichtung) und nicht adhärennten (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Cisplatin (0,008-1µg/ml). Zellviabilität unter adhärennten Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

Carboplatin	ZK	0,008	0,016	0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1
UKF-NB-3	100	95,67 ± 1,62	95,99 ± 4,08	89,99 ± 3,62	91,93 ± 3,54	85,13 ± 6,01	80,01 ± 1,32	59,34 ± 10,08	29,56 ± 11,43
UKF-NB-3 mit PH	54,86 ± 22,38	58,61 ± 11,54	54,39 ± 17,25	55,43 ± 14,06	55,21 ± 16,99	53,96 ± 9,12	50,90 ± 14,51	42,13 ± 6,02	22,37 ± 10,95
UKF-NB-6	100	85,65 ± 7,19	75,28 ± 16,78	76,30 ± 15,29	60,85 ± 11,90	50,84 ± 18,35	45,15 ± 12,12	45,98 ± 0,67	31,53 ± 11,60
UKF-NB-6 mit PH	85,15 ± 12,11	70,91 ± 8,12	79,16 ± 6,56	75,61 ± 7,21	69,97 ± 18,66	51,66 ± 8,78	53,29 ± 27,76	57,10 ± 3,28	36,37 ± 8,87

**Tabelle 4-7: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der parentalen Zelllinien mit Carboplatinverdünnungsreihe unter adhärennten (keine Beschichtung) und nicht adhärennten (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Carboplatin (0,008-1µg/ml). Zellviabilität unter adhärennten Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 4. Ergebnisse

Cisplatin	ZK	0,16	0,31	0,63	1,3	2,5	5	10	20
UKF-NB- 2'CDDP <sup>500</sup>	100	85,87 ± 3,33	93,73 ± 5,31	88,35 ± 1,68	73,76 ± 15,06	43,40 ± 1,30	11,60 ± 4,09	2,22 ± 2,47	0,50 ± 1,10
UKF-NB- 2'CDDP <sup>500</sup> mit PH	80,74 ± 11,27	72,26 ± 6,99	81,55 ± 5,05	75,49 ± 2,07	68,38 ± 8,74	46,64 ± 2,68	13,43 ± 6,66	3,74 ± 2,21	1,21 ± 0,47
UKF-NB- 3'CDDP <sup>500</sup>	100	100,75 ± 6,70	89,80 ± 6,18	92,26 ± 7,58	76,97 ± 4,46	12,86 ± 4,81	0	0	0
UKF-NB- 3'CDDP <sup>500</sup> mit PH	41,68 ± 4,10	50,94 ± 20,79	41,75 ± 8,46	41,16 ± 14,02	36,25 ± 4,80	5,33 ± 2,98	0	0	0
UKF-NB- 6'CDDP <sup>1000</sup>	100	77,83 ± 10,83	78,99 ± 16,02	77,98 ± 15,81	65,13 ± 31,67	62,44 ± 7,62	15,88 ± 4,45	5,12 ± 0,68	0
UKF-NB- 6'CDDP <sup>1000</sup> mit PH	55,27 ± 3,23	45,72 ± 3,55	42,53 ± 8,52	48,15 ± 5,68	42,10 ± 7,43	48,34 ± 3,06	20,18 ± 9,76	4,90 ± 3,15	0

**Tabelle 4-8: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der Cisplatin-resistenten Sublinien mit Cisplatinverdünnungsreihe unter adhären (keine Beschichtung) und nicht adhären (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Cisplatin (0,16-20µg/ml). Zellviabilität unter adhären Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

Carboplatin	ZK	0,16	0,31	0,63	1,3	2,5	5	10	20
UKF-NB- 3'Carbo <sup>1000</sup>	100	96,61 ± 14,10	97,86 ± 13,44	97,24 ± 13,12	94,46 ± 10,30	80,13 ± 19,31	73,55 ± 7,40	50,73 ± 8,05	7,25 ± 10,40
UKF-NB- 3'Carbo <sup>1000</sup> mit PH	52,48 ± 10,87	48,01 ± 17,04	51,08 ± 11,28	50,16 ± 11,51	46,83 ± 13,94	36,01 ± 16,20	35,21 ± 9,70	26,12 ± 11,67	0
UKF-NB- 6'Carbo <sup>1000</sup>	100	85,56 ± 4,48	86,12 ± 7,48	89,01 ± 3,58	82,48 ± 3,81	78,14 ± 8,09	71,22 ± 17,63	44,58 ± 16,07	31,12 ± 13,54
UKF-NB- 6'Carbo <sup>1000</sup> mit PH	40,03 ± 4,16	30,87 ± 3,20	30,99 ± 4,78	29,29 ± 6,59	27,84 ± 4,33	24,37 ± 8,10	27,30 ± 8,33	18,78 ± 4,04	13,01 ± 5,06

**Tabelle 4-9: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der Carboplatin-resistenten Sublinien mit Carboplatinverdünnungsreihe unter adhären (keine Beschichtung) und nicht adhären (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Carboplatin (0,16-20µg/ml). Zellviabilität unter adhären Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

## 4. Ergebnisse

### **4.5 Untersuchungen des Einflusses ausgewählter Stoffe der Connectivity Map auf die Cisplatinresistenz verschiedener Neuroblastomzelllinien**

Die vorgestellten Ergebnisse der Kapitel 4.1 bis 4.4 wurden an Cisplatin-resistenten Sublinien der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 ermittelt, welche an Cisplatinkonzentrationen von 500 ng/ml und 1000 ng/ml adaptiert waren. Die folgenden Untersuchungen in diesem Kapitel wurden dagegen an Cisplatin-resistenten Sublinien der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 durchgeführt, welche an Cisplatinkonzentrationen von 1000 ng/ml (UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>, UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>) und 2000 ng/ml (UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>2000</sup>) adaptiert waren.

Grund dafür war zum einen ein zeitlicher Abstand zwischen den Versuchen, zum anderen wurden die genannten Zelllinien bereits in Vorversuchen benutzt, mit denen die neu erhobenen Daten verglichen werden sollten.

#### **4.5.1. Toxizität der potentiellen Resensitizer Pararosanilin, Tolbutamid, Topiramat, Fludrocortison und 12, 13-EODE**

Der Einfluß der durch die Connectivity Map bestimmten Resensitizer auf die Resistenz gegenüber Cisplatin wurde mit Hilfe des MTT-Tests in verschiedenen Zelllinien untersucht. Als Konzentrationen wurden vorerst zur Bestimmung der Toxizität die 5-, 10-, und 20-fache Menge der Connectivity Map-Dosis ausgetestet. Die Connectivity Map-Dosis kann aus der Connectivity Datenbank abgelesen werden, sie ist die Dosis des jeweiligen Stoffes mit der die Zellreihen der Connectivity Map behandelt wurden (s. a. Lamb et al., 2007). Ziel war es, die maximale Dosis zu finden, bei der noch eine >80%ige Viabilität der Zellkontrolle bestand. 12,13-EODE, Fludrocortison und Topiramat waren in keiner der getesteten Konzentrationen toxisch. Tolbutamid und Pararosanilin zeigten in der 20-fachen, bzw. 15-fachen Dosierung eine Reduktion der Zellviabilität um >20% und damit eine toxische Wirkung. Vereinheitlichend wurde daher die jeweilige 10-fache Connectivity Map-Dosis aller Stoffe für die weiteren Versuche ausgewählt. Hierbei wurde in allen Zelllinien eine Viabilität von >80% der unbehandelten Kontrolle erreicht, die Stoffe sind in den ausgewählten Konzentrationen nicht toxisch (siehe Tabelle 4-10).

#### 4. Ergebnisse

In den folgenden Versuchen (s. Kapitel 4.5.2) wurden die verschiedenen Zelllinien mit Cisplatin (in 1:2 verdünnter fortgesetzter Verdünnungsreihe) und einer Kombination aus Cisplatin (in 1:2 verdünnter fortgesetzter Verdünnungsreihe) und einem Resensitizer (in fester Konzentration) behandelt und die Zellviabilität mittels MTT-Test bestimmt. Verglichen wurden hierbei jeweils die chemosensitiven Zellen IMR-5, NGP, SK-N-AS, UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 und ihre Cisplatin-resistenten Sublinien. Die Stoffe Pararosanilin und Tolbutamid wurden dabei, bedingt durch technische Schwierigkeiten (initiale Messprobleme im Photometer bedingt durch die Eigenfarbe von Pararosanilin und Schwierigkeiten der Stofflöslichkeit bei Tolbutamid), lediglich an den Cisplatin-resistenten Sublinien getestet.

Die Testung der Stoffe 12,13-EODE, Topiramid und Fludrocortison erfolgte sowohl an Cisplatin-resistenten Sublinien als auch an den parental Zellen von IMR-5, NGP, SK-N-AS, UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6.

Zum Prinzip der Auswertung und Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte s. Kapitel 10.1.

#### 4. Ergebnisse

Zelllinie	Pararosanilin 100 µM Zellviabilität (% Kontrolle)	Tolbutamid 1000 µM Zellviabilität (% Kontrolle)	Topiramat 30 µM Zellviabilität (% Kontrolle)	12,13-EODE 2 µM Zellviabilität (% Kontrolle)	Fludrocortison 10 µM Zellviabilität (% Kontrolle)
IMR-5	#	#	100,30 ± 5,06	103,36 ± 5,17	101,10 ± 4,08
IMR-5'CDDP <sup>1000</sup>	85,79 ± 4,38	84,74 ± 7,55	91,59 ± 1,55	98,95 ± 6,12	101,48 ± 10,46
NGP	#	#	101,77 ± 6,35	103,49 ± 8,34	93,06 ± 3,82
NGP'CDDP <sup>1000</sup>	80,55 ± 7,96	91,41 ± 4,05	103,86 ± 5,63	98,90 ± 4,89	98,48 ± 7,33
SK-N-AS	#	#	99,23 ± 4,53	99,24 ± 1,10	95,27 ± 4,76
SK-N-AS'CDDP <sup>500</sup>	100,72 ± 4,95	94,65 ± 9,56	104,11 ± 7,13	101,68 ± 3,76	97,82 ± 3,29
UKF-NB-2	#	#	97,77 ± 1,77	99,45 ± 5,98	99,94 ± 4,31
UKF-NB-2'CDDP <sup>1000</sup>	93,83 ± 4,84	84,83 ± 1,22	98,91 ± 6,48	101,11 ± 2,37	99,15 ± 6,46
UKF-NB-3	#	#	96,73 ± 0,78	98,38 ± 8,12	104,17 ± 1,36
UKF-NB-3'CDDP <sup>1000</sup>	83,25 ± 14,46	93,52 ± 5,72	95,09 ± 8,66	97,82 ± 1,36	94,53 ± 4,73
UKF-NB-6	#	#	97,50 ± 0,84	95,98 ± 4,90	100,40 ± 4,38
UKF-NB-6'CDDP <sup>2000</sup>	93,90 ± 8,36	101,95 ± 8,31	100,84 <sup>§</sup>	96,52 ± 2,31	105,95 <sup>§</sup>

**Tabelle 4-10: Zellviabilität der Neuroblastomzelllinien bei Zugabe von Pararosanilin 100µM, Tolbutamid 1000µM, Topiramat 30µM, 12,13-EODE 2µM oder Fludrocortison 10µM.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. # keine Testung des Stoffes an der Zelle. <sup>§</sup> Einzelwert da inkonstantes Wachstum in weiteren Versuchen.



## 4. Ergebnisse

### 4.5.2 Einfluss potentieller Resensitizer auf die Cisplatinwirkung in Cisplatin-resistenten Sublinien

#### 4.5.2.1 Pararosanilin

Die Zugabe von 100 µM Pararosanilin zur Cisplatin-Verdünnungsreihe (Startdosis 50µg/ml) senkte die IC<sub>50</sub>-Dosis in allen resistenten Sublinien um den Faktor 1,20 bis 1,87, verglichen mit der IC<sub>50</sub>-Dosis für Cisplatin allein. Für NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>, SK-N-AS<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> ist die Verringerung des IC<sub>50</sub>-Werts signifikant (p < 0,05), für IMR-5<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> sogar hochsignifikant (p < 0,01).

Zelllinie	IC <sub>50</sub> - Wert CDDP (µg/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert CDDP (µg/ml) +100µM Pararosanilin	Verringerung der IC <sub>50</sub> - Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	3,73± 0,73	2,64± 0,65	1,41**
NGP <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	5,02± 0,62	2,68± 1,05	1,87*
SK-N-AS <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	6,16± 1,43	4,72± 1,48	1,31*
UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	9,26 ± 2,50	7,59± 1,59	1,22*
UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	2,98± 0,39	2,23± 0,75	1,34
UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>2000</sup>	5,51± 1,41	4,58± 1,03	1,20

**Tabelle 4-11: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Pararosanilin 100µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Pararosanilin 100µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Pararosanilin 100µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05; \*\* hochsignifikant: p < 0,01.

#### 4.5.2.2 Tolbutamid

1000 µM Tolbutamid senkt ebenfalls den IC<sub>50</sub>-Wert in Kombination mit Cisplatin. IMR-5<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>, UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>, UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>2000</sup> zeigen eine signifikante Absenkung der IC<sub>50</sub>-Werte um den Faktor 1,10 bis 2,45 (p < 0,05). Die Veränderung der IC<sub>50</sub>-Werte von NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> sind deutlich geringer, aufgrund ihrer sehr geringen Standardabweichung und damit sehr guten Reproduzierbarkeit aber hochsignifikant (p < 0,01).

Bei SK-N-AS<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> ist genau das Gegenteil der Fall, stärkere Schwankungen der Messwerte führen hier zu einem Signifikanzverlust der gemessenen Dosisreduktion von Cisplatin.

## 4. Ergebnisse

Zelllinie	IC <sub>50</sub> - Wert CDDP (µg/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert CDDP (µg/ml) +1000µM Tolbutamid	Verringerung der IC <sub>50</sub> - Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	2,91± 0,26	1,51± 0,31	1,93*
NGP <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	5,56± 1,31	5,05± 1,17	1,10**
SK-N-AS <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	5,38± 1,69	3,62± 0,41	1,49
UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	7,66± 1,63	3,13± 2,34	2,45*
UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	2,50± 0,25	1,16± 0,56	2,16*
UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>2000</sup>	4,43± 0,24	3,86± 0,32	1,15*

Tabelle 4-12: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Tolbutamid 1000µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Tolbutamid 1000µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Tolbutamid 1000µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05; \*\* hochsignifikant: p < 0,01.

### 4.5.2.3 Topiramat

Die Kombination von 30µM Topiramat und Cisplatin führt in keiner getesteten Zelle zu einer signifikanten Senkung der IC<sub>50</sub>-Werte. Vielmehr steigt die IC<sub>50</sub>-Dosis für Cisplatin bei allen Zellen mit Ausnahme von UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>2000</sup> an, bei NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> sogar signifikant (p<0,05).

Zelllinie	IC <sub>50</sub> - Wert CDDP (µg/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert CDDP (µg/ml) +30µM Topiramat	Verringerung/Erhöhung der IC <sub>50</sub> - Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	1,09 <sup>#</sup>	1,48 <sup>#</sup>	0,74 <sup>#</sup>
NGP <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	3,89± 0,24	4,37± 0,28	0,89*
SK-N-AS <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	3,73± 2,18	4,18± 2,61	0,89
UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	7,39± 1,01	8,46± 1,40	0,87
UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	2,13± 0,28	2,54± 0,20	0,84*
UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>2000</sup>	5,18 <sup>#</sup>	4,93 <sup>#</sup>	1,05 <sup>#</sup>

Tabelle 4-13: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Topiramat 30µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Topiramat 30µM als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Topiramat 30µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05. # Einzelwert da inkonstantes Wachstum in weiteren Versuchen.

## 4. Ergebnisse

### 4.5.2.4 12, 13-EODE

In Kombination mit 2  $\mu\text{M}$  12,13-EODE zeigte sich in keiner Zelllinie eine signifikante Verringerung des  $\text{IC}_{50}$ -Werts von Cisplatin.

Zelllinie	$\text{IC}_{50}$ - Wert CDDP ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{IC}_{50}$ -Wert CDDP ( $\mu\text{g/ml}$ ) +2 $\mu\text{M}$ 12,13-EODE	Verringerung/Erhöhung der $\text{IC}_{50}$ -Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	2,21 $\pm$ 1,17	2,22 $\pm$ 0,81	1,00
NGP <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	3,71 $\pm$ 0,14	3,85 $\pm$ 0,34	0,96
SK-N-AS <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	4,25 $\pm$ 1,48	4,49 $\pm$ 1,24	0,95
UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	7,38 $\pm$ 0,62	8,13 $\pm$ 0,25	0,91
UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	2,46 $\pm$ 0,56	2,56 $\pm$ 0,51	0,96
UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>2000</sup>	6,20 $\pm$ 2,09	5,70 $\pm$ 1,15	1,09

**Tabelle 4-14: Vergleich der  $\text{IC}_{50}$ -Werte von CDDP und CDDP mit 12,13-EODE 2 $\mu\text{M}$  an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von CDDP mit 12,13-EODE 2 $\mu\text{M}$  als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der  $\text{IC}_{50}$ -Dosis von CDDP durch Kombination mit 12,13-EODE 2 $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}\text{CDDP}/\text{IC}_{50}\text{CDDP} + \text{Resensitizer}$ ).

### 4.5.2.5 Fludrocortison

Fludrocortison 10  $\mu\text{M}$  führte zu keiner Verringerung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte. Im Gegenteil stieg der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Cisplatin in allen Zellen an; in NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>, SK-N-AS<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> sogar signifikant ( $p < 0,05$ ).

Zelllinie	$\text{IC}_{50}$ - Wert CDDP ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{IC}_{50}$ -Wert CDDP ( $\mu\text{g/ml}$ ) +10 $\mu\text{M}$ Fludrocortison	Erhöhung der $\text{IC}_{50}$ - Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	4,06 $\pm$ 1,54 <sup>§</sup>	4,57 $\pm$ 1,53 <sup>§</sup>	0,90 <sup>§*</sup>
NGP <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	3,85 $\pm$ 0,24	4,79 $\pm$ 0,26	0,80*
SK-N-AS <sup>r</sup> CDDP <sup>500</sup>	4,29 $\pm$ 3,70	5,60 $\pm$ 4,27	0,77*
UKF-NB-2 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	6,63 $\pm$ 0,62	7,11 $\pm$ 2,22	0,93
UKF-NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup>	2,40 $\pm$ 0,07	2,97 $\pm$ 0,35	0,81*
UKF-NB-6 <sup>r</sup> CDDP <sup>2000</sup>	4,99 <sup>#</sup>	5,01 <sup>#</sup>	1,00 <sup>#</sup>

**Tabelle 4-15: Vergleich der  $\text{IC}_{50}$ -Werte von CDDP und CDDP mit Fludrocortison 10 $\mu\text{M}$  an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von CDDP mit Fludrocortison 10 $\mu\text{M}$  als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der  $\text{IC}_{50}$ -Dosis von CDDP durch Kombination mit Fludrocortison 10 $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}\text{CDDP}/\text{IC}_{50}\text{CDDP} + \text{Resensitizer}$ ). § Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, # Einzelwert da inkonstantes Wachstum in weiteren Versuchen. \* signifikant:  $p < 0,05$ .

## 4. Ergebnisse

### 4.5.3 Einfluss potentieller Resensitizer auf die Cisplatinwirkung in parentalen Neuroblastomzelllinien

#### 4.5.3.1 Topiramat

Der Zusatz von Topiramat führte in allen getesteten parentalen Zelllinien zu einem geringen, nicht-signifikanten Anstieg des IC<sub>50</sub>-Werts von Cisplatin.

Zelllinie	IC <sub>50</sub> - Wert CDDP (µg/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert CDDP (µg/ml) +30µM Topiramat	Erhöhung der IC <sub>50</sub> - Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5	0,40± 0,00	0,44± 0,07	0,91
NGP	0,31± 0,09	0,35± 0,04	0,89
SK-N-AS	0,55± 0,28	0,55± 0,25	1
UKF-NB-2	0,31± 0,06	0,33± 0,13	0,94
UKF-NB-3	0,25± 0,04	0,26± 0,03	0,96
UKF-NB-6	0,48± 0,04	0,51± 0.01	0,94

**Tabelle 4-16: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Topiramat 30µM an parentalen chemosensitiven Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Topiramat 30µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Topiramat 30µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer)

#### 4.5.3.2 12, 13-EODE

Auch bei 12,13-EODE kam es bei den Zelllinien NGP, UKF-NB2 und UKF-NB-3 zu einem nicht-signifikanten Anstieg des IC<sub>50</sub>-Werts von Cisplatin (s. Tabelle 4-17). Lediglich in IMR-5, SK-N-AS und UKF-NB-6 sank der IC<sub>50</sub>-Wert gering, im Falle von IMR-5 jedoch signifikant (p<0,05).

#### 4. Ergebnisse

Zelllinie	IC <sub>50</sub> - Wert CDDP (µg/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert CDDP (µg/ml) +2µM 12,13- EODE	Verringerung/Erhöhung der IC <sub>50</sub> - Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5	0,46± 0,09	0,42± 0,09	1,10*
NGP	0,32± 0,10	0,36± 0,08	0,89
SK-N-AS	0,51± 0,18	0,50± 0,16	1,02
UKF-NB-2	0,30± 0,03	0,31± 0,04	0,97
UKF-NB-3	0,25± 0,07	0,27± 0,06	0,93
UKF-NB-6	0,45± 0,06	0,44± 0,07	1,02

**Tabelle 4-17: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit 12,13-EODE 2µM an parentalen chemosensitiven Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit 12,13-EODE 2µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit 12,13-EODE 2µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer)  
\* signifikant: p < 0,05.

#### 4.5.3.3 Fludrocortison

Zur stärksten IC<sub>50</sub>-Wert-Erhöhung in den parentalen Zellen kam es durch den Zusatz von 10µM Fludrocortison. Hierbei stieg die IC<sub>50</sub>-Dosis von Cisplatin in allen Zelllinien an. Am höchsten war dabei die Dosissteigerung in UKF-NB-6 um den Faktor 0,69. Mit Ausnahme von NGP waren die IC<sub>50</sub>-Werte von allen Zelllinien signifikant erhöht (p<0,05), in den Zelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-6 sogar hochsignifikant erhöht (p < 0,01).

Zelllinie	IC <sub>50</sub> - Wert CDDP (µg/ml)	IC <sub>50</sub> -Wert CDDP (µg/ml) +10µM Fludrocortison	Erhöhung der IC <sub>50</sub> - Dosis von CDDP (Faktor)
IMR-5	0,43± 0,10	0,56± 0,08	0,77*
NGP	0,28± 0,08	0,33± 0,08	0,85
SK-N-AS	0,55± 0,22	0,65± 0,23	0,85*
UKF-NB-2	0,28± 0,05	0,38± 0,09	0,74*
UKF-NB-3	0,29± 0,04	0,40± 0,07	0,73**
UKF-NB-6	0,40± 0,07	0,58± 0,08	0,69**

**Tabelle 4-18: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Fludrocortison 10µM an parentalen chemosensitiven Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Fludrocortison 10µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Fludrocortison 10µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05; \*\* hochsignifikant: p < 0,01.

### 5. Diskussion

Das Neuroblastom, der häufigste solide extrakranielle Tumor im Kindesalter, zeichnet sich durch seine biologische Heterogenität sowie seinen variablen klinischen Verlauf aus. Zum Zeitpunkt der Diagnose findet sich bei mehr als der Hälfte der Patienten eine Neuroblastomerkrankung vom high risk-Typ (Gheeya et al., 2010). Die aggressive multimodale Therapie führt hier nur zu einem Überleben von 30-40% der Patienten (Gheeya et al., 2010) und ist mit multiplen Komplikationen verbunden (Ruggiero et al., 2013). Auch die Behandlung von high risk-Rezidiven stellt eine klinische Herausforderung dar, während in der Rezidivbehandlung von low und intermediate risk-Tumoren auf erfolgreiche Therapien zurückgegriffen werden kann (Maris et al., 2007). Ursache eines Therapieversagens ist in den meisten Fällen eine Resistenzentwicklung des Tumors gegenüber den Chemotherapeutika (D'Aguzzo et al., 2010). Studien an resistenten Tumorzellen haben eine Vielzahl an Mechanismen nachgewiesen, über die diese Zellen verfügen und mit deren Hilfe sie die Wirkung der Chemotherapeutika minimieren. Diese Erkenntnisse haben wiederum Modifikationen der Therapie ermöglicht, die diese zellulären Mechanismen umgehen oder blockieren, z. B. durch den Einsatz von Histondeacetylaseinhibitoren wie Valproat (Groh et al., 2012). Bedingt durch die relativ geringe Prävalenz pädiatrischer Tumore ist die Studienlage aber, verglichen mit der von Tumorerkrankungen des Erwachsenenalters, gering. Der Bedarf an neuen, effektiven, nebenwirkungsarmen Therapieoptionen ist jedoch groß.

#### 5.1 Charakterisierung der Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB -6 und ihrer Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien

Heterogenität, sowohl in der zellulären Zusammensetzung als auch im klinischen Verhalten, ist ein Charakteristikum des Neuroblastoms (Ross et al., 2003).

Die Untersuchung der Expression verschiedener Zellmarker auf Gen- und Proteinebene sollte Hinweise auf eine neuronale, indifferente oder nicht-neuronale Differenzierung der Zellen geben und einen Vergleich der untersuchten Neuroblastomzelllinien mit den von Ross et al. (1995, 2003, 2007) propagierten N-, I- und S-Zelltypen ermöglichen. Von Interesse war dabei auch die Identifizierung von Krebsstammzellen (cancer stem cells, CSC), da Zellen des I-Typs CSC-Eigenschaften zeigen. Als einziger Zelltyp exprimieren sie

## 5. Diskussion

die Stammzellmarkerproteine CD133 und c-Kit und können sich nach Induktion bidirektional zu N- oder S-Typ-Zellen differenzieren (Ross & Spengler, 2007). Auch zeigen sie ein CSC-typisches Malignitätspotential in Form einer hohen colony forming efficiency und einer hohen Tumorigenität bei Injektion in athymische Mäuse (Walton, 2004). Im Fokus stand bei allen Untersuchungen auch die Veränderung des Expressionsprofils und eine damit einhergehende Veränderung des Zelltyps bedingt durch eine kurzzeitige Modifikation der Platinexposition bzw. die erworbene Platinresistenz der Neuroblastomzellen.

### 5.1.1. Die Expression der Stammzellmarker CD133 und c-Kit ist gering

CD133 ließ sich am Durchflusszytometer nur in den parentalen Zellen UKF-NB-2 und UKF-NB-3 sowie ihren Cisplatin-resistenten Sublinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> in sehr geringem Maße nachweisen. Die CD133-Expression von UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> war im Vergleich mit UKF-NB-3 dabei aber signifikant um den Faktor 25,8 erhöht ( $p < 0,05$ ). Der vermehrte Nachweis von CD133<sup>+</sup>-Zellen in den Cisplatin-resistenten Sublinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> unterstützt die CSC-Hypothese der positiven Selektion von CSCs durch Chemotherapeutika. Sartelet et al. (2012) beobachtete ebenfalls, dass mit Doxorubicin, Vincristin und Cisplatin chemotherapeutisch behandelte Neuroblastomzelllinien eine größere CD133<sup>+</sup>-Subpopulation aufweisen.

Im Kontrast dazu war am Durchflusszytometer die Expression von c-Kit in allen Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien, mit Ausnahme von UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, geringgradig schwächer ausgeprägt als in den jeweiligen parentalen Zellen. In UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> war sie dabei um den Faktor 0,6 signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). Die Rolle von c-Kit und seinem Liganden, dem Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF), in Bezug zum klinischen Verhalten und der Prognose von Neuroblastomen ist widersprüchlich (Krams et al., 2004; Uccini et al., 2005). Cohen et al. (1994) stellte eine signifikant höhere Expression von c-Kit-mRNA in parentalen Zellen (SK-N-SH, SK-N-BE (2), LA-N-1) und ihren N-Typ-Sublinien fest, verglichen mit den I- und S-Typ-Sublinien. Auch eine durch all-trans-Retinsäure (ATRA) hervorgerufene Ausdifferenzierung der Neuroblastomzellen führte zu einem Anstieg der c-Kit-Expression (Neumann et al., 2010). Krams et al. (2004) und Ootsuka et al. (2007) stellten ebenfalls eine enge

## 5. Diskussion

Verbindung zwischen der Expression von c-Kit und einem hohen Differenzierungsgrad der Neuroblastomzellen fest und assoziierten damit eine gute Prognose. Eine direkte Regulation des neuronalen Differenzierungsprozesses durch c-Kit und SCF konnte aber bisher in Neuroblastomen nicht dargestellt werden.

Eine eindeutige Identifikation einer CSC in den untersuchten Zelllinien ist anhand der vorliegenden Werte nicht möglich. Auch wird die Aussagekraft der sogenannten CSC-Marker, insbesondere CD133, zurzeit kontrovers diskutiert (Irollo & Pirozzi, 2013).

### **5.1.2. Keine Überexpression von EGF-R in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien**

Der epidermal growth factor (EGF) induziert eine Reihe von zellulären Reaktionen wie Zellproliferation, Inhibition der Apoptose aber auch Zelltod (Chiu et al., 2007). Die Expression des EGF-Rezeptors in Neuroblastomzellen und anderen malignen Tumoren wurde bereits vielfältig untersucht. Verschiedene Tumore zeigen eine Überexpression von EGF-R, oft ist diese dabei mit einer spezifischen Chemoresistenz oder Multidrugresistenz verbunden; der EGF-Rezeptor ist daher Ziel spezifischer Antikörpertherapien (Hoffmann et al, 2011; Michaelis et al, 2008; Hynes & Lane, 2005; Dai et al. 2005).

Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zeigten am Durchflusszytometer alle eine Expression von EGF-R; mit Ausnahme von UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> jedoch keine signifikanten Expressionsveränderungen zwischen den parentalen und resistenten Zellen. In UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> war die EGF-R-Expression im Vergleich zu UKF-NB-2 um den Faktor 0,5 signifikant vermindert ( $p < 0,01$ ). Dies steht im Kontrast zu Beobachtungen in anderen Tumorentitäten (u. a. Cervixkarzinom, OSCC (oral cavity squamous cell carcinoma)), in denen die Ausbildung einer Cisplatinresistenz mit einer Überexpression von EGF-R zu korrelieren scheint (Dai et al., 2005; Hiraishi et al., 2008). Weitere Untersuchungen von Cisplatin-resistenten Neuroblastomzelllinien und Neuroblastomgewebeproben durch Zheng et al., 2016, zeigten eine Überexpression von EGF-R in allen 5 untersuchten Neuroblastomzelllinien. In den untersuchten prä- und postchemotherapeutischen EGF-R-positiven Gewebeproben von 10 Patienten, welche eine Cisplatin-haltige Chemotherapie erhielten, konnte hier jedoch keine signifikante Zunahme der EGF-R-



## 5. Diskussion

Expression durch Cisplatin-Exposition nachgewiesen werden. Aufgrund dieser unterschiedlichen Erkenntnisse sind weitere Untersuchungen nötig, um den Nutzen einer gezielten EGF-R-Therapie in der Behandlung des Cisplatin-resistenten Neuroblastoms bewerten zu können.

### **5.1.3. Reduzierte Expression des neuronalen Marker N-CAM in den Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien**

Auch die Expression von N-CAM war am Durchflusszytometer in den Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien vermindert, in den Zellen UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> mit einer Expressionsminderung um den Faktor 0,5 und 0,4 auch signifikant (im Vergleich zu UKF-NB-3).

Das neurale Zelladhäsionsmolekül N-CAM ist ein Marker differenzierter neuronaler Zellen. Eine Herunterregulation im Vergleich zur parentalen Zelle wurde bereits von Blaheta et al. (2007) für die Vincristin-resistenten Sublinien von UKF-NB-2 und UKF-NB-3 beschrieben. Diese Zellen zeigten dabei auch ein gesteigertes invasives Verhalten. Die verminderte Expression von N-CAM reduziert die Zell-Zell-Adhäsionsfähigkeit von Neuroblastomzellen, erleichtert damit die Ablösung von Zellen aus dem Verband und begünstigt so eine Metastasierung (Blaheta et al., 2002 & 2006).

### **5.1.4 Vergleich der Genexpression von N-CAM, Tyrosinhydroxylase, Neurofilament-L, -M und -H in parentalen und Platin-resistenten Zellen**

Auch die Genexpression von N-CAM zeigte sich in den Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien von UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 vermindert. Der Proteinexpression entsprechend waren auch hier nur die Werte von UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> (fold change (fc) bis -4,4) und UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> (fc bis -7,2) signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Die Expression von N-CAM ist auf Gen- und Proteinebene kongruent.

Die Expression der Tyrosinhydroxylase (TH) war sowohl in den Cisplatin- als auch in den Carboplatin-resistenten Sublinien, im Vergleich mit den parentalen Zellen, signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Die Zellen UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> (fc bis -19,7), UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> (fc bis -42,7) und vor allem UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> (fc bis -1314,9) zeigten die stärkste Herunterregulierung der Genexpression. Die TH dient als Marker differenzierter neuronaler, insbesondere dopaminergischer Zellen, kann aber transient

## 5. Diskussion

auch von Neuroblasten exprimiert werden. In Neuroblastomzelllinien werden TH-positive Zellen daher dem N-Typ zugeordnet, TH-negative Zellen dagegen dem S-Typ (Ross et al., 1983). SH-SY5Y-Zellen, welche in Kultur sowohl den N- als auch S-Phänotyp zeigen, weisen nach Induktion der neuronalen Ausreifung durch ATRA eine erhöhte Expression von TH auf (Conte da Frola Junior et al., 2011). Die schwächere TH-Expression in den platinresistenten Sublinien spricht für einen Verlust der neuronalen Differenzierung bzw. einer negativen Selektion der neuroblastischen Tumorzellen unter Platineinwirkung.

Auch die Ergebnisse der Neurofilamentexpression sprechen für einen Verlust der neuronalen Differenzierung in den untersuchten Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien. Die drei Neurofilamentproteine NF-L, NF-M und NF-H sind Teil der Neuronen-spezifischen Intermediärfilamente und finden sich vor allem in hohen Konzentrationen in den axonalen Strukturen neuronaler Zellen. Ihre Expression war, wie die von N-CAM und TH, in der Mehrzahl der untersuchten Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien signifikant erniedrigt. UKF-NB-6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> zeigte dabei als einzige Zelle eine signifikant verminderte Expression aller drei Neurofilamente ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.5 Temporäre Platinkarenz hat wenig Einfluss auf die Genexpression

Die Platinkarenz durch Kultivierung der Zellen in Cisplatin- und Carboplatin-freiem Medium über 7, 14 und 21 Tage führte nur in UKF-NB-6<sup>r</sup> Carbo<sup>1000</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> zu signifikanten Veränderungen der Genexpression.

Bei UKF-NB-6<sup>r</sup> Carbo<sup>1000</sup> war die Expression der TH in den Passagen mit Carboplatin immer signifikant niedriger als in den Passagen ohne Carboplatin ( $p < 0,05$ ). Eine Verstärkung der Expression von TH mit zunehmender Dauer der Carboplatinkarenz zeigte sich nicht.

Die Kultivierung von UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> in Cisplatin-freiem Medium über den Zeitraum von 7 Tagen senkte die NF-M-Expression signifikant ( $p < 0,05$ ). Eine Verstärkung dieses Effekts war in weiteren Passagen mit Cisplatin-karenz jedoch ebenfalls nicht zu beobachten.

## 5. Diskussion

In den Zellen UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> kam es zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Veränderung der Genexpression von N-CAM, Tyrosinhydroxylase, Neurofilament-L, -M oder -H durch die Cisplatin- oder Carboplatinkarenz.

Eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums wäre hier sinnvoll, um die Auswirkung der Cisplatin- oder Carboplatin-Exposition auf die untersuchten Genexpressionen sicher beurteilen zu können. Des Weiteren wäre dann auch eine simultane Überprüfung des Resistenzstatus mittels MTT interessant, um die Korrelation von Platinresistenz, Platinexposition und Genexpression differenzierter darstellen zu können.

### 5.1.6 Klassifizierung der Zelllinien nach Phänotyp und Differenzierungsgrad

Alle Zelllinien exprimierten sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Markerproteine, wenn auch in verschiedener Intensität. Hier zeigte sich bereits eine verminderte Expression von NCAM in den platinresistenten Sublinien. Dies bestätigte sich auch auf der Ebene der Genexpression, hier zeigte sich zusätzlich die Expression der TH und die der drei Neurofilamente NF-L, -M und -H signifikant erniedrigt. Sowohl in den parentalen als auch in den platinresistenten Zelllinien konnte der Stammzellmarker CD133 nur schwach bis gar nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis von c-Kit und EGF-R gelang dagegen in allen Zelllinien, ein signifikanter Unterschied zwischen der parentalen Zelle und der resistenten Sublinie bestand nur bei UKF-NB-2 und UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>. Alle untersuchten Zelllinien wiesen somit sowohl Charakteristika neuronaler als auch nicht-neuronaler Zellen auf, die für die indifferenten I-Typ-Zellen typische Stammzellmarkerexpression war jedoch gering. Ein ähnliches Verhalten ist auch von der Zelllinie IMR-32 bekannt (Bégaud-Grimaud et al., 2007). Für eine definitive Zuordnung sollte daher das Testspektrum um weitere neuroblastische Marker (HuC, HuD, NSE, Chromogranin A) und nicht-neuronale Marker (Vimentin, Tyrosinase, Desmin) ergänzt werden.

Die beiden von ihrem morphologischen Phänotyp auffälligsten Zelllinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> ließen sich nicht eindeutig dem ihrer Morphologie entsprechenden Zelltyp zuordnen. UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> wächst in Aggregaten

## 5. Diskussion

(Pseudoganglia), ist fast vollständig freischwimmend und entspricht somit morphologisch stärker einer Zelle vom N-Typ als UKF-NB-2. Die Expression der neuronalen Marker war aber gegenüber der parentalen Zelle geringer ausgeprägt. Bei UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> legen der geringe bis fehlende Nachweis von Stammzellmarkern sowie die Herunterregulierung der neuronalen Marker, insbesondere der Tyrosinhydroxylase, nahe, dass es sich tatsächlich der Morphologie der Zellkultur entsprechend um eine Zelle vom S-Typ handelt. Da die EGF-R-Expression aber für diesen Zelltyp gering ausfällt, sind weitere Testungen auf nicht-neuronale Marker indiziert, um eine zweifelsfreie Zuordnung zu erlauben. Der Nachweis von S100A6 (Calcyclin) würde hier eine gliale Ausreifung bestätigen (Acosta et al, 2009).

Auch ist generell die Rolle von EGF-R in dieser Klassifizierung zu hinterfragen. Ross et al. (1995; 2003; 2007) schreibt den niedrig-malignen S-Typ-Zellen eine hohe und den hochmalignen I-Typ-Zellen eine mäßige EGF-R-Expression zu. Die natürliche Expression von EGF-R in Gliazellen und glatten Muskelzellen erklärt die Assoziation mit den S-Typ-Zellen des Neuroblastoms. Da S-Typ-Zellen aber als niedrig-maligne beschrieben werden, steht dies im Kontrast zu diversen Untersuchungen, die verstärkt EGF-R exprimierenden Neuroblastom- und anderen Tumorzellen ein hohes Malignitätspotenzial u. a. bedingt durch eine ausgeprägte Chemoresistenz attestieren (Hoffmann et al, 2011; Michaelis et al., 2008).

### 5.2 Anoikis-Induktion durch Poly-HEMA

Die Untersuchung zum Anoikis-Verhalten der Zelllinien erfolgte zunächst unter normalen Zellkulturbedingungen. Die Zelllinien verhielten sich dabei analog zu ihren in Kultur beobachteten Morphologien zum Teil sehr unterschiedlich bei Exposition gegenüber Poly-HEMA.

Die unter normalen Zellkulturbedingungen fast vollständig nicht-adhären wachsenden UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> zeigten erwartungsgemäß keine signifikante Beeinträchtigung der Zellviabilität durch Verlust des Zell-Matrix-Kontakts bedingt durch die Beschichtung der Zellkulturplatten mit Poly-HEMA. Auch die Zellviabilität der parentalen Zelle UKF-NB-2 war nicht signifikant beeinträchtigt.

## 5. Diskussion

UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> dagegen wächst in der Zellkultur als stark adhärenter Monolayer und reagierte auf den Kontaktverlust mit einem signifikanten Abfall der Zellviabilität bis auf 40% ( $p < 0,05$ ). Aber auch UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> zeigte eine signifikante Reduktion der Viabilität auf 55,3% ( $p < 0,05$ ). Doch auch hier war die Zellviabilität der parentalen Zelle UKF-NB-6 nicht signifikant beeinträchtigt.

UKF-NB-3 und seine Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> zeigten alle einen signifikanten Viabilitätsverlust durch Anoikis induziert durch Poly-HEMA.

Nur bei UKF-NB-6 führte der Erwerb einer Platinresistenz also zu einer signifikant veränderten Toleranz gegenüber Anoikis. Die Ausbildung der Cisplatin- und insbesondere der Carboplatinresistenz scheint hier mit einer verstärkten Sensitivität der Zellen gegenüber Anoikis einherzugehen.

Zur weiteren Untersuchung der Zellviabilität unter Einfluss von Poly-HEMA in Kombination mit den beiden Platinderivaten wurden nun die Zelllinien mit Cisplatin- und Carboplatin in steigender Dosierung im Sinne einer Verdünnungsreihe auf Poly-HEMA-Beschichtung kultiviert. Dabei wurden die chemoresistenten Sublinien nur am jeweils adaptierten Platinderivat getestet. Hierbei ergab sich jedoch kein synergistischer Effekt der Substanzen, es bestätigten sich lediglich die vorherigen Beobachtungen aus der Zellkultur. Bei Zelllinien, bei denen aufgrund ihrer Morphologie die Zellviabilität durch die Poly-HEMA-Beschichtung nicht oder nur wenig beeinflusst wird, wie im Falle von UKF-NB-2, UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6, ist die Viabilität lediglich von der Cisplatin- oder Carboplatindosis abhängig. In diesem Fall besteht kein signifikanter Unterschied zwischen adhärenten und nicht-adhärenten Kulturbedingungen. Bei stark adhärent wachsenden Zellen wie UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> jedoch ist die Zellviabilität bereits durch die Poly-HEMA-Beschichtung alleine so stark beeinträchtigt, dass durch Zugabe von Carboplatin kein zusätzlicher signifikanter Zellviabilitätsverlust nachzuweisen ist.

Die Resistenz gegenüber Anoikis ist eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen. Ein wichtiger Mechanismus dieser Resistenz ist die Überexpression des Tyrosinkinase-Rezeptors B (TrkB) (Geiger & Peiper, 2005; Douma et al., 2004). TrkB

## 5. Diskussion

fördert, zusammen mit dem brain-derived neurotrophic factor (BDNF), die Proliferation, Differenzierung und das Überleben neuronaler Zellen. Eine Überexpression von TrkB verändert die Zellform, die Zellen runden ab, lösen sich von ihrer Matrix und werden so resistent gegenüber Anoikis, was sie zu hochaggressiven Tumorzellen macht (Douma et al., 2004). Eine Überexpression von TrkB findet sich in Neuroblastomen und weiteren malignen soliden Tumoren und wird mit einer schlechten Prognose assoziiert (Fujikawa et al., 2012; Geiger & Peeper 2005). Eine Untersuchung der Anoikis-resistenten Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6 hinsichtlich der Expression von TrkB wäre daher interessant. Für die Anoikis-sensiblen Zellen könnte eine Testung von Anoikis-auslösenden Wirkstoffen wie Cilengitide neue Behandlungsmöglichkeiten aufzeigen. Bisherige Untersuchungen an Gliomzellen zeigten vielversprechende Resultate (Leblond et al., 2013).

### **5.3 Wirkungen der ausgewählten Substanzen der Connectivity Map auf die Cisplatin-Resistenz**

Neue Möglichkeiten in der Therapie chemoresistenter Tumore verspricht auch die Nutzung bioinformatischer Datenbanken wie der Connectivity Map des Broad Institutes. Sie diente in dieser Arbeit der Entdeckung neuer, potenziell resensibilisierender Wirkstoffe (Resensitizer) gegenüber Cisplatin. Sie verknüpft die eingegebenen zu untersuchenden Gensignaturen der Neuroblastomzellen mit den gespeicherten Gensignaturen aus ihrer Datenbank und erstellt einen connectivity score, welcher ein Maß für die Übereinstimmung der Signaturen ist. Ein negativer connectivity score weist auf ein gegensätzliches Expressionsprofil hin. Die in dieser Arbeit untersuchten Stoffe besitzen alle einen negativen connectivity score gegenüber resistenzspezifischen Signaturen der untersuchten Neuroblastomzelllinien und qualifizieren sich somit als potenzielle Resensitizer. Neben den Neuroblastomzelllinien UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 wurden in diesen Versuchen auch die Neuroblastomzelllinien IMR-5, NGP und SK-N-AS jeweils gemeinsam mit ihren Cisplatin-resistenten Sublinien untersucht. Um eine Beeinflussung der Zellviabilität durch eine toxische Wirkung der Resensitizer selbst ausschließen zu können, wurde für jeden Stoff die höchste nicht-toxische Konzentration ermittelt. Als nicht-toxisch galt

## 5. Diskussion

eine Stoffkonzentration, wenn die Viabilität aller damit behandelter Zelllinien über 80% lag.

### 5.3.1 Pararosanilin und Tolbutamid wirken als Resensitizer

Die Kombination von 100  $\mu$ M Pararosanilin mit Cisplatin führte zu einer Absenkung der  $IC_{50}$ -Werte von Cisplatin in allen resistenten Sublinien um 17,4% bis 46,5% im Vergleich zur jeweils parental Zelle. Für NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> (-46,5%), SK-N-AS<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup> (-23,5%) und UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> (-18,1%) war die Verringerung des  $IC_{50}$ -Werts signifikant ( $p < 0,05$ ), für IMR-5<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> (-29,3%) sogar hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Diese Wirkung lässt sich an Hand der aktuellen Datenlage nicht hinreichend erklären. Zu Pararosanilin finden sich lediglich vor allem tierexperimentelle Studien, welche ihm eine Kanzerogenität zuschreiben (Lunn R, 12th Report on carcinogens, 2011).

1000  $\mu$ M Tolbutamid führten in Kombination mit Cisplatin ebenfalls zu einem verstärkten Abfall der Zellviabilität in allen resistenten Sublinien. Bei den Sublinien IMR-5<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>, UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> halbierte sich die benötigte Cisplatindosis, es zeigte sich eine signifikante Absenkung der  $IC_{50}$ -Werte um bis zu 59,2% ( $p < 0,05$ ). Die Veränderung der  $IC_{50}$ -Werte von NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> waren, mit einer Reduktion um 9,0%, deutlich geringer, jedoch hochsignifikant ( $p < 0,01$ ).

Tolbutamid, ein Medikament aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe, wird zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt und wirkt als Inhibitor der ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanäle (KATP). Diese und andere Ionenkanäle sind wichtig für den Zellzyklus und die Zellproliferation. Insbesondere KATP sollen, vermittelt über die extracellulär signal-regulated kinase (ERK), bei der Proliferation verschiedener Tumorzellen eine Rolle spielen. Ihr Einfluss auf die Proliferation von Gliomzellen wurde mittels Tolbutamid durch Huang et al. (2009) nachgewiesen. Dabei wurden Gliomzellen, welche eine höhere Expression von KATP im Vergleich zu gesundem Gewebe zeigten, mit Tolbutamid behandelt. Tolbutamid, als Inhibitor von KATP, unterdrückte die Proliferation der Gliomzellen und führte zu einem Zellzyklusarrest in der  $G_0/G_1$ -Phase. Dieser Effekt ließ sich bei alleiniger Applikation von Tolbutamid in den Neuroblastomzellkulturen dieser Arbeit nicht beobachten, die Zellviabilität lag immer bei >80% der unbehandelten Kontrolle. Worauf nun die toxisitätsverstärkende

## 5. Diskussion

Wirkung von Tolbutamid in Kombination mit Cisplatin basiert und ob es sich um einen resensibilisierenden Effekt zu Gunsten von Cisplatin handelt, bleibt daher unklar.

Da bei initialen technischen Problemen aus Zeit- und organisationsbedingten Gründen keine Testung von Pararosanilin und Tolbutamid an den parentalen Zellen erfolgt ist, sollte dies im Rahmen weiterer Untersuchungen ergänzt werden.

### **5.3.2 Fludrocortison verstärkt die Cisplatin-Resistenz und desensibilisiert Zellen für Cisplatin**

Die Zugabe vom 10 $\mu$ M Fludrocortison führte zu einer Desensibilisierung aller getesteten resistenten und parentalen Zelllinien gegenüber Cisplatin. Die Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes von Cisplatin bei Zugabe von Fludrocortison auf 118,9-144,8% war dabei in allen parentalen Zellen, mit Ausnahme von NGP, signifikant; in UKF-NB6 sogar hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). Auch zwei der getesteten resistenten Sublinien (NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> und SK-N-AS<sup>r</sup>CDDP<sup>500</sup>) zeigten eine signifikante Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes auf 124,5% bzw. 130,5% ( $p < 0,05$ ).

Ursache der Desensibilisierung kann die neuroprotektive und antiapoptotische Wirkung der Mineralkortikoid-Rezeptoren (MR) sein. Eine Induktion der MR-Expression in reifen Neuronen durch Behandlung mit Aldosteron wurde durch Munier et al. (2010) nachgewiesen. Studien an Hippocampus- und Cortex- Zellkulturen zeigten wiederum eine rapide Zunahme der MR nach neuronaler Verletzung, z. B. durch einen toxischen Stoff (Macleod et al., 2003). Beide Faktoren lagen während des MTT-Versuchs vor, der toxische Reiz durch Cisplatin sowie die Exposition gegenüber Fludrocortison, einem synthetischen Aldosteronanalogen. Eine Stimulation anti-apoptotischer Signalwege durch MR mittels Beeinflussung der Ratio des pro-apoptotischen Proteins Bax zu Gunsten der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, sowie eine Senkung des zellulären p53-Gehalts durch MR-Aktivierung zeigte Almeida et al. (2000). Ob allerdings Resultate, welche aus Untersuchungen an reifen neuronalen Zellen stammen, auf Zellen des als heterogen bekannten, aber doch größtenteils unreifen Neuroblastoms übertragen werden können, müssen weitere Untersuchungen zeigen.



### **5.3.3 12,13-EODE führt zu keiner signifikanten Veränderung des IC<sub>50</sub>-Wertes von Cisplatin in resistenten Sublinien**

12, 13-EODE bewirkte keine signifikante Veränderung des IC<sub>50</sub>-Wertes von Cisplatin in den resistenten Sublinien (IC<sub>50</sub> –Werte zwischen 91,8% und 110,1%). Eine signifikante Senkung des IC<sub>50</sub>-Werts auf 92,8% war nur in der parentalen Zelle IMR-5 zu beobachten. Insgesamt ließ sich sonst eine mehrheitliche nicht-signifikante Resistenzverstärkung in den verschiedenen Zellen beobachten. Dies passt zu einem von Markarevich et al. (2005) beobachteten Phänomen, nachdem Leukotoxin-Diole, zu denen auch der aktive Metabolit von 12, 13-EODE, 12,13-DiHOME gehört, die Proliferation von Tumorzellen (MCF-7 Mammakarzinomzellen) stimulieren.

### **5.3.4 Topiramamat erhöht den IC<sub>50</sub> von Cisplatin in resistenten Sublinien**

Die mit Topiramamat ko-inkubierten Cisplatin-resistenten Sublinien zeigten alle eine Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes von Cisplatin; bei UKF-NB3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> (119,6%) war dieser signifikant ( $p < 0,05$ ), bei NGP<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> (112,3%) sogar hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Die geringeren IC<sub>50</sub>-Erhöhungen in allen parentalen Zellen waren nicht signifikant.

Topiramamat ist wie Valproat ein Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor (Eyal et al., 2004). In verschiedenen Arbeiten der letzten Jahre konnte eine mögliche antitumorale Wirkung von Valproat u. a. bedingt durch seine Funktion als HDAC-Inhibitor an Neuroblastomzellen nachgewiesen werden (Cinatl J Jr. et al., 1996; Michaelis et al., 2007). Die Inhibition von HDAC durch Valproat führte zu einer verminderten Zellproliferation und Induktion des Zellzyklusarrests sowie einer Veränderung des DNA-Methylierungsstatus zu Gunsten von Tumorsuppressorgenen (Gu et al., 2012). Eine Einleitung der Apoptose über den mitochondrialen Signalweg, via Bax-Aktivierung und Bcl2-Down-Regulierung, sowie eine Wiederherstellung der p53-Funktion durch Valproat in Neuroblastomzelllinien wurde durch Condorelli et al. (2008) nachgewiesen. Topiramamat selbst wird ein Einfluss auf das Neuronenwachstum und eine neuroprotektive Wirkung bei Applikation nach vorangegangener neuronaler Schädigung durch Apoplex oder Status epilepticus zugeschrieben (Smith-Swintosky et al., 2001; Gensel et al., 2012).

## 5. Diskussion

Ob man die in den Versuchen beobachtete Erhöhung des  $IC_{50}$ -Wertes von Cisplatin mit einer neuroprotektiven Wirkung von Topiramamat erklären kann, ist fraglich. Eine Valproat-ähnliche Wirkung auf die Tumorzellen ließ sich in den durchgeführten Versuchen ebenfalls nicht erkennen. Vielleicht ist, ähnlich wie in den Versuchen von Groh et al. (2012), der Zeitpunkt der Applikation des jeweiligen Stoffes ausschlaggebend für die Wirkung auf die Zellen. Denn dort zeigte sich nur eine Wirkungsverstärkung von Etoposid durch Valproat in UKF-NB-4-Neuroblastomzellen, wenn die Zellen zuerst in Etoposid inkubiert wurden und Valproat später hinzugegeben wurde; geschah es in umgekehrter Reihenfolge, wurde die Zytotoxizität von Etoposid nicht gesteigert.

### 5.3.5 Wertung der Ergebnisse zur Connectivity Map

Auch wenn die in dieser Arbeit erreichten Resensibilisierungen von Cisplatin-resistenten Sublinien durch Pararosanilin und Tolbutamid, mit einer  $IC_{50}$ -Dosisreduktion von Cisplatin von bis zu 59,2% (entsprechend dem Faktor 2,45), sehr vielversprechend erscheinen, zeigen sie doch kein so eindeutiges Ergebnis wie Lamb et al. (2006) mit der  $IC_{50}$ -Reduktion von Dexamethason durch Sirolimus um mehr als den Faktor 50. Gleichzeitig stehen diesen durch die Connectivity Map richtig prognostizierten Erfolgen der Resensibilisierung mehrere falsch prognostizierte Stoffwirkungen gegenüber. Die Mehrzahl der hier untersuchten Stoffe verstärkte entgegen der Connectivity Map Prognose die Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin und dies zum Teil signifikant um bis zu 144,82% der  $IC_{50}$ -Dosis von Cisplatin alleine (entsprechend dem Faktor 1,45).

Es stellt sich daher die Frage, ob die den Daten der Connectivity Map zugrundeliegenden Genexpressionsprofile der zwei epithelialen Zelllinien (Mammakarzinom MCF7, Prostatakarzinom PC3) und nicht-epithelialen Zelllinien (Leukämie HL60, Melanom SKMEL5) das Neuroblastom hinreichend repräsentieren können. Ein weiterer Ausbau der Datenbank, nicht nur in Hinsicht auf weitere Stoffe, wie bereits in der 2. Version der Connectivity Map geschehen, sondern um weitere Zelllinien, könnte die Repräsentation auch anderer Tumore durch die Connectivity Map-Daten verbessern.

## 5. Diskussion

Hinsichtlich einer Untersuchung der beiden identifizierten potentiellen Resensitizer Pararosanilin & Tolbutamid in vivo wäre, neben effektiven Dosen und Verabreichungswegen, auch auf eventuelle Nebenwirkungen zu achten. Die Mehrheit der in der Connectivity Map gelisteten Wirkstoffe sind von der U. S. Food and Drug Administration (FDA) für die Anwendung am Menschen freigegeben (Lamb, 2007). Im Fall von Pararosanilin besteht jedoch der Verdacht der Kanzerogenität (Lunn R, 12th Report on carcinogens, 2011); Risiko und Nutzen sind hier noch genauer zu untersuchen. Wenn sich Tolbutamid in weiteren Untersuchungen als Cisplatin-Resensitizer bestätigen sollte, müsste bei einem Einsatz als chemosensibilisierendes Adjuvanz auch die primäre Wirkung von Tolbutamid auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas bedacht werden.

Auch wenn die Nutzung der Connectivity Map in dieser Arbeit nicht zur Identifizierung eines definitiv Chemoresistenz-aufhebenden Stoffes geführt hat, zeigt sie doch Potential, welches durch einen weiteren Ausbau der Datenbank gesteigert werden sollte.

### 6. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters. Bei Diagnosestellung befinden sich die meisten Patienten bereits in fortgeschrittenen Tumorstadien; trotz intensiver multimodaler Therapie überleben nur 30-40% der Hochrisikopatienten die Erkrankung. Zum Therapieversagen führt in den meisten Fällen eine Resistenzentwicklung des Tumors gegenüber den Chemotherapeutika. Die Entdeckung neuer effektiver Therapieansätze und Überwindung der Chemoresistenz durch Resensibilisierung der Tumorzellen ist daher ein dringendes Forschungsanliegen.

Zur Charakterisierung der Zelllinien im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Zellmorphologie, die Gen- und Proteinexpression verschiedener Differenzierungs- bzw. Krebsstammzell-Marker und das Anoikis-Verhalten der Neuroblastomzellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6 sowie ihrer Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien untersucht. Der zytomorphologischen Phänotyp der untersuchten Zellen ließ keine eindeutigen Schlüsse auf eine neuronale, indifferente oder nicht-neuronale Differenzierung der Zellen zu. Gemessen an der Expression der neuronalen Marker NCAM, TH und der Neurofilamente L, M und H zeigte jedoch die Mehrzahl der untersuchten Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Sublinien einen signifikanten Verlust der neuronalen Differenzierung im Vergleich zu ihren parentalen Zellen. Dieser Effekt war auch durch eine temporäre Platinkarenz nicht vollständig reversibel.

Der EGF-Rezeptor, dessen Überexpression als negativer prognostischer Marker für den Therapieerfolg gilt, wurde von allen untersuchten Zelllinien exprimiert, es ließ sich jedoch keine signifikant verstärkte Expression in den resistenten Sublinien nachweisen. Eine Krebsstammzelle ließ sich in den untersuchten Zelllinien bei schwacher bis fehlender Stammzellmarkerexpression von CD133 und c-Kit nicht eindeutig identifizieren.

Die Resistenz gegenüber Anoikis ist eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastomzelllinien zeigten 3 von 8 Zelllinien, UKF-NB-2, UKF-NB-2<sup>rCDDP<sup>500</sup></sup> und UKF-NB-6, eine Anoikis-Resistenz. UKF-NB-3 sowie ihre beiden Sublinien waren Anoikis-sensibel, sie zeigten alle einen signifikanten Viabilitätsverlust durch Kultivierung auf Poly-HEMA-Beschichtung und daraus resultierendem Adhärenzverlust. Bei UKF-NB-6 nahm durch den Erwerb der

## 6. Zusammenfassung

Platinresistenz die Toleranz gegenüber Anoikis ab, wie man an dem signifikanten Viabilitätsverlust der Sublinien UKF-NB-6<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> und UKF-NB6<sup>r</sup>Carbo<sup>1000</sup> unter nicht-adhärenenten Bedingungen sieht. Die Ausbildung der Cisplatin- und insbesondere der Carboplatinresistenz geht hier mit einer signifikant verstärkten Sensitivität der Zellen gegenüber Anoikis einher. Ein synergistischer Effekt auf die Zellviabilität durch Anoikis-induzierende PolyHEMA-Beschichtung und simultane Cisplatin- oder Carboplatin-Exposition ließ sich jedoch nicht beobachten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die durch die Connectivity Map ermittelten potentiellen Resensitizer für Cisplatin (Pararosanilin, Tolbutamid, Fludrocortison, 12,13-EODE und Topiramate) und deren Wirkung auf die Viabilität der Neuroblastomzelllinien (IMR-5, NGP, SK-N-AS, UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6) sowie ihrer Cisplatin-resistenten Sublinien untersucht.

Hierbei zeigte die Kombinationstherapie von Cisplatin mit 12,13-EODE, Topiramate oder Fludrocortison keine signifikante Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Therapie mit Cisplatin alleine. Ein z. T. signifikanter Anstieg des IC<sub>50</sub>-Werts von Cisplatin in den getesteten parentalen Zellen und resistenten Sublinien ließ eher einen desensibilisierenden Effekt dieser Stoffe gegenüber Cisplatin vermuten.

Die Kombination von Cisplatin mit Pararosanilin oder Tolbutamid hingegen hatte einen deutlich wachstumshemmenden Effekt auf alle untersuchten resistenten Sublinien. Die IC<sub>50</sub>-Werte von Cisplatin wurden hier in fast allen Zelllinien signifikant reduziert, z. T. bis um den Faktor 2,45, was einer Halbierung der Cisplatin-Dosis entspricht. Pararosanilin und Tolbutamid erwiesen sich somit als mögliche Resensitizer für Cisplatin in Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen.

Diese Daten lassen erkennen, dass die Connectivity Map ein vielversprechendes Werkzeug in der gezielten Therapie von chemoresistenten Neuroblastomen sein kann. In Kombination mit bisher gängigen Therapieschemata könnten Resensitizer den Erfolg der Behandlung möglicherweise deutlich verbessern. Die mögliche Toxizität der identifizierten Resensitizer, insbesondere Pararosanilin, und damit den tatsächlichen Stellenwert dieses Therapieansatzes wird man jedoch zunächst in vivo noch weiter untersuchen müssen.

### 7. Summary

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor of infancy. At the time of initial diagnosis most patients are already in advanced tumor stages. Despite intensive multimodal therapy only 30-40% of high-risk patients survive. In most cases treatment failure is due to development of chemotherapy resistance. Therefore, the discovery of new effective therapies and ways to overcome chemotherapy resistance by resensitizing tumor cells is an important research interest.

The first part of this thesis focussed on the characterisation of the neuroblastoma cell lines UKF-NB-2, UKF-NB-3 and UKF-NB-6 as well as their cisplatin- and carboplatin resistant sublines. For this their cell morphology, their gene and protein expression of different stem cell and differentiation markers as well as their anoikis tolerance was examined. The observed cytomorphologic phenotypes alone could not predict a neuronal, indifferent or non-neuronal differentiation of the cells.

The expression of neuronal markers NCAM, TH and neurofilaments L, M and H showed a significant loss of neuronal differentiation in the majority of the cisplatin and carboplatin resistant sublines compared to their parental cells. This effect could not be reversed by a temporary platin abstinence. EGF-receptor was expressed in all examined cell lines. An overexpression of EGF-receptor in the resistant sublines, a negative prognostic marker for therapeutic success, was not detected. A cancer stem cell could not be clearly identified due to low or lacking expression of stem cell markers CD133 and c-Kit.

Anoikis resistance is a known prerequisite for tumor metastasis. Three of eight neuroblastoma cell lines used in this thesis, UKF-NB-2, UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> and UKF-NB-6, showed anoikis resistance. UKF-NB-3 and its sublines were anoikis sensitive, they all showed a significant decrease in viability through loss of adhesion when cultivated on polyHEMA-coated surfaces. Acquired chemoresistance in UKF-NB-6 led to significantly impaired anoikis tolerance in its sublines UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> and UKF-NB6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup>. The development of a cisplatin and especially a carboplatin resistance in these neuroblastoma cells leads to a significantly increased sensitivity for anoikis. A synergistic effect on cell viability through anoikis-inducing polyHEMA-coating and simultaneous cisplatin or carboplatin exposure could not be observed.

## 7. Summary

In the second part of this thesis potential resensitizers (pararosaniline, tolbutamide, fludrocortisone, 12,13-EODE and topiramate) were determined by use of the connectivity map to study their influence on cell viability in neuroblastoma cell lines (IMR-5, NGP, SK-N-AS, UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6) and their cisplatin-resistant sublines.

Combination therapy of cisplatin with 12,13-EODE, topiramate or fludrocortisone did not show a significant decrease in cell viability compared to treatment with cisplatin alone. Furthermore, a partially significant increase of  $IC_{50}$ -value in the examined cell lines, parental cell lines as well as cisplatin resistant sublines, even suggests a desensitizing effect of these substances towards cisplatin.

Combination therapy of cisplatin with pararosaniline or tolbutamide however had an obvious growth inhibiting effect in all resistant sublines. In almost all cell lines  $IC_{50}$ -values of cisplatin were significantly reduced up to factor 2.45; the needed cisplatin dosage was consequently reduced by half. These results have proven pararosaniline and tolbutamide to be possible resensitizers for cisplatin in cisplatin-resistant neuroblastoma sublines.

In conclusion, all these results show that the connectivity map is a promising tool for targeted therapy of chemoresistant neuroblastoma cells. In combination with established therapy regimes resensitizers could improve therapeutic success. Possible toxicity of the identified resensitizers, especially pararosaniline, and therefore the significance of this therapeutic approach should be further investigated in vivo.

## 8. Literaturverzeichnis

- Acosta S, Lavarino C, Paris R, Garcia I, de Torres C, Rodríguez E, Beleta H, Mora J. (2009): Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells. *BMC Dev Biol*, 9: 12.
- Almeida OF, Condé GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TM. (2000): Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J*, 14(5): 779-90.
- Arnold AC, Shibao C. (2013): Current concepts in orthostatic hypotension management. *Curr Hypertens Rep*, 15(4): 304-12.
- Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM (2010): Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)*, 9(7): 745-53.
- Bégaud-Grimaud G, Battu S, Lazcoz P, Castresana JS, Jauberteau MO, Cardot PJ (2007): Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by sedimentation field flow fractionation. *Int J Oncol*, 1(4): 883-92.
- Berridge MV, Tan AS (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2): 474-82.
- Blaheta RA, Hundemer M, Mayer G, Vogel JU, Kornhuber B, Cinatl J, Markus BH, Driever PH, Cinatl J Jr (2002): Expression level of neural cell adhesion molecule (NCAM) inversely correlates with the ability of neuroblastoma cells to adhere to endothelium in vitro. *Cell Commun Adhes*. 2002 May-Jun;9(3):131-47.
- Blaheta RA, Daher FH, Michaelis M, Hasenberg C, Weich EM, Jonas D, Kotchetkov R, Doerr HW, Cinatl J Jr (2006): Chemoresistance induces enhanced adhesion and transendothelial penetration of neuroblastoma cells by down-regulating NCAM surface expression. *BMC Cancer* 2006 Dec. 21, 6: 294.



## 8. Literaturverzeichnis

- Blaheta RA, Michaelis M, Natsheh I, Hasenberg C, Weich E, Relja B, Jonas D, Doerr HW, Cinatl J Jr (2007): Valproic acid inhibits adhesion of vincristine- and cisplatin-resistant neuroblastoma tumour cells to endothelium. *Br J Cancer*, 4; 96(11): 1699-706.
- Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR, Vandesompele J, Van Roy N: Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999 Jun 24; 340(25): 1954-61.
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. (1993): Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*, 11(8): 1466-77.
- Brodeur GM (2011): Knowing Your ABCs: Novel Functions of ABCC Transporters. *J Natl Cancer Inst*, 103(16): 1207-8.
- Charlet J, Schnekenburger M, Brown KW, Diederich M (2012): DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol*, 83(7):858-65.
- Chiu B, Mirkin B, Madonna MB (2007): Epidermal growth factor can induce apoptosis in neuroblastoma. *J Pediatr Surg*, 42(3): 482-8.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1): 156-9.
- Chou TC, Talalay P (1984): Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 22: 27-55.
- Cinatl J Jr, Cinatl J, Scholz M, Driever PH, Henrich D, Kabickova H, Vogel JU, Doerr HW, Kornhuber B (1996): Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs*. 1996 Sep;7(7):766-73.
- Cohen PS, Chan JP, Lipkuns kaya M, Biedler JL, Seeger RC (1994): Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group. *Blood*, 84(10): 3465-72.

## 8. Literaturverzeichnis

- Condorelli F, Gnemmi I, Vallario A, Genazzani AA, Canonico PL (2008): Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol*, 153(4): 657-68.
- Conte da Frota Junior ML, Pires AS, Zeidán-Chuliá F, Bristot IJ, Lopes FM, de Bittencourt Pasquali MA, Zanotto-Filho A, Behr GA, Klamt F, Gelain DP, Moreira JC (2011): In vitro optimization of retinoic acid-induced neuritogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Mol Cell Biochem*, 358(1-2): 325-34.
- D'Aguzzo S, D'Alessandro A, Pieroni L, Roveri A, Zaccarin M, Marzano V, De Canio M, Bernardini S, Federici G, Urbani A (2011): New insights into neuroblastoma cisplatin resistance: a comparative proteomic and meta-mining investigation. *J Proteome Res*, 10(2): 416-28.
- Dai Q, Ling YH, Lia M, Zou YY, Kroog G, Iwata KK, Perez-Soler R (2005): Enhanced sensitivity to the HER1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib hydrochloride in chemotherapy-resistant tumor cell lines. *Clin Cancer Res*, 11(4):1572-8.
- De Preter K, De Brouwer S, Van Maerken T, Pattyn F, Schramm A, Eggert A, Vandesompele J, Speleman F (2009): Meta-mining of neuroblastoma and neuroblast gene expression profiles reveals candidate therapeutic compounds. *Clin Cancer Res*, 15(11): 3690-6.
- Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS (2004): Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*, 430(7003): 1034-39.
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M (2004): The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia*, 45(7): 737-44.
- Eyler CE, Rich JN (2008): Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 26(17): 2839-45.
- Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, Christen RD, Howell SB (1996): The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*, 56(21): 4881-6.

## 8. Literaturverzeichnis

- Fujikawa H, Tanaka K, Toiyama Y, Saigusa S, Inoue Y, Uchida K, Kusunoki M (2012): High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. *J Gastroenterol*, 47(7): 775-84.
- Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (Hrsg.) (2006): *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer Verlag Berlin und Heidelberg, 829-846.
- Geiger TR, Peeper DS (2005): The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective. *Cancer Res*, 65(16): 7033-6.
- Gensel JC, Tovar CA, Bresnahan JC, Beattie MS (2012): Topiramate treatment is neuroprotective and reduces oligodendrocyte loss after cervical spinal cord injury. *PLoS One*, 7(3): e33519.
- Gheeya J, Johansson P, Chen QR, Dexheimer T, Metaferia B, Song YK, Wei JS, He J, Pommier Y, Khan J (2010): Expression profiling identifies epoxy anthraquinone derivative as a DNA topoisomerase inhibitor. *Cancer Lett*, 293(1): 124-31.
- Gianasi E, Wasil M, Evagorou EG, Kedde A, Wilson G, Duncan R (1999): HEMA copolymer platinumates as novel antitumour agents: in vitro properties, pharmacokinetics and antitumour activity in vivo. *Eur J Cancer*, 35(6): 994-1002.
- Graf N, Ang WH, Zhu G, Myint M, Lippard SJ (2011): Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinumated DNA and cisplatin/oxaliplatin cytotoxicity. *Chembiochem*, 12(7): 1115-23.
- Groh T, Hrabeta J, Poljakova J, Eckschlager T, Stiborova M (2012): Impact of histone deacetylase inhibitor valproic acid on the anticancer effect of etoposide on neuroblastoma cells. *Neuro Endocrinol Lett*, 33 Suppl 3: 16-24.
- Gu S, Tian Y, Chlenski A, Salwen HR, Lu Z, Raj JU, Yang Q (2012): Valproic acid shows a potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. *Anticancer Drugs*, 23(10): 1054-66.
- Guadamillas MC, Cerezo A, del Pozo MA (2011): Overcoming anoikis – pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci*, 124: 3189-3197.
- Han D, Spengler BA, Ross RA (2011): Increased wild-type N-ras activation by neurofibromin down-regulation increases human neuroblastoma stem cell malignancy. *Genes Cancer*, 2(11): 1034-43.

## 8. Literaturverzeichnis

- Hayakawa M, Sugiyama S, Takamura T, Yokoo K, Iwata M, Suzuki K, Taki F, Takahashi S, Ozawa T (1986): Neutrophils biosynthesize leukotoxin, 9, 10-epoxy-12-octadecenoate. *Biochem Biophys Res Commun*, 137(1): 424-30.
- Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Tojyo I, Matsumoto T, Kiga N, Negoro K, Fujita S (2008): EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Pathol Oncol Res*. 2008 Mar;14(1):39-43.
- Hoffmann K, Xiao Z, Franz C, Mohr E, Serba S, Büchler MW, Schemmer P (2011): Involvement of the epidermal growth factor receptor in the modulation of multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Cancer Cell Int*, 11: 40.
- Holzer AK, Manorek GH, Howell SB (2006): Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol.*, 70(4): 1390-4.
- Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ (2010): Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol*, 77(6): 887-94.
- Huang L, Li B, Li W, Guo H, Zou F (2009): FATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity. *Carcinogenesis*, 30(5): 737-44.
- Hughes M, Marsden HB, Palmer MK (1974): Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer*, 34(5): 1706-11.
- Hynes NE, Lane HA (2005): ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5(5): 341-54.
- Irollo E, Pirozzi G (2013): CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res*, 5(6): 563-581.
- Kartalou M, Essigmann JM (2001): Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*, 478(1-2): 23-43.
- Kirschner K, Melton DW (2010): Multiple roles of the ERCC XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res*, 30(9): 3223-32.
- Köberle B, Ditz C, Kausch I, Wollenberg B, Ferris RL, Albers AE (2010): Metastases of squamous cell carcinoma of the head and neck show increased levels of

## 8. Literaturverzeichnis

- nucleotide excision repair protein XPF in vivo that correlate with increased chemoresistance ex vivo. *Int J Oncol*, 36(5): 1277-84.
- Kothandapani A, Dangeti VS, Brown AR, Banze LA, Wang XH, Sobol RW, Patrick SM (2011): Novel role of base excision repair in mediating cisplatin cytotoxicity. *J Biol Chem*, 286(16): 14564-74.
- Kothandapani A, Sawant A, Dangeti VS, Sobol RW, Patrick SM (2013): Epistatic role of base excision repair and mismatch repair pathways in mediating cisplatin cytotoxicity. *Nucleic Acids Res*, 41(15): 7332-43.
- Krams M, Parwaresch R, Sipos B, Heidorn K, Harms D, Rudolph P (2004): Expression of the c-kit receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favorable prognosis. *Oncogene*, 23(2): 588-95.
- Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, Lerner J, Brunet JP, Subramanian A, Ross KN, Reich M, Hieronymus H, Wei G, Armstrong SA, Haggarty SJ, Clemons PA, Wei R, Carr SA, Lander ES, Golub TR (2006): The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*, 313(5795): 1929-35.
- Lamb J.: The Connectivity Map (2007): a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer*, 7(1): 54-60.
- Lautz TB, Jie C, Clark S, Naiditch JA, Jafari N, Qiu YY, Zheng X, Chu F, Madonna MB (2012): The effect of vorinostat on the development of resistance to doxorubicin in neuroblastoma. *PLoS One*, 7(7): e40816.
- Leblond P, Dewitte A, Le Tinier F, Bal-Mahieu C, Baroncini M, Sarrazin T, Lartigau E, Lansiaux A, Meignan S (2013): Cilengitide targets pediatric glioma and neuroblastoma cells through cell detachment and anoikis induction. *Anticancer Drugs*, 24(8): 818-25.
- Li GM (2008): Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*, 18(1): 85-98.
- Lunn R (2011): 12<sup>th</sup> Report on carcinogens, U.S. Department of Health and Human Services: 59-60.
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2006): *Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme Verlag.

## 8. Literaturverzeichnis

- Macleod MR, Johansson IM, Söderström I, Lai M, Gidö G, Wieloch T, Seckl JR, Olsson T (2003): Mineralocorticoid receptor expression and increased survival following neuronal injury. *Eur J Neurosci*, 17(8): 1549-55.
- Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ (2012): Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3): 283-96.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007): Neuroblastoma. *Lancet*, 369(9579): 2106-20.
- Maris JM (2010): Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*, 362(23): 2202-11.
- Markaverich BM, Crowley JR, Alejandro MA, Shoulars K, Casajuna N, Mani S, Reyna A, Sharp J (2005): Leukotoxin diols from ground corncob bedding disrupt estrous cyclicity in rats and stimulate MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect*, 113(12): 1698-704.
- McGurk CJ, Cummings M, Köberle B, Hartley J. A., Oliver RT, Masters JR (2006): Regulation of DNA Repair Gene Expression in Human Cancer Cell Lines. *J Cell Biochem*, 97(5): 1121-36.
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J Jr. (2007): Valproic acid as anti-cancer drug. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(33):3378-93.
- Michaelis M, Bliss J, Arnold SC, Hinsch N, Rothweiler F, Deubzer HE, Witt O, Langer K, Doerr HW, Wels WS, Cinatl J Jr (2008): Cisplatin-resistant neuroblastoma cells express enhanced levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) and are sensitive to treatment with EGFR-specific toxins. *Clin Cancer Res*, 14(20): 6531-7.
- Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD; INRG Task Force (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*, 27(2): 298-303.
- Mowry RW (1978): Aldehyde fuchsin staining, direct or after oxidation: problems and remedies, with special reference to human pancreatic B cells, pituitaries, and elastic fibers. *Stain Technol*, (3): 141-54.

## 8. Literaturverzeichnis

- Munier M, Meduri G, Viengchareun S, Leclerc P, Le Menuet D, Lombès M (2010): Regulation of mineralocorticoid receptor expression during neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Endocrinology*, 151(5): 2244-54.
- Neumann I, Foell JL, Bremer M, Volkmer I, Korholz D, Burdach S, Staeger MS (2010): Retinoic acid enhances sensitivity of neuroblastoma cells for imatinib mesylate. *Pediatr Blood Cancer*, 55(3): 464-70.
- Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, Yoshida Y, Nemoto N, Shichino H, Chin M, Mugishima H, Suzuki T (2007): Analyses of novel prognostic factors in neuroblastoma patients. *Biol Pharm Bull*, 30(12): 2294-9.
- Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983): Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cell. *J Natl Cancer Inst*, 71(4): 741-7.
- Ross RA, Spengler BA, Domènech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL (1995): Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ*, 6(4): 449-56.
- Ross RA, Biedler JL, Spengler BA (2003): A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett*, 197(1-2): 35-9.
- Ross RA, Spengler BA (2007): Human neuroblastoma stem cells. *Semin Cancer Biol*, 17(3): 241-7.
- Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M, Pierri F, Riccardi R (2013): Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs*, 24(10): 1007-19.
- S1-Leitlinie Neuroblastom der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). In: AWMF online (Stand 2011)
- Safaei R (2006): Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett*, 234(1): 34-9.
- Sartelet H, Imbriglio T, Nyalendo C, Haddad E, Annabi B, Duval M, Fetni R, Victor K, Alexendrov L, Sinnott D, Fabre M, Vassal G (2012): CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology*, 60(7): 1144-55.
- Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, Maris JM, Brodeur GM, Attiyeh E, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Speleman F, Noguera R, Tonini GP, Fischer M, Ambros I,

## 8. Literaturverzeichnis

- Monclair T, Matthay KK, Ambros P, Cohn SL, Pearson AD (2012): Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer*. 2012 Oct 9; 107(8):1418-22.
- Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ (2009): Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5): 822-9.
- Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ (2003): Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell*, 3(4): 377-86.
- Siddik ZH (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47): 7265-79.
- Smith-Swintosky VL, Zhao B, Shank RP, Plata-Salaman CR (2001): Topiramate promotes neurite outgrowth and recovery of function after nerve injury. *Neuroreport*, 12(5): 1031-4.
- Sprowl JA, Ness RA, Sparreboom A (2013): Polymorphic transporters and platinum pharmacodynamics. *Drug Metab Pharmacokinet*, 28(1): 19-27.
- Tai DJ, Jin WS, Wu CS, Si HW, Cao XD, Guo AJ, Chang JC (2012): Changes in intracellular redox status influence multidrug resistance in gastric adenocarcinoma cells. *Exp Ther Med*, 4(2): 291-296.
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M (1996): A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res*, 56(18): 4124-9.
- Thompson DA, Hammock BD (2007): Dihydroxyoctadecamonoenoate esters inhibit the neutrophil respiratory burst. *J Biosci*, 32(2): 279-91.
- Tiede N, Hofbauer LC, Bornstein SR, Kirch W (2010): Therapie des Morbus Addison. *Dtsch med Wochenschr*, 135(31/32): 1561-1562.
- Uccini S, Mannarino O, McDowell HP, Pauser U, Vitali R, Natali PG, Altavista P, Andreano T, Coco S, Boldrini R, Bosco S, Clerico A, Cozzi D, Donfrancesco A, Inserra A, Kokai G, Losty PD, Nicotra MR, Raschellà G, Tonini GP, Dominici C



## 8. Literaturverzeichnis

(2005): Clinical and molecular evidence for c-kit receptor as a therapeutic target in neuroblastic tumors. *Clin Cancer Res*, 11(1): 380-9.

Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA (2004): Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*, 6(6): 838-45.

Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, London WB, Cohn SL (2007): Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res*, 13(11): 3191-7.

Zheng C, Shen R, Li K, Zheng N, Zong Y, Ye D, Wang Q, Wang Z, Chen L, Ma Y (2016): Epidermal growth factor receptor is overexpressed in neuroblastoma tissues and cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016 Aug;48(8):762-7.

<http://www.broadinstitute.org/cmap/>

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ATRA	all-trans Retinsäure
BER	Base excision repair
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CDDP	Cisplatin
Carbo	Carboplatin
CSC	Cancer stem cell
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynucleotide
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERCC1	Excision repair cross-complementing group 1
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetales Kälberserum
fc	Fold change
FDA	Food and Drug Administration
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
HDAC	Histon-Deacetylase
IC <sub>50</sub>	Inhibitory concentration 50, mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IMDM	Isocove's modified Dulbecco's medium

## 9. Abkürzungsverzeichnis

INPC	International Neuroblastoma Pathology Committee
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
KATP	ATP-abhängige K <sup>+</sup> -Kanäle
MIBG	Metajodobenzylguanidin
MMR	Mismatch repair pathway
MR	Mineralkortikoidrezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MTT	3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NB	Neuroblastom
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NER	Nucleotide excision repair
NF	Neurofilament
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphate buffered saline
PH	PolyHEMA, Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat
RFU	Relative fluorescence units
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
SCF	Stem cell factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat

## 9. Abkürzungsverzeichnis

TH	Tyrosinhydroxylase
TrkB	Tyrosinrezeptorkinase B
XP	Xeroderma pigmentosum

### 10. Statistische Auswertung

#### 10.1 Datenauswertung und Statistik der Connectivity Map-Versuche

Die statistische Auswertung, ob durch Zugabe eines bestimmten Resensitizers (z.B. Tolbutamid) der IC<sub>50</sub>-Wert von Cisplatin für einen bestimmten Zelltyp signifikant erniedrigt wurde, basiert auf den Daten von drei unabhängigen Messreihenpaaren. Ein Messreihen-Paar besteht aus einer Messreihe  $\{C_i, Z_i\}$  von Cisplatin-Konzentrationen  $C_i$  und dazu gemessenen Zellviabilitäten  $Z_i$  für Zellen ohne Resensitizer und einer Messreihe  $\{C_i^*, Z_i^*\}$  für Zellen mit Resensitizer. Ein Messreihenpaar ist dadurch gekennzeichnet, dass die Versuchsreihe simultan durchgeführt wurde. Deshalb ist davon auszugehen, dass externe Faktoren die Reihe  $\{C_i, Z_i\}$  ohne Resensitizer und  $\{C_i^*, Z_i^*\}$  mit Resensitizer gleichermaßen beeinflussten.

In einem ersten Schritt wurde bei jeder Messreihe  $\{C_i, Z_i\}$  und  $\{C_i^*, Z_i^*\}$  der IC<sub>50</sub>-Wert durch nichtlineare Regression bestimmt. Damit ergibt sich für jedes der drei Messreihenpaare aus der Differenz die Verminderung der IC<sub>50</sub>-Werte durch den Resensitizer. In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob diese drei unabhängigen Verminderungswerte statistisch signifikant von Null verschieden sind. Im zweiten Schritt wurde der Einstichproben-t-Test angewandt.

#### 1. Schritt: Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte

Bei Durchführung der MTT-Versuche ergab sich ein systematischer Fehler in Form negativer Messwerte für die Zellviabilität ( $Z_i$ ) bei hohen Cisplatin-Konzentrationen. Um diesen Fehler zu kompensieren, wurde jeder Messwert der Zellviabilität linear transformiert, so dass minimal ein Wert von Null erreicht wurde. Der formale Zusammenhang dieser Stauchung ist gegeben durch

$$Z_i \rightarrow \frac{Z_i - \min(\{Z_i\}, 0)}{100\% - \min(\{Z_i\}, 0)} \cdot (1)$$

An dieser Stelle sei erwähnt, dass nur im unteren einstelligen Bereich von wenigen Prozent negative Werte angenommen wurden, so dass diese Transformation die Messwerte nur marginal ändert.

## 10. Statistische Auswertung

Die weiteren Berechnungen erfolgten mit diesen normierten Werten der Zellviabilitäten.

Der funktionale Zusammenhang zwischen der Konzentration von Cisplatin und der Zellviabilität, der für die Regression verwendet wurde, basiert auf dem *Median Effect Principle* von Chou & Talalay (1984).

Dabei ist das Verhältnis des Anteils abgestorbener Zellen  $f_a$  („affected“) zum Anteil noch lebender Zellen  $f_u$  („unaffected“) in Abhängigkeit der Cisplatin-Konzentration gegeben durch

$$\frac{f_a}{f_u} = \left( \frac{C}{IC_{50}} \right)^m \quad (2)$$

Dabei steht  $C$  für die Cisplatin-Dosierungen der Verdünnungsreihe,  $IC_{50}$  für die  $IC_{50}$ -Dosierung und  $m$  für den Sigmoidalwert. Da  $f_u$  genau unserer relativen Zellviabilität  $Z$  entspricht und  $f_a = 1 - f_u$  gilt, kann Gleichung (2) leicht zu

$$Z = \left( 1 + \left( \frac{C}{IC_{50}} \right)^m \right)^{-1} \quad (3)$$

umgeformt werden.

Für jede Messreihe  $\{C_i, Z_i\}$  bzw.  $\{C_i^*, Z_i^*\}$  wurden Sigmoidalwert  $m$  und  $IC_{50}$  in einer nicht-linearen Regression derart bestimmt, dass die Summe der Residuenquadrate  $\varepsilon_i$ , die sich aus

$$Z_i = \left( 1 + \left( \frac{C_i}{IC_{50}} \right)^m \right)^{-1} + \varepsilon_i \quad (4)$$

ergeben, minimiert wird. Die entsprechende Minimierung wurde mit dem Solver-Tool des Programms Excel von Microsoft durchgeführt.

### 2. Schritt: Bestimmung, ob eine signifikante Verminderung vorliegt

Da im Experiment in jedem Schritt die Dosis von Cisplatin halbiert, also exponentiell erniedrigt wurde, ist es sinnvoll anstelle der einfachen Differenz zwischen der Messreihe ohne und der Messreihe mit Resensitizer vielmehr die Differenz der logarithmierten  $IC_{50}$ -Werte zu betrachten. Damit wird statt der absoluten Änderung in

## 10. Statistische Auswertung

$\mu\text{g/ml}$  die relative Änderung durch die Resensitizer verglichen. So ergab sich für jedes der Messpaare die Verminderung der logarithmierten  $IC_{50}$  aus

$$\Delta \log IC_{50} = \ln(IC_{50}) - \ln(IC_{50}^*). \quad (5)$$

Im zweiseitigen Einstichproben-t-Test wurde anschließend getestet, ob der Mittelwert der Log-Differenzen aus den drei unabhängigen Messreihenpaaren signifikant ungleich Null ist, ob also eine Veränderung des  $IC_{50}$ -Werts vorlag.

Eine alternative Auswertung, die nicht von Messreihenpaaren, sondern einfach von sechs unabhängigen Messreihen (jeweils drei ohne und drei mit Resensitizer) ausgeht, würde für jede Reihe die  $IC_{50}$ -Werte ermitteln und dann in einem Zweistichproben-t-Test überprüfen, ob der mittlere  $IC_{50}$  für die Reihen ohne Resensitizer signifikant höher ist als der mittlere  $IC_{50}$  für die Reihen mit Resensitizer. Dieser Ansatz ignoriert aber, dass jeweils simultane Messreihenpaare  $\{C_i, Z_i\}$  und  $\{C_i^*, Z_i^*\}$  untersucht wurden, die nicht unabhängig voneinander durch externe Faktoren beeinflusst wurden.

Tatsächlich können äußere Umstände, die auf ein Messpaar wirken, die Vitalität der Zellen und damit die Messergebnisse beeinflussen, so dass die  $IC_{50}$ -Werte zwischen den verschiedenen Paaren schwanken und somit ein Zweistichproben-t-Test kein aussagekräftiges Ergebnis liefern kann. Der Einfluss der äußeren Umstände wird aber stark vermindert, indem die  $IC_{50}$ -Veränderung für jedes einzelne Messpaar betrachtet wird. Anstelle von zwei Stichproben (eine mit und eine ohne Resensitizer) hat man somit eine Stichprobe von Differenzen. Damit beschränkt man die gemessene Veränderung auf die Wirkung des Resensitizers.

### Auswertungsbeispiel:

Zur Verdeutlichung wird am Beispiel eines Messreihenpaares, UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> mit Cisplatin und UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> mit Cisplatin & Tolbutamid, die Regression graphisch in Abbildung 10-1 dargestellt. Dort ist die relative Zellviabilität von UKF-NB2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> gegenüber der Cisplatin-Konzentration in logarithmischer Skalierung abgetragen. Dabei entsprechen die blauen Quadrate den Messwerten ohne Tolbutamid und die grünen

## 10. Statistische Auswertung

Dreiecke den Messwerten mit Tolbutamid. Mit Hilfe des Excel Solver wurden für die Messreihen die Werte  $m = 2,247$  und  $IC_{50} = 6,233$  bzw.  $m^* = 1,412$  und  $IC_{50}^* = 1,802$  bestimmt, welche die Abweichungsquadrante aus Gleichung (4) minimieren. Die durchgezogene blaue und grüne Linie sind die zu diesen Werten zugehörigen Regressionsgraphen gemäß Gleichung (3). In der Graphik ist gut zu erkennen, dass diese Graphen genau an den obigen Werten für den  $IC_{50}$  einen Wert von 50% für die Zellviabilität annehmen. Diese Punkte sind mit einem gelben Kreis ( $IC_{50}$  von CDDP) und einem orangen Kreis ( $IC_{50}$  von CDDP & Tolbutamid) markiert. In diesem Beispiel erkennen wir, dass durch Tolbutamid der  $IC_{50}$ -Wert von Cisplatin für UKF-NB2rCDDP<sup>1000</sup> von 6.233µg/ml auf 1.802 µg/ml reduziert wurde, was eine Reduktion auf 29% der ursprünglichen Cisplatin-Konzentration entspricht.

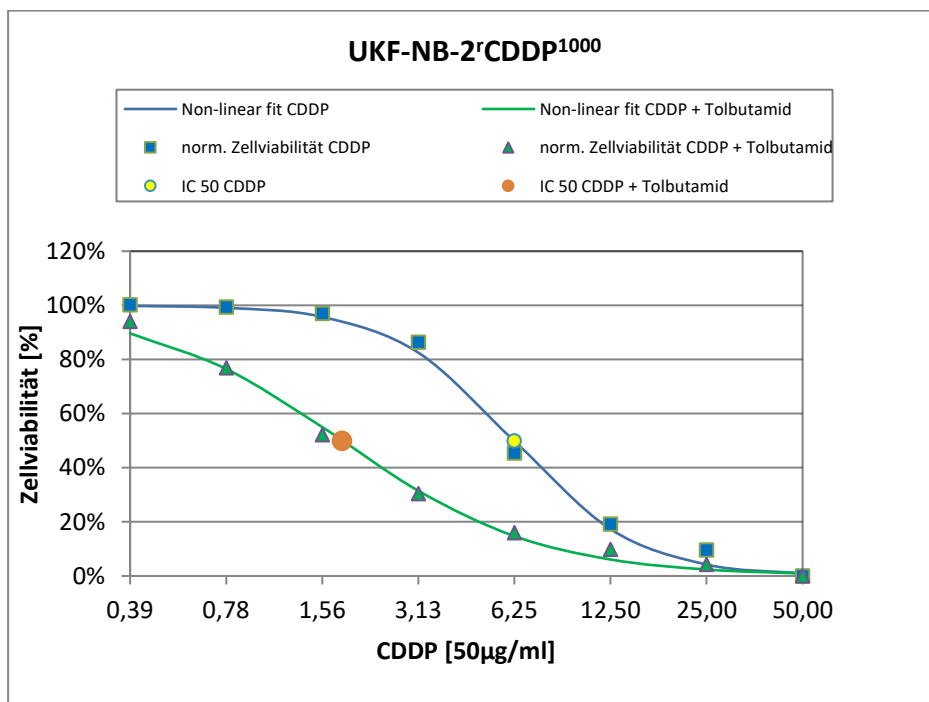


Abbildung 10-1:  $IC_{50}$ -Bestimmung von CDDP und CDDP mit 1000µM Tolbutamid mittels nicht-linearer Regression anhand der relativen Zellviabilität von UKF-NB-2rCDDP<sup>1000</sup> (nicht dargestellt: Zellkontrolle = 100% Zellviabilität). MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. MW±SD aus 3 unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz.

Die Differenz der logarithmierten  $IC_{50}$ -Werte für dieses Messreihenpaar ist  $\Delta \log IC_{50} = \ln(6,233) - \ln(1,802) = 1,241$ . Aus den anderen beiden Messreihenpaaren (nicht graphisch dargestellt) der insgesamt 3 unabhängigen Experimente ergeben sich nach analoger Vorgehensweise die Werte  $IC_{50} = 7,609$ ,



## 10. Statistische Auswertung

$IC_{50}^* = 2,719$  bzw.  $IC_{50} = 9,484$ ,  $IC_{50}^* = 6,239$  und damit die Differenzwerte  $\Delta \log IC_{50} = 1,029$  bzw.  $\Delta \log IC_{50} = 0,419$ .

Die mittlere Logdifferenz der drei Messreihenpaare ist 0,896, was einer Verminderung des  $IC_{50}$  durch Tolbutamid auf  $\exp(-0,896) = 40,81\%$  der ursprünglichen Cisplatin-Dosis entspricht. Dabei ist nach dem zweiseitigen Einstichproben-t-Test die Logdifferenz mit einer Konfidenz von 96,60% verschieden von Null und damit signifikant ( $p=0,034$ ).

### 10.2 Statistische Auswertung der Versuche zur Zellcharakterisierung

In gleicher Weise wurde auch die statistische Auswertung zur Signifikanzprüfung der Versuchsergebnisse zur Zellcharakterisierung (Anoikis-Testung mit PolyHEMA, Antigennachweis in der Durchflußzytometrie und Genexpressionsveränderungen in der quantitativen real-time PCR) mittels des zweiseitigen Einstichproben-t-Tests durchgeführt, da auch hier immer Paare untersucht wurden, für die identische externe Bedingungen herrschten. Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm Excel 2010 für Windows.

### 11. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 4-1:** Molekulare Struktur von Cisplatin, Quelle:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Cisplatin#/media/File:Cisplatin-stereo.svg>

**Abbildung 4-1:** Phasenkontrastmikrofotografie von UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> in 10x (links) und 40x (rechts) Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

**Abbildung 4-2:** Phasenkontrastmikrofotografie von UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> in 10x (links) und 40x (rechts) Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

**Abbildung 4-5:** Phasenkontrastmikrofotografie von UKF-NB-3 in 10x (links) und 40x (rechts) Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

**Abbildung 4-4:** Relative Expression von Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-5:** Relative Expression von Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-6:** Relative Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-7:** Relative Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-8:** Relative Expression von Neurofilament-L (NF-L) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-9:** Relative Expression von Neurofilament-L (NF-L) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-10:** Relative Expression von Neurofilament-M (NF-M) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-11:** Relative Expression von Neurofilament-M (NF-M) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-12:** Relative Expression von Neurofilament-H (NF-H) in den Sublinien UKF-NB-2<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup>, UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>500</sup> und UKF-NB-6<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parentalen Zellen UKF-NB-2, UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-13:** Relative Expression von Neurofilament-H (NF-H) in den Sublinien UKF-NB-3<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup> im Vergleich mit den parental Zellen UKF-NB-3 und UKF-NB-6. Eigenes Excel-Diagramm.

**Abbildung 4-14:** Cisplatinverdünnungsreihe mit und ohne PolyHEMA-Beschichtung. Relative Zellviabilität von UKF-NB-2 und UKF-NB-2<sup>r</sup> CDDP<sup>500</sup>. Eigene Abbildung.

**Abbildung 4-15:** Cisplatinverdünnungsreihe mit und ohne PolyHEMA-Beschichtung. Relative Zellviabilität von UKF-NB-2 und UKF-NB-2<sup>r</sup> CDDP<sup>500</sup>. Eigene Abbildung.

**Abbildung 4-16:** Carboplatinverdünnungsreihe mit und ohne PolyHEMA-Beschichtung. Relative Zellviabilität von UKF-NB-6 und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup>. Eigene Abbildung.

**Abbildung 4-17:** Carboplatinverdünnungsreihe mit und ohne PolyHEMA-Beschichtung. Relative Zellviabilität von UKF-NB-6 und UKF-NB-6<sup>rCarbo</sup><sup>1000</sup>. Eigene Abbildung.

**Abbildung 10-1:** IC<sub>50</sub>-Bestimmung von CDDP & CDDP +1000µM Tolbutamid mittels nicht-linearer Regression anhand der relativen Zellviabilität von UKF-NB-2<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup>. Eigene Abbildung.

## 12. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 3-1:** International Neuroblastoma Staging System (INSS) nach Maris et al., 2007

**Tabelle 1-4:** The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System nach Monclair et al., 2009

**Tabelle 2-1:** In dieser Arbeit verwendete Neuroblastomzelllinien

**Tabelle 3-1:** Plattenschema zur Testung der Resensitizer. Messung im 3-fach Ansatz, \*im Versuch mit Pararosanilin ebenfalls Zusatz von Pararosanilin zur Mediumkontrolle

**Tabelle 3-2:** Zur Analyse verwendete Antikörper

**Tabelle 4-1: Relative Expression von EGF-R in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Neuroblastomsublinien im Vergleich mit ihren parentalen Zelllinien.** Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinie aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen Fluoreszenzänderung (RFU resistente Sublinie/RFU parentale Zelle).

\* signifikant:  $p < 0,05$

**Tabelle 4-2: Relative Expression von N-CAM in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Neuroblastomsublinien im Vergleich mit Ihren parentalen Zelllinien.** Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinie aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen Fluoreszenzänderung (RFU resistente Sublinie/RFU parentale Zelle).

\* signifikant:  $p < 0,05$

**Tabelle 4-3: Relative Expression von CD133 in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Neuroblastomsublinien im Vergleich mit Ihren parentalen Zelllinien.** Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinien aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen Fluoreszenzänderung (RFU resistente Sublinie/RFU parentale Zelle).

\* signifikant:  $p < 0,05$ , # keine Expression

**Tabelle 4-4: Relative Expression von c-Kit in Cisplatin- und Carboplatin-resistenten Neuroblastomsublinien im Vergleich mit Ihren parentalen Zelllinien.** Spalte 1 zeigt die verglichenen Zellpaare, Spalte 2 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der parentalen Zelle aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 3 zeigt den geometrischen Mittelwert sowie die Standardabweichung der resistenten Sublinien aus drei unabhängigen Experimenten, Spalte 4 den Faktor der relativen

## 12. Tabellenverzeichnis

Fluoreszenzänderung (RFU resistente SublinieZelle/RFU parentale Zelle). \* signifikant:  $p < 0,05$

**Tabelle 4-5: Vergleich der Zellviabilität (%) unter adhären (keine Beschichtung) und nicht adhären (PolyHEMA-Beschichtung) Bedingungen.** Zellviabilität unter adhären Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. MW±SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

\* signifikante Reduktion der Viabilität unter nicht adhären Bedingungen:  $p < 0,05$ ; # signifikante Reduktion der Viabilität unter nicht adhären Bedingungen im Vergleich zur parentalen Zelle.

**Tabelle 4-6: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der parentalen Zellen mit Cisplatinverdünnungsreihe unter adhären (keine Beschichtung) und nicht adhären (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Cisplatin (0,008-1µg/ml). Zellviabilität unter adhären Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

**Tabelle 4-7: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der parentalen Zelllinien mit Carboplatinverdünnungsreihe unter adhären (keine Beschichtung) und nicht adhären (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Carboplatin (0,008-1µg/ml). Zellviabilität unter adhären Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

**Tabelle 4-8: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der Cisplatin-resistenten Sublinien mit Cisplatinverdünnungsreihe unter adhären (keine Beschichtung) und nicht adhären (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Cisplatin (0,16-20µg/ml). Zellviabilität unter adhären Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

**Tabelle 4-9: Vergleich der Zellviabilität (in Prozent) der Carboplatin-resistenten Sublinien mit Carboplatinverdünnungsreihe unter adhären (keine Beschichtung) und nicht adhären (PolyHEMA(PH)-Beschichtung) Bedingungen.** Spalte 1 zeigt die Zelllinien mit und ohne PolyHEMA (PH). Zeile 1 zeigt die Zellkontrolle (ZK) und die Verdünnungsreihe von Carboplatin (0,16-20µg/ml). Zellviabilität unter adhären Bedingungen = 100%. MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellviabilität (%) dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

## 12. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 4-10: Zellviabilität der Neuroblastomzelllinien bei Zugabe von Pararosanilin 100µM, Tolbutamid 1000µM, Topiramat 30µM, 12,13-EODE 2µM oder Fludrocortison 10µM.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. # keine Testung des Stoffes an der Zelle. § Einzelwert da inkonstantes Wachstum in weiteren Versuchen.

**Tabelle 4-11: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Pararosanilin 100µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Pararosanilin 100µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Pararosanilin 100µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05; \*\* hochsignifikant: p < 0,01.

**Tabelle 4-12: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Tolbutamid 1000µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Tolbutamid 1000µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Tolbutamid 1000µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05; \*\* hochsignifikant: p < 0,01.

**Tabelle 4-13: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Topiramat 30µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Topiramat 30µM als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Topiramat 30µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05. # Einzelwert da inkonstantes Wachstum in weiteren Versuchen.

**Tabelle 4-14: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit 12,13-EODE 2µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit 12,13-EODE 2µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit 12,13-EODE 2µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer).

**Tabelle 4-15: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Fludrocortison 10µM an CDDP-adaptierten Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Fludrocortison 10µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Fludrocortison 10µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). § Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, # Einzelwert da inkonstantes Wachstum in weiteren Versuchen. \* signifikant: p < 0,05.

**Tabelle 4-16: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Topiramat 30µM an parentalen chemosensitiven Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Topiramat 30µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Topiramat 30µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer)

**Tabelle 4-17: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit 12,13-EODE 2µM an parentalen chemosensitiven Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit 12,13-EODE 2µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit 12,13-EODE 2µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer) \* signifikant: p < 0,05.

**Tabelle 4-18: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von CDDP und CDDP mit Fludrocortison 10µM an parentalen chemosensitiven Neuroblastomzellen.** MTT-Test, Inkubationszeit 120 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Spalte 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, Spalte 2 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 3 zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert von CDDP mit Fludrocortison 10µM als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im 3-fach Ansatz, Spalte 4 zeigt den Faktor der Veränderung der IC<sub>50</sub>-Dosis von CDDP durch Kombination mit Fludrocortison 10µM (IC<sub>50</sub>CDDP/IC<sub>50</sub>CDDP + Resensitizer). \* signifikant: p < 0,05; \*\* hochsignifikant: p < 0,01.

## Danksagung

### **Danksagung**

Ich möchte mich sehr herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Professor Dr. Jindrich Cinatl für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung der Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Florian Rothweiler und Professor Dr. Martin Michaelis für die intensive Betreuung und die vielfältigen Ideen und Anregungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Professor Dr. Volkhard Kempf und Professor Dr. Hans Wilhelm Doerr danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Virologie.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie danke ich für eine hervorragende Arbeitsatmosphäre und die allzeit freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Partner Dr. Andreas Hubener für seine Unterstützung und stetige Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit sowie meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.



## Schriftliche Erklärung

### **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung von Neuroblastomzelllinien und ihrer platinresistenten Sublinien und Möglichkeit der Resistenzüberwindung mittels ausgewählter Substanzen der Connectivity Map“

in dem Institut für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Jindrich Cinatl mit Unterstützung durch Prof. Dr. Martin Michaelis und Dr. Florian Rothweiler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)