

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

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

**Untersuchung synthetischer Letalität in Vincristin-resistenten  
Neuroblastomzellen**

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

vorgelegt von  
Katja Zeitz

aus Erzhausen

Frankfurt am Main, 2020

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Jindrich Cinatl
Korreferentin:	Prof. Dr. Elke Hattingen
Tag der mündlichen Prüfung:	21.10.2021

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1	Das Neuroblastom.....	- 1 -
1.1.1	<i>Definition</i> .....	- 1 -
1.1.2	<i>Epidemiologie</i> .....	- 1 -
1.1.3	<i>Risikofaktoren</i> .....	- 2 -
1.1.4	<i>Lokalisation</i> .....	- 2 -
1.1.5	<i>Stadieneinteilung</i> .....	- 2 -
1.1.6	<i>Metastasierung</i> .....	- 4 -
1.1.7	<i>Symptome</i> .....	- 4 -
1.1.8	<i>Diagnostik</i> .....	- 5 -
1.1.9	<i>Pathologie</i> .....	- 6 -
1.1.10	<i>Molekulargenetik</i> .....	- 7 -
1.1.11	<i>Therapie</i> .....	- 8 -
1.1.12	<i>Prognose</i> .....	- 10 -
1.2	Begriffserklärung: Zelllinie .....	- 11 -
1.3	Vincristin .....	- 11 -
1.4	Chemotherapeutika-Resistenz .....	- 11 -
1.5	Ursprung der Tumorzelllinie UKF-NB-2 <sup>r</sup> VCR <sup>20</sup> .....	- 12 -
1.6	Ribonucleic-acid(RNA)-Interferenz .....	- 12 -
1.7	Synthetische Letalität .....	- 13 -
1.8	Zielsetzung .....	- 13 -
2	MATERIAL .....	- 15 -
2.1	Laborgeräte .....	- 15 -
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	- 16 -
2.3	Zelllinie .....	- 17 -
2.4	Antikörper (Western Blot) .....	- 17 -
2.5	Kits, einzelne Chemikalien, Enzyme und sonstige Zusatzstoffe.....	- 17 -
2.6	Lösungen.....	- 19 -
2.6.1	<i>Speziell Viabilitätstest</i> .....	- 19 -

2.6.2	<i>Speziell Proteinextraktion, Angleichung der Proben-Proteinkonzentrationen, Natriumlaurylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western Blot</i> .....	- 20 -
2.6.3	<i>Sonstige</i> .....	- 21 -
2.7	Gele .....	- 22 -
3	METHODEN .....	- 24 -
3.1	Zellkultivierung .....	- 24 -
3.2	Transfektion .....	- 24 -
3.3	Transfektionsoptimierung .....	- 25 -
3.3.1	<i>Transfektion von mit Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-gekoppelter siRNA</i> .....	- 25 -
3.3.2	<i>Durchflusszytometrie</i> .....	- 26 -
3.4	Transfektion der vorgegebenen siRNAs .....	- 27 -
3.5	Viabilitätstest .....	- 31 -
3.6	Transfektion für den Western Blot .....	- 34 -
3.7	Proteinextraktion .....	- 34 -
3.8	Angleichung der Proben-Proteinkonzentrationen .....	- 35 -
3.9	Natriumlaurylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	- 36 -
3.10	Western Blot .....	- 37 -
4	ERGEBNISSE .....	- 40 -
4.1	Transfektionsoptimierung .....	- 40 -
4.2	Viabilitätsassay .....	- 41 -
4.3	Western Blot .....	- 63 -
5	DISKUSSION .....	- 64 -
5.1	ABCB1 .....	- 68 -
5.2	FOXJ1 .....	- 69 -
5.3	MAP2K1 .....	- 72 -
5.4	NFYB .....	- 74 -
5.5	RICS .....	- 76 -
5.6	SMARCA1 .....	- 78 -
5.7	SMARCB1 .....	- 80 -

5.8	SMARCC1 .....	- 82 -
5.9	STK35 .....	- 85 -
5.10	TOCA1 .....	- 87 -
5.11	TPM2.....	- 88 -
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	- 91 -
7	SUMMARY .....	- 92 -
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	- 93 -
9	ANHANG .....	- 124 -
9.1	small interfering RNA-Zielsequenzen: .....	- 124 -
9.2	Gesamttabelle relative Zellviabilitäten bei Viabilitätstests nach Transfektion.....	- 132 -
9.3	Ergebnisse Durchflusszytometrie zur Optimierung der Transfektion.....	- 135 -
10	DANKSAGUNG .....	- 139 -
11	LEBENS LAUF .....	- 140 -
12	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG .....	- 141 -

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Verteilung der Stadien bei Diagnose bei 1125 Patienten der Studie NB97 .....	- 3 -
Tabelle 2. International Neuroblastoma Pathology Classification.....	- 6 -
Tabelle 3. Überlebensraten nach Stadien .....	- 10 -
Tabelle 4. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>ACTR1A</i> , <i>ACTR1B</i> , <i>ARPC1A</i> .....	- 42 -
Tabelle 5. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>ARPC3</i> , <i>ATP2C1</i> , <i>BIN3</i> .....	- 43 -
Tabelle 6. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>CALR</i> , <i>DAPK1</i> , <i>DST</i> .....	- 44 -
Tabelle 7. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>FMN</i> , <i>FMN2</i> , <i>FNBP1</i> .....	- 45 -
Tabelle 8. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>FOXJ1</i> , <i>ITSN1</i> , <i>ITSN2</i> .....	- 46 -
Tabelle 9. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>KRAS2</i> , <i>LCP1</i> , <i>MAEA</i> .....	- 47 -
Tabelle 10. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>MAP2K1</i> , <i>MAP2K2</i> , <i>MAPK1</i> .....	- 48 -
Tabelle 11. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>NF1</i> , <i>NFYA</i> , <i>NFYB</i> .....	- 50 -
Tabelle 12. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>NFYC</i> , <i>NRAS</i> , <i>PAK4</i> .....	- 51 -
Tabelle 13. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>PAK6</i> , <i>PAK7</i> , <i>RICS</i> .....	- 52 -
Tabelle 14. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>SMARCA1</i> , <i>SMARCA5</i> , <i>SMARCB1</i> .....	- 54 -
Tabelle 15. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>SMARCC1</i> , <i>SMARCC2</i> , <i>STK35</i> .....	- 56 -
Tabelle 16. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>TOCA1</i> , <i>TPM2</i> , <i>TRIP10</i> .....	- 57 -
Tabelle 17. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>WASPIP</i> und <i>ABCB1</i> .....	- 59 -

Tabelle 18. Gesamttabelle relative Zellviabilitäten bei Viabilitätstests nach Transfektion bei Kandidatengeneten und Kontrollen als Prozentwerte in Relation zur Zellviabilität der -siRNA-Kontrolle ohne Zugabe von Vincristin (Darstellung % Viabilität; bei Vorliegen mehrerer Ergebnisse gemittelt  $\pm$  Standardabweichung). ..... - 132 -

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Aufbau einer 96-Well-MTT-Platte .....	- 33 -
Abbildung 2. Berechnung der benötigten Proteinproben volumina.....	- 35 -
Abbildung 3. Darstellung der durch Durchflusszytometrie ermittelten Effizienz, Intensität und Viabilität bei UKF-NB-2 <sup>VCR</sup> bei Anwendung der 24 Programme des Neon®-Transfektionsgeräts .....	- 40 -
Abbildung 4. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>ACTR1A</i> , <i>ACTR1B</i> , <i>ARPC1A</i> .....	- 42 -
Abbildung 5. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>ARPC3</i> , <i>ATP2C1</i> , <i>BIN3</i> .....	- 43 -
Abbildung 6. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>CALR</i> , <i>DAPK1</i> , <i>DST</i> .....	- 44 -
Abbildung 7. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>FMN</i> , <i>FMN2</i> , <i>FNBP1</i> .....	- 45 -
Abbildung 8. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>FOXJ1</i> , <i>ITSN1</i> , <i>ITSN2</i> .....	- 46 -
Abbildung 9. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>KRAS2</i> , <i>LCP1</i> , <i>MAEA</i> .....	- 48 -
Abbildung 10. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>MAP2K1</i> , <i>MAP2K2</i> , <i>MAPK1</i> .....	- 49 -
Abbildung 11. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>NF1</i> , <i>NFYA</i> , <i>NFYB</i> .....	- 50 -
Abbildung 12. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>NFYC</i> , <i>NRAS</i> , <i>PAK4</i> .....	- 52 -
Abbildung 13. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>PAK6</i> , <i>PAK7</i> , <i>RICS</i> .....	- 53 -
Abbildung 14. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>SMARCA1</i> , <i>SMARCA5</i> , <i>SMARCB1</i> .....	- 54 -
Abbildung 15. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>SMARCC1</i> , <i>SMARCC2</i> , <i>STK35</i> .....	- 56 -
Abbildung 16. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>TOCA1</i> , <i>TPM2</i> , <i>TRIP10</i> .....	- 58 -



Abbildung 17. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene <i>WASPIP</i> und <i>ABCB1</i> .....	- 59 -
Abbildung 18. Darstellung der Zellviabilitäten nach Transfektion als Prozentwerte der Zellviabilität der ohne siRNAs behandelten Kontrolle. Bei mehreren Versuchsdurchführungen wurden die Werte gemittelt. Auf die Darstellung von Standardabweichungen wurde zur Beibehaltung der Übersichtlichkeit verzichtet. Die dazugehörige Tabelle mit Prozentzahlen $\pm$ Standardabweichungen befindet sich im Anhang 9.2. Die bei 12,5–100 ng/ml Vincristin untersten Kurven sind <i>SMARCC1</i> (grün) und <i>ABCB1</i> (blau). -	62 -
Abbildung 19. Nachweis der <i>SMARCC1</i> -Protein-Verminderung von <i>SMARCC1</i> -siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu scramble-siRNA transfizierten Zellen und der Pufferkontrolle im Western Blot. Beta-Aktin wurde als Ladekontrolle nachgewiesen.....	- 63 -
Abbildung 20. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2 <sup>VCR</sup> 20-Zellen Teil 1: getestete Programme 1 bis 7.....	- 135 -
Abbildung 21. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2 <sup>VCR</sup> 20-Zellen Teil 2: getestete Programme 8 bis 15.....	- 136 -
Abbildung 22. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2 <sup>VCR</sup> 20-Zellen Teil 3: getestete Programme 16 bis 23.....	- 137 -
Abbildung 23. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2 <sup>VCR</sup> 20-Zellen Teil 4: getestetes Programm 24 .....	- 138 -

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-Aza	<i>5-Aza-2'-deoxycytidine</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1	<i>ATP-binding cassette subfamily B member 1</i>
ACTR 1A	<i>ARP1 actin-related protein 1 homolog A, cetractin alpha (yeast)</i>
ACTR 1B	<i>ARP1 actin-related protein 1 homolog B, cetractin beta (yeast)</i>
ADH	<i>Antidiuretisches Hormon</i>
ALK	<i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
APS	<i>Ammoniumperoxodisulfat</i>
ARID1A	<i>AT-rich interaction domain 1A</i>
Arp2/3	<i>actin-related protein-2/3</i>
ARPC1A	<i>actin related protein 2/3 complex, subunit 1A</i>
ARPC3	<i>actin related protein 2/3 complex, subunit 3</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
ATP2C1	<i>ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, type 2C, member 1</i>
BAEE	<i>N<math>\alpha</math>-Benzoyl-L-arginine ethyl ester</i>
BAF155	<i>BRG1-Associated-Factor 155</i>
BAFs	<i>BRM- oder BRG1-Assoziierte-Faktoren</i>
BCL	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i>
BIN3	<i>bridging integrator 3</i>
BioGRID	<i>Biological General Repository for Interaction Datasets</i>
BRG1	<i>Brahma-related gene 1</i>
BRM	<i>Brahma</i>

BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
CALR	<i>calreticulin</i>
CAT	<i>chloramphenicol-acetyltransferase</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42, cell division control protein 42 homolog</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CECR2	<i>cat eye syndrome chromosome region candidate 2</i>
CERF	<i>CECR2-containing-remodeling factor</i>
CO <sub>2</sub>	<i>Kohlendioxid</i>
CRPs	<i>Conditional Regulatory Programs</i>
DAPK1	<i>death-associated protein kinase 1</i>
DC	<i>detergent compatible</i>
ddH <sub>2</sub> O	<i>double-distilled water</i>
DDX1	<i>DEAD/H-box helicase 1</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DST	<i>dystonin</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EFS	<i>event-free survival</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
F-Aktin	<i>filamentäres Aktin</i>
F-BAR	<i>Fes/CIP4</i> <span style="float: right;"><i>homology</i></span> <i>Bin/Amphiphysin/Rvs</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>

FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FMN	<i>formin 1</i>
FMN2	<i>formin 2</i>
FNBP1	<i>formin binding protein 1</i>
FOXJ1	<i>forkhead box J1</i>
G	<i>gap</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
G-Protein	<i>GTP-bindendes Protein</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
H <sub>2</sub> O	<i>Wasser</i>
HCl	<i>Chlorwasserstoff</i>
HDAC	<i>Histondeacetylase</i>
HRAS	<i>Harvey Ras</i>
IDRF	<i>Image-Defined Risk Factors</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INK4	<i>inhibitors of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)</i>
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i>
INRGSS	<i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
ITSN1	<i>intersectin 1 (SH3 Domain Protein)</i>
ITSN2	<i>intersectin 2</i>
KRAS	<i>Kirsten Ras</i>

KRAS2	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LCP1	<i>lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)</i>
LIM	<i>LIN-11, Isl1, Mec-3</i>
M	<i>Mitose</i>
MAEA	<i>macrophage erythroblast attacher</i>
MAP2K1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MAP2K2	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
MATCH	<i>Molecular Analysis for Therapy Choice</i>
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MEKKs	<i>MEK-Kinasen</i>
MEKs	<i>MAP/ERK-Kinasen</i>
MESNA	<i>Natrium-2-mercaptoethansulfonat</i>
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
MRT	<i>maligner rhabdoider Tumor</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
MYC	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene</i>
MYCN	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaF	<i>Natriumfluorid</i>
NaHCO <sub>3</sub>	<i>Natriumbicarbonat</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>

NBAS	<i>neuroblastoma amplified sequence</i>
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
NF1	<i>neurofibromin 1</i>
NFYA	<i>nuclear transcription factor Y, alpha</i>
NFYB	<i>nuclear transcription factor Y, beta</i>
NFYC	<i>nuclear transcription factor Y, gamma</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NRAS	<i>neuroblastoma ras, neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NURF	<i>nucleosome-remodeling factor</i>
OS	<i>overall survival</i>
PAK4	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4</i>
PAK6	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6</i>
PAK7	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDZ	<i>Post-synaptic density protein-95 (PSD95), Drosophila disc large tumour suppressor (DlgA), Zonula occludens-1 protein (zo-1)</i>
P-gp	<i>P-glycoprotein</i>
PIM	<i>Protease Inhibitor Mix</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>
PRC2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
PrEC	<i>Prostata-Epithelzellen</i>
PX	<i>phox homology</i>

Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
Rb	<i>retinoblastoma</i>
RCCL	<i>Resistant Cancer Cell Line</i>
Rho	<i>Ras homology</i>
RhoA	<i>ras homolog family member A</i>
RICS	<i>Rho GTPase activating protein 32</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SANT	<i>switching-defective protein 3 (Swi3), adaptor 2 (Ada2), nuclear receptor co-repressor (N-CoR), transcription factor (TF)IIIB'</i>
SDS	<i>Natriumlaurylsulfat</i>
SH3	<i>src-homology 3</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SLIDE	<i>SANT-like imitation switch (ISWI) domain</i>
SMARCA1	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1</i>
SMARCA5	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5</i>
SMARCC1	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1</i>

SMARCC2	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2</i>
SNF	<i>sucrose non-fermenter</i>
SNF5	<i>sucrose non fermenting 5</i>
Src	<i>Sarcoma</i>
St.	<i>Stadium</i>
STK35	<i>serine/threonine kinase 35</i>
SYNLET	<i>Regulatory Control Networks of Synthetic Lethality</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin</i>
TMD	<i>transmembrane domains</i>
TOCA1	<i>formin binding protein 1-like</i>
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>
TPM2	<i>tropomyosin 2 (beta)</i>
TRIP10	<i>thyroid hormone receptor interactor 10</i>
UKF-NB-2 <sup>VCR</sup> <sup>20</sup>	<i>Uniklinik Frankfurt-Neuroblastom-2 resistent gegen Vincristin</i>
v	<i>Volumen</i>
w	<i>Masse</i>
WAS	<i>Wiskott-Aldrich syndrome</i>
WASL	<i>Wiskott-Aldrich syndrome like</i>
WASPIP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome/Wiskott-Aldrich syndrome like (WAS/WASL) interacting protein family, member 1</i>
WIP	<i>WAS/WASL interacting protein family member 1</i>



# **1 Einleitung**

Bei der folgenden Arbeit wurden im Rahmen des Regulatory Control Networks of Synthetic Lethality (SYNLET) Projekts zuvor ausgesuchte Gene in der Vincristin-resistenten Neuroblastom-Sublinie der Zelllinie Uniklinik Frankfurt-Neuroblastom-2 (UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>) mit small interfering ribonucleic acids (siRNAs)<sup>1,2</sup> stillgelegt. Anschließend wurden die Zellviabilität und die Resistenz gegen Vincristin von transfizierten und untransfizierten Zellen verglichen. Bei stark verminderter Viabilität von transfizierten Zellen wurde die Verminderung des Zielproteins nachgewiesen.

## **1.1 Das Neuroblastom**

### **1.1.1 Definition**

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor, der aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems entsteht.<sup>3</sup> Die Zellen des sympathischen Nervensystems stammen aus der embryonalen Neuralleiste. Die Neuralleiste entsteht aus der Neuralplatte. Diese bildet sich aus Zellen des Ektoderms. Das Ektoderm wiederum entsteht aus dem Embryoblasten, dem Teil der befruchteten Eizelle, aus dem sich der Embryo entwickelt (aus dem Trophoblasten entstehen Plazenta und Eihäute).<sup>4</sup>

### **1.1.2 Epidemiologie**

In den Jahren 2004 bis 2013 hatten 1236 Kinder bis einschließlich 14 Jahren in Deutschland ein Neuroblastom oder Ganglioneuroblastom<sup>5</sup> (enthält sowohl maligne als auch benigne Zellen<sup>6</sup>). Dies entspricht 7,1 % der in diesem Zeitraum bei Kindern bis einschließlich 14 Jahren in Deutschland aufgetretenen Malignomen.<sup>5</sup> Die Inzidenz des Neuroblastoms beträgt 1,1 Erkrankungen auf 100.000 Kinder < 15 Jahre.<sup>7</sup> Ca. 24 % der Neuroblastom- oder Ganglioneuroblastompatienten versterben. Ca. 85 % der Neuroblastome und Ganglioneuroblastome treten in Deutschland im ersten Lebensjahr auf.<sup>3</sup> Damit ist das Neuroblastom der häufigste Tumor im Säuglingsalter.<sup>8</sup> Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter.<sup>9</sup>

### **1.1.3 Risikofaktoren**

Ungefähr 1 % aller Neuroblastome treten familiär gehäuft auf. Risikofaktoren für nicht vererbte Neuroblastome konnten noch nicht ausreichend nachgewiesen werden.<sup>10</sup> So schreibt die American Cancer Society, dass Risikofaktoren, die mit der Lebensführung zu tun haben, wie beispielsweise Rauchen und Übergewicht, bei der Entstehung von Malignomen bei Kindern vermutlich keine große Rolle spielen, und dass keine Umweltfaktoren bekannt sind, die die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Neuroblastoms erhöhen.<sup>11</sup> Im Artikel „The epidemiology of neuroblastoma: a review“ von 2008 fassten Heck et al. die Ergebnisse aller bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Artikel bzgl. Risikofaktoren für das Neuroblastom zusammen. Sie fanden einen Zusammenhang mit der mütterlichen Einnahme von Alkohol oder Medikamenten vor oder während der Schwangerschaft und Stillzeit, der Exposition des Vaters mit Kohlenwasserstoffen, Holzstaub und Lötlutten sowie einem niedrigen Geburtsgewicht des Neugeborenen. Ein eventuell protektiver Effekt stellte sich heraus für atopische Veranlagungen und die mütterliche Einnahme von Vitaminen (insbesondere Folsäure).<sup>12</sup>

### **1.1.4 Lokalisation**

Bei ca. 51 % der Neuroblastompatienten befindet sich der Primärtumor in der Nebenniere, bei ca. 25 % im restlichen Abdomen, bei ca. 16 % im Brustkorb, bei ca. 2,9 % im Hals, bei ca. 2,9 % im Becken und bei ca. 1,5 % multilokulär. In ca. 0,7 % der Fälle ist der Primärtumor nicht auffindbar.<sup>13</sup>

### **1.1.5 Stadieneinteilung**

Nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS) wird das Neuroblastom postoperativ in verschiedene Stadien eingeteilt<sup>14</sup>: Stadium 1: Lokalisierter Tumor, der komplett oder mit mikroskopisch erkennbaren Resten entfernt werden konnte. Repräsentative ipsilaterale nicht anhaftende Lymphknoten sind mikroskopisch tumorfrei. Stadium 2A: Lokalisierter Tumor, der nicht komplett entfernt werden konnte. Repräsentative ipsilaterale nicht anhaftende Lymphknoten sind mikroskopisch tumorfrei. Stadium 2B: Lokalisierter Tumor. Ipsilaterale Lymphknoten enthalten Tumorzellen. Vergrößerte

kontralaterale Lymphknoten sind mikroskopisch tumorfrei. Stadium 3: Nicht resezierbarer Tumor, der sich auf beiden Seiten der Wirbelsäule befindet. (Regionale Lymphknoten enthalten eventuell Tumorzellen.) ODER Lokalisierter Tumor. Kontralaterale regionale Lymphknoten enthalten Tumorzellen. Stadium 4: Tumor mit Fernmetastasen zu entfernten Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder anderen Organen. Eine Ausnahme bilden Tumoren, die dem Stadium 4S zugeordnet werden. Stadium 4S (Sonderfall): Lokalisierter Primärtumor mit Metastasen ausschließlich in Haut, Leber und/oder Knochenmark. Alter des Kindes unter 1 Jahr<sup>15</sup> oder unter 18 Monate<sup>14</sup>. Knochenmark-Metajodbenzylguanidin-Szintigrafie negativ. Geringer Knochenmarkbefall.<sup>16</sup>

**Tabelle 1. Verteilung der Stadien bei Diagnose bei 1125 Patienten der Studie NB97**

Stadium 1	24 %
Stadium 2	16 %
Stadium 3	15 %
Stadium 4	35 %
Stadium 4S	10 %

Quelle: Hiddemann, Bartram<sup>13</sup>.

Eine präoperative Stadieneinteilung des Neuroblastoms wurde 2009 veröffentlicht, das International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS). Danach werden die Tumoren mit Hilfe der sogenannten Image-Defined Risk Factors (IDRF) eingeteilt: Stadium L1: Lokalisierter Tumor, der auf eine Körperregion (Hals, Thorax, Abdomen, Becken) begrenzt ist und nicht die Kriterien der Image-Defined Risk Factors erfüllt. Stadium L2: Lokalisierter einseitiger Tumor, der die Kriterien eines oder mehrerer Image-Defined Risk Factors erfüllt. Stadium M: Tumor mit Fernmetastasen (ausgenommen Stadium MS). Stadium MS: Tumor mit Fernmetastasen ausschließlich in Haut, Leber und/oder Knochenmark. Alter des Kindes unter 18 Monate. Metajodbenzylguanidin-Szintigrafie negativ in Knochen und Knochenmark. Weniger als 10 % Tumorzellen unter den kernhaltigen Zellen im Knochenmarkausstrich bzw. in der Knochenmarksbiopsie.<sup>17,18</sup>

### 1.1.6 Metastasierung

Bei ca. 50 % der Patienten haben sich bei Diagnosestellung Metastasen des Neuroblastoms gebildet.<sup>7</sup> Fernmetastasen treten auf im Knochenmark (ca. 90 % Stadium (St.) 4, ca. 65 % St. 4S), im Knochen (ca. 69 % St. 4), in den Lymphknoten, in der Leber (ca. 16 % St. 4, ca. 72 % St. 4S), im Kopf/Gehirn (ca. 8 % St. 4), in der Haut (ca. 2,6 % St. 4, ca. 11 % St. 4S), in der Lunge/im Brustfell, im Hodensack und im Eierstock.<sup>19,13</sup> Die Metastasierung erfolgt hämatogen und lymphogen.<sup>9</sup>

### 1.1.7 Symptome

Dieser Abschnitt soll einen groben Überblick über die Symptomatik beim Neuroblastom geben. Das häufigste Symptom, mit dem das Neuroblastom auftritt, ist die Raumforderung. Diese zeigt sich in den meisten Fällen im Bereich des Abdomens.<sup>20</sup> Ungefähr 20 bis 34 % der Neuroblastome werden zufällig, beispielsweise bei bildgebenden Untersuchungen bei einem Arzt- oder Krankenhausbesuch, entdeckt.<sup>20,21</sup> Ca. 33 % der Neuroblastome äußern sich durch Schmerzen.<sup>7</sup> Bei ca. 26 % der Patienten findet sich ein verminderter Allgemeinzustand.<sup>21</sup> In ca. 26 % der Fälle tritt Fieber auf.<sup>20</sup> Ca. 12 % der Patienten nehmen an Gewicht ab.<sup>20</sup> Periorbitale Ekchymosen oder ein Exophthalmus treten in ca. 3,8 % bis 12 % der Fälle auf.<sup>22,23</sup> Ca. 3 bis 8 % der Patienten haben respiratorischen Symptome, die durch ein thorakales Neuroblastom bedingt sind.<sup>24</sup> Auch bei abdominalem Neuroblastom können respiratorische Symptome auftreten. Beim Neuroblastom des Halses sind respiratorische Symptome am häufigsten.<sup>25</sup> Bei ca. 5,2 % der Patienten tritt eine komplette oder inkomplette Querschnittssymptomatik auf (motorisches Defizit ca. 99 %, radikuläre Schmerzen/Rückenschmerzen ca. 62 %, Sphinkterdefizit ca. 39 %, erkennbares sensorisches Defizit ca. 14 %).<sup>26</sup> Ungefähr 5 % der Patienten haben Hautmetastasen, die sich oft als bläuliche Hautknötchen darstellen.<sup>7,21,15</sup> Lymphknotenschwellungen weisen ca. 4 % der Patienten auf.<sup>21</sup> Durch das Vasoaktive Intestinale Peptid hervorgerufene wässrige Diarrhoen zeigen weniger als 1–4 % der Neuroblastompatienten.<sup>7,27</sup> Bei ca. 2,4 % tritt ein Horner-Syndrom auf.<sup>7</sup> Ein Opsoklonus-Myoklonus-Ataxie-Syndrom (unwillkürliche Augenbewegungen in verschiedene Richtungen, unwillkürliche

Muskelzuckungen, Ataxie) haben ca. 1 bis 2 %.<sup>7</sup> Ca. 1 % der Patienten haben gastrointestinale oder urologische Symptome, die von Neuroblastomen des Beckens verursacht werden.<sup>28</sup> Auch abdominale Neuroblastome können Symptome wie Obstipation oder eine Hydronephrose hervorrufen.<sup>29,13</sup> Einen erhöhten Blutdruck weisen ungefähr 1 % der Patienten auf.<sup>7</sup> Bei starkem Knochenmarkbefall kann es zu einer Verminderung der Erythrozyten, Leukozyten und/oder Thrombozyten kommen mit beispielsweise Leistungsbeeinträchtigung, Müdigkeit, Atemnot, schnellem Herzschlag, erhöhter Infektionsanfälligkeit und/oder verstärkter Blutungsneigung.<sup>30,2</sup> Bei primären oder sekundären cerebralen Neuroblastomen können allgemeine und lokale Symptome von Hirntumoren wie Kopfschmerzen oder Muskelschwäche auftreten.<sup>31,32</sup> Weitere Symptome sind beispielsweise Ödeme (= Wasseransammlungen im Gewebe) oder Heterochromia iridis.<sup>30,33</sup>

### **1.1.8 Diagnostik**

Die Diagnose Neuroblastom wird dann gestellt, wenn entweder die Tumorbiopsie einen eindeutigen lichtmikroskopischen pathologischen Befund ergibt, oder in der Knochenmarkpunktion oder Knochenmarkstanzbiopsie eindeutige Tumorzellen nachgewiesen werden und gleichzeitig zwei der drei Katecholamine bzw. Katecholaminmetaboliten Dopamin, Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure im Serum oder Urin erhöht sind. Neben Dopamin, Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure in Urin und Serum können auch Laktatdehydrogenase, Ferritin, Neuron-Spezifische Enolase, das Disialogangliosid GD2 und Chromogranin A im Serum, z. B. für prognostische Zwecke, bestimmt werden.<sup>16,7</sup> Das Ausmaß des Primärtumors und von eventuell vorhandenen Metastasen wird durch eine Computertomografie und/oder eine Magnetresonanztomografie mit 3D-Abmessungen und eine Metajodbenzylguanidin-Szintigrafie dargestellt. Durch zwei Knochenmarkbiopsien und zwei Knochenmarkaspirate wird der Befall des Knochenmarks ermittelt. Weiterhin sollte zur Darstellung einer eventuellen thorakalen Beteiligung eine Röntgen-Thorax-Aufnahme in zwei Ebenen erfolgen. Ist diese positiv oder ist eine Ausbreitung des Tumors in den Brustraum feststellbar, sollte die betroffene Region computer- oder magnetresonanztomografisch dargestellt werden. Bei negativer oder nicht

verfügbarer Metajodbenzylguanidin-Szintigrafie soll eine Technetium-Szintigrafie stattfinden. Auffälligkeiten bei der Szintigrafie sollen durch Röntgenübersichtsaufnahmen dargestellt werden. Beteiligte Lymphknoten werden computertomografisch oder magnetresonanztomografisch dargestellt und dreidimensional vermessen. Tastbare Lymphknoten können auch manuell untersucht werden. Erfolgt ein chirurgischer Eingriff, sollen Lymphknoten-Biopsien gewonnen werden.<sup>16</sup>

### 1.1.9 Pathologie

Aus der Neuralleiste entstehen u. a. die Zellen des peripheren vegetativen Nervensystems.<sup>4</sup> Zu diesen Zellen gehören auch die Schwann-Zellen, die im sympathischen Nervensystem die efferenten präganglionären Axone umhüllen.<sup>34</sup> Neuroblastische Tumore bestehen aus Neuroblasten/Ganglienzellen sowie Schwann-Zellen. Die International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) unterteilt die Neuroblastischen Tumore in Neuroblastome, Ganglioneuroblastome (gemischt und nodulär) sowie Ganglioneurome. Ein morphologisches Unterscheidungsmerkmal dieser Tumorgruppen ist der Anteil und die Verteilung des Schwann-Zell-Stromas innerhalb der Tumore.<sup>35</sup>

**Tabelle 2. International Neuroblastoma Pathology Classification**

Patientenalter in Jahren	Differenzierung	Mitosis-Karyorrhexis-Index	Prognose
Neuroblastom (Schwann-Zell-Stroma-arm)			
< 1,5	wenig differenziert oder differenzierend	niedrig oder mittel	günstig
1,5–5	differenzierend	niedrig	günstig
< 1,5	undifferenziert	hoch	ungünstig
1,5–5	wenig differenziert oder undifferenziert	mittel oder hoch	ungünstig
≥ 5			ungünstig

Ganglioneuroblastom, gemischt (Schwann-Zell-Stroma-reich)	
	günstig
Ganglioneurom (Schwann-Zell-Stroma-dominant), reifend oder reif	
	günstig
Ganglioneuroblastom, nodulär (gemischt Schwann-Zell-Stroma-arm und Schwann-Zell-Stroma-reich/-dominant)	
Die Einteilung in die prognostischen Gruppen erfolgt anhand des nodulären Anteils wie beim Neuroblastom (Schwann-Zell-Stroma-arm). Liegen noduläre Anteile mit günstiger Histologie und solche mit ungünstiger Histologie im selben Tumor vor, ist die Tumorphistologie insgesamt prognostisch ungünstig.	
Quellen: Shimada et al <sup>36</sup> und Peuchmaur et al <sup>37</sup> .	

In Deutschland werden neuroblastäre Tumore auch nach dem (modifizierten) Grading-System von Hughes et al. eingeteilt.<sup>38,13</sup> Hughes-Klassifikation: Grad I: Undifferenzierte Neuroblasten und reife Ganglienzellen. Grad II: Undifferenzierte und partiell differenzierte Neuroblasten. Grad III: Undifferenzierte Neuroblasten<sup>39</sup>. Modifizierte Hughes-Klassifikation: Grad Ia: Diffuses Ganglioneuroblastom: Diffuse Mischung aus undifferenzierten und sich differenzierenden Zellen und reifen Ganglienzellen. Grad Ib: Ganglioneuroblastom vom Kompositionstyp: Ganglioneurom mit Knötchen aus undifferenziertem Neuroblastom mit scharfer Begrenzung zwischen beiden Komponenten. Grad II: Mischung aus undifferenzierten Zellen und mindestens einigen Zellen mit partieller Differenzierung zu Ganglienzellen. Grad III: Undifferenzierte Zellen ohne Zeichen der Reifung<sup>40</sup>

### 1.1.10 Molekulargenetik

Prognostisch wichtige molekulargenetische Eigenschaften bei neuroblastären Tumoren sind die Amplifikation (= Vervielfältigung) von v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog (*MYCN*), Anomalien des Chromosoms 11q und das Vorliegen verschiedener DNA-Indices.<sup>41,42,2</sup> Physiologisch ist *MYCN* auf dem Chromosom 2 in der Region 2p23–24 lokalisiert.<sup>43</sup> Die Amplifikation des Gens kommt in ca. 20 % der

neuroblastischen Tumore vor<sup>7</sup> und ist mit einer schlechten Prognose korreliert. Ebenfalls in ca. 20 % der neuroblastären Tumore kommen Aberrationen des Chromosoms 11q vor.<sup>41</sup> In der Mehrzahl der Fälle werden Deletionen festgestellt.<sup>44</sup> Eine 11q-Aberration tritt selten in Kombination mit einer *MYCN*-Amplifikation auf und korreliert mit einer schlechten Prognose.<sup>45</sup> Ein weiteres Merkmal, das zur Abschätzung der Prognose herangezogen wird, ist der DNA-Index. Dieser stellt ein Maß für die Menge der Chromosomensätze in einer Zelle dar. Ein doppelter (diploider) Chromosomensatz hat einen DNA-Index von 1 (Standard), ein dreifacher (triploider) Chromosomensatz hat den DNA-Index 1,5. Ein DNA-Index von 1, den ca. 21 % der neuroblastären Tumore aufweisen, gilt als prognostisch ungünstig.<sup>41,46</sup> Weitere genetische Merkmale der neuroblastären Tumore werden derzeit oder in Zukunft auf ihre Aussagekraft hin untersucht. Dazu gehören beispielsweise Veränderungen oder eine veränderte Anzahl der Chromosomenabschnitte 1p, 2p, 3p, 4p, 7q, 9p, 12p, 14q, 17q und der Gene DEAD/H-box helicase 1 (*DDX1*), neuroblastoma amplified sequence (*NBAS*) und anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (*ALK*).<sup>45,42</sup> Die International Neuroblastoma Risk Group-Task Force geht davon aus, dass sich die Risikostratifizierung neuroblastärer Tumore durch Analyse des Tumorgenoms in Zukunft verbessern wird.<sup>41</sup>

### **1.1.11 Therapie**

Patienten, die bei neuroblastomtypischen Auffälligkeiten unter 3 Monate alt sind und/oder einen guten Allgemeinzustand vorweisen, werden bis zum Alter von 3 Monaten beobachtet. Bei eindeutiger Regression des Tumors wird die Beobachtung fortgesetzt. Findet diese nicht statt, ist der Patient über 3 Monate alt und/oder liegt ein schlechter Allgemeinzustand vor, wird die Diagnostik vervollständigt. Liegt ein Neuroblastom vor, wird der Patient im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien behandelt.<sup>47</sup> In Deutschland stehen dafür aktuell die Therapieoptimierungsstudien NB2004 und NB2004-HR zur Verfügung.<sup>48</sup> Danach werden die Patienten in die 3 Risikogruppen Beobachtungsgruppe, Mittlere Risikogruppe und Hochrisikogruppe eingeteilt. Bei der Beobachtungsgruppe findet als erstes ein operativer Eingriff statt, bei dem entweder eine Biopsie entnommen oder der Tumor komplett oder inkomplett



entfernt wird. Bei Progression des Resttumors oder dem Auftreten bedrohlicher Symptome wird der Patient mit einem Chemotherapieblock (N4) behandelt. Der Chemotherapieblock kann maximal 3-mal wiederholt werden, bis der Tumor nicht mehr wächst bzw. die Symptome abklingen. Ist dies nicht der Fall, wird der Patient in der Mittleren Risikogruppe weiterbehandelt. Geht der Tumor ins Stadium 4 über, werden Patienten, die das erste Lebensjahr noch nicht erreicht haben, in der Mittleren Risikogruppe behandelt. Ältere Patienten werden in der Hochrisikogruppe behandelt. Im Chemotherapieblock N4 wird mit den Medikamenten Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid und Natrium-2-mercaptoethansulfonat (MESNA) behandelt. In der Mittleren Risikogruppe findet ebenfalls als erstes eine Biopsieentnahme oder Tumorresektion statt. Danach werden die Patienten mit 3 Chemotherapieblöcken N5 und 3 Therapieblöcken N6 im Wechsel behandelt. Eventuell finden nach dem 4. und/oder 6. Chemotherapieblock noch weitere operative Eingriffe statt. Patienten unter 6 Monaten erhalten statt den Chemotherapieblöcken N5 und N6 N4-Chemotherapieblöcke. Als sogenannte Erhaltungstherapie werden bei allen Patienten der Mittleren Risikogruppe im Anschluss 4 Chemotherapieblöcke N7 gegeben. Bei stoffwechselaktivem Resttumor soll in dieser Zeit zusätzlich eine externe Radiotherapie stattfinden. Nach den N7-Zyklen wird den Patienten ein Jahr lang, mit einer 3-monatigen Pause, Retinsäure verabreicht. Im N5-Chemotherapieblock werden den Patienten Cisplatin, Etoposid, Vindesin und G-CSF verabreicht. Beim N6-Chemotherapieblock erhalten die Patienten Vincristin, Dacarbacin, Ifosfamid, Doxorubicin und G-CSF. Im N7-Chemotherapieblock werden lediglich Cyclophosphamid und MESNA verabreicht. In der Hochrisikogruppe werden die Patienten in 2 Behandlungsgruppen aufgeteilt. Nach der chirurgischen Behandlung erfolgen entweder 6 Zyklen N5 und N6 im Wechsel oder 2 Zyklen N8 und danach 6 Zyklen N5 und N6 im Wechsel. Säuglinge werden dem Standardarm zugeteilt. Patienten unter 6 Monaten werden statt mit N5/N6 im Wechsel mit N4-Chemotherapieblöcken behandelt. Bei allen Hochrisikopatienten können weitere chirurgische Eingriffe nach dem 4. und/oder 6. Zyklus erfolgen. Im Anschluss findet bei allen Hochrisiko-Patienten eine Hochdosischemotherapie mit Transplantation von patienteneigenen Stammzellen statt. Danach erfolgt die einjährige Gabe von Retinsäure, die nach

6 Monaten für 3 Monate pausiert wird. Bei stoffwechselaktivem Resttumor erfolgt bei Metajodbenzylguanidin-sensitivem Resttumor vor der Hochdosischemotherapie eine Metajodbenzylguanidin-Therapie. Nach der Hochdosischemotherapie erfolgt bei stoffwechselaktivem Resttumor eine externe Radiotherapie. Beim N8-Chemotherapiezyklus werden Topotecan, Cyclophosphamid, MESNA, Etoposid und G-CSF verabreicht. Bei der Hochdosischemotherapie werden Melphalan, Etoposid, Carboplatin, cluster of differentiation (CD) 34+-Stammzellen und G-CSF verabreicht.<sup>40,2,49</sup> Für die Behandlung des rekurrenten Neuroblastoms steht die RIST-rNB 2011-Studie zur Verfügung.<sup>50</sup>

### 1.1.12 Prognose

In Deutschland beträgt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten bis einschließlich 14 Jahren mit einem Neuroblastom oder Ganglioneuroblastom 79 %. Die 15-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt 76 %.<sup>5</sup> Die von der International Neuroblastoma Risk Group Task Force in den Jahren 2002 bis 2004 nachverfolgten 8800 Patienten bis einschließlich 21 Jahren mit Neuroblastomen, Ganglioneuroblastomen oder reifenden Ganglioneuromen hatten eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit (5-year overall survival (OS)) von 70 % ± 1 % und ein ereignisfreies Überleben nach 5 Jahren (5-year event-free survival (EFS)) von 63 % ± 1 %.

**Tabelle 3. Überlebensraten nach Stadien**

Stadien 1 & 2	80–100 %
Stadium 3	20–90 %
Stadium 4	30–40 %
Stadium 4S (< 1 Lebensjahr)	Ca. 80 %

Quelle: Hiddemann, Bartram<sup>13</sup>.

Die Prognose von Neuroblastompatienten wird beeinflusst von Stadium, Alter, Histologie, Differenzierungsstatus, MYCN-Status, 11q-Status und der Tumorzellploidie. Mit einem Klassifikationsschema der International Neuroblastoma Risk Group kann ein Neuroblastom einer von 16 verschiedenen Gruppen zugeteilt werden. Diese wiederum lassen sich in 4 verschiedene

Gruppen mit unterschiedlichen 5-year EFSs aufteilen (sehr geringes Risiko: 5-year EFS > 85 %; geringes Risiko: 5-year EFS > 75 % bis ≤ 85 %; mittleres Risiko: 5-year EFS ≥ 50 % bis ≤ 75 %; hohes Risiko: 5-year EFS < 50 %).<sup>41,51</sup>

## **1.2 Begriffserklärung: Zelllinie**

Eine Zelllinie sind Zellen, die aus einem Organismus entnommen und kultiviert wurden und deren Nachfolgezellen.<sup>52</sup>

## **1.3 Vincristin**

Vincristin wird beim Neuroblastom im Rahmen der Chemotherapieblöcke N4 und N6 intravenös in einer Menge von 0,025 mg/kgxd bzw. 0,05 mg/kgxd bei Säuglingen und Kindern, die leichter sind als 10 kg und 0,75 mg/m<sup>2</sup>xd, max. 2 mg bzw. 1,5 mg/m<sup>2</sup>xd, max. 2 mg bei älteren/schwereren Kindern appliziert. Das Alkaloid, das aus der Pflanze *Catharanthus roseus* extrahiert wird, zerstört die Mikrotubuli, indem es am  $\beta$ -Tubulin bindet (die röhrenförmigen Mikrotubuli bilden sich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin). Damit wird die Zellteilung irreversibel blockiert. Weiterhin hemmt Vincristin die DNA- und RNA-Synthese. Die Plasmahalbwertszeit von Vincristin beträgt ca. 85 Stunden. Die Plasmaproteinbindung beträgt 44 %. Es wird zu 80 % über die Galle und zu 20 % über den Urin eliminiert. Nebenwirkungen von Vincristin sind periphere Neuropathie, zentrale Neurotoxizität (selten), Verstopfung, Venenverschlusskrankheit (selten), Polyurie, Dysurie, inadäquate Antidiuretisches Hormon (ADH) Sekretion, vorübergehende Knochenmarksuppression, reversibler Haarverlust und Nekrose nach paravenöser Infusion.<sup>40,2,53,54</sup>

## **1.4 Chemotherapeutika-Resistenz**

Von Chemotherapeutika-Resistenz spricht man beispielsweise, wenn Tumorzellen Eigenschaften haben, die die proliferationshemmende oder abtötende Wirkung der Chemotherapeutika verhindern.<sup>55,56</sup> Die Hauptprinzipien der Tumorresistenz sind die verminderte Erreichbarkeit der Tumorzellen durch die spezifische Absorption, Distribution, den Metabolismus oder die Elimination eines Medikaments, ein verminderter Influx oder vermehrter Efflux, die fehlende Aktivierung oder die Inaktivierung, die Veränderung oder veränderte Menge des

Angriffsziels, reaktive Mechanismen, die zum Überleben der Zelle führen und die Dysfunktion des programmierten Zelltods.<sup>57</sup> Bekannte Resistenzmechanismen bei Neuroblastomzellen beinhalten beispielsweise den Efflux von Medikamenten durch ABC-Transporter oder den Funktionsverlust von p53.<sup>58,59</sup>

## **1.5 Ursprung der Tumorzelllinie UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>**

Die parentale Tumorzelllinie UKF-NB-2 stammt aus metastatischem Tumorgewebe aus dem Knochenmark eines Patienten des Universitätsklinikums Frankfurt mit rezidiviertem Neuroblastom im Evans-Stadium IV (Tumor mit Fernmetastasen, der nicht die Kriterien des Evans-Stadiums IV-S erfüllt). Die international anerkannte Stadieneinteilung nach Evans wurde 1971 vorgestellt und 1990 in Deutschland vom INSS abgelöst.<sup>60,61,19,13</sup> Durch Zugabe ansteigender Mengen an Vincristin in das Zellmedium (angefangen von 0,2 ng/ml) entstand die Vincristin-resistente adaptierte chemoresistente Sublinie UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>, die mit 20 ng/ml Vincristin im Zellmedium angesetzt wird.<sup>62</sup> Die Zelle ist Teil der Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection (<https://research.kent.ac.uk/industrial-biotechnology-centre/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection/>).

## **1.6 Ribonucleic-acid(RNA)-Interferenz**

Als RNA-Interferenz wird die Stilllegung von Genen durch kleine RNA-Moleküle bezeichnet. Dabei wird beispielsweise in eine Zelle eingeschleuste doppelsträngige RNA durch das Enzym Dicer in sogenannte small interfering RNAs (siRNAs) mit jeweils ca. 21 Basenpaaren zerlegt. Nach Bindung einer siRNA an einen speziellen Proteinkomplex verbleibt nur einer der beiden Einzelstränge dort. Dieser bindet an komplementäre mRNA. Ein Argonautenprotein des Proteinkomplexes katalysiert die Spaltung dieser mRNA, die abgebaut wird.<sup>1</sup> Somit ist die Proteinbiosynthese aus dieser mRNA verhindert. Aufgrund des katalytischen Mechanismus kann eine siRNA zum Abbau vieler mRNAs führen.<sup>63</sup> Die Stilllegung der Gene ist nur vorübergehend, weil sich die siRNA nicht repliziert und sich dadurch das Mengenverhältnis siRNA:Zellen bei Proliferation reduziert. Innerhalb des Proteinkomplexes scheint die siRNA vor Abbau relativ geschützt zu sein.<sup>64</sup> Durch siRNAs kann nahezu jedes Gen stillgelegt werden.<sup>65</sup>

## 1.7 Synthetische Letalität

Tumorzellen entstehen meist durch eine veränderte Expression bestimmter Gene. Diese Mutationen können sowohl zur Bekämpfung der Krebsentstehung, aber auch im Kampf gegen die Entwicklung von Chemoresistenzen ein geeignetes Ziel darstellen.<sup>66</sup> Hierzu sind verschiedene Methoden beschrieben, eine davon stellt die synthetische Letalität dar. Dabei unterliegt die synthetische Letalität dem Prinzip von Genpaaren, die mit einander funktionell in Bezug stehen. Ist die Expression nur bei einem der beiden Gene aus dem Genpaar verändert, hat das keine Auswirkung auf die Zellviabilität. Kommt es jedoch zu einer gleichzeitigen Änderung der Expression beider Gene, so führt dies zum Tod der Zelle.<sup>67,68</sup> Mithilfe dieses Prozesses wäre es bei einer Identifizierung dieser Resistenz-assoziierten Partnergene möglich, Vincristin-resistente Neuroblastomzellen spezifisch zu töten. Zur Identifizierung dieser Partnergene, die in einem synthetisch letalen Verhältnis zueinander stehen, wurden im Rahmen des EU-geförderten Kooperationsprojekts „SYNLET“ (*Regulatory Control Networks of Synthetic Lethality*) im Vorfeld genomweite Genexpressionsprofile von 6 humanen chemosensitiven Neuroblastom-zelllinien und ihren jeweiligen Vincristin-resistenten Sublinien mit Hilfe von Microarray-Analysen auf der Transkriptionsebene verglichen. Die Veränderungen wurden mit verschiedenen bioinformatischen Methoden analysiert und ausgewertet, um so Expressionsänderungen in Genen zu identifizieren, die ein synthetisch letales Partnergen aufweisen.

## 1.8 Zielsetzung

Im Rahmen des EU-geförderten SYNLET-Projekts wurde basierend auf den Genexpressionsdaten von 6 parental chemosensitiven Neuroblastom-zelllinien und ihren an Vincristin adaptierten Sublinien mit Hilfe verschiedener bioinformatischer und computerbiologischer Modelle eine Konsensusliste von Kandidatengenen erstellt, deren Hemmung/Ausschalten durch spezifische siRNAs zu einer (Re)Sensibilisierung gegen Vincristin und somit zu einer Senkung der Zellviabilität führen sollte. Das Ziel dieser Arbeit war die Durchführung eines siRNA-Screens mit 40 ausgewählten Kandidatengenen in

der Vincristin-resistenten Sublinie UKF-NB-2<sup>rVCR</sup><sup>20</sup>, die eine der 6 untersuchten an Vincristin adaptieren Neuroblastomsublinien ist. Dabei soll der Einfluss der Hemmung dieser Gene auf die Zellviabilität und Vincristinsensitivität in UKF-NB-2<sup>rVCR</sup><sup>20</sup> untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Blot-Apparatur (Mini-PROTEAN)	Biorad, Hercules
Brutschränke mit Kohlendioxid(CO <sub>2</sub> )-Begasung (MCO-20AIC)	Sanyo, Osaka
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Eismaschine (micro-cube® ICE)	Sanyo, Osaka
Elektrische Pipettierhilfe (Pipetboy comfort)	IBS Biosystems
Faserpads	General Electric, Boston
Filmkassette (X-RAY-CASSETTE)	Rego, Augsburg
Fotometer (Infinite® M200)	Tecan, Männedorf
Gelelektrophoresesystem (Mini-PROTEAN)	Biorad, Hercules
Glaswaren	Schott, Mainz Duran, Wertheim/Main
Kühlschränke	Liebherr, Bulle
Magnetrührer	Velp Scientifica, Usmate
Mikroskop (Olympus CKX 41)	Olympus, Tokio
NEON Transfektionssystem	Invitrogen
pH-Meter (pH 730, WTW SERIES)	WTW
Pipettierhilfen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Rollenmischer (RM5-V)	Labortechnik Fröbel, Lindau
Sicherheitswerkbank (HERA safe)	Kendro
Software BD FACSDiva™	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Software i-control 1.5	Tecan, Männedorf
Spannungsquellen (Power Pac HC)	Biorad, Hercules
Thermomixer (comfort)	Eppendorf, Hamburg

Vortex (2 X <sup>3</sup> )	Velp Scientifica, Usmate
Waage (KERN 440-47N)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Zählkammer (Bürker)	Marienfeld superior, Lauda-Königshofen
Zellzählgerät (Countess)	Invitrogen
Zentrifuge (ROTANTA 460 R)	Hettich, Bäch
Zentrifuge (Mikro 200)	Hettich, Bäch

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Einwegpipetten (Costar Stripetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning, Corning
Farblaserfolien	Soennecken, Overath
Filterpapier	Biorad, Hercules
Mehrzwecktücher (Vala®Comfort)	Hartmann, Heidenheim
Mikroschraubröhrchen (0,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
NEON Tipps (10 µl, 100 µl)	Invitrogen
Nitrozellulosemembran (Protran-Nitrocellulose Transfer Membran)	General Electric, Boston
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	General Electric, Boston
RNAi-Transfektionskontrolle (BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo)	Invitrogen
Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht



Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Gewebekulturplatten (6-, 24- und 96-Well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster
small interfering RNA mit verschiedenen Zielsequenzen, s. Anhang 9.1	Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Waltham)

### 2.3 Zelllinie

UKF-NB-2<sup>v</sup>VCR<sup>20</sup>

### 2.4 Antikörper (Western Blot)

Anti-β-Aktin (Maus)	Biovision, Milpitas
Anti-switch/sucrose non-fermenting (SWI/SNF) related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1 (SMARCC1) (Maus)	Abnova, Taipeh
Anti-Maus Immunglobulin G (IgG) (Ziege)	Calbiochem

### 2.5 Kits, einzelne Chemikalien, Enzyme und sonstige Zusatzstoffe

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat ((APS) ≥ 98 %, p. a. (10 % w/v))	Roth, Karlsruhe
Aqua ad Injunctabilia	Braun, Melsungen
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH
Detergent compatible (DC) Protein Assay Kit	Biorad, Hercules
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
ECL Western Blot Detektionsreagenzien (Detection Reagents Luminol Enhancer Solution & Peroxide Solution)	Thermo Scientific
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (Titriplex® III)	Merck, Darmstadt
Entwickler (Roentogen liquid)	Tetenal, Norderstedt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fixierer (Roentogen Superfix)	Tetenal, Norderstedt
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Biochrom, Berlin
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsstandard für Proteine (ColorPlus Prestained Protein Ladder (10–230 kDa))	Biolabs, Ipswich
MTT-Pulver (MTT= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Serva
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe / Sigma-Aldrich, St. Louis
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydroxid (NaOH, 32 %)	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe / Sigma-Aldrich, St. Louis

NEON™	Invitrogen
„Transfection System Kits“ (10 µl, 100 µl)	
Resuspensionspuffer (R)	
Elektrolytpuffer (E bzw. E2)	
Okadasäure	Sigma-Aldrich, St. Louis
Orthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Propidiumiodid	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail Set III (PIM)	Calbiochem
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischverhältnis 37,1 : 1)	Roth, Karlsruhe
Signal Boost™ Immunoreaction Enhancer Kit	Calbiochem
Streptomycin	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tetra-Natriumdiphosphat-decahydrat	Merck, Darmstadt
Tris-Base	AppliChem
Tris/HCl	AppliChem / Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Fluka
Trypanblau (0,4 %)	Invitrogen
Trypsin (BAEE 1570 units/ml)	Sigma
Tween-20	Merck, Darmstadt
Vincristin	Gry

## 2.6 Lösungen

### 2.6.1 Speziell Viabilitätstest

MTT-Lösung	1 g MTT mit PBS auf 500 ml auffüllen
------------	---

steril filtrieren

## **2.6.2 Speziell Proteinextraktion, Angleichung der Proben-Proteinkonzentrationen, Natriumlaurylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western Blot**

1x Blockpuffer auf 1 l Aqua dest.	50 mmol Tris/HCl (pH 7,5) 200 mmol NaCl 0,5 ml Tween-20 30 g BSA
10x Gelelektrophorese-Laufpuffer auf 1 l Aqua dest.	30 g Tris-Base 143 g Glycin 10 g SDS
1x Gelelektrophorese-Laufpuffer	pH 8,3
6-fach-Probenpuffer	0,35 mol Tris/HCl pH 6,8 360 ml Glycerin 0,6 mol DTT 102,8 g SDS 0,012 % Bromphenolblau mit double-distilled water (ddH <sub>2</sub> O) auf 1 l auffüllen
10x Transferpuffer (Blotpuffer) auf 1 l Aqua dest.	30 g Tris-Base 143 g Glycin
1x Transferpuffer	+ 20 % Methanol [v/v] pH 8,3
Triton-X-100-Lysispuffer auf 1 l Aqua bidest.	20 mmol Tris/HCl pH 7,5 150 mmol NaCl

	10 mmol NaPPi
	20 mmol NaF
	10 ml Triton-X-100
Waschpuffer 10x Konzentrat auf 1 l	60,6 g Tris
Aqua dest.	87,7 g NaCl
	pH 7,5
1x Waschpuffer	+ 0,3 % Tween [v/v]
Western-Blot-Lysispuffer (pro 6-Well-Platten-Well 100 µl)	frisch ansetzen:
	10 µl/ml Orthovanadat
	10 µl/ml Okadasäure
	12 µl/ml PIM
	4 µl/ml PMSF
	mit Triton-X-100 Lysispuffer auffüllen

### 2.6.3 Sonstige

IMDM	17,26 g Trockenmedium mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen steril filtrieren
L-Glutamin	29,2 g L-Glutamin mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen steril filtrieren
Natriumbicarbonatlösung	75 g NaHCO <sub>3</sub> mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen steril filtrieren
PBS 10x Konzentrat	95,5 g PBS-Trockenmedium

	mit Aqua ad injectabilia auf 1 l auffüllen autoklavieren
1x PBS	50 ml 10x PBS mit Aqua ad injectabilia auf 500 ml auffüllen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10 <sup>6</sup> IE Penicillin 10 g Streptomycinsulfat mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen steril filtrieren
SDS-Lösung	400 g SDS mit Dimethylformamid und Aqua dest. im Verhältnis 1 : 1 auf 2 l auffüllen pH 4,7
Trypsin-Lösung	2,0 g Trypsin 0,6 g EDTA mit PBS auf 1 l auffüllen steril filtrieren

## 2.7 Gele

Sammelgel	2,48 ml H <sub>2</sub> O 0,55 ml 30 % Acrylamid [v/v] 0,44 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8 35 µl 10 % SDS [w/v] 24 µl 10 % APS [w/v] 4,5 µl TEMED
Trenngel	4,3/2,7 ml H <sub>2</sub> O

3,2/4,8 ml 30 % Acrylamid [v/v]

4,5 ml 1 M Tris/HCl pH 8,8

120  $\mu$ l 10 % SDS [w/v]

90  $\mu$ l 10 % APS [w/v]

15  $\mu$ l TEMED

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultivierung**

Die adhärennten Zellen der Zelllinie UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> wuchsen bei einer Temperatur von 37 °C in CO<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre unter sterilen Bedingungen in einem Brutschrank in Zellkulturflaschen mit einer effektiven Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> in 10 bzw. 20 ml Nährmedium, das aus 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Glutamin, 4 % Natriumbicarbonat, 10 % Fötalem Kälberserum und 83 % Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) bestand.<sup>69,70</sup> Einmal wöchentlich erfolgte unter einer Sterilbank die Umsetzung der Zellen in neue Zellkulturgefäße. Kurz vor der Umsetzung wurden die Zellen lichtmikroskopisch betrachtet, um Verunreinigungen durch Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen und andere Störungen der Zellentwicklung frühzeitig zu erkennen und die Zelldichte zu beurteilen. Die Umsetzung erfolgte wie folgt: Zuerst wurde das Medium abgegossen. Mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurden die Zellen gewaschen und somit von Mediumsresten befreit. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellflasche gelöst. Dann wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, dadurch erfolgte auch die Inaktivierung des Trypsins. Ein Fünftel, nach einiger Zeit ein Zehntel der Zell-Medium-Suspension wurde in mit Neumedium gefüllte Zellkulturgefäße überführt (Splittingrate 1/5 bzw. 1/10). Zum Schluss wurde das Zytostatikum Vincristin in einer Konzentration von 20 ng/ml hinzugefügt.

### **3.2 Transfektion**

Transfektion bedeutet das Einbringen von genetischem Material in eukaryotische Zellen.<sup>71</sup> Um eine RNA Interferenz hervorzurufen, wurden sogenannte small interfering RNAs (siRNA) in die Zelle eingeschleust. Als Transfektionsmethode wurde dabei die Elektroporation verwendet. Bei der Transfektion durch Elektroporation werden zwischen 2 Elektroden, zwischen denen sich die Zellsuspension befindet, kurzfristig elektrische Felder generiert. Ab einer bestimmten Spannung entstehen in der Zellmembran Poren. Aufgrund der negativen Ladung der siRNAs werden sie von der positiven Elektrode angezogen, wodurch eine Wanderungsbewegung entsteht. So gelangen die



siRNAs ins Zellinnere.<sup>72-74</sup> Die Transfektion erfolgte unter sterilen Bedingungen. Am Tag vor der Transfektion wurden die 5–6 Tage in den Zellkulturgefäßen gewachsenen Zellen im Verhältnis 1 : 3 umgesetzt, um die für die Transfektion benötigte Zelldichte von 60–80 % zu erreichen. Die Transfektion wurde dann folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurde lichtmikroskopisch die Unversehrtheit der Zellen festgestellt. Danach wurde das alte Zellmedium entfernt, anschließend die Zellen mit PBS gewaschen (nach der Zugabe von PBS in das Zellkulturgefäß wurde dieses geschwenkt und dann ausgeschüttet). Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet. Die jetzt losen Zellen wurden in frischem Medium suspendiert. Eine 10- $\mu$ l-Probe wurde entnommen, mit Trypanblau gefärbt und mit einem elektrischen Zellzählgerät gezählt. Mit dem Ergebnis wurde die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension berechnet.

### **3.3 Transfektionsoptimierung**

#### **3.3.1 Transfektion von mit Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-gekoppelter siRNA**

Auf dem Neon® Transfektionsgerät sind 24 verschiedene Programme für die Transfektion gespeichert. Jedes Programm beinhaltet eine bestimmte elektrische Spannung, Dauer und Anzahl der Impulse für die Elektroporation. Eine höhere elektrische Spannung, Dauer und Anzahl der Impulse geht mit einem vermehrten Einschleusen von siRNA, aber auch einer verminderten Zellviabilität einher. Bei der Transfektionsoptimierung wurde das für die Transfektion der UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen geeignetste Programm ermittelt. Dafür wurden insgesamt 24-mal  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen mit einer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiozyanat (FITC) gekoppelten siRNA ohne Zielgen (scramble-siRNA) transfiziert und in eine 24-Well-Gewebekulturplatte ausgesät. Für jedes Well wurde ein unterschiedliches Transfektionsprogramm verwendet und die Effizienz (= Anzahl der transfizierten Zellen), Intensität (= Durchschnittsmenge der siRNA pro Zelle) und die Zellviabilität durch Durchflusszytometrie (s. u.) ermittelt. Das für die Versuche benötigte Volumen, das die Zellzahl  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/Well der zur Transfektionsoptimierung verwendeten 24-Well-Platte beinhaltete, wurde für die gezählten Zellen (siehe oben) berechnet und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurde die Zellsuspension bei 150 g und 19 °C für 5 Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS resuspendiert und dann erneut bei 150 g und 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wurde der Überstand abgegossen und die Zellen mit 297 µl Resuspensionspuffer R resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und 3 µl verdünnte FITC-gekoppelte siRNA hinzugegeben. Dann wurde die Neon® Küvette mit 3 ml Neon® Elektrolytpuffer E2 gefüllt. Nach Aufnahme von 10 µl der Zellsuspension wurde die Neon® Pipette in die Neon® Küvette eingesetzt und dann die Elektroporation durchgeführt. Dabei wurden alle 24 Programme durchgetestet. Die 10-µl-Neon®-Pipettenspitzen wurden jeweils 2-mal verwendet. Die Neon® Küvette wurde alle 10 Durchgänge gewechselt und mit neuem Elektrolytpuffer gefüllt. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in die Wells der 24-well Gewebekulturplatte ausgesät.

### **3.3.2 Durchflusszytometrie**

Am Tag nach der Transfektion wurde die Menge der noch lebenden Zellen pro Well per Lichtmikroskop abgeschätzt und im Optimierungsprotokoll notiert. Dann wurden die Zellen für das Durchflusszytometer vorbereitet. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Boden der Wells gelöst, mit Medium resuspendiert und pro Well in jeweils ein Rundbodenröhrchen überführt. Danach wurden die Zellen bei 20 °C und 1600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen mit PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS resuspendiert. Dann wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid hinzugefügt. Dieser kann nur defekte Membranen passieren und markiert somit tote Zellen. Mit dem Durchflusszytometer kann die Anzahl, die Größe und die Granularität der Zellen ermittelt werden. Weiterhin registrieren Detektoren die Menge und die Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen wie FITC und Propidiumiodid.<sup>75,76</sup> Damit konnte die Effizienz, die Intensität und die Zellviabilität (s. o.) festgestellt werden (s. Anhang 9.3).

Durch die mit dem Durchflusszytometer gemessenen Werte wurde das Optimierungsprotokoll vervollständigt und das für die Transfektion der UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen optimalste Programm (Programm 4, elektrische Spannung 1600 Volt, Dauer der Impulse 20 ms, 1 Impuls) ausgewählt.

### **3.4 Transfektion der vorgegebenen siRNAs**

Mit dem aus der Optimierung ermittelten Programm 4 konnte die Zelllinie UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup> nun mit den siRNAs für die Gene aus der Konsensusliste transfiziert werden. Das für die Versuche benötigte Volumen, das die Zellzahl  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/Well der verwendeten 6-Well-Platte beinhaltete, wurde berechnet (vorher Zählung der Zellen, s. o.) und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurde die Zellsuspension bei 150 g und 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS resuspendiert und dann erneut bei 150 g und 19 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Während der Zentrifugation der Zellsuspension wurden die zuvor vorbereiteten siRNA-Aliquots (30 µl, darin enthalten 2 µmol siRNA) aufgetaut und in Reaktionsgefäße gegeben. Außerdem wurde eine mit Nährmedium versehene Multiwell Gewebekulturplatte bereitgestellt. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wurde der Überstand abgegossen und die Zellen mit 645 µl Resuspensionspuffer R resuspendiert. Die Suspension wurde auf 3x 30-µl-siRNA-Aliquots verteilt. Dann wurde die Neon® Küvette mit 3 ml Neon® Elektrolytpuffer E2 gefüllt. Nach Aufnahme von 100 µl der Zellsuspension wurde die Neon® Pipette in die Neon® Küvette eingesetzt und dann die Elektroporation durchgeführt. Die 100-µl-Neon®-Pipettenspitzen wurden jeweils 2-mal verwendet. Nach jedem Wechsel der spezifischen siRNA wurde der Neon® Elektrolytpuffer E2 ausgetauscht. Die Neon® Küvette wurde alle 10 Durchgänge gewechselt und mit neuem Elektrolytpuffer gefüllt. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in die Wells der 6-Well-Gewebekulturplatte ausgesät. Pro 6-Well-Platte wurden, außer bei den 6-Well-Platten, die die Pufferkontrolle enthielten, in der Regel 3 verschiedene siRNAs im Doppelansatz verwendet. Im Rahmen des SYNLET-Projektes wurden folgende Zielgene durch siRNAs herunterreguliert (Funktionen der kodierten Proteine sind aufgeführt):

1. *ACTR1A* (ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)): Beteiligt z. B. an Bewegungsvorgängen innerhalb einer Zelle
2. *ACTR1B* (ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast)): Beteiligt z. B. an Bewegungsvorgängen innerhalb einer Zelle
3. *ARPC1A* (actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa): Evtl. beteiligt an der Überwachung der Aktin-Polymerisation in Zellen
4. *ARPC3* (actin related protein 2/3 complex, subunit 3): Beteiligt an der Überwachung der Aktin-Polymerisation
5. *ATP2C1* (ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, type 2C, member 1): Katalysiert die Hydrolyse von ATP verbunden mit dem Transport von Kalzium-Ionen
6. *BIN3* (bridging integrator 3): Beteiligt an der Lokalisation von F-Aktin bei Zytokinese und Septierung
7. *CALR* (calreticulin): Bindet Calcium und fördert Faltung, „oligomeric assembly“ und Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum
8. *DAPK1* (death-associated protein kinase 1): Positiver Mediator von Gamma-Interferon induziertem programmiertem Zelltod
9. *DST* (dystonin): Verknüpfendes Protein (Integrator von Intermediär-Filamenten, Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett-Netzwerken)
10. *FMN* (formin 1): Beteiligt an der Bildung der Adherent Junction und an der Polymerisation von linearen Aktin-Strängen
11. *FMN2* (formin 2): Evtl. wichtig für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und die Zellpolarität
12. *FNBP1* (formin binding protein 1): Evtl. Verbindung zwischen der Rho-related-GTP-binding-protein-RhoN(RND2)-Signalgebung und der Regulation des Aktin-Zytoskeletts, beteiligt an der Clathrin-vermittelten Endozytose
13. *FOXJ1* (forkhead box J1): Evtl. Transkriptionsfaktor, der für die motile Ziliogenese benötigt wird.
14. *ITSN1* (intersectin 1 (Sarcoma (Src) homology 3 (SH3) domain protein)): Koordiniert indirekt endozytischen Membranverkehr mit der Aktin-Zusammenfüge-Maschinerie. Könnte die Bildung von Clathrin-Coated Vesikeln regulieren und könnte beteiligt sein am Recycling synaptischer Vesikel

15. *ITSN2* (intersectin 2): Reguliert evtl. die Bildung von Clathrin-Coated Vesikeln
16. *KRAS2* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog): GTPase, beteiligt an der Regulation der Zellproliferation
17. *LCP1* (lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)): Aktin-bindend
18. *MAEA* (macrophage erythroblast attacher): Vermittelt die Befestigung von Erythroblasten an Makrophagen
19. *MAP2K1* (mitogen-activated protein kinase kinase 1): Teil des MAP-Kinasen-Signaltransduktionswegs, dadurch beteiligt z. B. an Proliferation, Differenzierung, Transkriptionsregulation und Entwicklung
20. *MAP2K2* (mitogen-activated protein kinase kinase 2): Teil der Mitogen-Wachstumsfaktor-Signaltransduktion, aktiviert MAPK1 und MAPK2
21. *MAPK1* (mitogen-activated protein kinase 1): Beteiligt an Zellwachstum, Adhäsion, Überleben und Differenzierung
22. *NF1* (neurofibromin 1): Evtl. negativer Regulierer des Ras-Signaltransduktionswegs
23. *NFYA* (nuclear transcription factor Y, alpha): Komponente des Transkriptionsfaktors NF-Y, der als Aktivator und als Repressor fungieren kann
24. *NFYB* (nuclear transcription factor Y, beta): Komponente des Transkriptionsfaktors NF-Y, der als Aktivator und als Repressor fungieren kann
25. *NFYC* (nuclear transcription factor Y, gamma): Komponente des Transkriptionsfaktors NF-Y, der als Aktivator und als Repressor fungieren kann
26. *NRAS* (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog): GTPase
27. *PAK4* (p21 protein (cell-division-control-protein-42-homolog(Cdc42)/rat-sarcoma(Ras)-related-C3-botulinum-toxin-substrate(Rac))-activated-kinase-4): Beteiligt an verschiedenen Signalwegen (z. B. Regulation des Zytoskeletts, Zellmigration, Wachstum, Proliferation und Zellüberleben)
28. *PAK6* (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6): Transkriptionsregulation

29. *PAK7* (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7): Beteiligt an verschiedenen Signalwegen (z. B. Regulation des Zytoskeletts, Zellmigration, Proliferation und Zellüberleben)
30. *RICS* (Ras homology (Rho) GTPase activating protein 32): Moduliert evtl. die Rho-GTPase und reguliert damit evtl. die Wirbelsäulenmorphologie und -stärke
31. *SMARCA1* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1): Beteiligt an der Transkription, evtl. beteiligt an der Beschädigung der DNA, Wachstumshemmung und Apoptose von Krebszellen
32. *SMARCA5* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5): Evtl. Transkriptionsregulation einiger Gene durch Veränderung der Chromatinstruktur um diese Gene herum
33. *SMARCB1* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1): Teil eines Komplexes, der der Transkriptionsmaschinerie einen effektiveren Zugriff auf ihre Ziele ermöglicht
34. *SMARCC1* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1): Evtl. Transkriptionsregulation einiger Gene durch Veränderung der Chromatinstruktur um diese Gene herum
35. *SMARCC2* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2): Evtl. Transkriptionsregulation einiger Gene durch Veränderung der Chromatinstruktur um diese Gene herum
36. *STK35* (serine/threonine kinase 35): Evtl. Regulierer von Aktin-Stressfasern in Nichtmuskelzellen
37. *TOCA1* (formin binding protein 1-like): Fördert die Aktin-Polymerisation, ist deshalb beteiligt an einem Pfad, der Signale der Zelloberfläche mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet
38. *TPM2* (tropomyosin 2 (beta)): Bindet Aktinfilamente

39. *TRIP10* (thyroid hormone receptor interactor 10): Beteiligt beispielsweise an Transportprozessen

40. *WASPIP* (Wiskott-Aldrich syndrome/Wiskott-Aldrich syndrome like (WAS/WASL) interacting protein family, member 1): Beteiligt an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts<sup>42,77-80</sup>

Im Unterschied zur Transfektionsoptimierung wurden nach der Transfektion von siRNAs mit Zielgenen für die Aussaat der Zellen 6-Well-Platten verwendet. Dabei wurden in der Regel für jede siRNA pro Versuchstag 2 Wells einer 6-Well-Platte verwendet, in die jeweils  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen ausgesät wurden. Außerdem wurden an jedem Versuchstag in 2 Wells einer 6-Well-Platte Zellen ausgesät, die ohne siRNA im Transfektionsgerät den Impulsen ausgesetzt worden waren (Pufferkontrolle) und in ebenfalls 2 Wells Zellen ausgesät, die mit einer siRNA ohne Zielprotein transfiziert worden waren (scrambled Kontrolle). Jede Kandidatengen-siRNA wurde 2x an UKF-NB-2rVCR<sup>20</sup> transfiziert (4 Wells). Die Zellen in den 6-Well-Platten wurden anschließend zur Bebrütung in den Brutschrank gestellt. Am Tag nach der Transfektion wurde unter sterilen Bedingungen das alte Medium aus allen 6 Wells der 6-Well-Platte entfernt und 2 ml frisches Medium pro Well zugegeben. Die spezifischen Sequenzen aller verwendeter siRNAs sind in Anhang 9.1 aufgeführt.

### **3.5 Viabilitätstest**

Einen Tag nach dem Mediumwechsel (48 h nach Transfektion) wurde mit den transfizierten Zellen ein Viabilitätstest durchgeführt. Dabei wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit abfallenden Konzentrationen an Vincristin versehen. Für den Viabilitätstest wurde pro 2 Wells der mit den transfizierten Zellen versehenen 6-Well-Platte eine 96-Well-Platte angesetzt. Die erste und letzte Reihe der 96-Well-Platte beinhaltete lediglich pro Well 100 µl Medium und wurde zur Kontrolle verwendet (Mediumkontrolle). In die restlichen 10 Reihen wurden pro Well jeweils 50 µl Medium und 20.000 transfizierte Zellen in Resuspensionsmedium (insgesamt nochmal 50 µl) gegeben, wobei jeweils 5 Reihen der 96-Well-Platte Zellen eines Wells der 6-Well-Platte enthielten (s. Abb. 1). Jeweils 4 der 5 mit Zellen versehenen Reihen eines 6-Well-Platten-Wells wurden mit absteigenden Konzentrationen (100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5

ng/ml) an Vincristin versehen. Der letzten Reihe mit Zellen wurde kein Vincristin beigefügt. Diese Wells dienten der Analyse der Zellsterblichkeit der transfizierten Zellen ohne Zugabe von Vincristin (Zellkontrolle).



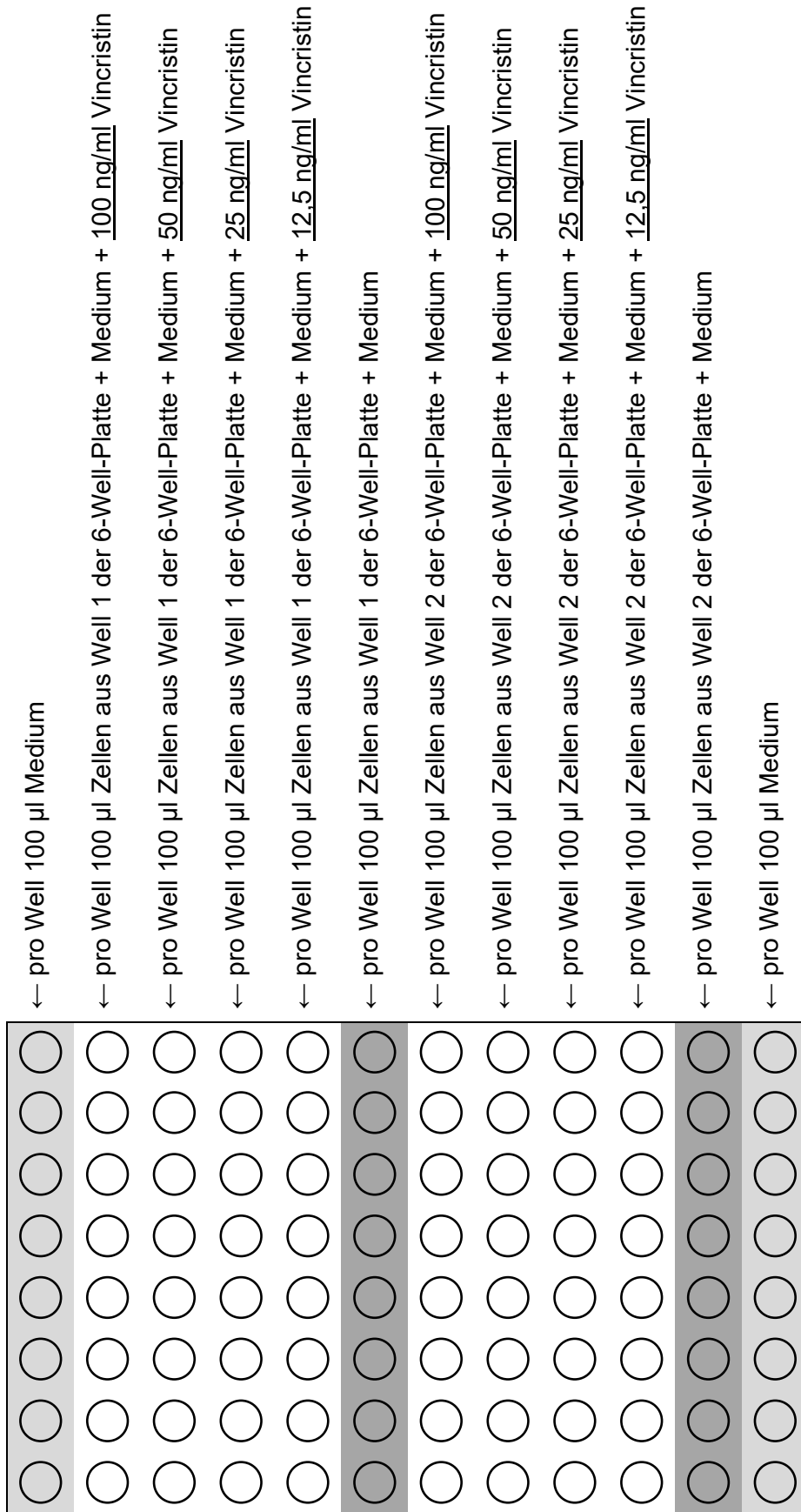


Abbildung 1. Aufbau einer 96-Well-MTT-Platte

Nach 5 Tagen Bebrütung wurde in jedes Well 25 µl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) gegeben. MTT ist ein gelber Farbstoff, der in lebenden Zellen zum blau-violetten Formazan reduziert wird.<sup>81</sup> Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde in jedes Well 100 µl Sodium Dodecyl Sulfate (SDS 20 % Lösung) gegeben. SDS ist ein anionisches Detergens, das Zellmembranen auflöst und Formazankristalle löst. So werden die Zellen zerstört, die Umsetzungsreaktion gestoppt und eine photometrische Messung ermöglicht. Je höher die Konzentration des Formazans ist, desto mehr Zellen haben überlebt.<sup>82,83</sup> Einen Tag später erfolgte die photometrische Messung der Farbstoffkonzentration bei einer Wellenlänge von 560 zu 620 nm. Die Kurven der mit den verschiedenen siRNAs transfizierten Zellen wurden mit den Kurven der Kontrollen verglichen und so festgestellt, welche siRNAs (unter Vincristin-Zugabe) zu einer veränderten Zellviabilität führten.

### **3.6 Transfektion für den Western Blot**

War nach der Transfektion einer Kandidatengen-siRNA die Zellviabilität stark vermindert, wurde die Herunterregulierung des jeweiligen Proteins durch die spezifische siRNA im Western Blot überprüft. Dazu wurden die Zellen jeweils einer 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit der spezifischen siRNA und einer anderen 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit scrambled siRNA transfiziert. Außerdem wurde eine Pufferkontrolle angefertigt. Die Zellen jeder 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden in jeweils eine 6-Well-Platte ausgesät.

### **3.7 Proteinextraktion**

Nach zwei Tagen Inkubation nach Transfektion (mit Mediumwechsel) wurde zuerst das Zellmedium aus den 6-Well-Platten abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und mit Western-Blot-Lysispuffer die Zellmembranen aufgelöst. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 Minuten im Kühlschrank wurde die entstandene Masse mit einer Pipette aufgenommen und pro 6-Well-Platte in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde dann 5–10 Minuten bei 7500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand, der das Proteinextrakt darstellte, wurde mit einer Pipette abgenommen. Er konnte dann entweder sofort für Versuche verwendet oder im Eisfach aufbewahrt werden.

### 3.8 Angleichung der Proben-Proteinkonzentrationen

Um die Proteinkonzentrationen in den bei der Proteinextraktion gewonnenen Proben bestimmen zu können, wurden zuerst 5 Reihen einer 96-Well-Platte jeweils im Dreifachansatz mit je 5 µl pro Well Bovinem Serum Albumin (BSA) in den Konzentrationen 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 und 2,5 mg/ml befüllt. Von den extrahierten Proteinen der mit der siRNA transfizierten Zellen, der scrambled Kontrolle und der Pufferkontrolle wurden ebenfalls im Dreifachansatz je 5 µl/Well gegeben. In alle verwendeten Wells wurde dann 25 µl von einer Mischung aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S gegeben (DC Protein Assay Kit von Biorad). Die Kupferionen in dieser Mischung bildeten mit den Proteinen Biuret-Komplexe. Nach Zugabe von 200 µl/Well Reagenz B wurden die Kupfer-Biuret-Komplexe zu einem blauen Farbstoff reduziert.<sup>84,85</sup> Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde mit dem Fotometer die Absorption bei 620 nm gemessen, mit der Absorption und den bekannten Konzentrationen des BSA eine Eichkurve erstellt und so anhand der Absorption der reduzierten Proben-Komplexe die Proteinkonzentrationen ermittelt (s. Abb. 2 Beispiel).

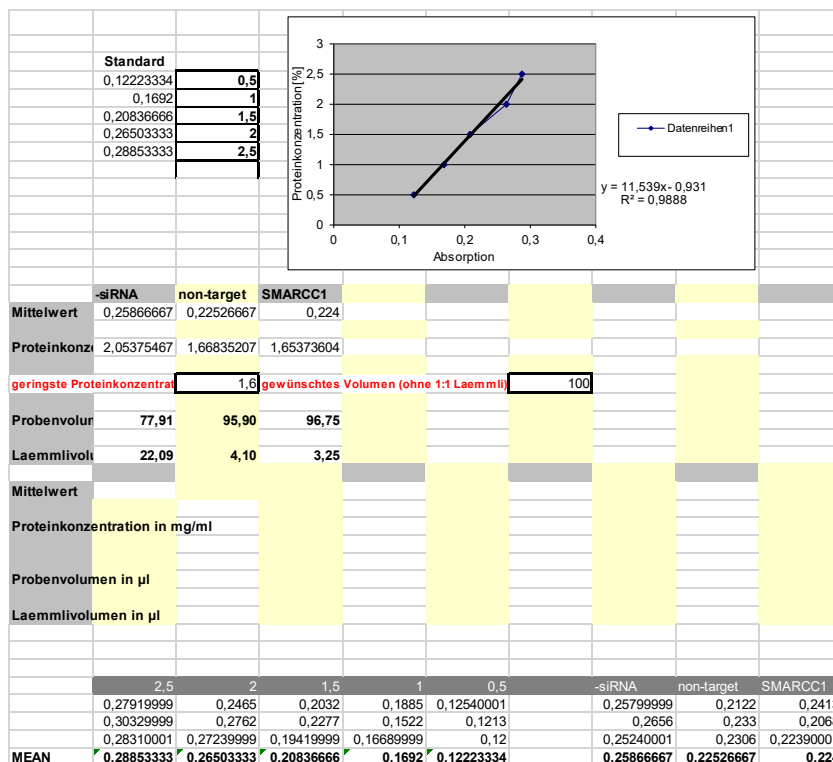


Abbildung 2. Berechnung der benötigten Proteinprobenvolumina

Aus den Proteinkonzentrationen wurden dann die benötigten Probenvolumina errechnet und in Reaktionsgefäße überführt. Die Lösungen wurden mit Triton-X-100-Lysispuffer verdünnt, so dass alle Elektrophorese-Proben dieselbe Proteinkonzentration beinhalten.

### **3.9 Natriumlaurylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese**

1/6 des Volumens wurde nun von einem Dithiothreitol (DTT) und SDS enthaltenden 6-fach-Probenpuffer in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Proben wurden mittels Vortex geschüttelt und anschließend im Thermoblock für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Dabei führten DTT und SDS zum Aufbrechen der Disulfidbrücken und zur Entfaltung und Trennung der Proteine. Es entstanden negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit annähernd konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis, die gewährleisten, dass die Proteine bei der späteren Gelelektrophorese nicht aufgrund ihrer Eigenladung, Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur, sondern anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt wurden. Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird über einem Acrylamid enthaltenden Gel ein elektrisches Feld angelegt. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern durch die Poren des Gels in Richtung der positiven Anode. Je kleiner der Stokes-Radius und das Molekulargewicht der SDS-Protein-Komplexe sind, desto schneller wandern sie durch die Poren und trennen sich dadurch entsprechend ihres Molekulargewichtes auf.<sup>86,87</sup> Für die Elektrophorese wurden 2 Gele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt und pH-Wert benötigt: ein Sammelgel mit geringerem Acrylamidgehalt und damit größeren Poren, das zur Aufkonzentration der Proteine diente und ein Trenngel, innerhalb dessen die Proteine separiert wurden. Die Inhaltsstoffe des Trenngels (siehe Materialteil Abschnitt 2.7) wurden in einem Glasgefäß zusammengemischt und in eine Form aus abgedichteten Glasplatten gegeben. Dann wurde zur Ausbildung einer glatten Oberfläche Isopropanol darüberschichtet, das nach der 15–30-minütigen Polymerisation abgegossen wurde. Die Inhaltsstoffe des Sammelgels wurden ebenfalls zusammengemischt und dann auf das Trenngel gegossen. Dann wurde ein Kamm hineingegeben, der zur Ausbildung der Geltaschen, in die später die Proteinproben eingetragen wurden, führte. Das Sammelgel wurde 30–60 Minuten polymerisiert. Dann wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen. Die

Gele wurden dann mitsamt der Glasplatten-Form in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut (die Geltaschen befanden sich auf der Kathodenseite des Gels). Ein Elektrolytpuffer wurde dazugegeben, der den pH-Wert aufrechterhielt. Jeweils 18 µl der mit dem Farbstoff Bromphenolblau enthaltenden Probenpuffer aufbereiteten Proteinproben wurden in jeweils eine Geltasche eingetragen, ebenso wie 8 µl des Molekulargewichtsstandards für Proteine, der ebenfalls vorher für 5 Minuten bei 95 °C erwärmt worden war. Nach Anlegen des elektrischen Stroms wanderten die Proteine in Richtung Anode. Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht sammelten sich in Banden. Je weiter die Proteine gewandert waren, desto niedriger war das Molekulargewicht. Das Molekulargewicht der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards war bekannt und diente als Maß für die Banden der Probenproteine. Die Aufkonzentrierung der Proteine im Sammelgel bei einer Stromstärke von 30 mA dauerte ca. 30 Minuten. Die Separierung der Proteine bei einer Stromstärke von 60 mA im Trenngel brauchte 2–3 Stunden.<sup>88,89</sup>

### **3.10 Western Blot**

Weil die Proteinbanden in der Gelmatrix nicht für Antikörper erreichbar sind, wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dafür wurde als erstes die zugeschnittene Nitrozellulosemembran in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne auf das von den Glasplatten und dem Sammelgel gelöste Trenngel gelegt. Auf beiden Seiten wurden dann jeweils ein Filterpapier und ein Faserpad angelegt. Dieses „Sandwich“ wurde in eine Gelhalterkassette eingelegt, die wiederum in die Elektroden-Baueinheit der Blot-Apparatur „Mini-Protean“ von Biorad eingespannt wurde. Diese wurde in einen Befestigungsrahmen eingespannt, der in einen Plastikbehälter gestellt wurde, dessen Deckel über Stromkabel die Verbindung zur stromversorgenden Einheit herstellte. In den Plastikbehälter wurde Transferpuffer gefüllt. Durch die mit Elektroden angelegte elektrische Spannung wurden die Proteine, die sich immer noch in der negativ geladenen SDS-Ummantelung befanden, in Richtung Anode auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Dort blieben sie aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen haften. Nach 1,5 Stunden bei einer Stromstärke von 250 mA war der Transfervorgang abgeschlossen. Die Nitrozellulosemembran wurde

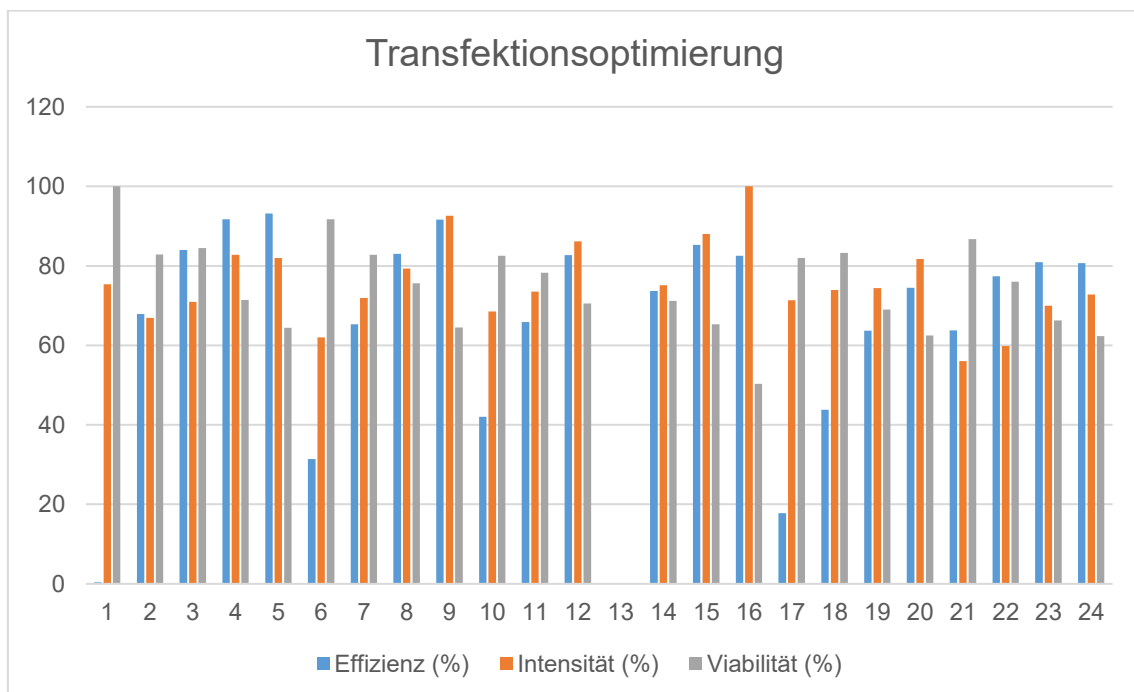
dann mit 5–10 ml Blockingpuffer in einem verschlossenen 50-ml-Zentrifugenröhrchen 40 Minuten lang bei ca. 14 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert, um die Membranstellen, an denen keine Proteine hafteten, abzusättigen. Damit wurde eine Bindung des Erstantikörpers durch hydrophobe Wechselwirkungen an ungesättigten Stellen verhindert. Nach Abschütten des Blockingpuffers wurde eine Nitrozellulosemembran mit dem Erstantikörper zum Nachweis des Kandidatenproteins in einer Verdünnung von 1 : 500 bis 1 : 1000 und eine andere Nitrozellulosemembran mit dem Erstantikörper zum Nachweis von  $\beta$ -Aktin in einer Verdünnung von 1 : 5000 für 2 Stunden auf dem Rollenmischer inkubiert. Der Erstantikörper war spezifisch für das nachzuweisende Protein. Danach wurden die Membranen 5-mal für jeweils 10 Minuten mit 5–10 ml Waschpuffer, der 0,3 % Tween enthielt, auf dem Rollenmischer inkubiert und damit der ungebundene Erstantikörper abgewaschen. Dann erfolgte wieder eine 40-minütige Absättigung mit Blockingpuffer. Danach wurden die Membranen für 1 Stunde mit jeweils 5–10 ml des 1 : 20.000 mit Waschpuffer ohne Tween verdünnten gleichen Anti-Maus-Zweitantikörpers inkubiert. Dann wurden die Membranen wieder 5-mal für jeweils 10 Minuten mit 5–10 ml Waschpuffer mit Tween inkubiert, um den ungebundenen Zweitantikörper zu entfernen. Die Nitrozellulosemembranen wurden dann auf eine durchsichtige Farblaserfolie gelegt und die ECL Western Blot Detektionsreagenzien Luminol Enhancer Solution und Peroxide Solution von Thermo Scientific darauf gegeben. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysierte die Oxidation von Luminol, wodurch elektromagnetische Strahlung emittiert wurde. Nach einer Einwirkzeit von ca. 2 Minuten wurde die Membran mit einer zweiten Farblaserfolie abgedeckt und die Folien zusammengedrückt. Diese Konstruktion wurde dann in einer lichtundurchlässigen Röntgenkassette verschlossen. In einer mit Rotlicht beleuchteten Dunkelkammer wurde den Folien ein Röntgenfilm aufgelegt und die Röntgenkassette wieder verschlossen. Film und Folien verblieben für definierte Minuten in der Röntgenkassette. An den belichteten Stellen wurden Silberkationen des Röntgenfilms in geringen Mengen zu elementarem Silber reduziert. Der Röntgenfilm wurde aus der Röntgenkassette herausgeholt und in der Entwicklungslösung Roentogen liquid geschwenkt. Ein Reduktionsmittel im

Entwickler reduzierte in den schon belichteten Kristallen des Röntgenfilms Silberkationen zu elementarem Silber, was zu einer Schwarzfärbung des Röntgenfilms an den belichteten Stellen führte. Die Reduktion von Silberkationen wurde durch das Schwenken des Röntgenfilms in destilliertem Wasser mit der Verdünnung der Entwicklungslösung vermindert. Danach wurde der Röntgenfilm in der Fixierlösung Roentogen Superfix geschwenkt. In Fixierlösungen ist ein Fixiermittel wie Natriumthiosulfat enthalten. Aus dem Natriumthiosulfat und den übrig gebliebenen Silberkationen eines Röntgenfilms bilden sich Silberthiosulfat-Komplexe, die sich aus dem Röntgenfilm lösen. Weil die Silberkationen jetzt fehlen, kann der Röntgenfilm nicht mehr mit Licht reagieren. Zum Schluss wurde der Röntgenfilm in Leitungswasser geschwenkt, um verbliebene Chemikalien zu entfernen.<sup>87,90-93</sup>

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Transfektionsoptimierung

Bei der Transfektionsoptimierung wurde von den 24 Transfektionsprogrammen (s. Abb. 3) des NEON™-Transfektionsgeräts ein Programm ausgewählt, das zu einer hohen Anzahl von siRNAs in einer großen Anzahl von lebenden Zellen der Zelllinie UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> führte (das Programm 4, elektrische Spannung 1600 Volt, Dauer der Impulse 20 ms, 1 Impuls). Nachfolgend erfolgt die Darstellung der nach Transfektion von mit Fluoreszeinisothiozyanat gekoppelter non-target-siRNA mit jedem Programm der 24 Transfektionsprogramme des NEON™-Transfektionsgeräts mit dem Durchflusszytometer ermittelten Effizienz (= Anzahl der transfizierten Zellen), Intensität (= Durchschnittsmenge der siRNAs pro Zelle) und Viabilität. Die von der Durchflusszytometer-Software BD FACSDiva™ generierten Diagramme befinden sich im Anhang (siehe Anhang 9.3).



**Abbildung 3.** Darstellung der durch Durchflusszytometrie ermittelten Effizienz, Intensität und Viabilität bei UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> bei Anwendung der 24 Programme des Neon®-Transfektionsgeräts

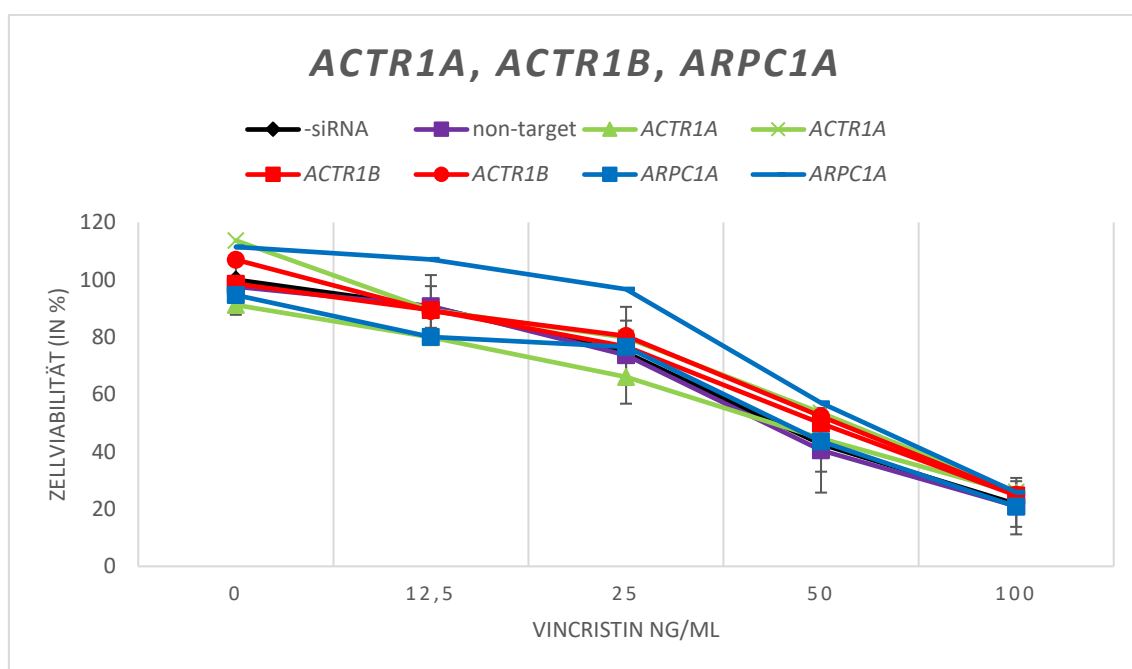


## 4.2 Viabilitätsassay

Nach der Transfektion der siRNAs der im Methodenteil vorgestellten 40 Gene (Sequenzen der siRNAs siehe Anhang 9.1) wurde für jedes Gen in 2 Ansätzen die Zellviabilität ohne und mit verschiedenen Mengen von Vincristin (12,5, 25, 50 und 100 ng/ml) ermittelt. Die ermittelte Viabilität beider Ansätze ist in den folgenden Tabellen jeweils einzeln in Prozent dargestellt. Jeder Tabelle folgt eine grafische Aufbereitung der Daten, auch in den Abbildungen sind die Doppelansätze für jede spezifische siRNA einzeln dargestellt. Die Auflistung der Gene erfolgt alphabetisch. Der Mittelwert der an jedem Versuchstag als Referenzen bestimmten Zellviabilitäten der Pufferkontrolle und der scramble-siRNA wird in jeder Tabelle/Grafik als Prozentsatz  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zur Kontrolle wurde die Expression von ATP-binding cassette subfamily B member 1 (*ABCB1*) mit siRNAs herunterreguliert. *ABCB1* ist ein ATP-binding cassette (ABC) Transporterprotein, das in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen exprimiert wird und Vincristin aus Zellen heraus transportieren kann.<sup>58,77,94,95</sup> Nach Transfektion von *ABCB1*-siRNAs in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen kam es bei Zugabe von Vincristin zu einer verminderten Zellviabilität (s. Abb. 17). Die *SMARCB1*-siRNA zeigte an den jeweiligen Versuchstagen eine auffallend niedrige Zellviabilität im Vergleich zu den am selben Tag transfizierten siRNAs bzw. der Pufferkontrolle. Deshalb wurden die Versuche mit *SMARCB1* insgesamt 3-mal durchgeführt. Auch die *STK35*-siRNA wurde aufgrund der an einem Versuchstag nach Zugabe von Vincristin auffällig niedrigen Zellviabilität 3-mal transfiziert. Bei einer Ab- oder Zunahme der Zellviabilitäts-Mittelwerte im Vergleich zum Mittelwert der non-target-siRNA-Kontrolle um über 25 % ist von einer deutlichen Ab- oder Zunahme der Zellviabilität die Rede.

**Tabelle 4. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *ACTR1A*, *ACTR1B*, *ARPC1A***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>ACTR1A</i>	91,17	79,93	66,08	44,67	25,59
<i>ACTR1A</i>	113,68	89,38	79,82	53,61	26,02
<i>ACTR1B</i>	98,57	89,45	76,73	49,86	24,73
<i>ACTR1B</i>	106,98	89,03	80,39	52,29	24,95
<i>ARPC1A</i>	94,64	79,98	76,57	43,59	20,83
<i>ARPC1A</i>	111,43	107,08	96,66	57,01	25,83

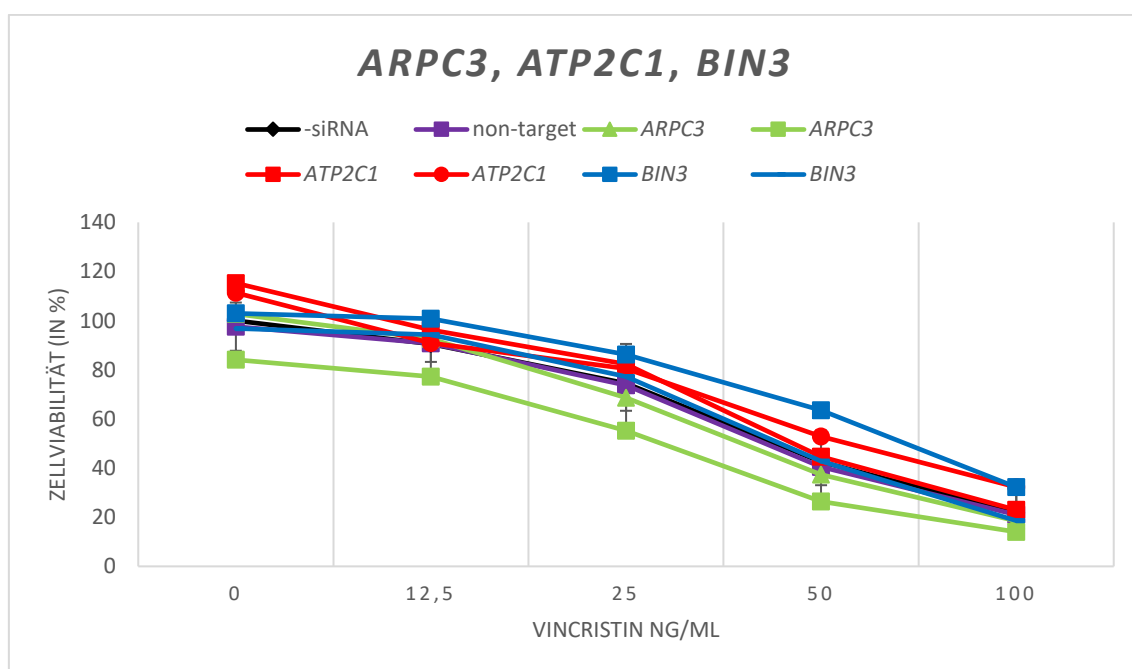


**Abbildung 4. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *ACTR1A*, *ACTR1B*, *ARPC1A***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *ACTR1A*, *ACTR1B* und *ARPC1A* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin.

**Tabelle 5. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *ARPC3*, *ATP2C1*, *BIN3***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>ARPC3</i>	102,74	92,65	68,65	37,39	18,46
<i>ARPC3</i>	84,08	77,27	55,24	26,43	14,02
<i>ATP2C1</i>	115,27	96,20	82,30	44,68	22,96
<i>ATP2C1</i>	111,35	90,85	80,42	52,82	32,26
<i>BIN3</i>	102,96	100,81	86,25	63,50	32,24
<i>BIN3</i>	96,81	94,32	77,24	42,86	18,59

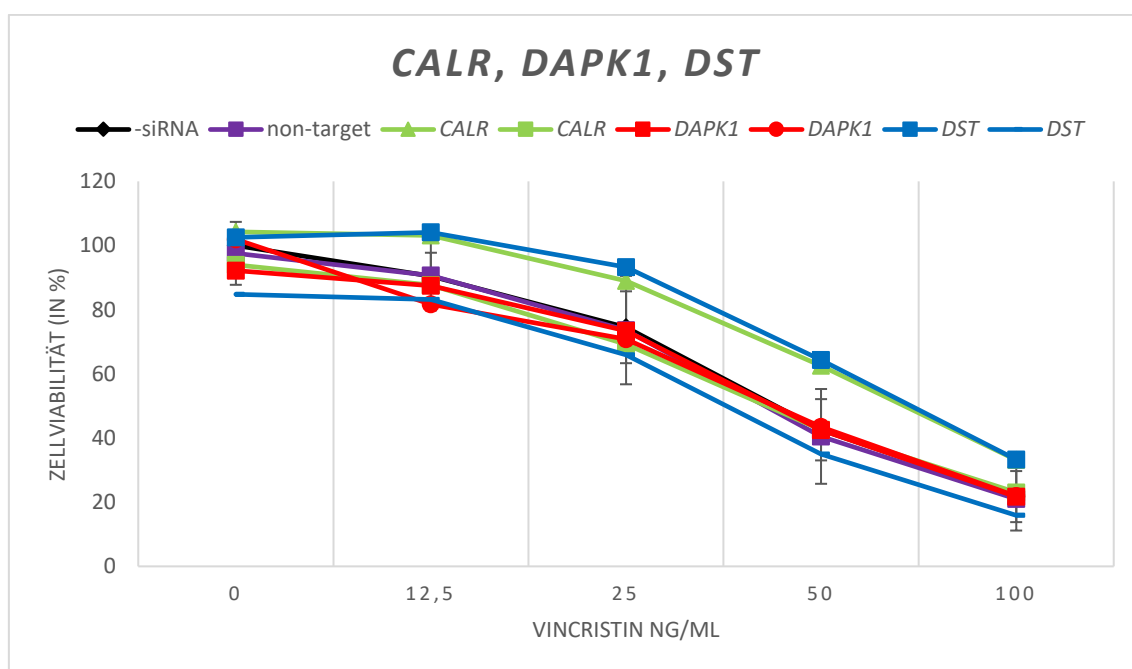


**Abbildung 5. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *ARPC3*, *ATP2C1*, *BIN3***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *ARPC3*, *ATP2C1* und *BIN3* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin.

**Tabelle 6. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *CALR*, *DAPK1*, *DST***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>CALR</i>	104,27	103,13	88,98	62,54	33,17
<i>CALR</i>	93,97	87,62	69,21	42,54	23,05
<i>DAPK1</i>	92,18	87,44	73,40	42,50	21,69
<i>DAPK1</i>	101,94	81,72	70,82	43,51	21,88
<i>DST</i>	102,55	104,09	93,25	64,32	33,29
<i>DST</i>	84,79	83,14	65,95	34,94	15,90

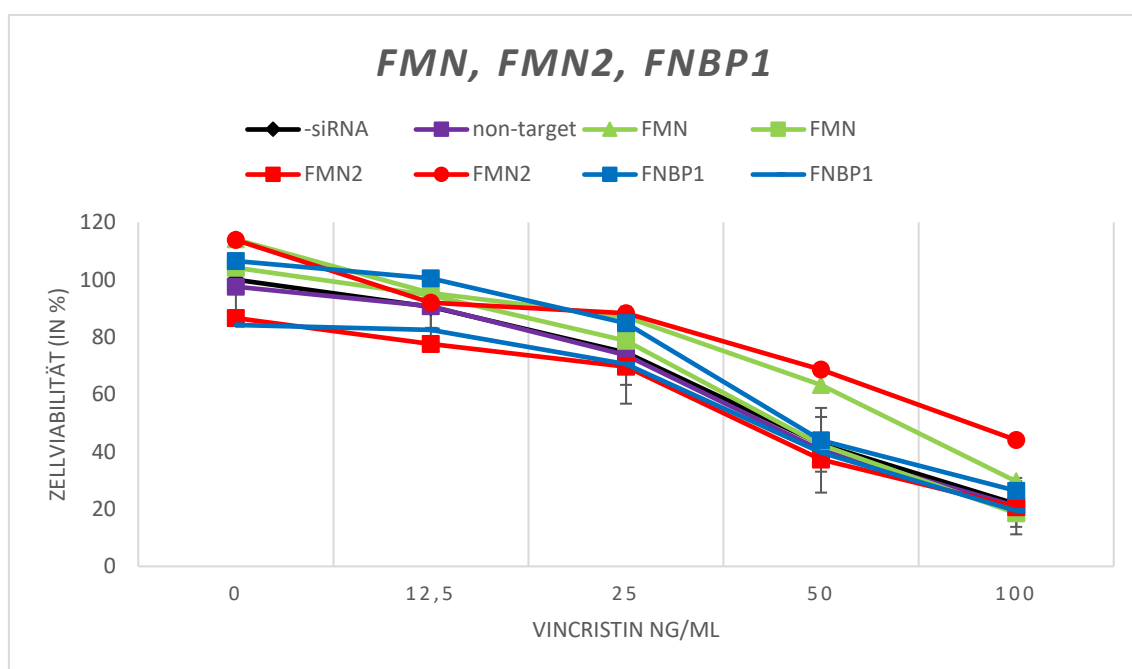


**Abbildung 6. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *CALR*, *DAPK1*, *DST***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *CALR*, *DAPK1* und *DST* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin.

**Tabelle 7. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *FMN*, *FMN2*, *FNBP1***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>FMN</i>	114,04	95,31	86,91	63,29	29,64
<i>FMN</i>	104,16	94,50	78,70	42,45	18,53
<i>FMN2</i>	86,61	77,52	69,69	37,21	20,64
<i>FMN2</i>	113,85	91,98	88,35	68,69	44,07
<i>FNBP1</i>	106,52	100,52	84,87	43,97	26,36
<i>FNBP1</i>	84,21	82,54	70,57	39,74	19,38

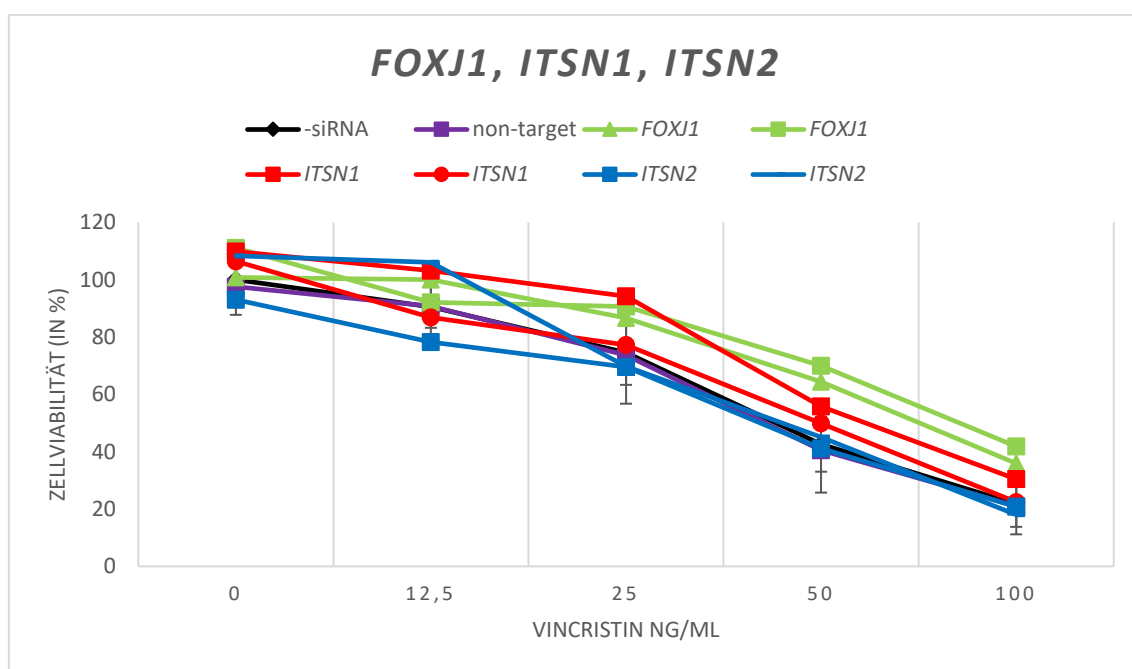


**Abbildung 7. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *FMN*, *FMN2*, *FNBP1***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *FMN*, *FMN2* und *FNBP1* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin.

**Tabelle 8. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *FOXJ1*, *ITSN1*, *ITSN2***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>FOXJ1</i>	100,78	100,00	86,57	64,42	35,91
<i>FOXJ1</i>	111,09	92,05	90,69	69,97	41,84
<i>ITSN1</i>	109,85	103,19	94,19	55,78	30,42
<i>ITSN1</i>	106,43	86,87	77,28	49,85	22,45
<i>ITSN2</i>	93,04	78,19	69,57	41,14	20,80
<i>ITSN2</i>	108,32	106,08	69,74	45,06	18,01



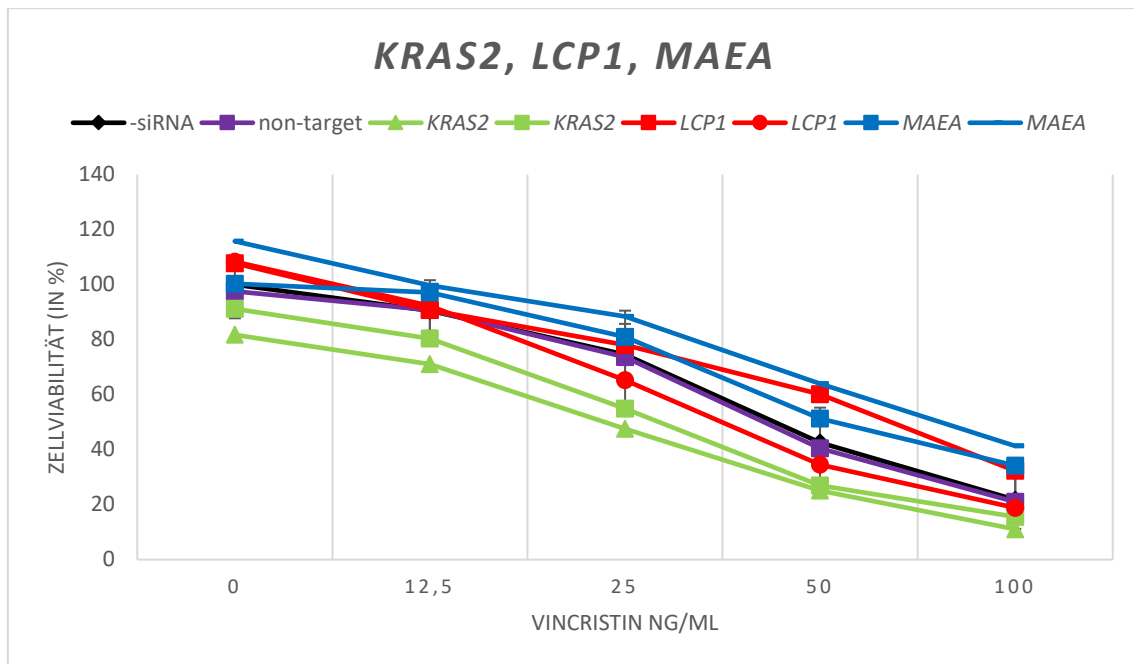
**Abbildung 8. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *FOXJ1*, *ITSN1*, *ITSN2***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *ITSN1* und *ITSN2* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der

Transfektion mit siRNAs gegen *FOXJ1* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5; 25 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei der Vincristin-Konzentration 50 ng/ml zeigt sich eine deutliche Zunahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle.

**Tabelle 9. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *KRAS2*, *LCP1*, *MAEA***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>KRAS2</i>	81,73	71,02	47,53	25,05	11,05
<i>KRAS2</i>	91,19	80,35	54,85	26,92	15,56
<i>LCP1</i>	107,76	90,73	78,11	60,13	32,29
<i>LCP1</i>	108,34	92,30	65,23	34,47	18,85
<i>MAEA</i>	100,32	97,10	81,01	51,31	34,18
<i>MAEA</i>	115,78	99,70	88,44	63,96	41,33



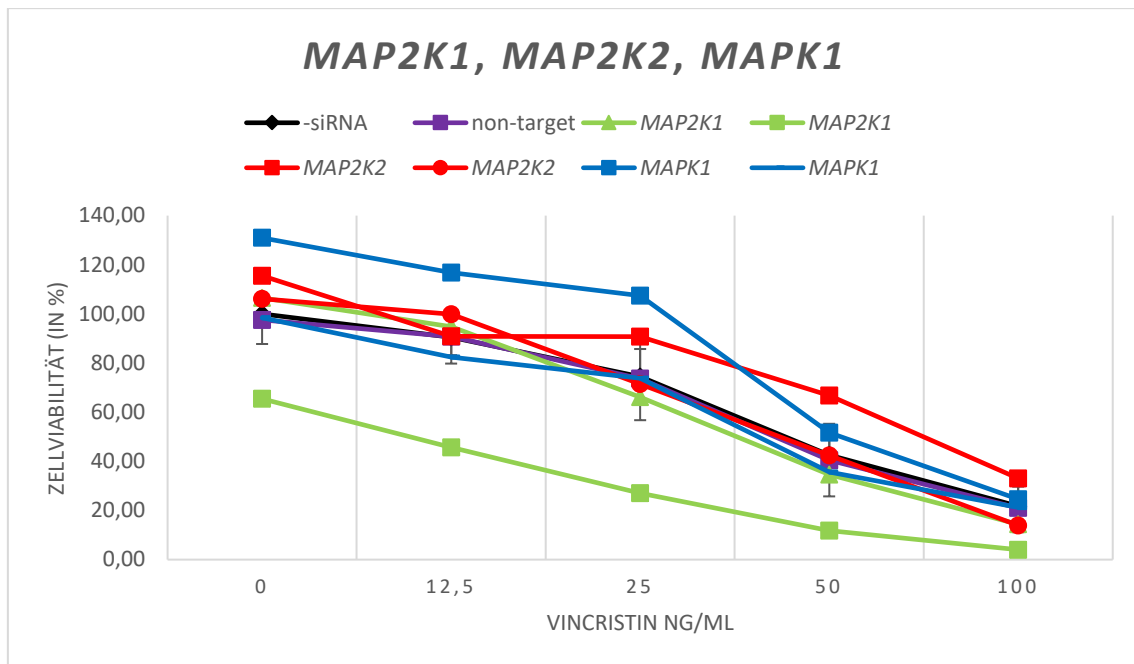
**Abbildung 9. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *KRAS2*, *LCP1*, *MAEA***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *KRAS2*, *LCP1* und *MAEA* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin.

**Tabelle 10. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAPK1***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00	90,48	74,52	42,57	21,74
	± 0,00	± 7,27	± 11,20	± 9,55	± 7,96
non-target	97,56	90,70	73,64	40,50	21,00
	± 9,81	± 10,91	± 16,89	± 14,77	± 9,84
<i>MAP2K1</i>	106,51	94,77	66,12	34,63	14,38
<i>MAP2K1</i>	65,44	45,67	27,00	11,75	4,03
<i>MAP2K2</i>	115,52	90,94	90,81	66,74	33,06
<i>MAP2K2</i>	106,15	99,88	71,46	42,42	13,92
<i>MAPK1</i>	130,95	116,83	107,46	51,65	24,60
<i>MAPK1</i>	98,41	82,43	73,84	35,63	21,23



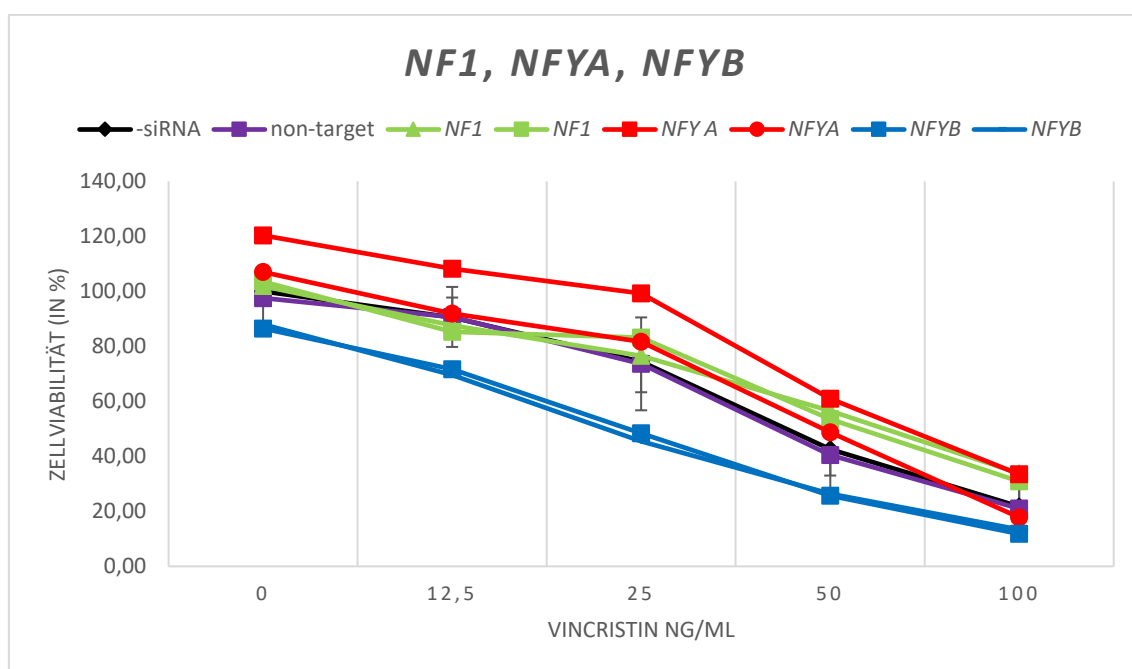


**Abbildung 10. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAPK1***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *MAPK1* und *MAP2K2* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *MAP2K1* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5; 50 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei der Vincristin-Konzentration 25 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei *MAP2K1* fällt auf, dass die Zellviabilitätskurve bei einem Ansatz fast den Zellviabilitätskurven der Kontrollen entspricht, während beim anderen Ansatz die Zellviabilität bei den Konzentrationen 0–50 ng/ml Vincristin im Vergleich zu den Kontrollen stark erniedrigt ist.

**Tabelle 11. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *NF1*, *NFYA*, *NFYB***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>NF1</i>	101,87	87,59	76,57	56,58	33,80
<i>NF1</i>	103,52	85,29	83,14	53,52	30,90
<i>NFYA</i>	120,36	108,20	99,28	60,91	33,46
<i>NFYA</i>	107,04	91,91	81,68	48,70	17,78
<i>NFYB</i>	86,50	71,63	48,38	25,65	11,79
<i>NFYB</i>	88,00	69,52	45,43	26,43	13,38



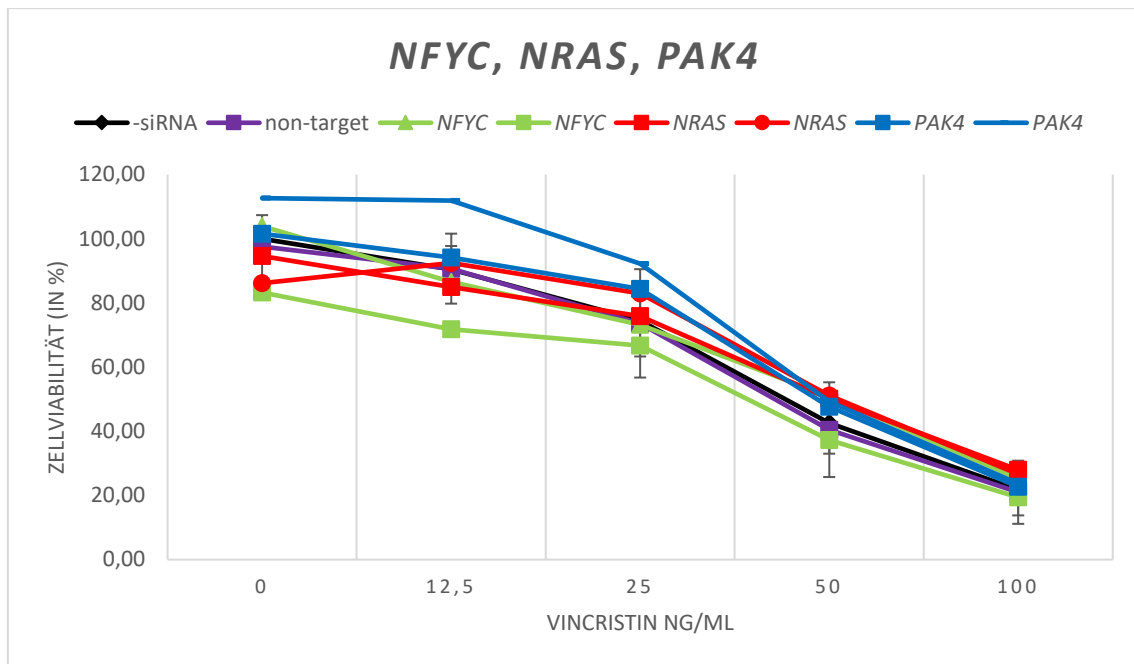
**Abbildung 11. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *NF1*, *NFYA*, *NFYB***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *NF1* und *NFYA* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion

mit siRNAs gegen *NFYB* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5; 50 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei der Vincristin-Konzentration 25 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle.

**Tabelle 12. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *NFYC*, *NRAS*, *PAK4***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>NFYC</i>	103,91	86,60	73,17	50,86	25,21
<i>NFYC</i>	83,25	71,83	66,69	37,29	19,42
<i>NRAS</i>	94,62	84,92	75,84	50,17	27,94
<i>NRAS</i>	86,19	92,46	82,93	51,14	26,63
<i>PAK4</i>	101,57	94,11	84,33	47,66	22,73
<i>PAK4</i>	112,67	111,90	92,24	49,26	23,69

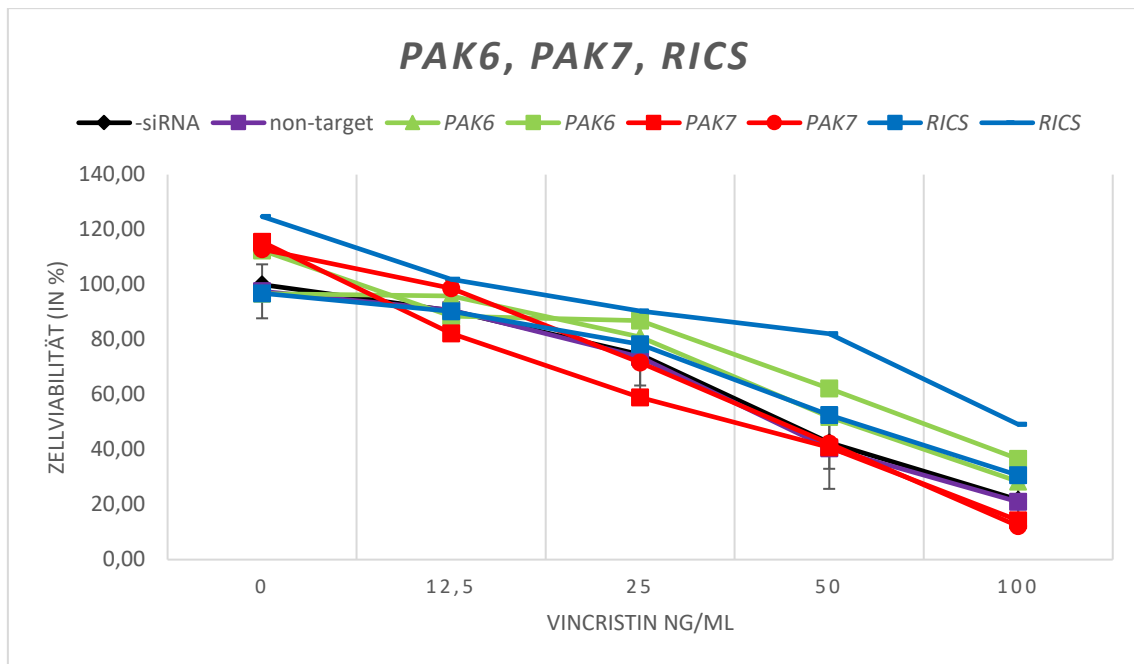


**Abbildung 12. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *NFYC*, *NRAS*, *PAK4***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *NFYC*, *NRAS* und *PAK4* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin.

**Tabelle 13. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *PAK6*, *PAK7*, *RICS***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>PAK6</i>	96,71	95,83	80,98	51,92	28,38
<i>PAK6</i>	112,43	88,48	86,85	62,27	36,61
<i>PAK7</i>	115,54	82,21	58,99	40,86	14,24
<i>PAK7</i>	112,83	98,64	71,61	42,17	12,19
<i>RICS</i>	96,85	90,23	78,30	52,54	30,64
<i>RICS</i>	124,76	101,94	90,37	82,16	49,17

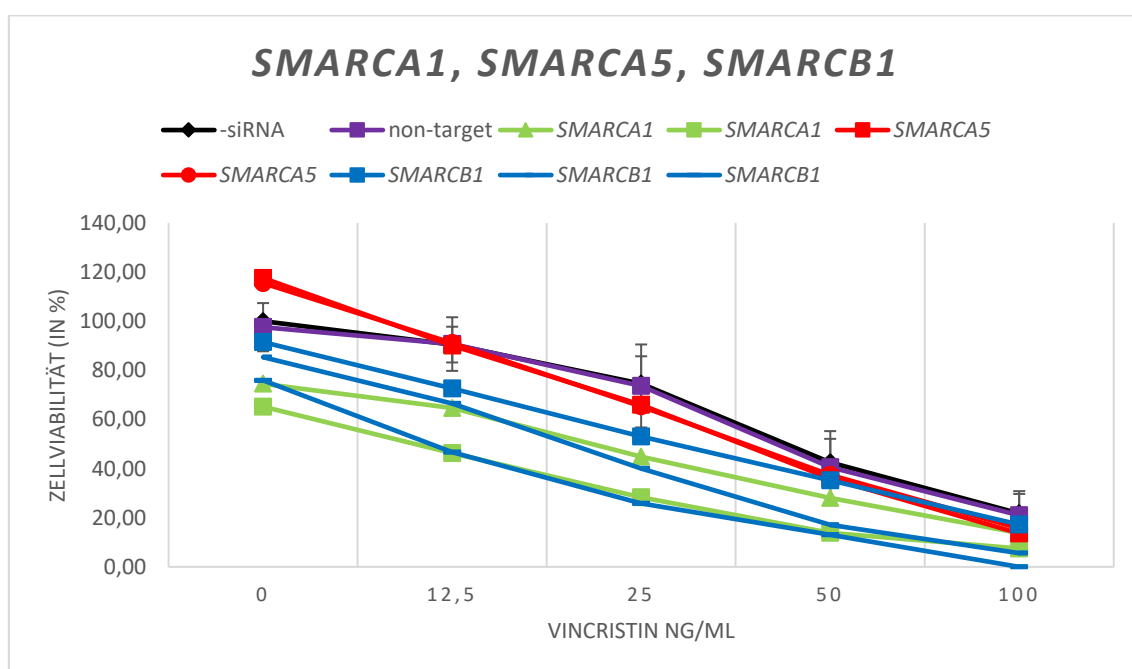


**Abbildung 13. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *PAK6*, *PAK7*, *RICS***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *PAK6* und *PAK7* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *RICS* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5; 25 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei der Vincristin-Konzentration 50 ng/ml zeigt sich eine deutliche Zunahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. Die Zellviabilitätskurve entspricht bei einem Ansatz fast den Zellviabilitätskurven der Kontrollen, während beim anderen Ansatz die Zellviabilität bei den Konzentrationen 0, 50 und 100 ng/ml Vincristin im Vergleich zu den Kontrollen stark erhöht ist.

**Tabelle 14. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *SMARCA1*, *SMARCA5*, *SMARCB1***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
ir-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>SMARCA1</i>	74,52	64,68	44,87	28,06	13,78
<i>SMARCA1</i>	65,21	46,24	28,26	13,91	7,49
<i>SMARCA5</i>	117,57	90,05	65,99	36,01	13,64
<i>SMARCA5</i>	115,47	91,12	65,37	37,37	15,71
<i>SMARCB1</i>	91,49	72,63	53,00	35,21	17,24
<i>SMARCB1</i>	85,36	66,50	40,02	17,16	5,58
<i>SMARCB1</i>	75,93	46,65	25,81	13,11	0,00

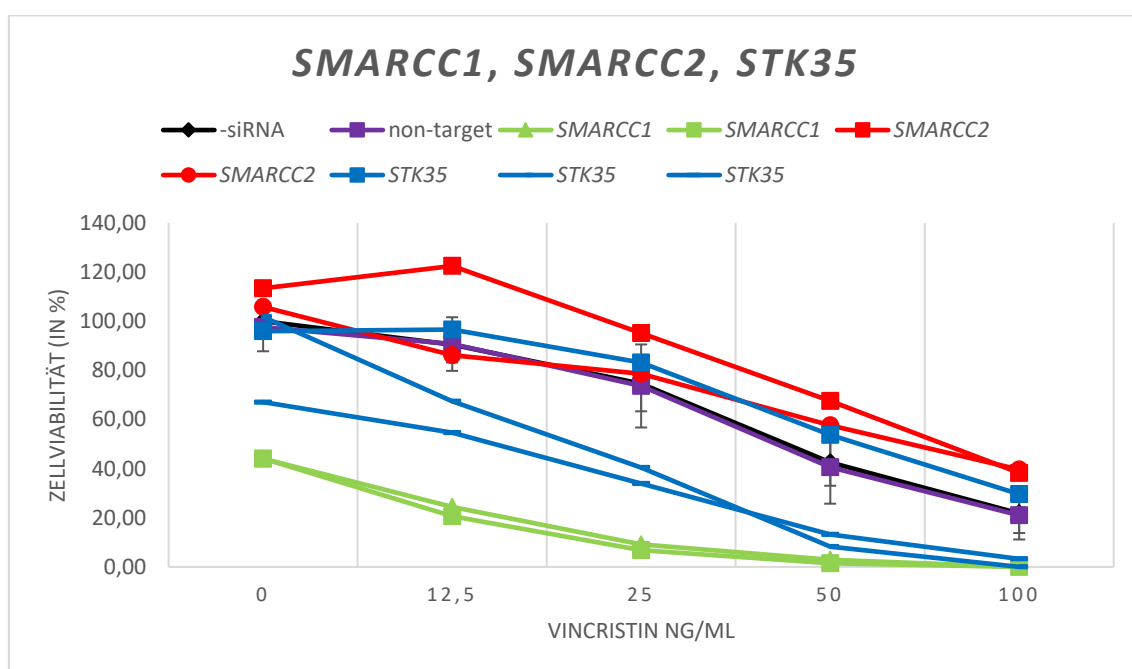


**Abbildung 14. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *SMARCA1*, *SMARCA5*, *SMARCB1***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *SMARCA5* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *SMARCA1* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 50 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5 und 25 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Vincristin-Konzentration 50 ng/ml zeigt sich in einem Ansatz eine starke Abnahme der Viabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *SMARCB1* zeigt sich bei Mittelung der 3 Ansätze bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 50 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei den Vincristin-Konzentrationen 12,5 und 25 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Vincristin-Konzentration 50 ng/ml zeigt sich in einem Ansatz eine starke Abnahme der Viabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *SMARCB1* zeigt sich bei Mittelung von 2 Ansätzen bei den Vincristin-Konzentrationen 0 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei den Vincristin-Konzentrationen 12,5; 25 und 50 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle.

**Tabelle 15. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *SMARCC1*, *SMARCC2*, *STK35***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>SMARCC1</i>	44,06	24,45	9,21	2,86	0,00
<i>SMARCC1</i>	44,10	20,67	6,80	1,44	0,00
<i>SMARCC2</i>	113,43	122,48	95,21	67,55	38,27
<i>SMARCC2</i>	105,82	86,10	78,57	57,65	39,61
<i>STK35</i>	95,93	96,59	83,10	53,69	29,60
<i>STK35</i>	101,73	67,41	40,49	8,24	0,00
<i>STK35</i>	67,07	54,62	33,97	13,14	3,25



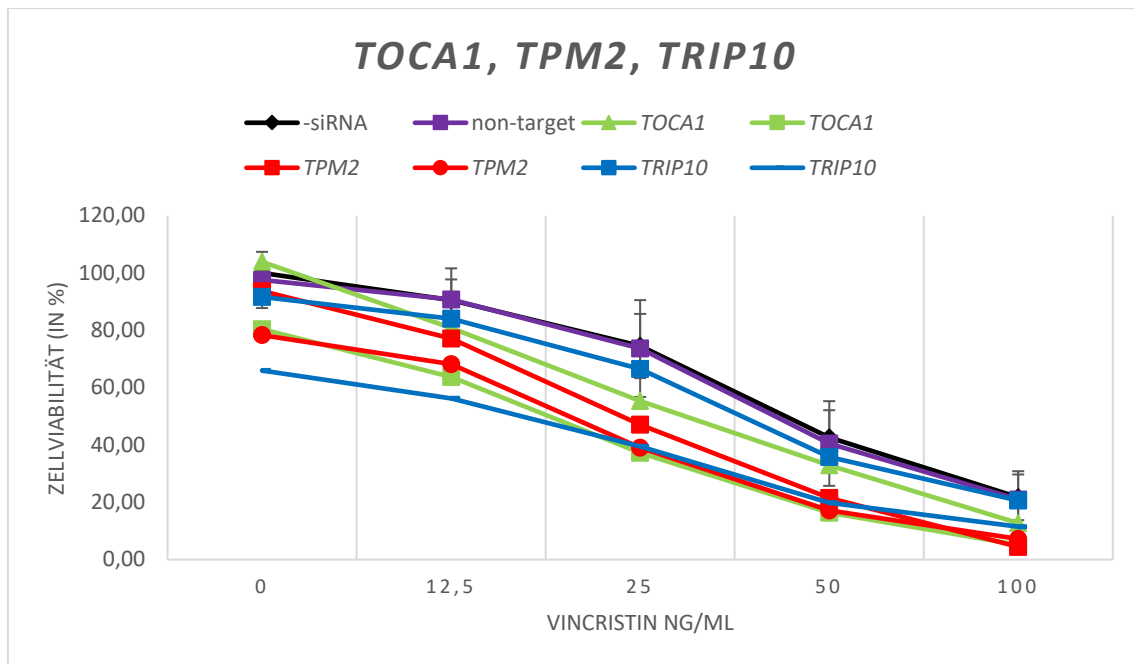
**Abbildung 15. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *SMARCC1*, *SMARCC2*, *STK35***



Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *SMARCC2* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *SMARCC1* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5; 25 und 50 ng/ml eine deutliche Abnahme der Viabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Vincristin-Konzentration 100 ng/ml sind die Zellen alle tot. Die Zellviabilitätswerte sind bei den jeweiligen Vincristin-Konzentrationen fast einheitlich bei beiden Ansätzen. Die alleinige Herunterregulation von *SMARCC1* senkt die Viabilität um über 50 %, der stärkste Effekt bei allen verwendeten siRNAs. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *STK35* zeigt sich bei Mittelung der 3 Ansätze keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *STK35* zeigt sich bei Mittelung von 2 Ansätzen bei den Vincristin-Konzentrationen 0 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei den Vincristin-Konzentrationen 12,5; 25 und 50 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Vincristin-Konzentration 0 ng/ml zeigt sich bei einem Ansatz eine starke Abnahme der Viabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle.

**Tabelle 16. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *TOCA1*, *TPM2*, *TRIP10***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>TOCA1</i>	103,89	80,79	55,32	32,89	12,73
<i>TOCA1</i>	80,38	63,72	37,21	16,41	5,15
<i>TPM2</i>	93,70	77,11	47,04	21,45	4,45
<i>TPM2</i>	78,29	68,13	39,08	17,09	7,22
<i>TRIP10</i>	91,63	84,04	66,47	35,82	20,61
<i>TRIP10</i>	65,96	56,25	39,49	19,80	11,50

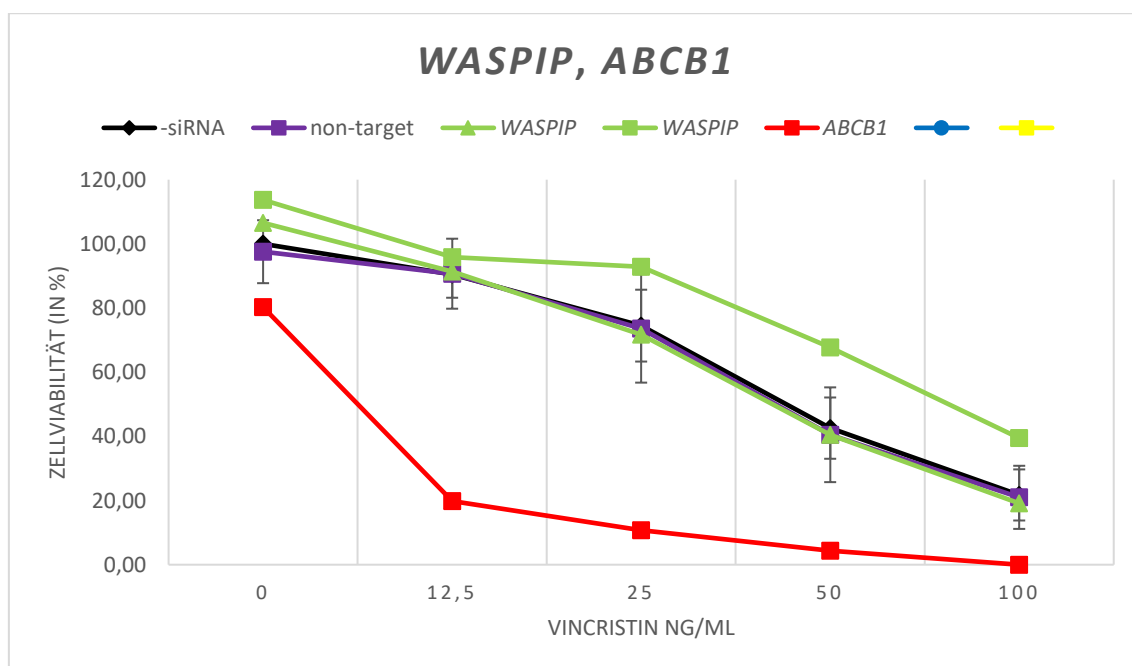


**Abbildung 16. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *TOCA1*, *TPM2*, *TRIP10***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *TRIP10* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *TOCA1* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5; 50 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei der Vincristin-Konzentration 25 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Vincristin-Konzentration 12,5 ng/ml zeigt sich bei einem Ansatz eine starke Abnahme der Viabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *TPM2* zeigt sich bei den Vincristin-Konzentrationen 0; 12,5; 50 und 100 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei der Vincristin-Konzentration 25 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle.

**Tabelle 17. Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *WASPIP* und *ABCB1***

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 ± 0,00	90,48 ± 7,27	74,52 ± 11,20	42,57 ± 9,55	21,74 ± 7,96
non-target	97,56 ± 9,81	90,70 ± 10,91	73,64 ± 16,89	40,50 ± 14,77	21,00 ± 9,84
<i>WASPIP</i>	106,55	91,34	71,71	40,45	19,12
<i>WASPIP</i>	113,71	95,82	92,86	67,68	39,46
<i>ABCB1</i>	80,29	19,83	10,73	4,40	0,00



**Abbildung 17. Verlauf der Zellviabilität (in %) gegen Vincristin nach Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *WASPIP* und *ABCB1***

Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *WASPIP* zeigt sich keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität gegen Vincristin. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen *ABCB1* zeigt sich bei der Vincristin-Konzentration 0 ng/ml keine deutliche Erniedrigung oder Erhöhung der Viabilität. Bei den Vincristin-Konzentrationen 12,5; 25; 50 und 100 ng/ml zeigt sich eine deutliche Abnahme

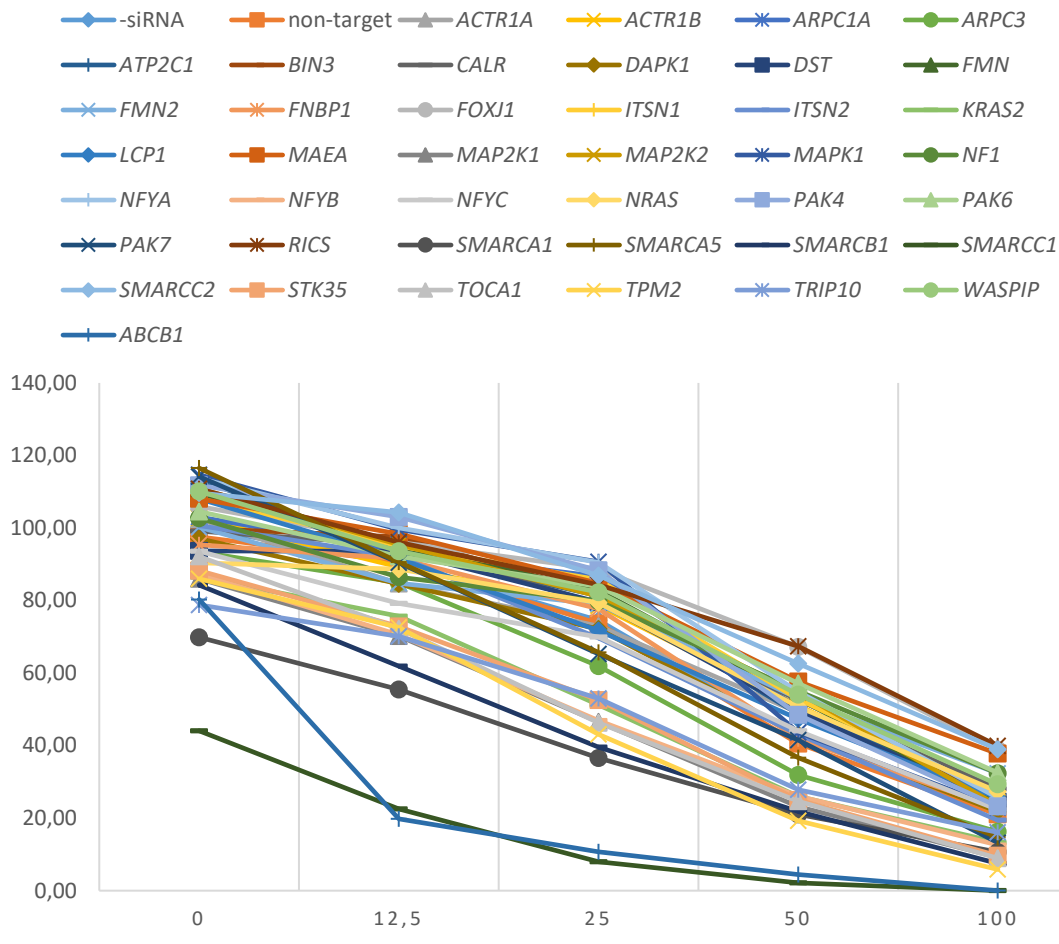
der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. Folgende Angaben gelten bei Vorliegen mehrerer Ansätze für gemittelte Werte (Bei Mittelung wird die Standardabweichung (SD) angegeben; Darstellung der Ergebnisse in Prozentwert ggf.  $\pm$  SD): Ohne Zugabe von Vincristin zeigen nur SMARCC1 ( $44,08 \pm 0,03$ ) und SMARCA1 ( $69,86 \pm 6,59$ ) eine über 25% abweichende Zellviabilität von der non-target-siRNA ( $97,56 \pm 9,81$ ). Die Zellviabilitätskurven der Puffer- und scramble-siRNA-Kontrolle fallen bei Zugabe steigender Mengen von Vincristin konvex ab (0 ng/ml:  $100/97,56 \pm 9,81$ ); 12,5 ng/ml:  $90,48 \pm 7,27/90,70 \pm 10,91$ ; 25 ng/ml:  $74,52 \pm 11,20/73,64 \pm 16,89$ ; 50 ng/ml:  $42,57 \pm 9,55/40,50 \pm 14,77$ ; 100 ng/ml:  $21,74 \pm 7,96/21,00 \pm 9,84$ ). Eine im Vergleich zur non-target-siRNA über 25% veränderte Zellviabilität zeigen:

ABCB1: erniedrigte Viabilität bei 12,5; 25; 50 und 100 ng/ml Vincristin (VCR);  
 FOXJ1: erhöhte Viabilität bei 50 ng/ml VCR;  
 MAP2K1: erniedrigte Viabilität bei 25 ng/ml VCR;  
 NFYB: erniedrigte Viabilität bei 25 ng/ml VCR;  
 RICS: erhöhte Viabilität bei 50 ng/ml VCR;  
 SMARCA1: erniedrigte Viabilität bei 0; 12,5 und 25 ng/ml VCR;  
 SMARCB1: erniedrigte Viabilität bei 12,5; 25 und 50 ng/ml VCR;  
 SMARCC1: erniedrigte Viabilität bei 0; 12,5; 25 und 50 ng/ml VCR;  
 STK35: erniedrigte Viabilität bei 12,5; 25 und 50 ng/ml VCR;  
 TOCA1: erniedrigte Viabilität bei 25 ng/ml VCR;  
 TPM2: erniedrigte Viabilität bei 25 ng/ml VCR

Keines der Kandidatengene zeigt wie ABCB1 eine im Vergleich zur non-target-siRNA um über 25 % veränderte Zellviabilität bei allen Konzentrationen außer 100 ng/ml Vincristin erst nach Zugabe von Vincristin. Bei 100 ng/ml Vincristin sind die Zellen bei ABCB1 alle tot. Von 40 ausgewählten Kandidatengenen zeigten nach Transfektion mit spezifischer siRNA 10 Kandidatengene Effekte von mehr als 25 % veränderter Zellviabilität (beim Ansetzen der transfizierten Zellen an einer Vincristin-Verdünnungsreihe). Das entspricht einem Prozentsatz von 25 % Kandidatengenen, bei denen die bioinformatisch vorhergesagte Wirkung *in vitro* bestätigt werden konnte. Allerdings sind bei diesen 10 effektiven Kandidatengenen auch 2 Gene dabei, nach deren Herunterregulierung es zu einer erhöhten Zellviabilität kam (FOXJ1 und RICS). Bei der Frage, welche Gene

das Absterben der Tumorzellen beschleunigen und als ein mögliches Therapieziel in Frage kommen könnten, bleiben also 8 Kandidatengene (20 % aller Kandidatengene). Das interessanteste Kandidatengene ist SMARCC1, da die Herunterregulierung alleine (ohne Zugabe von Vincristin) zu einer massiven Abnahme der Zellviabilität führte. Damit stellt SMARCC1 ein interessantes Ziel zur Therapie in Tumorzellen dar. Es folgt eine Gesamtübersicht über die Zellviabilitäten der Kandidatengene und Kontrollen bei den verschiedenen Vincristin-Konzentrationen (bei Vorliegen mehrerer Ansätze gemittelte Werte). Zur Beibehaltung der Übersichtlichkeit wurden die Standardabweichungen in der Grafik weggelassen. Eine Tabelle mit Werten und Standardabweichungen befindet sich im Anhang (siehe Anhang 9.2).

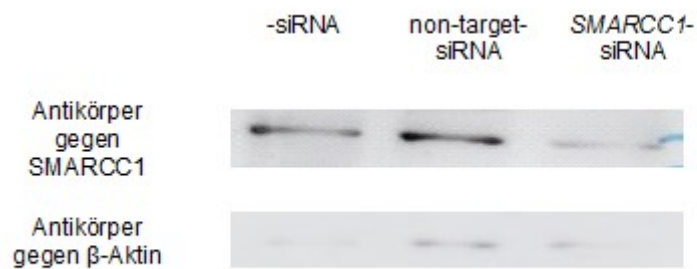
## GESAMTÜBERSICHT RELATIVE ZELLVIABILITÄTEN BEI VIABILITÄTSTESTS NACH TRANSFEKTION



**Abbildung 18.** Darstellung der Zellviabilitäten nach Transfektion als Prozentwerte der Zellviabilität der ohne siRNAs behandelten Kontrolle. Bei mehreren Versuchsdurchführungen wurden die Werte gemittelt. Auf die Darstellung von Standardabweichungen wurde zur Beibehaltung der Übersichtlichkeit verzichtet. Die dazugehörige Tabelle mit Prozentzahlen  $\pm$  Standardabweichungen befindet sich im Anhang 9.2. Die bei 12,5-100 ng/ml Vincristin untersten Kurven sind SMARCC1 (grün) und ABCB1 (blau).

### 4.3 Western Blot

Der Knock-down von SMARCC1 in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> hatte den größten negativen Einfluss auf die Zellviabilität. Zum Nachweis der erfolgreichen Herunterregulierung von SMARCC1 wurde ein Western Blot auf SMARCC1 durchgeführt. Im Western Blot zeigte sich eine Verminderung des SMARCC1-Proteins nach Transfektion der *SMARCC1*-siRNA im Vergleich zur scramble-siRNA und der Pufferkontrolle. Zu erkennen ist dies an der Verdünnung der Bande bei den *SMARCC1*-siRNA transfizierten Zellen (s. Abb. 19).



**Abbildung 19.** Nachweis der SMARCC1-Protein-Verminderung von *SMARCC1*-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu scramble-siRNA transfizierten Zellen und der Pufferkontrolle im Western Blot. Beta-Aktin wurde als Ladekontrolle nachgewiesen.

## 5 Diskussion

Das Neuroblastom ist ein Tumor des Kindesalters. Ab einem Alter von 11 Jahren tritt es sehr selten auf.<sup>8</sup> Ca. 1760 Kinder unter 15 Jahren erkranken pro Jahr in Deutschland an malignen Tumoren, davon ca. 124 an einem Neuroblastom oder Ganglioneuroblastom. Von den ca. 1.760 an malignen Tumoren erkrankten Kindern versterben pro Jahr ca. 426, davon ca. 44 am Neuroblastom oder Ganglioneuroblastom. Damit ist die Gruppe der Neuroblastome und Ganglioneuroblastome die dritthäufigste Todesursache bei malignen Tumoren im Kindesalter bis 14 Jahren.<sup>96</sup> Ca. 9,1 % der Todesfälle waren in der Therapiestudie NB97 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie auf die Therapie zurückzuführen.<sup>97</sup> Dies entspricht einer Anzahl von 4 Todesfällen pro Jahr. Außerdem können Langzeitfolgen auftreten (relatives Risiko für eine chronische Erkrankung von Neuroblastom-Überlebenden im Vergleich zu einer Geschwisterpopulation in einer Studie des New England Journal of Medicine ca. 2,0<sup>98</sup>). Aus vorgenannten Gründen ist die Entwicklung neuer evtl. in Kombination mit bestehenden Arzneimitteln gegen das Neuroblastom wirkender Medikamente wichtig. Beim Projekt "Regulatory Control Networks of Synthetic Lethality" (SYNLET) sollten mit informatischen Methoden Proteine identifiziert werden, die essentiell sind für das Überleben bzw. die Proliferation von Neuroblastomzellen. Dafür wurden im Vorfeld genomweite Genexpressionsprofile von 6 chemosensitiven humanen Neuroblastomzelllinien und ihren jeweiligen Vincristin-resistenten Sublinien mit Hilfe von Microarray-Analysen auf der Transkriptionsebene verglichen, unterschiedlich exprimierte Gene ermittelt und bioinformatisch analysiert. Dabei stand der Vergleich der Expression zwischen parentaler Zelle und zugehöriger Vincristin-adaptierter Sublinie im Fokus. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Expression der ermittelten Kandidatenproteine in der Vincristin-resistenten Sublinie UKF-NB-2'VCR<sup>20</sup> durch siRNAs blockiert und mittels MTT-Viabilitätstests das Zellüberleben auch bei Zugabe unterschiedlicher Mengen von Vincristin ermittelt. Alle Patienten mit Neuroblastom, die Chemotherapie im Rahmen der Therapieoptimierungsstudien NB2004 und NB2004-HR erhalten, werden mit Vincristin behandelt. Vincristin-resistente Neuroblastomzellen sind deshalb in Deutschland bei Tumorpersistenz nach chemotherapeutischer Behandlung vermutlich in der Regel vorhanden.



Jedes Kandidatengen wurde in 2 Versuchsdurchgängen durch siRNAs herunterreguliert. Bei *SMARCB1* und *STK35* wurden die Versuche 3-mal durchgeführt, weil *SMARCB1* im Vergleich zu den Kontrollen und den am selben Tag stillgelegten Genen bei beiden Versuchsdurchgängen und *STK35* bei einem Versuchsdurchgang nach Zugabe von Vincristin eine erniedrigte Zellviabilität zeigte. Die Zellviabilität bei Blockade der einzelnen Gene und der Effekt der Vincristinverdünnung wird in Prozent zur Zellviabilität der Pufferkontrolle ohne Zugabe von Vincristin dargestellt, die als 100 % Viabilität festgelegt wurde. Nach Transfektion der siRNAs wurden unterschiedliche Mengen von Vincristin appliziert (12,5; 25; 50 und 100 ng/ml). Die Kurve der Pufferkontrolle fällt von 100 % bei 0 ng/ml Vincristin auf 21,74 % bei Zugabe von 100 ng/ml Vincristin ab. Die Kurve der non-target-siRNA fällt von 97,56 % bei 0 ng/ml Vincristin auf 21 % bei Zugabe von 100 ng/ml Vincristin ab. Je höher die Konzentration von Vincristin war, desto niedriger war die Zellviabilität in den beiden Referenzen Pufferkontrolle und non-target-siRNA-Kontrolle. Die beiden Kontrollen zeigen, dass trotz der Resistenz der Zelllinie UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup> gegen 20 ng/ml Vincristin steigende Konzentrationen von Vincristin im Zellmedium zu einer Abnahme der Zellviabilität führen. ABCB1 (ATP-binding cassette subfamily B member 1), auch bekannt unter den Namen P-glycoprotein (P-gp) und multidrug resistance protein 1 (MDR1)<sup>66,110</sup> ist ein ATP-binding cassette (ABC) Transporterprotein, das in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen exprimiert wird und Vincristin aus der Zelle heraus transportiert. Damit vermindert sich die Sensitivität der Zellen auf Vincristin.<sup>108,111</sup> Die Zellviabilitätskurve von *ABCB1* sinkt von 80,29 % bei 0 ng/ml VCR auf 0 % bei 100 ng/ml VCR. Die Blockade von *ABCB1* in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen nach Zugabe von Vincristin führte somit zu einer verminderten Zellviabilität und diente beim Screen der 40 Kandidatengene als Positivkontrolle. Die Zellviabilitätskurven der meisten transfizierten Kandidatengene zeigen ähnliche Werte wie die Zellviabilitätskurven der Puffer- und der non-target-Kontrolle. Die Blockade der Produktion der entsprechenden Proteine führte also nicht oder nur in einem geringen Ausmaß zu einer erniedrigten Viabilität im Vergleich zu den Kontrollen. Auffällig niedrig ist die Zellviabilitätskurve des Kandidatengens *SMARCC1* im Vergleich zur Puffer- und non-target-Kontrolle. In beiden Versuchsdurchgängen sinkt die Zellviabilitätskurve von 44 % ohne Zugabe von Vincristin auf 0 % bei

Zugabe von 100 ng/ml Vincristin und zeigt wie die Zellviabilitätskurve von *ABCB1* einen konkaven Verlauf. Von den Kandidatengenen zeigt die bei 0; 12,5 und 25 ng/ml Vincristin zweitniedrigste gemittelte Zellviabilitätskurve *SMARCA1* (s. Grafik Gesamtübersicht). Sie sinkt von ca. 70 % ohne Zugabe von Vincristin auf ca. 11 % bei Zugabe von 100 ng/ml Vincristin ab (s. Gesamttabelle im Anhang). Im Vergleich dazu liegt die Zellviabilitätskurve der Pufferkontrolle bei 100 % (Standardabweichung 0 %) ohne Zugabe von Vincristin und bei ca. 22 % (Standardabweichung ca. 8 %) bei Zugabe von 100 ng/ml Vincristin. Wie bei *SMARCC1* und *SMARCA1* sind bei manchen anderen Kandidatengenen die Mittelwerte der Viabilität bei mindestens einer Vincristin-Konzentration deutlich niedriger (um 25 % verminderte Zellviabilität im Vergleich zur non-target-siRNA) als bei der entsprechenden Vincristin-Konzentration in der non-target-Kontrolle. Diese Gene sind nun folgend mit Angabe der entsprechenden Vincristinkonzentration aufgeführt (Darstellung Mittelwert der Viabilität in %  $\pm$  Standardabweichung):

<i>MAP2K1:</i>	bei	25	ng/ml	Vincristin	46,56	$\pm$	27,66	non-	73,64	$\pm$	16,89
								target:			
<i>NFYB:</i>	bei	25	ng/ml	Vincristin	46,90	$\pm$	2,08	non-	73,64	$\pm$	16,89
								target:			
<i>SMARCA1:</i>	bei	0	ng/ml	Vincristin	69,86	$\pm$	6,59	non-	97,56	$\pm$	9,81
								target:			
	bei	12,5	ng/ml	Vincristin	55,46	$\pm$	13,04	non-	90,70	$\pm$	10,91
								target:			
	bei	25	ng/ml	Vincristin	36,57	$\pm$	11,75	non-	73,64	$\pm$	16,89
								target:			
<i>SMARCB1:</i>	bei	12,5	ng/ml	Vincristin	56,58	$\pm$	14,04	non-	90,70	$\pm$	10,91
								target:			
	bei	25	ng/ml	Vincristin	32,92	$\pm$	10,05	non-	73,64	$\pm$	16,89
								target:			
	bei	50	ng/ml	Vincristin	15,14	$\pm$	2,86	non-	40,50	$\pm$	14,77
								target			
<i>SMARCC1:</i>	bei	0	ng/ml	Vincristin	44,08	$\pm$	0,03	non-	97,56	$\pm$	9,81
								target:			
	bei	12,5	ng/ml	Vincristin	22,56	$\pm$	2,68	non-	90,70	$\pm$	10,91
								target:			

	bei	25	ng/ml	Vincristin	8,00	±	1,70	non-	73,64	±	16,89
								target:			
	bei	50	ng/ml	Vincristin	2,15	±	1,00	non-	40,50	±	14,77
								target:			
<i>STK35:</i>	bei	12,5	ng/ml	Vincristin	61,02	±	9,04	non-	90,70	±	10,91
								target:			
	bei	25	ng/ml	Vincristin	37,23	±	4,61	non-	73,64	±	16,89
								target:			
	bei	50	ng/ml	Vincristin	10,69	±	3,46	non-	40,50	±	14,77
								target:			
<i>TOCA1:</i>	bei	25	ng/ml	Vincristin	46,27	±	12,80	non-	73,64	±	16,89
								target:			
<i>TPM2:</i>	bei	25	ng/ml	Vincristin	43,06	±	5,63	non-	73,64	±	16,89
								target:			

Anzumerken ist, dass eine im Vergleich zur non-target-siRNA um 25 % verminderte Zellviabilität bei 100 ng/ml Vincristin rechnerisch nicht möglich ist (Wert für Zellviabilität liegt für non-target-siRNA bei 100 ng/ml Vincristin bei 21,00 ± 9,84 % Viabilität). Im Gegensatz dazu zeigten sich die Mittelwerte der Zellviabilitäten bei manchen siRNAs bei mindestens einer Vincristin-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erhöht (um 25 % erhöhte Zellviabilität im Vergleich zur non-target-siRNA):

<i>FOXJ1:</i>	bei	50	ng/ml	Vincristin	67,19	±	3,93,	non-	40,50	±	14,77
								target			
<i>RICS:</i>	bei	50	ng/ml	Vincristin	67,35	±	20,95,	non-	40,50	±	14,77
								target			

Bei allen anderen Kandidatengenens zeigten die Mittelwerte nach Herunterregulierung der Expression durch siRNA bei keiner Vincristinkonzentration einen Unterschied von mehr als 25 % Viabilität im Vergleich zur non-target-siRNA. Im Folgenden werden die Gene besprochen, deren siRNAs ohne Zugabe von Vincristin und/oder bei mindestens einer bestimmten Vincristin-Konzentration die Zellviabilität der UKF-NB-2'VCR<sup>20</sup> im Mittel am stärksten beeinflussten (Abweichung der Zellviabilität von über 25 % von der Zellviabilität der non-target-siRNA).

## 5.1 ABCB1

ABCB1 ist eine Abkürzung für „ATP binding cassette subfamily B member 1“.<sup>99</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Multidrug resistance protein 1“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 7 in der Region 7q21.12. Das menschliche Multidrug resistance protein 1 hat 1280 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 141 kDa.<sup>100</sup> Vermutlich wird Multidrug resistance protein 1 hauptsächlich in der Nebenniere, der Leber, der Niere und in Blutzellen exprimiert, aber auch beispielsweise in Darm und Gehirn.<sup>100</sup> Multidrug resistance protein 1 ist ein ATP-binding cassette (ABC) Transporter.<sup>99</sup> ABC-Proteine sind benannt nach der charakteristischen ABC-Domäne (nucleotide binding domain, NBD). ABC-Transporter besitzen außerdem transmembrane Domänen (transmembrane domains, TMD).<sup>101</sup> Sie spalten ATP und transportieren Moleküle über Membranen.<sup>102,99</sup> Das Humangenom kodiert 48, nach manchen Quellen 49, ABC-Proteine, die in 7 Gruppen eingeteilt werden (A–G). Die ABCB-Gruppe beinhaltet Volltransporter mit der Domänen-Anordnung TMD1-ABC1-TMD2-ABC2 und Halbtransporter mit der Domänen-Anordnung TMD-ABC. Multidrug resistance protein 1 ist ein Volltransporter, der Fremdstoffe aus Zellen schleust.<sup>101,103</sup> Es wird angenommen, dass er Organe und Fetus vor giftigen Fremdstoffen schützt.<sup>104</sup> Überexpression von Multidrug resistance protein 1 führte in vielen Studien zu einem verminderten Ansprechen auf die jeweilige Chemotherapie (beispielsweise bei Leukämie, Myelom, Brustkrebs und Neuroblastom). Andere Studien zeigten eine verstärkte Expression von Multidrug resistance protein 1 nach Chemotherapie.<sup>105</sup> Multidrug resistance protein 1 verursacht Resistenzen gegen mehrere, strukturell nicht verwandte Substanzen (multidrug resistance).<sup>106,107</sup> Vincristin wird als Substrat von Multidrug resistance protein 1 beschrieben.<sup>94</sup> Forschergruppen beschreiben das Vorkommen und bewerten die prognostische Relevanz von Multidrug resistance protein 1 in Neuroblastomen unterschiedlich: Bei Cremoux et al. führte die Überexpression von *ABCB1* bei 20 von 27 Stadium-3(mit MYCN-Amplifikationen)- und Stadium-4-Patienten nicht zu einer signifikant veränderten Prognose.<sup>108</sup> Kurowski und Berthold fanden das Protein in 10 von 44 (23 %), Chan et al. in 12 von 19 (63 %) Stadium-4-Neuroblastomen. Kurowski und Berthold gehen von einem eventuell leicht verbesserten Überleben bei Multidrug resistance protein 1-negativen

Stadium-4-Neuroblastomen aus, Chan et al. berichten von einem signifikant besseren Überleben bei 31 Multidrug resistance protein 1-negativen im Vergleich zu 13 Multidrug resistance protein 1-positiven Patienten mit Neuroblastomen der Stadien III, IV und IVS. Bei Chan et al. waren alle 23 Patienten mit Stadium I- und II- Neuroblastomen Multidrug resistance protein 1-negativ und zeigten ein rezidivfreies Überleben. Alle 18 Patienten mit Tumorrezidiv waren oder wurden Multidrug resistance protein 1-positiv, und nur ein Patient mit Multidrug resistance protein 1-positivem Tumor hatte kein Rezidiv.<sup>109,110</sup> In der Zelllinie UKF-NB-2 wurde keine Expression von Multidrug resistance protein 1 entdeckt.<sup>62</sup> Bei der Etablierung der Vincristin-resistenten Sublinie UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> kam es zu einer Amplifikation der Region 7q21.1, in der sich *ABCB1* befindet (s. o.).<sup>111</sup> Anders als UKF-NB-2-Zellen exprimieren UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen hohe Mengen von Multidrug resistance protein 1. Außerdem kam es bei der Etablierung von UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> zu einer Zunahme maligner Eigenschaften wie einer beschleunigten transendothelialen Penetration.<sup>62</sup> Bei den hier beschriebenen Versuchen (s. Ergebnisteil) kam es in einem einmaligen Versuchsansatz nach Blockade der Multidrug resistance protein 1-Expression durch entsprechende siRNA ohne Zugabe von Vincristin nicht zu einer Abnahme der Zellviabilität von über 25 % im Vergleich zur non-target-Kontrolle. Nach Zugabe von Vincristin kam es bei allen Vincristin-Konzentrationen außer 100 ng/ml zu einer Abnahme der Zellviabilität von über 25 % im Vergleich zur non-target-Kontrolle. Bei der Vincristin-Konzentration 100 ng/ml betrug die Zellviabilität 0 %. Dies ist kongruent mit dem beschriebenen Vorkommen und den beschriebenen Eigenschaften von Multidrug resistance protein 1. Bei Blockade von *ABCB1* kommt es vermutlich zu einer höheren Akkumulation von Vincristin in den Zellen. Klinische Versuche mit Multidrug resistance protein 1-Inhibitoren zeigten bis jetzt keine Brauchbarkeit, was sich aber aufgrund der heutigen technischen Möglichkeiten ändern könnte.<sup>107</sup>

## 5.2 FOXJ1

FOXJ1 ist eine Abkürzung für „forkhead box J1“.<sup>112</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Forkhead box protein J1“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 17 in der Region 17q25.1. Das menschliche Forkhead box protein J1 hat 421

Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 45 kDa.<sup>113</sup> Forkhead box protein J1 gehört zur Forkhead-Transkriptionsfaktoren-Familie.<sup>112</sup> Allen Forkhead Proteinen gemeinsam ist die Forkhead Box Domäne (DNA-bindende Domäne).<sup>114</sup> Menschliches FOXJ1 wird exprimiert in Hoden, Eileiter, Lunge und Gehirn, nach GeneCards auch in anderen Geweben.<sup>115,113</sup> Es wird stark exprimiert in Zellen an der Ventrikeloberfläche und einigen Zellen in der subventrikulären Zone des menschlichen Gehirns.<sup>116</sup> In Maus- und Rattengeweben wird FOXJ1 in Lunge, Eierstock/Eileiter, Hoden, Gehirn, peripherem Nerv und Luftröhre exprimiert.<sup>117</sup> Weiterhin wird FOXJ1 bei Mausembryonen in Zellen des „embryonic node“ exprimiert, die Monozilien enthalten. In den Luftwegen ist FOXJ1 mit Zilienzellen assoziiert: Epithelzellen der Luftröhren von FOXJ1-mutierten Mäusen bildeten fast keine Zilien aus. Zentriolen und Basalkörper (dazu mehr s. u.) waren zwar vorhanden, die meisten Basalkörper erreichten aber nicht die apikale Membran.<sup>118</sup> Didon et al. generierten Basalzellkulturen aus menschlichen Luftwegs-Epithelzellen. Bei der Differenzierung zu Zilienzellen *in vitro* kam es zu einer Induktion der FOXJ1-Expression. Nach Transfektion von FOXJ1 in Basalzellen kam es zu einer Induktion der Expression von Zilien-assoziierten Genen.<sup>119</sup> Zilien der Luftwege sind sog. motile Zilien (im Gegensatz zu den nicht-motilen primären Zilien). Im Kern von Zilien befindet sich ein Gerüst, das Axonem. Hier sind 18 Mikrotubuli, Röhren aus Alpha- und Beta-Tubulin, kreisförmig als Dubletten (bestehend aus jeweils einem A und einem B Mikrotubulus) manchmal um 2 einzelne Mikrotubuli angeordnet ((9 + 2)- oder (9 + 0)- Zilien).<sup>120-122</sup> Außer in der Lunge befinden sich motile Zilien im Mittelohr, in den Ventrikeln des Zentralen Nervensystems und im Eileiter.<sup>121</sup> Spermatozoen haben sog. Flagellen mit dem gleichen Innenaufbau aus Mikrotubuli-Aggregaten wie Zilien.<sup>122</sup> Mikrotubuli sind wichtige Komponenten des Zytoskeletts<sup>123</sup>, außerdem bilden sie den Spindelapparat<sup>124</sup>. In der Mitosephase von Zellen bilden sog. Zentrosomen die Spindelpole nach Verdopplung des Zentrosoms in der Synthesephase.<sup>125,126</sup> Das Zentrosom besteht aus 2 Zentriolen und perizentriolarem Material.<sup>127</sup> Zentriolen enthalten 9 Mikrotubuli-Tripletten, die zylinderförmig angeordnet sind.<sup>34</sup> Das Zentrosom wird auch als Mikrotubuli-Organisationszentrum bezeichnet.<sup>128</sup> Das Minusende der Mikrotubuli ist in das Zentrosom eingebettet, während das Plusende, an dem ggf.

Alpha- und Beta-Tubulin-Heterodimere polymerisieren, in die Peripherie herausragt.<sup>124,129</sup> Ebenfalls ein Mikrotubuli-Organisationszentrum ist der Basalkörper, von dem aus Zilien oder Flagellen wachsen.<sup>130,131</sup> Bei primären Zilien bilden sich die Basalkörper aus Zentriolen der Zentrosomen.<sup>132</sup> Vincristin bindet am Beta-Tubulin und hemmt den Aufbau der Kernspindeln.<sup>53,54</sup> Nach Christen und Jaussi hängt die Länge von Mikrotubuli von der Konzentration der freien Tubulindimere ab.<sup>129</sup> Möglicherweise war FOXJ1 in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup> im Vergleich zu UKF-NB-2 hochreguliert, weil es durch die Bindung von Vincristin an Beta-Tubulin zu einem Überangebot an freiem Tubulin kam und die Bildung von motilen Zilien durch Induktion von FOXJ1 angeregt wurde, wodurch wiederum weniger Tubulin für die Zellteilung zur Verfügung stand. Vielleicht bewirkt eine große Menge von freien Tubulin-Heterodimeren während der Mitose die Differenzierung zu Multizilienzellen. Nach Ishikawa und Marshall sind Multizilienzellen terminal differenziert und teilen sich nicht mehr.<sup>133</sup> Außer zu einem Unterangebot an Tubulin-Heterodimeren könnte es auch zu einem Unterangebot an GTP für die Bildung der Kernteilungsspindel gekommen sein, das an Tubulin gebunden in die Mikrotubuli eingebaut wird.<sup>124</sup> Unter dem Einfluss von Vincristin könnte also die Menge an Zentrosomen zugunsten der Menge an Basalkörpern abgenommen haben. Nach Blockade von FOXJ1 in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen kam es im Vergleich zur non-target-Kontrolle zu einer Erhöhung der Zellviabilität von über 25 % nur bei 50 ng/ml Vincristin. Bei allen anderen Konzentrationen waren die gemittelten Werte der Zellviabilität erhöht im Vergleich zur non-target-Kontrolle, allerdings waren bei 0 und 12,5 ng/ml Vincristin bei einem Ansatz die Werte ähnlich wie bei der non-target-Kontrolle (0 ng/ml Vincristin: 100,78 %, non-target 97,56 ± 9,81 %; 12,5 ng/ml Vincristin: 92,05 %, non-target 90,70 ± 10,91 %). Angesichts der hohen Standardabweichungen der non-target-Werte bei allen Konzentrationen könnte es sich um einen Zufall handeln. Wenn es durch FOXJ1 tatsächlich bei der Etablierung von UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen zu einer Bildung von motilen Zilien kommt, ist dies möglicherweise mikroskopisch zu erkennen. Forschungsberichten zufolge haben gegen Chemotherapie resistente Zellen ähnliche Charakteristiken wie Stammzellen.<sup>134</sup> Die Wände der Seitenventrikel beim Menschen enthalten multipotente, sich selbst erneuernde Stammzellen.<sup>135</sup>

Die Expression von FOXJ1 wird bei Mäusen benötigt für die Differenzierung in Ependymzellen und eine kleine Untermenge von FOXJ1<sup>+</sup> Astrozyten in den Wänden der Seitenventrikel. FoxJ1<sup>EGFP</sup>-Zellen aus Subventrikulären Zonen von Postnataltag 0 und 21 Mäusen konnten sich *in vitro* selbst erneuern und besaßen neurogenes Potential.<sup>136</sup> Nach Einwirkung von Vincristin geht die Zelle möglicherweise evolutiv bedingt in einen Zustand, in dem sie sich selbst erneuern kann. Dies kann ein ähnlicher oder gleicher Zustand zu einem bereits im menschlichem Körper vorhandenen sein, bei dem ähnliche oder gleiche Signalwege benutzt werden, wenige Aspekte und/oder die Umgebung sich aber unterscheiden. UKF-NB-2<sup>rVCR</sup><sup>20</sup>-Zellen zeigen verstärktes klonales Wachstum, verstärkte Adhäsion und transendotheliale Penetration *in vitro* und höhere Tumorigenität *in vivo* und exprimieren, wie die sich selbst erneuernden FoxJ1<sup>EGFP</sup>-Zellen aus den Subventrikulären Zonen, FOXJ1.<sup>62</sup>

### 5.3 MAP2K1

MAP2K1 ist eine Abkürzung für „mitogen-activated protein kinase kinase 1“.<sup>137</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 15 in der Region 15q22.31. Die menschliche mitogen-activated protein kinase kinase 1 hat 393 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 43 kDa.<sup>138</sup> MAP2K1 kommt in vielen menschlichen Geweben/Organen vor und ist weitgehend ein zytoplasmatisches Protein.<sup>139-141</sup> MAP2K1 ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt wie Proliferation, Differenzierung, Transkriptionsregulation und Entwicklung.<sup>142</sup> MAP2K1 aktiviert die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung. Bis 2001 waren keine anderen Substrate des Enzyms bekannt. Weiterhin sind MAP2K1 und MAP2K2 die einzigen Aktivatoren von ERK1 und ERK2.<sup>143</sup> MAP/ERK-Kinasen (MEKs), zu denen MAP2K1 gehört, werden von MEK-Kinasen (MEKKs) aktiviert. Eine MEKK, die MAP2K1 phosphoryliert, ist Raf. Die Raf-Isoform Raf-1 bildet mit MAP2K1 und dem G-Protein Ras Komplexe.<sup>141,144</sup> MAP2K2<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln sich normal, während MAP2K1-Knockout bei Mäusen den embryonalen Tod zur Folge hat.<sup>143</sup> MAP2K1/2-Mutationen sind insgesamt selten in Krebs.<sup>143</sup> Dagegen ist das Ras-Gen in ca. 25 % aller menschlichen Tumoren mutiert.<sup>145</sup> Die 3 Ras-Gene HRAS,



NRAS and KRAS bilden die am häufigsten mutierte Onkogen-Familie in menschlichen Krebsarten.<sup>146</sup> Ras ist auch in manchen Neuroblastomzellen mutiert.<sup>147</sup> Die Inhibition von MAP2K1 mit siRNAs bei UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen führte nur bei Zugabe von 25 ng/ml Vincristin zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur non-target-Kontrolle. Nur bei einem der beiden Versuchsdurchläufe ist die Viabilität im Vergleich zur non-target-Kontrolle ohne und mit Zugabe von Vincristin durchgehend erniedrigt. Grund dafür kann ein Versuchsfehler sein, beispielsweise könnte die Transfektion bei einem Versuchsdurchgang nicht funktioniert haben. Weiterhin könnten sich beispielsweise bei einem Versuchsdurchgang schon vor der Transfektion Zellen vermehrt haben, bei denen keine Abhängigkeit von MAP2K1 besteht. Die Literaturrecherche könnte darauf hindeuten, dass die Inhibition von MAP2K1 tatsächlich oft zu einem Absterben von Tumorzellen führt. Damit könnte die Behandlung von Neuroblastompatienten mit MAP2K1/2-Inhibitoren zum Erfolg führen. In mehr als 30 % aller menschlichen Krebsarten ist der RAS–RAF–MEK–ERK1/2 Pathway anormal aktiviert.<sup>147</sup> Eleveld et al. fanden in 18 von 23 Neuroblastomrezidiven Mutationen, die vermutlich den RAS-MAPK-Signalweg hyperaktivierten. Davon wurden 7 in den entsprechenden Primärtumoren nicht detektiert und wurden somit möglicherweise durch die chemotherapeutische Behandlung selektiert. Menschliche Neuroblastomzelllinien mit RAS-MAPK-Mutationen zeigten Sensitivität auf MEK-Inhibitoren.<sup>148</sup> In Deutschland zugelassen sind bisher die MAP2K1/2-Inhibitoren Trametinib und Cobimetinib für Erwachsene.<sup>149-151</sup> Cobimetinib ist derzeit in mehreren Staaten, u. a. Deutschland, für eine Phase I/II-Studie bei Patienten im Alter von 6 Monaten bis 30 Jahren u. a. bei Neuroblastomen zugelassen.<sup>152</sup> Trametinib wird in Kombinationstherapie in 5 Staaten 3 verschiedener Kontinente u. a. bei Neuroblastompatienten ab 1 Monat sowie in den U.S.A. und Kanada in Monotherapie bei Kindertumoren ab 1 Monat erprobt.<sup>153-155</sup> Im Rahmen der sog. Pediatric MATCH(Molecular Analysis for Therapy Choice)-Trials ist der MAP2K1/2-Inhibitor Selumetinib in 2 amerikanischen Staaten u. a. für Neuroblastompatienten ab 1 Jahr zugelassen.<sup>156,157</sup> Bei einer Phase-1-Studie mit Kindern im Alter von 5–20 Jahren mit fortschreitenden oder wiedergekehrten niedriggradigen Gliomen sprachen 5 von 25 Patienten partiell auf den

MAP2K1/2-Inhibitor Selumetinib an, die die empfohlene Phase-2-Dosis erhielten. In einem Phase-I-Versuch mit Selumetinib bei Kindern zwischen 3 und 18 Jahren mit Neurofibromatose Typ 1 und inoperablen plexiformen Neurofibromen kam es bei 17 von 24 Kindern zu einem partiellen Ansprechen. Bei beiden Studien traten als dosislimitierende Toxizitäten Kreatinkinase-Erhöhung, Schleimhautentzündung, Ausschlag, Zellulitis, verminderte linksventrikuläre Auswurfraction, Urticaria, Amylase/Lipase-Erhöhung und Kopfschmerzen auf.<sup>158,159</sup>

## 5.4 NFYB

NFYB ist eine Abkürzung für „nuclear transcription factor Y subunit beta“.<sup>160</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Nuclear transcription factor Y subunit beta“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 12 in der Region 12q23.3. Das menschliche Nuclear transcription factor Y subunit beta hat 207 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 23 kDa.<sup>161</sup> Das Protein NFYB wurde in allen für den „Human Protein Atlas“ getesteten Organen hoch exprimiert und ist im Zellkern lokalisiert.<sup>139,162</sup> NFYB ist ein Bestandteil des heterotrimeren Transkriptionsfaktors NF-Y, der spezifisch ein 5'-CCAAT-3'-Box-Motiv in den Promotoren seiner Zielgene erkennt.<sup>163</sup> Im Wesen sind Y- und CCAAT-Boxen äquivalent.<sup>164</sup> Bei der Inhibition von NFYB in der Zelllinie UKF-NB-2rVCR<sup>20</sup> kam es bei beiden Versuchsdurchgängen schon ohne zusätzliche Zugabe von Vincristin und bei allen Vincristin-Konzentrationen zu einer Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur non-target-Kontrolle. Allerdings kam es nur bei der Vincristin-Konzentration 25 ng/ml im Vergleich zur non-target-Kontrolle zu einer Abnahme des Zellviabilitäts-Mittelwerts von über 25 %. Die Versuchsergebnisse werden durch die Literaturrecherche bestätigt: Bei den meisten beschriebenen Versuchen wirkten NF-Y oder NFYB antiapoptotisch. Rhodes et al. kombinierten Gensets mit statistisch signifikant differentieller Expression in Krebs mit mutmaßlichen Zielgensets von Transkriptionsfaktoren. Verbindungen von NF-Y-Bindungsstellen mit den differentiell exprimierten Genen („Conditional Regulatory Programs (CRPs) involving human cancer“) waren häufig und deckten sich üblicherweise mit E2F-Cancer Regulatory Programs.<sup>165</sup> Promotoren/Enhancer für NFYB haben Bindungsstellen für E2F1.<sup>161</sup> 126 von den 232 entdeckten „CRPs

involving human cancer“ verbanden mutmaßliche E2F-Bindungsstellen mit Zielgenen in Krebstypen, u. a. Glioblastom und Medulloblastom.<sup>165</sup> Bei Sinha et al. waren NFY Motif-Module in vielen Krebstypen induziert und in den entsprechenden Normalgeweben unterdrückt.<sup>166</sup> In den Oxaliplatin-resistenten menschlichen Zelllinien OR-DLD1 und OR-RKO (Kolonkarzinom) waren im Vergleich zu den sensiblen Zelllinien die Proteine NFYB und E2F1 erhöht. Knockdown von NFYB durch siRNAs reduzierte in beiden Zelllinien die Proteinlevel von E2F1 und schwächte die Resistenz ab. In den parental sensiblen Zelllinien kam es bei Herunterregulation von NFYB dagegen zu einer Erhöhung der Zellviabilität.<sup>167</sup> Eine ChIP-Seq-Analyse ergab, dass NF-Y in den menschlichen Zelllinien K562 (Chronische Myeloische Leukämie), HeLa-S3 (endozervikales Adenokarzinom) und GM12878 (Lymphoblastoid) die Promotoren oder Gene von unter anderem ABCB1, ABCC2, MYC und TP53 ansteuert.<sup>164,168-170</sup> Der menschliche MDR1-Promoter beinhaltet eine 10-Basenpaar-Homologie mit der Y-Box-Konsensussequenz. Goldsmith et al. transfizierten 2780-Zellen (menschliche Ovarialkarzinom-Zelllinie) mit normalen und mutierten *mdr*-chloramphenicol-acetyltransferase(CAT)-Expressionskonstrukten. Mutationen in der Y-Box-Konsensussequenz reduzierten die *mdr*CAT-Expression 5–10fach.<sup>171</sup> Kotransfektion eines dominant negativen NF-YA Expressionsvektors (NF-YA29) mit einem Wildtyp-MDR1-Promoter/Luciferase-Konstrukt (pMDR1–1202) in menschliche Epidermoid-Karzinom-Zellen (KB-3-1) verminderte die Aktivierung des MDR1-Promoters durch UV-Licht und somit genotoxischen Stress.<sup>172</sup> In menschlichen Kolonkarzinom SW620 Zellen verminderte die Inaktivierung von NF-Y die Aktivierung des MDR-1-Promoters durch Trichostatin A, einen Histondeacetylase(HDAC)-Inhibitor.<sup>173</sup> Knockdown von HDAC1, HDAC2 und HDAC1 plus HDAC2 in menschlichen HCT-8- oder HCT-116-Zellen (Kolonkarzinom) induzierte die Assoziation des MDR1-Promoters mit NF-Y, führte zu einer erhöhten Aktivität des MDR1-Promoters und MDR1-Proteinmenge und erhöhte die Vincristin-Resistenz.<sup>174</sup> Der multi-HDAC-Inhibitor Vorinostat wird in den U.S.A in Klinischen Phase-II-Studien für die Therapie von Neuroblastomen eingesetzt.<sup>175-177</sup> Die Herunterregulation von NF-Y könnte hier wie die Herunterregulation von NFYB in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen die Entstehung von

Resistenzen durch die Expression von MDR1 verhindern. Die Herunterregulation von NFYB in HCT116-Zellen durch siRNAs führte zur Induktion von Apoptose. Dabei wurde p53 induziert sowohl auf dem mRNA- als auch auf dem Proteinlevel.<sup>178</sup> Eine p53-Mutation ist mit über 50 % der Fälle die häufigste Veränderung bei der Entwicklung von menschlichen Tumoren.<sup>179</sup> Die Herunterregulation von NFYB in HCT116-Zellen durch shRNAs führte zu einem langsameren Zellwachstum. Nach NFYB-Depletion wurden die Transkriptionslevel von 515 Genen angehoben und von 685 Genen vermindert. Die Bindung von NF-Y an seine Zielgene wurde vermindert mit der hauptsächlich beobachteten Folge der Unterdrückung der Transkription von CCAAT-Genen, besonders von G2/M-Genen, die eine hohe Affinität zu NF-Y zeigen.<sup>180</sup> In der menschlichen Neuroblastom-Zelllinie BE2 ist NF-Y wichtig für die konstitutive Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase.<sup>181</sup> Die Hemmung der löslichen Guanylatcyclase in SK-N-BE menschlichen Neuroblastomzellen hob den protektiven Effekt von NO auf, wirkte also apoptotisch.<sup>182</sup>

## 5.5 RICS

RICS ist ein Synonym für „ARHGAP32“, eine Abkürzung für „Rho GTPase activating protein 32“.<sup>183</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Rho GTPase-activating protein 32“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 11 in der Region 11q24.3. Das menschliche Rho GTPase-activating protein 32 hat 2087 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 231 kDa.<sup>184</sup> PX-RICS ist eine RICS-Spleißvariante, die eine PX-Domäne beinhaltet.<sup>185</sup> Laut Human Protein Atlas wird das Protein in vielen Organen/Geweben exprimiert, am stärksten in Leber und Gallenblase, Gastrointestinaltrakt, Niere und Blase und männlichen Geweben.<sup>139,186</sup> Außerdem wird RICS in hohen Leveln in den menschlichen Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und SMS-KCN exprimiert.<sup>187</sup> In der Zelllinie SH-SY5Y wird PX-RICS exprimiert.<sup>185</sup> Laut Moon und Zheng kann ein „Rho GTPase-activating protein“ (Rho-GAP) die GTPase-Aktivität von Rho-Proteinen katalysieren und sie damit inaktivieren, oder die von Rho-Proteinen hervorgerufenen Effekte vermitteln.<sup>188</sup> Bestandteile der Rho Familie der kleinen GTPasen kontrollieren einige der fundamentalsten zellbiologischen Prozesse die allen Eukaryoten gemeinsam sind, inklusive Morphogenese, Polarität, Bewegung

und Zellteilung.<sup>189</sup> *In vitro* stimulierte die RICS GTPase-aktivierende Protein (GAP)-Domäne die GTP-Hydrolyse der Rho-GTPasen „cell division cycle 42“ (Cdc42), „ras homolog family member A“ (RhoA), und „Rac family small GTPase 1“ (Rac1).<sup>187,190-194</sup> Bei Lee et al. war bei Testung von 7 Tumorproben die Expression von Cdc42 in undifferenzierten Neuroblastomen im Vergleich zu benignen Ganglioneuromen erhöht. Hemmung von Cdc42 führte in den menschlichen Neuroblastomzelllinien BE(2)-C und BE(2)-M17, nicht aber in der menschlichen Neuroblastomzelllinie SK-N-AS zu einer verminderten Zellproliferation und Zellmigration und in BE(2)-C-Zellen zu erhöhter Apoptose und einer verminderten Koloniebildung.<sup>195</sup> Dies steht im Einklang zu der erhöhten Zellviabilität nach Inhibition von RICS, das evtl. in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen Cdc42 inhibiert. Überexpression von RHOA ist mit Tumorzellproliferation und Metastasierung assoziiert.<sup>196</sup> Platelet-derived growth factor (PDGF) kann die Proliferation von SH-SY5Y-Zellen stimulieren und in SH-SY5Y-Zellen Rac aktivieren.<sup>197</sup> Auch dies passt noch zu einer erhöhten Zellviabilität nach Blockade von RICS. In Maus-Swiss 3T3-Zellen stimuliert Rac1 die Bildung von „membrane ruffles“, Membranausbuchtungen am führenden Ende einer kriechenden Zelle“. <sup>198,199</sup> Bei Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit „epidermal growth factor“ (EGF) kam es zu einer Translokation von RICS an die Ränder der Zellperipherie und einer umfangreichen Verlagerung von RICS in „membrane ruffles“. <sup>187</sup> Nach der Datenbank Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) wurden Interaktionen von menschlichem RICS mit 46 (auch Maus-) Proteinen nachgewiesen.<sup>200</sup> Die Datenbank „BioMuta“ zeigt für RICS 511 „single-nucleotide variations“ in verschiedenen Krebsarten, davon 27 in Blastomen und 9 in malignen Gliomen an.<sup>201</sup> Überexpression von RICS in Maus-N1E-115-Neuroblastomzellen führte zu Differenzierung. Bei menschlichen Neuroblastomen ist die Prognose günstiger, je differenzierter die Zellen sind (s. Abschnitt 1.1.9 Pathologie). In Maus-Swiss 3T3-Fibroblasten kam es bei Expression der RICS-RhoGAP-Domäne zu einer Disruption von Aktin-Stressfasern.<sup>202</sup> Bei der Blockade von RICS in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen zeigt sich ab der Zugabe von Vincristin in beiden Versuchsdurchgängen eine Zunahme der Zellviabilität im Vergleich zur non-target-Kontrolle. Nur in einem Versuchsdurchgang fällt diese Zunahme deutlich aus, dies auch ohne Zugabe

von Vincristin. Die stark unterschiedlichen Ergebnisse deuten auf einen Fehler in der Versuchsdurchführung hin. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Genen, deren Blockade in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen zu einer deutlichen Erniedrigung der Zellviabilität im Vergleich zur non-target-Kontrolle führte, ist bei der Literaturrecherche bei RICS keine allgemeine Tendenz zur Bestätigung des Versuchsergebnisses erkennbar. Beispielsweise führte bei Shang et al. die ektopische Expression von RICS in Maus-NIH 3T3-Zellen zu einer erhöhten Zellproliferation. Ein Knock-down von RICS in diesen Zellen würde also evtl. zu einer verminderten Zellviabilität führen.<sup>203,204</sup> Selbstverständlich kann dies auch auf unterschiedliche Kontexte, wie verschiedene Zelllinien, zurückzuführen sein.

## 5.6 SMARCA1

SMARCA1 ist eine Abkürzung für „SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1“.<sup>205</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Probable global transcription activator SNF2L1“. Das Gen liegt auf dem X-Chromosom in der Region Xq25–q26.1. Das menschliche Probable global transcription activator SNF2L1 hat 1054 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 123 kDa.<sup>206</sup> Das Protein wird in einigen Geweben exprimiert, v. a. im Gehirn, in der Lunge, im Hoden und in der weiblichen Brust.<sup>139,207</sup> Es ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert.<sup>139,208</sup> SNF2L ist eine ATPase, die in den Chromatin-remodeling-Komplexen nucleosome-remodeling factor (NURF) und CECR2-containing-remodeling factor (CERF) enthalten ist.<sup>209-211</sup> Die Interaktion von Probable global transcription activator SNF2L1 mit den hier ebenfalls herunterregulierten Proteinen der Gene SMARCA5, SMARCC1 und SMARCC2 wurde durch Co-Fraktionierung gefolgert.<sup>212</sup> Knockdown von SMARCA1 führte zu einer starken Wachstumshemmung mit Zellzahlreduktion in menschlichen hochmalignen, aber zu keiner oder einer minimalen Wachstumshemmung in niedriggradigen oder gutartigen und normalen untransformierten menschlichen Zelllinien. In den hochmalignen Zelllinien kam es dabei zu einem DNA-Schaden und einer DNA-Schadensantwort, gefolgt von Apoptose. Für die beschriebenen Versuche nutzten Ye et al. die hochmalignen Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC202, HTB20, HTB27 (Brustkrebs), HeLa (Zervixkarzinom), RB (Rhabdomyosarkom), SKLMS-1 (Leiomyosarkom) und U2-OS (Osteosarkom)

und die niedriggradigen oder gutartigen und normalen untransformierten menschlichen Zelllinien HDF (Haut, Fibroblasten), HLF (Lunge, Fibroblasten), OSU-2 (Haut, Fibroblasten), HMEC (Brustepithel), MCF-10A (Brust), HMS-X (Speicheldrüsentumor, myoepithelial), HMS-1 (Speicheldrüsentumor, myoepithelial), HMS-3X, HMS-4X, HMS-6X (Speicheldrüse, Brust, Lunge, myoepithelial) und MCF-7 (Brustkrebs). Auch bei Überexpression von SNF2L1 kam es zu Apoptose.<sup>213</sup> Im Gegensatz zu den Versuchen von Ye et al. beschreiben Eckey et al. nach Knockdown von SMARCA1 durch siRNAs in HeLa-Zellen nach 72 Stunden eine erhöhte Zellzahl im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Außerdem stellte das Team eine erhöhte Chemotaxis fest. In normalen primären Melanozyten wurde Probable global transcription activator SNF2L1 hoch exprimiert, weniger in Mel Juso (Zelllinie, primäres Melanom) und war undetektierbar in Mel Ho (Zelllinie, Melanom), Mel Wei (Zelllinie, primäres Melanom), und malignen Melanom-Zellen. Bei Überexpression von Probable global transcription activator SNF2L1 in Mel IM-Zellen (Zelllinie, Melanom-Metastase) kam es zu einer signifikant verminderten Migration.<sup>214</sup> Ye et al. entdeckten eine verkürzte Isoform von SNF2L1, SNF2LT, der die Domänen HAND, SANT und SLIDE fehlen. Knockdown von SNF2LT führte wie der Knockdown von SNF2L1 in hochmalignen, weniger in niedriggradigen und normalen untransformierten Zelllinien zu einer Wachstumshemmung. Bei gleichzeitigem Knockdown von SNF2L1 und SNF2LT kam es dagegen zu einem verstärkten Zellwachstum. Der gleichzeitige Knockdown von SNF2L1 und SNF2LT induzierte wie der jeweils einzelne Knockdown einen DNA-Schaden, resultierte aber nicht in Apoptose. Ye et al. vermuten, dass das Verhältnis von SNF2L1 zu SNF2LT für das jeweilige Verhalten der Zellen verantwortlich ist.<sup>215</sup> Beim Knockdown von SMARCA1 in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen kam es bei beiden Versuchsdurchgängen zu einer Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur non-target-Kontrolle bei allen Vincristin-Konzentrationen. Wie bei ABCB1 und SMARCC1 zeigt sich eine konkave Zellviabilitäts-Kurve. Für die Knockdown-Versuche in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen wurden Gene ausgesucht, bei deren Blockade das Vorliegen einer sogenannten Synthetischen Letalität vermutet wurde, bei der es zu einer verminderten Viabilität von Tumor-, nicht aber gesunden Zellen kommen würde. Die Versuche von Ye et al. mit anderen

Tumorzelllinien weisen auf das Vorliegen einer solchen Synthetischen Letalität bei Blockade von SMARCA1 hin. V. a. in den hochmalignen Zelllinien kam es bei Blockade von SMARCA1 zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Die Versuche von Eckey et al. bestätigen dieses Ergebnis nicht. Das Vorliegen von 2 Quellen mit ähnlichen Ergebnissen macht das Vorliegen einer Synthetischen Letalität beim Knockdown von SMARCA1 aber wahrscheinlicher. Zudem führte auch bei Ye et al. die Blockade von SMARCA5 (Protein: SNF2H) wie in den hier durchgeführten Versuchen zu keiner signifikanten Veränderung der Zellviabilität.<sup>213,216</sup> Ob die Überexpression von SNF2L1 in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen ebenfalls zu Apoptose führt, sollte ebenfalls getestet werden.

## 5.7 SMARCB1

SMARCB1 ist eine Abkürzung für "SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1".<sup>217</sup> Das dazugehörige Protein heißt „SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 22 in der Region 22q11.23. Das menschliche SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 hat 385 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 44 kDa.<sup>218</sup> Laut Human Protein Atlas wird SMARCB1 in fast allen Geweben hoch exprimiert, Ausnahmen sind beispielsweise die Leber und der periphere Nerv (niedrige Expression).<sup>139,219</sup> Intrazelluläre Lokalisation ist hauptsächlich das Nukleoplasma.<sup>139,220</sup> SMARCB1 ist ein Kernbestandteil des BAF-Komplexes (näheres dazu s. Abschnitt SMARCC1).<sup>221</sup> Bei der Herunterregulation von SMARCB1 in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen zeigte sich bei den Vincristin-Konzentrationen 12,5 ng/ml und 25 ng/ml eine deutliche Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. In allen 3 Versuchsdurchgängen ist die Viabilität bei allen Vincristin-Konzentrationen bei den SMARCB1-Herunterregulierten Zellen im Vergleich zur non-target-Kontrolle herabgesetzt. Im Gegenteil ist SMARCB1 als Tumorsuppressor bekannt und beispielsweise in fast allen malignen Rhabdoiden Tumoren inaktiviert (Mutationsfrequenz 98 % in Rhabdoiden Tumoren).<sup>222</sup> Von daher könnte eine Inhibition im Körper zu schwerwiegenden Folgen führen. In G401-Zellen (aus malignem rhabdoidem Tumor (MRT), ca. 90% diploid) kam es



nach Expression von Wild-Typ-SMARCB1 zu einer verminderten Zellzahl und die Zellpopulation wurde fast perfekt diploid, vermutlich durch selektiven Arrest und Seneszenz von aneuploiden Zellen. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass SMARCB1 den mitotischen Checkpoint durch den p16<sup>INK4a</sup>-cyclinD/CDK4-pRb-E2F Pathway aktiviert. In nicht-MRT-Zellen kam es bei Herunterregulation von SMARCB1 zu Polyploidisierung. Möglicherweise kommt es auch in UKF-NB-2<sup>rVCR</sup><sup>20</sup>-Zellen bei Herunterregulation von SMARCB1 zu einer Polyploidisierung, die als Folge Seneszenz oder Apoptose haben könnte. Nach Expression von an einer Aminosäure mutiertem SMARCB1 in G401-Zellen waren ca. 25% der Zellen im tetraploiden Bereich und ca. 10 % der Zellen nahe octaploid. Von den mitotischen Zellen, die mutiertes SMARCB1 exprimierten, enthielten 33 % mehr als eine Spindel, vorher ca. 5 %. Nach Expression von Wild-Typ-SMARCB1 enthielten nahezu alle mitotischen Zellen eine Spindel. In Zellen, die mutiertes SMARCB1 enthielten, schien sich die mitotische Spindel nicht mit den Kinetochoren zu verbinden, während es bei Expression von Wild-Typ-SMARCB1 zu einer ordnungsgemäßen Verbindung zwischen Metaphase-Chromosomen und Zentrosomen kam. Vincristin zerstört die Mikrotubuli, indem es an  $\beta$ -Tubulin bindet und damit die Zellteilung irreversibel blockiert. Ohne SMARCB1 kommt es evtl. zusätzlich zu einer Störung der Verbindung zwischen Metaphase-Chromosomen und Zentrosomen, so dass sich die Zellen nicht mehr teilen.<sup>223</sup> Gleichzeitiger Ausfall von SMARCB1 und der enzymatischen Untereinheit von „Polycomb repressive complex 2“ (PRC2) EZH2 führte zu verminderter Proliferation von Tumorzellen (Zelllinie G401, menschlicher rhabdoider Nierentumor), vermutlich durch Seneszenz, und die Hemmung von EZH2 in SMARCB1-mutierten Tumoren führte zu Tumorschrumpfung.<sup>224-226</sup> Möglicherweise kommt es bei der Resistenzentwicklung von UKF-NB-2-Zellen gegen Vincristin zu einem Ausfall von EZH2. Inhibitoren, die gegen Rhabdoide Tumore wirken, in denen SMARCB1 oft mutiert ist (s. o.), sind beispielsweise der Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid und LEE011, ein Cyclinabhängige-Kinase-4/6(CDK4/6)-Inhibitor.<sup>227-229</sup> Vielleicht sind die Topoisomerase II und/oder CDK4/6 in UKF-NB-2<sup>rVCR</sup><sup>20</sup>-Zellen mutiert. Ähnliche Berichte über synthetische Letalität bei SMARCB1-verminderten bzw. defizienten Zellen finden sich auch in anderen Quellen über SMARCB1-verminderte oder -defiziente Tumoren. Bei

Wang et al. führte die Herunterregulation von SMARCB1 in den menschlichen Melanom-Zelllinien A375 und Mel888 zu einer Hochregulation der Expression der Mikro-RNA 146a (einem Marker für zelluläre Seneszenz, dabei kommt es zu einem permanenten Wachstumsstopp ohne Zelltod), verbunden mit einer Proliferationshemmung. Zelluläre Seneszenz kann Tumore unterdrücken, seneszente Zellen hatten aber bei Mäusen scheinbar prometastatische Effekte.<sup>230-232</sup> In A375- und Mel624(menschliche Melanom-Zelllinie)-Zellen verminderte ABT263 (ein Inhibitor der antiapoptotischen Proteine BCL-2, BCL-W, und BCL-XL) stark die Zellzahl der SMARCB1-supprimierten, nicht aber der parentalen Zellen.<sup>232,233</sup> In UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen könnte die Herunterregulation von SMARCB1 durch siRNAs zu Seneszenz geführt haben. Horbach et al. identifizierten 270 Gene, die als assoziiert mit Resistenz gegen Doxorubicin und Vincristin beschrieben werden, darunter SMARCB1. In Vincristin- bzw. Doxorubicin-resistenten Zellen der Zelllinie SK-ES-1 (Ewing-Sarkom, menschlich) war die SMARCB1-mRNA-Expression erhöht im Vergleich zu den entsprechenden Zytostatika-sensiblen Zellen.<sup>234</sup>

## 5.8 SMARCC1

Weil die Herunterregulation von *SMARCC1* von allen Kandidatengen bei allen Vincristin-Konzentrationen im Mittel zur niedrigsten Zellviabilität führte, wurde ein Western Blot gemacht und damit die Verminderung des *SMARCC1*-Proteins nach Transfektion der *SMARCC1*-siRNA in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen nachgewiesen (s. 4.3). *SMARCC1* ist eine Abkürzung für "SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting) related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1" und die Bezeichnung für ein Gen, das in Säugetieren für Brahma-related-gene-1(BRG1)-Associated-Factor-155 (BAF155) kodiert.<sup>235-239</sup> Es liegt auf dem Chromosom 3 in der Region 3p21.31.<sup>240</sup> Das menschliche BAF155 hat 1105 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 123 kDa.<sup>240</sup> Es beinhaltet eine azidische, eine Chromo-, eine SWIRM-, eine SANT-, eine Leuzin-Zipper-, eine Coiled-Coil- und eine Prolin-reiche Region.<sup>241-243</sup> Die BAF155 SWIRM-Domäne hat keine DNA-Bindungs-Aktivität.<sup>244</sup> BAF155 ist zu 62 % identisch und zu 77 % ähnlich zum ebenfalls im Rahmen dieser Dissertation reduzierten Protein BAF170 (Genname SMARCC2), hat jedoch

andere Funktionen.<sup>245-247</sup> Die SWIRM-Domäne von BAF155 oder BAF170 kann direkt mit der Repeat-1(RPT1)-Domäne des ebenfalls im Rahmen dieser Dissertation reduzierten Proteins BAF47 (Genname SMARCB1) interagieren.<sup>248,221</sup> BAF155 kommt im Zellkern vor und wird evtl. ubiquitär exprimiert.<sup>240</sup> In menschlichen Geweben wurde deutlich mehr BAF155-mRNA im Muskel gefunden als im Gehirn, der Lunge, der Leber, der Niere und der Bauchspeicheldrüse. Im Gehirn wurde ungefähr so viel BAF155-mRNA gefunden wie in der Lunge.<sup>245,248</sup> BAF155 ist eine Untereinheit des BAF-Komplexes.<sup>249</sup> Der BAF-Komplex besteht aus einer ATPase (Brahma (BRM) oder BRG1) und sogenannten BRM- oder BRG1-Assoziierten-Faktoren (BAFs), die nach ihrer Molekülgröße benannt wurden. Der menschliche BAF-Komplex hat über 8 Untereinheiten.<sup>239</sup> Die Zusammensetzung der Bestandteile kann nach Zelltyp und innerhalb einer Zelle variieren.<sup>238</sup> Ebenfalls im BAF-Komplex enthalten sind die Proteine der hier herunterregulierten Gene SMARCB1 (BAF47)<sup>221</sup> und SMARCC2 (BAF170)<sup>247</sup>. Es ist auffallend, dass die Herunterregulation von 2 Genen der Proteine des BAF-Komplexes (SMARCB1 und SMARCC1) im Rahmen dieser Doktorarbeit die Zellviabilität deutlich erniedrigte. Die Herunterregulation des BAF-Komplex-Bestandteils BAF170 (Genname SMARCC2) führte dagegen nicht zu einer Erniedrigung der Zellviabilität. Der menschliche BAF-Komplex wird ubiquitär exprimiert.<sup>249</sup> Er verändert die Chromatinstruktur und aktiviert oder unterdrückt so die Transkription von speziellen Genen.<sup>235,250,251</sup> BAF-Komplexe sind an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der DNA-Schadens-Antwort beteiligt.<sup>252,253</sup> In einer Studie wurden in 19 % von 669 menschlichen Tumorproben, die 18 verschiedene Tumorarten umfassten, Mutationen des BAF-Komplexes gefunden.<sup>254</sup> In der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa wurden bei einer Co-Immünpräzipitation und nachfolgender Massenspektrometrie sowie einer Literaturrecherche 158 Proteine gefunden, die mit SWI/SNF-Faktoren copurifizierten.<sup>255</sup> BAF155 kann scheinbar sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen agieren.<sup>256</sup> BAF155 ist erhöht in Prostatakarzinomen<sup>257</sup>, Cervicalen intraepithelialen Neoplasien<sup>258</sup>, Kolonkarzinomen<sup>259</sup> und Brusttumoren<sup>256</sup>. Die Erhöhung von BAF155 muss nicht unbedingt Ursache für die Tumorentstehung oder -erhaltung sein, sondern könnte auch eine Reaktion auf tumorinduzierende

oder tumorerhaltende Vorgänge sein. In der Osteosarkom-Zelllinie U2OS trat nach Suppression von *BAF155* durch siRNAs eine erhöhte Sensitivität auf Cisplatin und ionisierende Strahlung auf. Eine Suppression von *BAF155* könnte in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen zu einer defekten DNA-Reparatur und damit einer verminderten Zellviabilität führen. Der BAF-Komplex ist an der DNA-Schadens-Antwort beteiligt (s. o.). In der Lungenkarzinom-Zelllinie H1299 führte die Unterdrückung der Expression von *BAF155* durch siRNAs zu einer Verminderung von sucrose non fermenting 5 (*SNF5* = *BAF47*, Genname *SMARCB1*). Die Suppression von AT-rich interaction domain 1A (*ARID1A*) sowie auch *BAF47* führte zu einer Verminderung von *BAF155*.<sup>253</sup> Wie die Herunterregulation von *SMARCC1* führte die Herunterregulation von *SMARCB1* in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen im Rahmen der hier durchgeführten Versuche zu einer deutlichen Verminderung der Zellviabilität. Möglicherweise wird dieser Effekt durch eine gegenseitige Beeinflussung bewirkt oder verstärkt. Wie beschrieben führte die Verminderung von *BAF155* in einer menschlichen Zelllinie zur Verminderung eines anderen Bestandteils des BAF-Komplexes (*BAF47*, Genname *SMARCB1*). In anderen Versuchen wie beispielsweise von Keppler und Archer kam es auch zur Stabilisation von anderen BAF-Komplex-Bestandteilen durch *BAF155*. Die Autoren vermuten deshalb, dass *BAF155* innerhalb des SWI/SNF-Komplexes eine wichtige stabilisierende Rolle spielt.<sup>260</sup> Die Stilllegung von *SMARCC1* in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen durch siRNAs könnte ebenfalls zu einer Verminderung anderer BAF-Komplex-Bestandteile bis zu einem Fehlen des gesamten BAF-Komplexes in der Zelle führen und durch die Funktionsunfähigkeit des BAF-Komplexes eine erhöhte Sensitivität auf Vincristin oder eine verminderte Zellviabilität auch ohne zusätzliche Zugabe von Vincristin bewirken. Nach Chen und Archer könnte es in manchen Zellen nach Verminderung von *BAF155* zu einer Übernahme der Funktion durch *BAF170* (Genname *SMARCC2*) kommen.<sup>241</sup> Eine Verminderung beider Proteine könnte dann, beispielsweise auch in UKF-NB-2-Zellen, zur Verminderung der Zellviabilität führen. Von den 40 Kandidatengen ist *SMARCC1* das interessanteste Gen, da die Herunterregulation alleine die Zellviabilität massiv senkt und *SMARCC1* somit ein spannendes Ziel zur Therapie in Tumorzellen ist.

## 5.9 STK35

STK35 ist eine Abkürzung für „serine/threonine kinase 35“.<sup>261</sup> Das dazugehörige Protein heißt „serine/threonine-protein kinase 35“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 20 in der Region 20p13. Die menschliche serine/threonine-protein kinase 35 hat 534 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 58 kDa.<sup>262</sup>

STK35 ist hauptsächlich im Nukleus lokalisiert. STK35-mRNA wird in vielen menschlichen Geweben exprimiert.<sup>263</sup> STK35 ist eine Serin/Threonin-Kinase.<sup>264</sup>

Der Knockdown von STK35 wurde insgesamt in 3 Versuchsdurchgängen durchgeführt. Beim ersten Versuchsdurchgang waren die Zellviabilitäten ähnlich wie bei den Kontrollen. Beim zweiten Versuchsdurchgang war erst nach Zugabe von Vincristin die Zellviabilität erniedrigt, bei den Konzentrationen 25 und 50 ng/ml Vincristin um über 25 %. Beim dritten Versuchsdurchgang war die Zellviabilität bei den Konzentrationen 0, 12,5, 25 und 50 ng/ml Vincristin um über 25 % erniedrigt, bei 100 ng/ml Vincristin waren ebenfalls Effekte zu sehen (Erniedrigung um 25% ist hier rechnerisch nicht möglich). STK35 wird in mehreren Tumorgeweben überexprimiert (u. a. in 3 von 18 Glioblastomproben), aber niedrig oder nicht exprimiert in den entsprechenden Normalgeweben (bei den Glioblastomen waren keine Normalgewebeproben erhältlich).<sup>265</sup> STK35 wurde signifikant überexprimiert in Osteosarkomgeweben verglichen mit normalen menschlichen Knochengeweben. Zellen der menschlichen Osteosarkom-Zelllinien MG63 und HOS mit STK35-Knockdown zeigten eine signifikante Reduktion ihrer Proliferationsfähigkeit. STK35-Knockdown hemmte das MG63-Zellwachstum nach Injektion der Zellen in die Flanken von Mäusen. Behandlung von MG63- und HOS-Zellen mit STK35-shRNA verstärkte die Apoptose signifikant. STK35 shRNA-Behandlung von Zellen der menschlichen Osteosarkomzelllinie SaoS2 verursachte einen Anstieg der Expression von aktiver Caspase 3 und aktiver Caspase 7. Ein ChIP-Assay mit MG63-Zellen demonstrierte, dass STAT3 an den STK35-Promoter bindet. In MG63 und HOS-Zellen verminderte STAT3-Knockdown die Proteinlevel von STK35. STAT3-Knockdown beförderte die Zellapoptose von menschlichen SaoS2-Osteosarkom-Zellen, was teilweise aufgehoben wurde durch STK35-Überexpression.<sup>266</sup> HeLa-Zellen transfiziert mit STK35-siRNAs zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität verglichen mit Kontrollzellen. Nach Behandlung von HeLa-Zellen

mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das vermutlich Caspase-unabhängigen Zelltod induziert, wurde bei einer Chromatin-Immunpräzipitations(ChIP)-Analyse die Bindung von Importin  $\alpha$ 2 an die STK35-Promoterregion verzeichnet. In den behandelten Zellen war das STK35-Transkript signifikant erhöht. In zuvor mit STK35-siRNA transfizierten Zellen war die Anzahl von PI-positiven Zellen erhöht. Exposition von HeLa-Zellen mit Staurosporin (STS), einem Apoptose-induzierenden Reagenz, führte zu Herunterregulation von STK35-Transkripten.<sup>267</sup> Eine verminderte Expression von STK35 ist möglicherweise mit Apoptose assoziiert, während eine vermehrte Expression von STK35 mit dem nicht-apoptotischen Zelltod oder Resistenz assoziiert sein könnte. Ein Hefe-2-Hybrid-Screen mit einer menschlichen fetalen Leber-cDNA-Bibliothek mit LexA-STK35 identifizierte 37 Klone, von denen 36 CLP-36 repräsentierten.<sup>268</sup> CLP-36 (offizieller voller Name „PDZ and LIM domain 1“) spielt eine Rolle bei Glioblastomen.<sup>269,270</sup> Nach Coexpression von STK35 und CLP-36 in menschlichen U2OS-Osteosarkomzellen, die kein auffindbares endogenes CLP-36 exprimieren, wurde die Mehrheit von STK35 vom Zellkern ins Zytoplasma verlagert und kolokalisierte mit CLP-36 und wurde STK35 zu Aktin-Stressfasern verlagert und waren die Aktin-Filamentbündel partiell desorganisiert.<sup>268</sup> Aktin ist ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts.<sup>271</sup> Interaktionen zwischen Aktin und Mikrotubuli sind bekannt<sup>272</sup> (s. TPM2). In menschlichen Nabelvenen-Endothelzellen führte die Coexpression von EGFP-STK35 und mRFP-CLP36 nicht zu Translokation von STK35 ins Zytoplasma.<sup>273</sup> Aktin koimmunpräzipitierte mit EGFP-FLAG-STK35 von nukleären Extrakten von EGFP-FLAG-STK35-transfizierten HEK293-Zellen. STK35L1 wird benötigt für die endotheliale Zellmigration: In einem Wundheilungsversuch war die Migration von STK35L1-stillgelegten menschlichen endothelialen Zellen drastisch gehemmt: die Zellen waren nicht fähig, sich in Wundrichtung zu bewegen. In den STK35-stillgelegten Zellen konnte keine stabile Lamellipodienbildung in Migrationsrichtung beobachtet werden wie bei den Kontrollzellen, aber transiente Lamellipodienbildung in alle Richtungen. Während der endothelialen Zellmigration war STK35L1 im Nukleus lokalisiert. Endotheliale Zellen, die auf Matrigel kultiviert werden, migrieren auf der Matrix, aber proliferieren nicht, während sie auf Kollagen-beschichteten Oberflächen hauptsächlich proliferieren. Die Expression von STK35L1-Transkripten war dreifach erhöht innerhalb von 4

Stunden in endothelialen Zellen, die auf Matrigel wuchsen, statt auf Kollagen. Stilllegen von STK35L1 hemmte das endotheliale Zellsprossen, das benötigt wird für die Angiogenese.<sup>274</sup>

## 5.10 TOCA1

TOCA1 ist ein Synonym für FNBP1L, eine Abkürzung für „formin binding protein 1 like“.<sup>275</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Formin-binding protein 1-like“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 1 in der Region 1p22.1. Das menschliche Formin-binding protein 1-like hat 605 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 70 kDa.<sup>276</sup> FNBP1L ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und wird in vielen Organen/Geweben exprimiert, laut Human Protein Atlas am stärksten in den Skelettmuskelzellen, den Drüsenzellen von Gallenblase, Prostata, Samenblase, Eileiter und Endometrium und den Follikelzellen des Ovars.<sup>139,277</sup> Formin-binding protein 1-like hat eine F-BAR-Domäne. Die F-BAR-Domäne bindet die Phospholipid-Membran mit ihrer konkaven Oberfläche. Formin-binding protein 1-like spielt eine Rolle bei der Endozytose.<sup>278</sup> FNBP1L bindet an CDC42 (Rho-GTPase, s. o.) und WASL.<sup>275,279</sup> FNBP1L fördert die CDC42-induzierte Aktin-Polymerisation durch Aktivierung des N-WASP(WASL)-WAS/WASL-interacting-protein-family-member-1(WIP)-Komplexes.<sup>275,280</sup> Herunterregulation von TOCA1 in UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup>-Zellen führte bei der Vincristin-Konzentration 25 ng/ml zu einer deutlichen Abnahme der Viabilität gegen Vincristin im Vergleich zur non-target Kontrolle. Bei beiden Versuchsdurchgängen war die Viabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle durchgängig bei Vincristin-Zugabe vermindert, bei einem Versuchsdurchgang auch ohne Zugabe von Vincristin. WASL reguliert die Aktin-Polymerisation durch Stimulierung der Aktin-Keimbildungsaktivität des Arp2/3 Komplexes.<sup>281</sup> Knockdown von N-WASP in MDA-MB-231-Zellen (menschliche Zelllinie, Brustkrebs) führte zu einer verminderten Anzahl von invadierenden Zellen und Invadopodien (F-Aktin-basierten Membranvorwölbungen mit Extrazellulärer-Matrix-degradierender Aktivität) pro Zelle und einem verminderten Gelatine-Verlust.<sup>282,283</sup> CDC42 fördert die Filopodien-Bildung und reguliert die Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an Kinetochoren.<sup>284</sup> CDC42 wird in verschiedenen menschlichen Krebstypen überexprimiert.<sup>285</sup> Verminderung von CDC42 durch siRNAs in der menschlichen Neuroblastomzelllinie SHEP-21N

fürhte bei der Mehrheit der Zellen zum Zelltod. Nach Behandlung von SHEP-21N-Zellen mit N-myc-siRNAs kam es zu einem weniger stark reduzierten Zellwachstum. Ohne CDC42 war das Aktin in einem peripheren Membran-assoziierten Ring organisiert, nach Valentijn et al. darauf hinweisend, dass die Zellen unfähig waren, das Zytoskelett nach der Zellteilung zu rearrangieren. Bei Herunterregulation der N-myc-Expression in SHEP-21N-Zellen kam es zu einer Erhöhung des CDC42-Protein-Levels. Außerdem war im Northern Blot bei 10 Neuroblastomtumoren mit N-myc-Amplifikation im Vergleich zu 10 N-myc-Einzelkopietumoren die CDC42-Expression vermindert. Die Transfektion einer Wildtyp-CDC42flag-Konstruktion führte in SHEP-21N-Zellen nach Ausschaltung von N-myc zu neuronaler Differenzierung.<sup>286,287</sup> Die vielleicht auch in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen durch TOCA1-siRNAs ausgeschaltete Funktion von CDC42 erklärt möglicherweise auch das gegensätzliche Ergebnis bei Behandlung der Zellen mit RICS-siRNAs, die vielleicht zu einer Aktivierung von CDC42 führt (s. o.), das in UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen durch N-myc-Amplifikation vermindert und/oder teilweise inaktiviert worden sein könnte. Bei Lee et al. war bei Testung von 7 Tumorproben die Expression von CDC42 in undifferenzierten Neuroblastomen im Vergleich zu benignen Ganglioneuromen erhöht. Hemmung von CDC42 führte in den menschlichen Neuroblastomzelllinien BE(2)-C und BE(2)-M17, nicht aber in der menschlichen Neuroblastomzelllinie SK-N-AS zu einer verminderten Zellproliferation und Zellmigration und in BE(2)-C-Zellen zu erhöhter Apoptose und einer verminderten Koloniebildung (s. o.).<sup>195</sup> Verminderung von CDC42 führte in MDA-MB-231- and BT20-Zellen (menschliche Brustkrebszelllinien) zu gehemmter Zellproliferation und in MDA-MB-231-Zellen zu verminderter Zellmigration.<sup>288</sup>

## 5.11 TPM2

TPM2 ist eine Abkürzung für „tropomyosin 2“.<sup>289</sup> Das dazugehörige Protein heißt „Tropomyosin beta chain“. Das Gen liegt auf dem Chromosom 9 in der Region 9p13.3. Das menschliche Tropomyosin beta chain hat 284 Aminosäuren. Die Molekularmasse beträgt ca. 33 kDa.<sup>290</sup> Es gibt mehrere „Tropomyosin beta chain“-Isoformen.<sup>291</sup> Das Protein wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, am stärksten in Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur.<sup>292</sup> Es bindet an



Aktinfilamente und spielt eine Rolle bei Muskelkontraktion und Stabilisierung von Zytoskelett-Aktinfilamenten.<sup>293</sup> Bei der Transfektion von siRNAs gegen TPM2 in UKF-NB-2<sup>V</sup>CR<sup>20</sup>-Zellen kam es bei der Vincristin-Konzentration 25 ng/ml zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur non-target Kontrolle. Beide Versuchsdurchgänge zeigen durchgängig im Vergleich zur non-target-siRNA erniedrigte Zellviabilitäten, bei einem Versuchsdurchgang ist aber die Zellviabilität ohne Zugabe von Vincristin fast nicht erniedrigt. Interaktionen zwischen Aktin und Mikrotubuli sind bekannt.<sup>272</sup> Viele Autoren berichten von TPM2 als Tumorsuppressor.<sup>294,295</sup> Beispielsweise führte die Herunterregulation der TPM2-Expression in den menschlichen Brustkrebs-Zelllinien MCF7 und T47D zu verstärkter Zellmigration und -invasion. Bei Hypoxie kam es zu einer Hemmung der TPM2-Expression und verstärkter Zellmigration und -invasion. Behandlung mit dem demethylierenden Wirkstoff 5-Aza führte zu einer verstärkten Expression von TPM2.<sup>296</sup> Berichte über TPM2 als Onkogen sind selten. Laut Groth-Pedersen et al. führte die Herunterregulation von TPM2 durch siRNAs in MCF7-, HeLa- und U-2-OS-Zellen zu einer Wachstumshemmung und in MCF7-Zellen zu Undichtigkeit von Lysosomen, peripherer Lysosomenaggregation, einer Zunahme von Stressfasern und einer erhöhten Toxizität von Photooxidation und der Lysosomen-zerreißenden Medikamente Siramesin und Etoposid.<sup>297</sup> Vincristin induzierte starke lysosomale Veränderungen in HeLa- und MCF7-Zellen.<sup>298</sup> Auch in UKF-NB-2<sup>V</sup>CR<sup>20</sup>-Zellen könnte es durch Herunterregulation von TPM2 zu einer Störung der Lysosomen gekommen sein, die zum lysosomalen und nicht-apoptotischen Zelltod geführt haben könnte.<sup>297</sup> In den 3 menschlichen metastatischen Prostatakrebs-Zelllinien DU145, PC3, and LNCaP fanden Assinder et al. ca. 3-fach weniger TM1-Transkript (TPM2-Produkt) als in primären Kulturen von normalen menschlichen Prostata-Epithelzellen (PrEC). Stattdessen waren die Level einer neuen Transkriptvariante mit den mutmaßlichen Exonen 1-5, 6a, 6b 7, 8, und 10 mit einem vorzeitigen Stop-Codon in allen 3 Prostatakrebs-Zelllinien 2- bis 4-fach höher als in normalen menschlichen Prostata-Epithelzellen, die sich laut der Autoren von der Tm1-Transkriptvariante durch den Einschluss von Exon 6b unterscheidet. Weiterhin wurde im Western Blot in den Prostatakrebs-Zelllinien-Lysaten zusätzlich zu Tm1 (38 kDa) ein Tm311 (Antikörper erkennt einen Teil von

Exon 1a)-immunreaktives Protein mit einer Masse von ca. 25 kDa gefunden.<sup>299</sup>  
Wenn in UKF-NB-2'VCR<sup>20</sup>-Zellen diese Transkriptvariante vorkommt, könnte eine Herunterregulation zu vermindertem Zellwachstum geführt haben.

## 6 Zusammenfassung

Im EU-Projekt „Regulatory Control Networks of Synthetic Lethality“ (SYNLET) wurden durch Vergleich der Genexpressionsprofile auf Transkriptionsebene von parentalen sensitiven Neuroblastom-Zelllinien und ihren Vincristin-resistenten Sublinien bioinformatisch 40 Kandidatengene ermittelt, die für Vincristin-Resistenz und damit Zellüberleben essentiell sein könnten. Diese Kandidatengene wurden im Rahmen dieser Dissertation einzeln in Neuroblastomzellen der Vincristin-resistenten Sublinie UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup> herunterreguliert durch Transfektion (Elektroporation) von small interfering RNAs (siRNAs; knock down). Anschließend wurden die Zellen ohne und mit verschiedenen Vincristin-Konzentrationen auf Zellviabilitätsveränderungen getestet. Beim Kandidatengen mit den niedrigsten Zellviabilitäten (SMARCC1) wurde ein Western Blot gemacht, um die Herunterregulierung zu bestätigen. Zu Beginn wurde das effektivste Programm zur Elektroporation der UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen durch eine Transfektionsoptimierung ermittelt. Alle Kandidatengene wurden 2x transfiziert, bei unklaren oder besonders interessanten Ergebnissen auch 3x. Als positive Kontrolle wurde der ABC-Transporter MDR1 herunterreguliert, da hier die Auswirkungen auf die Resistenz gegen Vincristin bekannt sind. Bei 10 von 40 Kandidatengenen waren die Zellviabilitäten ohne Vincristin und/oder bei mindestens einer Vincristin-Konzentration extrem verändert (FOXJ1, MAP2K1, NFYB, RICS, SMARCA1, SMARCB1, SMARCC1, STK35, TOCA1 und TPM2). Das entspricht einem Prozentsatz von 25 % Kandidatengenen, bei denen die bioinformatisch vorhergesagte Wirkung *in vitro* bestätigt werden konnte. Allerdings sind bei diesen 10 effektiven Kandidatengenen auch 2 Gene dabei, nach deren Herunterregulierung es zu einer erhöhten Zellviabilität kam (FOXJ1 und RICS). Bei der Frage, welche Gene das Absterben der Tumorzellen beschleunigen und als ein mögliches Therapieziel in Frage kommen könnten, bleiben also 8 Kandidatengene (20 % aller Kandidatengene). Das interessanteste Kandidatengen ist SMARCC1, da die Herunterregulierung alleine (ohne Zugabe von Vincristin) zu einer massiven Abnahme der Zellviabilität führte. Damit stellt SMARCC1 ein interessantes Ziel zur Therapie in Tumorzellen dar.

## 7 Summary

In the EU project "Regulatory Control Networks of Synthetic Lethality" (SYNLET), by comparing the gene expression profiles at the transcription level of parental sensitive neuroblastoma cell lines and their vincristine-resistant sublines, 40 candidate genes were identified, which could be essential for vincristine resistance and thus cell survival. Within this dissertation, these candidate genes were individually down-regulated in neuroblastoma cells of the vincristine-resistant subline UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> by transfection (electroporation) of small interfering RNAs (siRNAs; knock down). Subsequently, the cells were tested for changes in cell viability without and with different vincristine concentrations. For the candidate gene with the lowest cell viability (SMARCC1) a Western blot was performed to confirm down regulation. Initially, the most effective electroporation program for UKF-NB-2<sup>VCR</sup><sup>20</sup> cells was determined by transfection optimization. All candidate genes were transfected twice, and 3x if the results were unclear or particularly interesting. The ABC transporter MDR1 was downregulated as a positive control, since the effects on resistance to vincristine are known here. For 10 of 40 candidate genes, cell viability was extremely changed without vincristine and/or for at least one vincristine concentration (FOXJ1, MAP2K1, NFYB, RICS, SMARCA1, SMARCB1, SMARCC1, STK35, TOCA1 and TPM2). This corresponds to a percentage of 25 % candidate genes for which the bioinformatically predicted effect could be confirmed *in vitro*. However, with these 10 effective candidate genes, there are also 2 genes whose downregulation led to increased cell viability (FOXJ1 and RICS). When asked which genes accelerate the death of the tumor cells and could be considered as a possible therapy target, there remain 8 candidate genes (20 % of all candidate genes). The most interesting candidate gene is SMARCC1, because downregulation alone (without the addition of vincristine) led to a massive decrease in cell viability. This makes SMARCC1 an interesting target for therapy in tumor cells.

## 8 Literaturverzeichnis

1. *RNA interference (RNAi): by Nature Video*. Basingstoke: Macmillan Publishers; 2011. [https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1\\_ELE](https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1_ELE). Accessed August 27, 2015.
2. Pschyrembel W. *Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch*. 261., neu bearb. und erw. Aufl. Berlin: W. de Gruyter; 2007.
3. Yiallourous M, Tallen G. Krankheitsbild: Was ist ein Neuroblastom? [http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere\\_solide\\_tumoren/pohn\\_euroblpatinfo120120611/allgemeine\\_informationen/krankheitsbild/index\\_ger.html](http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohn_euroblpatinfo120120611/allgemeine_informationen/krankheitsbild/index_ger.html). Updated June 30, 2014. Accessed January 23, 2015.
4. Sadler TW, Langman J. *Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. 10., korrigierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003.
5. Deutsches Kinderkrebsregister. *Jahresbericht / Annual Report 2013/14*. Mainz; 2014. [http://www.kinderkrebsregister.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2013\\_2014/jb2014\\_s.pdf](http://www.kinderkrebsregister.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2013_2014/jb2014_s.pdf). Accessed January 26, 2015.
6. American Cancer Society. What is neuroblastoma? <http://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/detailedguide/neuroblastoma-what-is-neuroblastoma>. Updated January 6, 2015. Accessed January 26, 2015.
7. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006.
8. American Cancer Society. What are the key statistics about neuroblastoma? <http://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/detailedguide/neuroblastoma-key-statistics>. Updated January 5, 2015. Accessed January 26, 2015.
9. Yiallourous M. Häufigkeit: Wie oft kommt ein Neuroblastom vor? [http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere\\_solide\\_tumoren/pohn\\_euroblpatinfo120120611/allgemeine\\_informationen/haeufigkeit/index\\_ger.html](http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohn_euroblpatinfo120120611/allgemeine_informationen/haeufigkeit/index_ger.html). Updated June 25, 2014. Accessed April 26, 2016.
10. Yiallourous M, Tallen G. Ursachen: Wie entsteht ein Neuroblastom? [http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere\\_solide\\_tumoren/pohn](http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohn)

- euroblpatinfo120120611/allgemeine\_informationen/ursachen/index\_ger.html. Updated January 5, 2015. Accessed January 27, 2015.
11. American Cancer Society. What are the risk factors for neuroblastoma? <http://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/detailedguide/neuroblastoma-risk-factors>. Updated January 6, 2015. Accessed January 27, 2015.
  12. Heck JE, Ritz B, Hung RJ, Hashibe M, Boffetta P. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009;23(2):125-143. doi:10.1111/j.1365-3016.2008.00983.x.
  13. Hiddemann W, Bartram CR. *Die Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
  14. Yiallourous M. Einteilung des Neuroblastoms nach Krankheitsstadien. [http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere\\_solide\\_tumoren/pohn\\_euroblpatinfo120120611/diagnostik\\_und\\_therapieplanung/therapieplanung/krankheitsstadien/index\\_ger.html](http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohn_euroblpatinfo120120611/diagnostik_und_therapieplanung/therapieplanung/krankheitsstadien/index_ger.html). Updated July 1, 2014. Accessed April 11, 2015.
  15. National Cancer Institute. Neuroblastoma Treatment—for health professionals (PDQ®): General Information About Neuroblastoma. <http://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq>. Updated July 9, 2015. Accessed July 9, 2015.
  16. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol.* 1993;11(8):1466-1477.
  17. Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, et al. Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology.* 2011;261(1):243-257. doi:10.1148/radiol.11101352.
  18. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(2):298-303. doi:10.1200/JCO.2008.16.6876.
  19. Cheung N-KV, Cohn SL. *Neuroblastoma*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005.

20. Rasmussen A, Muñiz AE, King B. Neuroblastoma causing acute urinary retention: a rare presentation. *J Emerg Med.* 2010;39(5):602-606. doi:10.1016/j.jemermed.2009.04.053.
21. Simon T. Neuroblastom. *Urologe A.* 2005;44(5):543. doi:10.1007/s00120-005-0821-9.
22. Smith SJ, Diehl NN, Smith BD, Mohny BG. Incidence, ocular manifestations, and survival in children with neuroblastoma: a population-based study. *Am. J. Ophthalmol.* 2010;149(4):677. doi:10.1016/j.ajo.2009.11.027.
23. Ahmed S, Goel S, Khandwala M, Agrawal A, Chang B, Simmons IG. Neuroblastoma with orbital metastasis: ophthalmic presentation and role of ophthalmologists. *Eye (Lond).* 2006;20(4):466-470. doi:10.1038/sj.eye.6701912.
24. Pochedly C. *Neuroblastoma: Tumor biology and therapy.* Boca Raton, Fla.: CRC Press; 1990.
25. Moukheiber AK, Nicollas R, Roman S, Coze C, Triglia JM. Primary pediatric neuroblastic tumors of the neck. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2001;60(2):155-161.
26. De Bernardi B, Pianca C, Pistamiglio P, et al. Neuroblastoma with symptomatic spinal cord compression at diagnosis: treatment and results with 76 cases. *J. Clin. Oncol.* 2001;19(1):183-190.
27. Bourdeaut F, Carli E de, Timsit S, et al. VIP hypersecretion as primary or secondary syndrome in neuroblastoma: A retrospective study by the Société Française des Cancers de l'Enfant (SFCE). *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(5):585-590. doi:10.1002/pbc.21912.
28. Haase GM, O'Leary MC, Stram DO, et al. Pelvic neuroblastoma--implications for a new favorable subgroup: a Children's Cancer Group experience. *Ann. Surg. Oncol.* 1995;2(6):516-523.
29. Esiashvili N, Anderson C, Katzenstein HM. Neuroblastoma. *Curr Probl Cancer.* 2009;33(6):333-360. doi:10.1016/j.currproblcancer.2009.12.001.
30. American Cancer Society. Signs and symptoms of neuroblastoma. <http://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/detailedguide/neuroblastoma-signs-and-symptoms>. Updated March 10, 2015. Accessed March 27, 2015.

31. Matthay KK, Brisse H, Couanet D, et al. Central nervous system metastases in neuroblastoma: radiologic, clinical, and biologic features in 23 patients. *Cancer*. 2003;98(1):155-165. doi:10.1002/cncr.11448.
32. Etuř V, Kurtkaya O, Sav A, Ilbay K, Ceylan S. Primary cerebral neuroblastoma: a case report and review. *Tohoku J. Exp. Med*. 2002;197(1):55-65.
33. Abramson SJ, Berdon WE, Ruzal-Shapiro C, Stolar C, Garvin J. Cervical neuroblastoma in eleven infants--a tumor with favorable prognosis. Clinical and radiologic (US, CT, MRI) findings. *Pediatr Radiol*. 1993;23(4):253-257.
34. Schiebler TH, Korf H-W. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 111 Tabellen. 10., vollst. überarb. Aufl. Darmstadt: Steinkopff; 2007.
35. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999;86(2):349-363.
36. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999;86(2):364-372.
37. Peuchmaur M, d'Amore, Emanuele S G, Joshi VV, et al. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2003;98(10):2274-2281. doi:10.1002/cncr.11773.
38. Yiallourous M. Einteilung des Neuroblastoms nach feingeweblichen Eigenschaften.  
[http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere\\_solide\\_tumoren/pohn\\_euroblpatinfo120120611/diagnostik\\_und\\_therapieplanung/therapieplanung\\_feingewebliche\\_merkmale/index\\_ger.html](http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohn_euroblpatinfo120120611/diagnostik_und_therapieplanung/therapieplanung_feingewebliche_merkmale/index_ger.html). Updated June 30, 2014. Accessed May 8, 2015.
39. Hughes M, Marsden HB, Palmer MK. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer*. 1974;34(5):1706-1711.



40. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. *NB2004 Trial Protocol*. [for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma]. Köln; 2004.  
[http://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studien\\_in\\_der\\_gpoh/poh\\_kinderkrebsinfotherapiestudien/nb2004/index\\_ger.html](http://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studien_in_der_gpoh/poh_kinderkrebsinfotherapiestudien/nb2004/index_ger.html). Accessed July 21, 2015.
41. Cohn SL, Pearson, Andrew D J, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(2):289-297. doi:10.1200/JCO.2008.16.6785.
42. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Home - Gene - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Accessed October 12, 2015.
43. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature*. 1984;308(5956):288-291.
44. Spitz R, Hero B, Simon T, Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2006;12(11 Pt 1):3368-3373. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2495.
45. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br. J. Cancer*. 2009;100(9):1471-1482. doi:10.1038/sj.bjc.6605014.
46. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer*. 2003;3(3):203-216. doi:10.1038/nrc1014.
47. Simon T. Handlungsempfehlung nach der Leitlinie „Neuroblastom“. *Monatsschr Kinderheilkd.* 2014;162(3):257-258. doi:10.1007/s00112-013-3047-8.
48. Yiallourous M. Welche aktuellen Therapieoptimierungsstudien gibt es für das Neuroblastom?  
[http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere\\_solide\\_tumoren/pohn\\_euroblpatinfo120120611/therapie/therapieoptimierungsstudien/aktuelle\\_th](http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohn_euroblpatinfo120120611/therapie/therapieoptimierungsstudien/aktuelle_th)

- erapiestudien/index\_ger.html. Updated June 30, 2014. Accessed August 5, 2015.
49. kinderblutkrankheiten.de. Blut- und Gerinnungserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen. <http://www.kinderblutkrankheiten.de/content/>. Updated March 22, 2016. Accessed March 26, 2016.
  50. Dobke J. RIST-rNB 2011. [http://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/phase\\_i\\_ii\\_studien\\_\\_pharmastudien/rist\\_rnb/index\\_ger.html](http://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/phase_i_ii_studien__pharmastudien/rist_rnb/index_ger.html). Updated March 6, 2014. Accessed March 26, 2016.
  51. National Cancer Institute. NCI Dictionary of Cancer Terms. <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?expand=E>. Accessed March 26, 2016.
  52. Bibliographisches Institut. Zelllinie. <http://www.duden.de/rechtschreibung/Zelllinie>. Updated August 7, 2015. Accessed August 7, 2015.
  53. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. 9., vollst. neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2008.
  54. Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2009 ; [für Studium und Praxis ; Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2008, Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften, umfassende Dosierungen]. 17. Aufl. Pulheim: [Selbstverl.]; 2009.
  55. Drews J. *Grundlagen der Chemotherapie*. Vienna: Springer Vienna; 1979.
  56. Urban und Fischer, Muenchen, <http://www.urbanfischer.de>. Roche Lexikon Medizin (5. Aufl.). <https://www.tk.de/rochelexikon/>. Updated December 8, 2010. Accessed September 29, 2015.
  57. Holohan C, van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer*. 2013;13(10):714-726. doi:10.1038/nrc3599.

58. Yu DMT, Huynh T, Truong AM, Haber M, Norris MD. ABC transporters and neuroblastoma. *Adv Cancer Res.* 2015;125:139-170. doi:10.1016/bs.acr.2014.10.005.
59. Fechete R, Barth S, Olender T, et al. Synthetic lethal hubs associated with vincristine resistant neuroblastoma. *Mol Biosyst.* 2011;7(1):200-214. doi:10.1039/c0mb00082e.
60. Cinatl J, Mainke M, Weissflog A, et al. Aphidicolin selectively kills neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett.* 1992;67(2-3):199-206.
61. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer.* 1971;27(2):374-378.
62. Kotchetkov R, Cinatl J, Blaheta R, et al. Development of resistance to vincristine and doxorubicin in neuroblastoma alters malignant properties and induces additional karyotype changes: a preclinical model. *Int J Cancer.* 2003;104(1):36-43. doi:10.1002/ijc.10917.
63. Silenseed LTD. RNA Interference. [http://silenseed.com/?page\\_id=2422](http://silenseed.com/?page_id=2422). Accessed March 2, 2016.
64. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: Short rnas that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(6):457-467. doi:10.1038/nrm1129.
65. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4(9):e252. doi:10.1038/mtna.2015.23.
66. Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science.* 1997;278(5340):1064-1068. doi:10.1126/science.278.5340.1064.
67. Kamb A. Mutation load, functional overlap, and synthetic lethality in the evolution and treatment of cancer. *J Theor Biol.* 2003;223(2):205-213. doi:10.1016/s0022-5193(03)00087-0.
68. Molenaar JJ, Ebus ME, Geerts D, et al. Inactivation of CDK2 is synthetically lethal to MYCN over-expressing cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):12968-12973. doi:10.1073/pnas.0901418106.

69. Schmitz S, ed. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011. Experimentator.
70. Biochrom. Zusammensetzung definierter Zellkulturmedien und Medienempfehlung für verschiedene Zelllinien (Auswahl). [http://www.google.de/url?url=http://www.biochrom.de/fileadmin/user\\_upload/service/Tipps\\_und\\_Hinweise/deutsch/090515\\_hintergrundinformation\\_medien.pdf&rct=j&q=&esrc=s&sa=U&ved=0CBQQFjAAahUKEwi2pJTcp\\_vHAhUBchQKHZBcDcU&usg=AFQjCNG85sddpj\\_-nC-HJxWz\\_1GUXexxwQ](http://www.google.de/url?url=http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/Tipps_und_Hinweise/deutsch/090515_hintergrundinformation_medien.pdf&rct=j&q=&esrc=s&sa=U&ved=0CBQQFjAAahUKEwi2pJTcp_vHAhUBchQKHZBcDcU&usg=AFQjCNG85sddpj_-nC-HJxWz_1GUXexxwQ). Updated May 15, 2009. Accessed September 16, 2015.
71. An Introduction to Transfection | Protocol (Translated to German). *J Vis Exp*. <http://www.jove.com/science-education/5068/eine-einfhrung-in-die-transfektion?language=German>. Accessed August 31, 2015.
72. Thermo Fisher Scientific. *Electroporation*. <http://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html>. Accessed September 22, 2015.
73. Friedrich, Uwe. *Elektroporation von Säugerzellen: technische Entwicklungen und Applikationen*. [Dissertation]. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2000. <https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/frontdoor/index/index/docId/87>. Accessed September 1, 2015.
74. Schnabel P. Kondensatoren. <http://www.elektronik-kompendium.de/sites/bau/0205141.htm>. Accessed September 1, 2015.
75. Becton, Dickinson and Company. *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*; 2006. <http://health.usf.edu/NR/rdonlyres/E9C6F213-BF6C-4AA4-9A72-0B2612BA1412/27228/CantoManual.pdf>. Accessed September 1, 2015.
76. Sigma-Aldrich. Propidium iodide  $\geq 94.0\%$  (HPLC) | Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4170?lang=de&region=DE>. Accessed September 1, 2015.
77. UniProt Consortium. UniProt. <http://www.uniprot.org/>. Accessed October 12, 2015.

78. Doenecke D, Karlson P. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie: [Faltna mit Stoffwechselübersicht]*. 15., komplett überarb. und neugestaltete Aufl. Stuttgart: Thieme; 2005.
79. European Molecular Biology Laboratory. SMART: Main page. <http://smart.embl-heidelberg.de/>. Accessed March 21, 2016.
80. Lennarz WJ, Lane MD. *Encyclopedia of Biological Chemistry, e-only*. 2nd ed. Burlington: Elsevier Science; 2013. <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10651026>.
81. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114(8):785-796. doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006.
82. Hallbach J. *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg: 175 Tabellen*. 2., überarb. Aufl. Stuttgart U.a.: Thieme; 2006.
83. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum; 2014. Experimentator. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>.
84. Bio-Rad Laboratories. *DC Protein Assay Instruction Manual*. [www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf). Accessed September 8, 2015.
85. Institut für Analytische Chemie, Universität Wien. *Photometrie: Quantitative Bestimmung eines Proteingehaltes mittels UV Absorptionsmessung*. Wien; 2010. [https://anchem.univie.ac.at/fileadmin/user\\_upload/anchem/ACUEMB/AC\\_MB-SKR-C3-UV-SS10.pdf](https://anchem.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/anchem/ACUEMB/AC_MB-SKR-C3-UV-SS10.pdf). Accessed September 8, 2015.
86. Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie: Mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*. 8., vollst. neu bearb. Aufl. Heidelberg: Springer; 2007. Springer-Lehrbuch.
87. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 6th ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. Experimentator. Accessed September 10, 2015.

88. Krüger M. Protein-Gelelektrophorese. <http://www.biozeugs.de/downloads.htm>. Accessed September 14, 2015.
89. American Electrophoresis Society. Gel Electrophoresis of Proteins. [http://www.aesociety.org/areas/one\\_de.php](http://www.aesociety.org/areas/one_de.php). Accessed September 15, 2015.
90. Müller-Esterl W. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 1. Aufl. München, Heidelberg: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl; 2004.
91. Löschmann N. Untersuchung des CDK2, 7 und 9 Inhibitors SNS-032 in chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen. [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2014.
92. Goretzki G. *Medizinische Strahlenkunde: Physikalisch-technische Grundlagen ; mit 29 Tabellen*. 2., völlig überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer; 2004. MTA-R-Ausbildung.
93. Laubenberger T, Laubenberger J. Technik der medizinischen Radiologie: Diagnostik, Strahlentherapie, Strahlenschutz ; für Ärzte, Medizinstudenten und MTRA ; [mit 71 Tabellen]. 7., überarb. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl; 1999.
94. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54(7):709-735. doi:10.1007/s40262-015-0267-1.
95. Michaelis M, Rothweiler F, Loschmann N, Sharifi M, Ghafourian T, Cinatl J, JR. Enzastaurin inhibits ABCB1-mediated drug efflux independently of effects on protein kinase C signalling and the cellular p53 status. *Oncotarget*. 2015;6(19):17605-17620. doi:10.18632/oncotarget.2889.
96. Deutsches Kinderkrebsregister. *Jahresbericht / Annual Report 2015*. Mainz; 2015. [http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure\\_downloads/22605/0/f474d594c6b5a8805c4e629db249872e05d69ddb/jb2015\\_s.pdf](http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/22605/0/f474d594c6b5a8805c4e629db249872e05d69ddb/jb2015_s.pdf). Accessed May 10, 2016.
97. Fuchs J. *Solide Tumoren im Kindesalter: Grundlagen ; Diagnostik ; Therapie ; Inkl. DVD mit mehr als 15 Tumoroperationen*. 1. Aufl. s.l.: Schattauer GmbH Verlag für Medizin und Naturwissenschaften; 2012.

Onkologie.

[http://www.content-select.com/index.php?id=bib\\_view&ean=9783794580859](http://www.content-select.com/index.php?id=bib_view&ean=9783794580859).

98. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(15):1572-1582. doi:10.1056/NEJMsa060185.
99. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. ABCB1 ATP binding cassette subfamily B member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5243>. Accessed May 28, 2018.
100. Weizmann Institute of Science. ABCB1 Gene - GeneCards | MDR1 Protein | MDR1 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB1>. Accessed May 28, 2018.
101. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1179-1236. doi:10.1152/physrev.00037.2005.
102. Binkhathlan Z, Lavasanifar A. P-glycoprotein Inhibition as a Therapeutic Approach for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Current Status and Future Perspectives. *CCDT*. 2013;13(3):326-346. doi:10.2174/15680096113139990076.
103. Pokharel D, Roseblade A, Oenarto V, Lu JF, Bebawy M. Proteins regulating the intercellular transfer and function of P-glycoprotein in multidrug-resistant cancer. *ecancer*. 2017;11. doi:10.3332/ecancer.2017.768.
104. Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*. 2015;149:1-123. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.013.
105. Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An Update on Overcoming MDR1-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *CPD*. 2006;12(3):273-286. doi:10.2174/138161206775201965.
106. Efferth T, Volm M. Multiple resistance to carcinogens and xenobiotics: P-glycoproteins as universal detoxifiers. *Arch Toxicol*. 2017;91(7):2515-2538. doi:10.1007/s00204-017-1938-5.

107. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;56:85. doi:10.1038/s41568-018-0005-8.
108. Cremoux P de, Jourdan-Da-Silva N, Couturier J, et al. Role of chemotherapy resistance genes in outcome of neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(3):311-317. doi:10.1002/pbc.20853.
109. Kurowski C, Berthold F. Presence of classical multidrug resistance and P-glycoprotein expression in human neuroblastoma cells. *Ann Oncol*. 1998;9(9):1009-1014.
110. Chan HS, Haddad G, Thorner PS, et al. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1991;325(23):1608-1614. doi:10.1056/NEJM199112053252304.
111. Bedrnicek J, Vicha A, Jarosova M, et al. Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. *Neoplasma*. 2005;52(5):415-419.
112. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. FOXJ1 forkhead box J1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/2302>. Accessed July 3, 2018.
113. Weizmann Institute of Science. FOXJ1 Gene - GeneCards | FOXJ1 Protein | FOXJ1 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXJ1>. Accessed July 3, 2018.
114. Myatt SS, Lam EW-F. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2007;7(11):847-859. doi:10.1038/nrc2223.
115. Murphy DB, Seemann S, Wiese S, Kirschner R, Grzeschik KH, Thies U. The human hepatocyte nuclear factor 3/fork head gene FKHL13: genomic structure and pattern of expression. *Genomics*. 1997;40(3):462-469. doi:10.1006/geno.1996.4587.
116. Abedalthagafi MS, Wu MP, Merrill PH, et al. Decreased FOXJ1 expression and its ciliogenesis programme in aggressive ependymoma and choroid plexus tumours. *J Pathol*. 2016;238(4):584-597. doi:10.1002/path.4682.
117. Hackett BP, Brody SL, Liang M, Zeitz ID, Bruns LA, Gitlin JD. Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and



- characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(10):4249-4253.
118. Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song SK, Shapiro SD. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23(1):45-51. doi:10.1165/ajrcmb.23.1.4070.
  119. Didon L, Zwick RK, Chao IW, et al. RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir Res*. 2013;14:70. doi:10.1186/1465-9921-14-70.
  120. Yaghi A, Dolovich MB. Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease. *Cells*. 2016;5(4). doi:10.3390/cells5040040.
  121. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol*. 2017;241(2):294-309. doi:10.1002/path.4843.
  122. Plattner H, Hentschel J. *Zellbiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011.
  123. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
  124. Christen P, Jaussi R, Benoit R. *Biochemie und Molekularbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
  125. Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Habedanck R, Stierhof Y-D, Nigg EA. Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell*. 2007;13(2):190-202. doi:10.1016/j.devcel.2007.07.002.
  126. Wong C, Stearns T. Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication. *Nat Cell Biol*. 2003;5(6):539-544. doi:10.1038/ncb993.
  127. Bettencourt-Dias M, Hildebrandt F, Pellman D, Woods G, Godinho SA. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet*. 2011;27(8):307-315. doi:10.1016/j.tig.2011.05.004.
  128. Lackie JM. *The Dictionary of Cell & Molecular Biology*. 5th ed. Burlington: Elsevier Science; 2012. <http://gbv.eblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1106490>.

129. Christen P, Jaussi R. *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005. Springer-Lehrbuch. <http://dx.doi.org/10.1007/b137457>.
130. Murata S-I, Warigaya K, Matsuzaki I, Itonaga M, Shimizu Y, Shuto M. Microtubule-organizing center-mediated nuclear polarity in various normal and neoplastic human tissues. *Virchows Arch*. 2015;466(6):625-635. doi:10.1007/s00428-015-1744-5.
131. Hagiwara H, Ohwada N, Aoki T, Suzuki T, Takata K. The primary cilia of secretory cells in the human oviduct mucosa. *Med Mol Morphol*. 2008;41(4):193-198. doi:10.1007/s00795-008-0421-z.
132. Bornens M. The centrosome in cells and organisms. *Science*. 2012;335(6067):422-426. doi:10.1126/science.1209037.
133. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(4):222-234. doi:10.1038/nrm3085.
134. Li R, Huang J, Ma M, et al. Two-stage induced differentiation of OCT4+/Nanog+ stem-like cells in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(42):68360-68370. doi:10.18632/oncotarget.11721.
135. Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisen J. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res*. 1999;253(2):733-736. doi:10.1006/excr.1999.4678.
136. Jacquet BV, Salinas-Mondragon R, Liang H, et al. FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*. 2009;136(23):4021-4031. doi:10.1242/dev.041129.
137. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. MAP2K1 mitogen-activated protein kinase kinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/5604>. Accessed July 3, 2018.
138. Weizmann Institute of Science. MAP2K1 Gene - GeneCards | MP2K1 Protein | MP2K1 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAP2K1>. Accessed July 3, 2018.

139. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. doi:10.1126/science.1260419.
140. The Human Protein Atlas. Tissue expression of MAP2K1 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169032-MAP2K1/tissue>. Accessed December 19, 2018.
141. Pearson G. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*. 2001;22(2):153-183. doi:10.1210/er.22.2.153.
142. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. MAP2K1 mitogen-activated protein kinase kinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/5604>. Accessed December 19, 2018.
143. Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat. Rev. Cancer*. 2015;15(10):577-592. doi:10.1038/nrc4000.
144. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH. Ras-Proteine. <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/ras-proteine/5294>. Accessed December 13, 2018.
145. Papke B, Der CJ. Drugging RAS: Know the enemy. *Science*. 2017;355(6330):1158-1163. doi:10.1126/science.aam7622.
146. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(11):828-851. doi:10.1038/nrd4389.
147. Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(7):385-400. doi:10.1038/nrclinonc.2014.83.
148. Eleveld TF, Oldridge DA, Bernard V, et al. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet*. 2015;47(8):864-871. doi:10.1038/ng.3333.
149. Cheng Y, Tian H. Current Development Status of MEK Inhibitors. *Molecules*. 2017;22(10). doi:10.3390/molecules22101551.

150. Rote Liste® Service GmbH. Rote Liste. <https://online.rote-liste.de/suche/praep/26404/Mekinist%C2%AE%200%2C5%20mg%2F-2%20mg%20Filmtabletten>. Accessed January 11, 2019.
151. Rote Liste® Service GmbH. Rote Liste. <https://online.rote-liste.de/suche/praep/26421/Cotellic%C2%AE%2020%20mg%20Filmtabletten>. Accessed January 11, 2019.
152. World Health Organization. ICTRP Search Portal. <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=NCT02639546>. Accessed January 11, 2019.
153. World Health Organization. ICTRP Search Portal. <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=NCT02124772>. Accessed January 14, 2019.
154. World Health Organization. ICTRP Search Portal. <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=NCT03190915>. Accessed January 14, 2019.
155. World Health Organization. ICTRP Search Portal. <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=NCT03363217>. Accessed January 14, 2019.
156. World Health Organization. ICTRP Search Portal. <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=NCT03155620>. Accessed January 14, 2019.
157. World Health Organization. ICTRP Search Portal. <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=NCT03213691>. Accessed January 14, 2019.
158. Banerjee A, Jakacki RI, Onar-Thomas A, et al. A phase I trial of the MEK inhibitor selumetinib (AZD6244) in pediatric patients with recurrent or refractory low-grade glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC) study. *Neuro Oncol.* 2017;19(8):1135-1144. doi:10.1093/neuonc/now282.
159. Dombi E, Baldwin A, Marcus LJ, et al. Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1-Related Plexiform Neurofibromas. *N Engl J Med.* 2016;375(26):2550-2560. doi:10.1056/NEJMoa1605943.
160. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. NFYB nuclear transcription factor Y subunit beta [Homo sapiens

- (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/4801>. Accessed July 3, 2018.
161. Weizmann Institute of Science. NFYB Gene - GeneCards | NFYB Protein | NFYB Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFYB>. Accessed July 3, 2018.
162. The Human Protein Atlas. Cell atlas - NFYB - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120837-NFYB/cell>. Accessed January 24, 2019.
163. UniProt Consortium. NFYB - Nuclear transcription factor Y subunit beta - Homo sapiens (Human) - NFYB gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P25208>. Updated January 16, 2019. Accessed January 27, 2019.
164. Dolfini D, Mantovani R. Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y? *Cell Death Differ.* 2013;20(5):676-685. doi:10.1038/cdd.2013.13.
165. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Barrette TR, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Mining for regulatory programs in the cancer transcriptome. *Nat Genet.* 2005;37(6):579-583. doi:10.1038/ng1578.
166. Sinha S, Adler AS, Field Y, Chang HY, Segal E. Systematic functional characterization of cis-regulatory motifs in human core promoters. *Genome Res.* 2008;18(3):477-488. doi:10.1101/gr.6828808.
167. Fang Z, Gong C, Yu S, et al. NFYB-induced high expression of E2F1 contributes to oxaliplatin resistance in colorectal cancer via the enhancement of CHK1 signaling. *Cancer Lett.* 2018;415:58-72. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.040.
168. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Cellosaurus cell line K-562 (CVCL\_0004). [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0004](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0004). Accessed October 21, 2019.
169. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Cellosaurus cell line HeLa S3 (CVCL\_0058). [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0058](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0058). Accessed October 21, 2019.
170. National Human Genome Research Institute. Encode Project Common Cell Types. <https://www.genome.gov/encode-project-common-cell-types>. Updated October 20, 2019. Accessed October 21, 2019.

171. Goldsmith ME, Madden MJ, Morrow CS, Cowan KH. A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *J Biol Chem.* 1993;268(8):5856-5860.
172. Hu Z, Jin S, Scotto KW. Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2979-2985. doi:10.1074/jbc.275.4.2979.
173. Jin S, Scotto KW. Transcriptional Regulation of the MDR1 Gene by Histone Acetyltransferase and Deacetylase Is Mediated by NF-Y. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(7):4377-4384. doi:10.1128/MCB.18.7.4377.
174. Xu Y, Jiang Z, Yin P, Li Q, Liu J. Role for Class I histone deacetylases in multidrug resistance. *Exp Cell Res.* 2012;318(3):177-186. doi:10.1016/j.yexcr.2011.11.010.
175. U.S. National Institutes of Health. Pediatric Precision Laboratory Advanced Neuroblastoma Therapy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02559778?term=Histone+Deacetylase+Inhibitors&cond=Neuroblastoma&rank=1>. Accessed October 18, 2019.
176. U.S. National Institutes of Health. 131I-MIBG Alone VS. 131I-MIBG With Vincristine and Irinotecan VS131I-MIBG With Vorinostat - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02035137?term=Histone+Deacetylase+Inhibitors&cond=Neuroblastoma&rank=5>. Accessed October 18, 2019.
177. Richon VM, Garcia-Vargas J, Hardwick JS. Development of vorinostat: current applications and future perspectives for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2009;280(2):201-210. doi:10.1016/j.canlet.2009.01.002.
178. Benatti P, Basile V, Merico D, Fantoni LI, Tagliafico E, Imbriano C. A balance between NF-Y and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(5):1415-1428. doi:10.1093/nar/gkm1046.
179. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH. p53-Protein. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/p53-protein/53394>. Updated September 4, 2018. Accessed February 1, 2019.

180. Benatti P, Dolfini D, Viganò A, Ravo M, Weisz A, Imbriano C. Specific inhibition of NF-Y subunits triggers different cell proliferation defects. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(13):5356-5368. doi:10.1093/nar/gkr128.
181. Sharina IG, Martin E, Thomas A, Uray KL, Murad F. CCAAT-binding factor regulates expression of the beta1 subunit of soluble guanylyl cyclase gene in the BE2 human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11523-11528. doi:10.1073/pnas.1934338100.
182. Ciani E, Guidi S, Della Valle G, Perini G, Bartesaghi R, Contestabile A. Nitric oxide protects neuroblastoma cells from apoptosis induced by serum deprivation through cAMP-response element-binding protein (CREB) activation. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49896-49902. doi:10.1074/jbc.M206177200.
183. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. ARHGAP32 Rho GTPase activating protein 32 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/9743>. Accessed July 3, 2018.
184. Weizmann Institute of Science. ARHGAP32 Gene - GeneCards | RHG32 Protein | RHG32 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARHGAP32>. Accessed July 3, 2018.
185. Hayashi T, Okabe T, Nasu-Nishimura Y, et al. PX-RICS, a novel splicing variant of RICS, is a main isoform expressed during neural development. *Genes Cells.* 2007;12(8):929-939. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01101.x.
186. The Human Protein Atlas. Tissue expression of ARHGAP32 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134909-ARHGAP32/tissue>. Accessed February 12, 2019.
187. Nakamura T, Komiya M, Sone K, et al. Grit, a GTPase-Activating Protein for the Rho Family, Regulates Neurite Extension through Association with the TrkA Receptor and N-Shc and CrkL/Crk Adapter Molecules. *Mol Cell Biol.* 2002;22(24):8721-8734. doi:10.1128/MCB.22.24.8721-8734.2002.
188. Moon S. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology.* 2003;13(1):13-22. doi:10.1016/S0962-8924(02)00004-1.
189. Jaffe A, Hall A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology.

190. TyersLab.com. Grit, a GTPase-activating protein for the Rho family, regulates neurite extension through association with the TrkA receptor and N-Shc and CrkL/Crk adapter molecules. | BioGRID. <https://thebiogrid.org/5722/publication/grit-a-gtpase-activating-protein-for-the-rho-family-regulates-neurite-extension-through-association-with-the-trka-receptor-and-n-shc-and-crklcrk-adapter-molecules.html>. Accessed February 20, 2019.
191. UniProt Consortium. ARHGAP32 - Rho GTPase-activating protein 32 - Homo sapiens (Human) - ARHGAP32 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/A7KAX9#interaction>. Updated February 13, 2019. Accessed February 20, 2019.
192. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. RHOA ras homolog family member A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/387>. Accessed February 28, 2019.
193. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. CDC42 cell division cycle 42 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/998>. Accessed February 28, 2019.
194. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. RAC1 Rac family small GTPase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5879>. Accessed February 28, 2019.
195. Lee S, Craig BT, Romain CV, Qiao J, Chung DH. Silencing of CDC42 inhibits neuroblastoma cell proliferation and transformation. *Cancer Lett.* 2014;355(2):210-216. doi:10.1016/j.canlet.2014.08.033.
196. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. RHOA ras homolog family member A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/387>. Accessed March 8, 2019.
197. Pola S, Cattaneo MG, Vicentini LM. Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells: involvement of Rac and



- MAP kinase activity. *J Biol Chem.* 2003;278(42):40601-40606. doi:10.1074/jbc.M306510200.
198. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 1992;70(3):401-410.
199. EMBL-EBI. QuickGO:Term GO:0001726. <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0001726>. Updated November 28, 2018. Accessed February 25, 2019.
200. TyersLab.com. ARHGAP32 Result Summary | BioGRID. <https://thebiogrid.org/115091>. Accessed February 25, 2019.
201. Dingerdissen HM, Torcivia-Rodriguez J, Hu Y, Chang T-C, Mazumder R, Kahsay R. BioMuta and BioXpress: mutation and expression knowledgebases for cancer biomarker discovery. *Nucleic Acids Res.* 2017;46(Database issue):D1128-36. doi:10.1093/nar/gkx907.
202. Moon SY, Zang H, Zheng Y. Characterization of a brain-specific Rho GTPase-activating protein, p200RhoGAP. *J Biol Chem.* 2003;278(6):4151-4159. doi:10.1074/jbc.M207789200.
203. Shang X, Moon SY, Zheng Y. p200 RhoGAP promotes cell proliferation by mediating cross-talk between Ras and Rho signaling pathways. *J Biol Chem.* 2007;282(12):8801-8811. doi:10.1074/jbc.M609375200.
204. Zhao C, Ma H, Bossy-Wetzel E, Lipton SA, Zhang Z, Feng G-S. GC-GAP, a Rho family GTPase-activating protein that interacts with signaling adapters Gab1 and Gab2. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34641-34653. doi:10.1074/jbc.M304594200.
205. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. SMARCA1 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6594>. Accessed May 16, 2018.
206. Weizmann Institute of Science. SMARCA1 Gene - GeneCards | SMCA1 Protein | SMCA1 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SMARCA1>. Accessed July 3, 2018.

207. The Human Protein Atlas. Tissue expression of SMARCA1 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000102038-SMARCA1/tissue>. Accessed March 12, 2019.
208. The Human Protein Atlas. Cell atlas - SMARCA1 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000102038-SMARCA1/cell>. Accessed March 12, 2019.
209. UniProt Consortium. SMARCA1 - Probable global transcription activator SNF2L1 - Homo sapiens (Human) - SMARCA1 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P28370>. Updated February 13, 2019. Accessed March 25, 2019.
210. HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute. NURF complex | HUGO Gene Nomenclature Committee. <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/1363>. Updated March 19, 2019. Accessed March 25, 2019.
211. Banting GS, Barak O, Ames TM, et al. CECR2, a protein involved in neurulation, forms a novel chromatin remodeling complex with SNF2L. *Hum Mol Genet.* 2005;14(4):513-524. doi:10.1093/hmg/ddi048.
212. TyersLab.com. A census of human soluble protein complexes. | BioGRID. <https://thebiogrid.org/142063/publication/a-census-of-human-soluble-protein-complexes.html>. Accessed March 19, 2019.
213. Ye Y, Xiao Y, Wang W, et al. Inhibition of expression of the chromatin remodeling gene, SNF2L, selectively leads to DNA damage, growth inhibition, and cancer cell death. *Mol Cancer Res.* 2009;7(12):1984-1999. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0119.
214. Eckey M, Kuphal S, Straub T, et al. Nucleosome remodeler SNF2L suppresses cell proliferation and migration and attenuates Wnt signaling. *Mol Cell Biol.* 2012;32(13):2359-2371. doi:10.1128/MCB.06619-11.
215. Ye Y, Xiao Y, Wang W, et al. Singular v dual inhibition of SNF2L and its isoform, SNF2LT, have similar effects on DNA damage but opposite effects on the DNA damage response, cancer cell growth arrest and apoptosis. *Oncotarget.* 2012;3(4):475-489. doi:10.18632/oncotarget.479.

216. Weizmann Institute of Science. SMARCA5 Gene - GeneCards | SMCA5 Protein | SMCA5 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SMARCA5>. Accessed March 26, 2019.
217. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. SMARCB1 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/6598>. Accessed July 3, 2018.
218. Weizmann Institute of Science. SMARCB1 Gene - GeneCards | SNF5 Protein | SNF5 Antibody. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SMARCB1>. Accessed May 16, 2018.
219. The Human Protein Atlas. Tissue expression of SMARCB1 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000099956-SMARCB1/tissue>. Accessed March 27, 2019.
220. The Human Protein Atlas. Cell atlas - SMARCB1 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000099956-SMARCB1/cell>. Accessed March 27, 2019.
221. UniProt Consortium. SMARCB1 - SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 - Homo sapiens (Human) - SMARCB1 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q12824>. Updated April 25, 2018. Accessed May 16, 2018.
222. Wilson BG, Roberts CWM. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2011;11(7):481-492. doi:10.1038/nrc3068.
223. Vries RGJ, Bezrookove V, Zuijderduijn LMP, et al. Cancer-associated mutations in chromatin remodeler hSNF5 promote chromosomal instability by compromising the mitotic checkpoint. *Genes Dev*. 2005;19(6):665-670. doi:10.1101/gad.335805.
224. Wilson BG, Wang X, Shen X, et al. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010;18(4):316-328. doi:10.1016/j.ccr.2010.09.006.

225. Morel D, Almouzni G, Soria J-C, Postel-Vinay S. Targeting chromatin defects in selected solid tumors based on oncogene addiction, synthetic lethality and epigenetic antagonism. *Ann Oncol.* 2017;28(2):254-269. doi:10.1093/annonc/mdw552.
226. Kim KH, Roberts CWM. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med.* 2016;22(2):128-134. doi:10.1038/nm.4036.
227. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie e. V. *EUROPEAN RHABDOID REGISTRY EU-RHAB*; 2016. Accessed April 11, 2019.
228. U.S. National Library of Medicine. Etoposide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36462>. Accessed April 11, 2019.
229. Dobke J. CLEE011X2102. [Eine offene, multizentrische Phase I Studie bei Patienten mit malignen rhabdoiden Tumoren oder Neuroblastomen]. [https://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/phase\\_i\\_ii\\_\\_studien\\_\\_pharmastudien/cee011x2102/index\\_ger.html](https://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/phase_i_ii__studien__pharmastudien/cee011x2102/index_ger.html). Updated April 28, 2014. Accessed April 11, 2019.
230. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discovery.* 2017;7(2):165-176. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241.
231. Angelini PD, Zacarias Fluck MF, Pedersen K, et al. Constitutive HER2 signaling promotes breast cancer metastasis through cellular senescence. *Cancer Res.* 2013;73(1):450-458. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2301.
232. Wang L, Leite de Oliveira R, Wang C, et al. High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell Rep.* 2017;21(3):773-783. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.085.
233. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Cellular Senescence - MeSH - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/mesh/68016922>. Accessed April 3, 2019.
234. Horbach L, Sinigaglia M, Da Silva CA, et al. Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in Ewing sarcoma cells. *Mol Clin Oncol.* 2018;8(6):719-724. doi:10.3892/mco.2018.1608.

235. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Home - Gene - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Accessed October 12, 2015.
236. Yoshimoto T, Matsubara D, Nakano T, et al. Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung. *Pathol Int*. 2015;65(11):595-602. doi:10.1111/pin.12350.
237. Ring HZ, Vameghi-Meyers V, Wang W, Crabtree GR, Francke U. Five SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) genes are dispersed in the human genome. *Genomics*. 1998;51(1):140-143. doi:10.1006/geno.1998.5343.
238. Hargreaves DC, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res*. 2011;21(3):396-420. doi:10.1038/cr.2011.32.
239. Hayat MA. *Pediatric Cancer, Volume 3: Diagnosis, Therapy, and Prognosis*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. Pediatric Cancer, Diagnosis, Therapy, and Prognosis; 3.
240. Weizmann Institute of Science. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. <http://www.genecards.org/>. Accessed October 18, 2015.
241. Chen J, Archer TK. Regulating SWI/SNF subunit levels via protein-protein interactions and proteasomal degradation: BAF155 and BAF170 limit expression of BAF57. *Mol Cell Biol*. 2005;25(20):9016-9027. doi:10.1128/MCB.25.20.9016-9027.2005.
242. UniProt Consortium. UniProt. <http://www.uniprot.org/>. Accessed October 12, 2015.
243. Tang L, Nogales E, Ciferri C. Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol*. 2010;102(2-3):122-128. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.001.
244. Yan L, Xie S, Du Y, Qian C. Structural Insights into BAF47 and BAF155 Complex Formation. *J Mol Biol*. 2017;429(11):1650-1660. doi:10.1016/j.jmb.2017.04.008.

245. Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns BR, Crabtree GR. Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* 1996;10(17):2117-2130.
246. Zhang X, Li B, Li W, et al. Transcriptional repression by the BRG1-SWI/SNF complex affects the pluripotency of human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports.* 2014;3(3):460-474. doi:10.1016/j.stemcr.2014.07.004.
247. UniProt Consortium. SMARCC2 - SWI/SNF complex subunit SMARCC2 - Homo sapiens (Human) - SMARCC2 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8TAQ2>. Updated April 25, 2018. Accessed May 16, 2018.
248. Jeon SH, Kang MG, Kim YH, et al. A new mouse gene, SRG3, related to the SWI3 of *Saccharomyces cerevisiae*, is required for apoptosis induced by glucocorticoids in a thymoma cell line. *J Exp Med.* 1997;185(10):1827-1836.
249. DelBove J, Rosson G, Strobeck M, et al. Identification of a core member of the SWI/SNF complex, BAF155/SMARCC1, as a human tumor suppressor gene. *Epigenetics.* 2011;6(12):1444-1453. doi:10.4161/epi.6.12.18492.
250. Kadam S, McAlpine GS, Phelan ML, Kingston RE, Jones KA, Emerson BM. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* 2000;14(19):2441-2451.
251. Foster KSJ, McCrary WJ, Ross JS, Wright CF. Members of the hSWI/SNF chromatin remodeling complex associate with and are phosphorylated by protein kinase B/Akt. *Oncogene.* 2006;25(33):4605-4612. doi:10.1038/sj.onc.1209496.
252. Cell Signaling Technology, Inc. PhosphoSitePlus: a resource for protein phosphorylation and other post-translational modifications. <http://www.phosphosite.org/homeAction.do>. Accessed November 14, 2015.
253. Watanabe R, Ui A, Kanno S-I, et al. SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability. *Cancer Res.* 2014;74(9):2465-2475. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3608.

254. Shain AH, Pollack JR. The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS One*. 2013;8(1):e55119. doi:10.1371/journal.pone.0055119.
255. Euskirchen GM, Auerbach RK, Davidov E, et al. Diverse roles and interactions of the SWI/SNF chromatin remodeling complex revealed using global approaches. *PLoS Genet*. 2011;7(3):e1002008. doi:10.1371/journal.pgen.1002008.
256. Wang L, Zhao Z, Meyer MB, et al. CARM1 methylates chromatin remodeling factor BAF155 to enhance tumor progression and metastasis. *Cancer Cell*. 2014;25(1):21-36. doi:10.1016/j.ccr.2013.12.007.
257. Heeboll S, Borre M, Ottosen PD, et al. SMARCC1 expression is upregulated in prostate cancer and positively correlated with tumour recurrence and dedifferentiation. *Histol Histopathol*. 2008;23(9):1069-1076.
258. Shadeo A, Chari R, Lonergan KM, et al. Up regulation in gene expression of chromatin remodelling factors in cervical intraepithelial neoplasia. *BMC Genomics*. 2008;9:64. doi:10.1186/1471-2164-9-64.
259. Andersen CL, Christensen LL, Thorsen K, et al. Dysregulation of the transcription factors SOX4, CBFβ and SMARCC1 correlates with outcome of colorectal cancer. *Br. J. Cancer*. 2009;100(3):511-523. doi:10.1038/sj.bjc.6604884.
260. Keppler BR, Archer TK. Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex. *J Biol Chem*. 2010;285(46):35665-35674. doi:10.1074/jbc.M110.173997.
261. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. STK35 serine/threonine kinase 35 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/140901>. Accessed November 27, 2019.
262. Weizmann Institute of Science. STK35 Gene - GeneCards | STK35 Protein | STK35 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STK35>. Accessed November 27, 2019.
263. Weizmann Institute of Science. STK35 Gene - GeneCards | STK35 Protein | STK35 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STK35>. Accessed January 29, 2020.

264. Kanehisa Laboratories. KEGG T01001: 140901. [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?hsa:140901](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa:140901). Accessed February 7, 2020.
265. Capra M, Nuciforo PG, Confalonieri S, et al. Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Res.* 2006;66(16):8147-8154. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3489.
266. Wu Z, Liu J, Hu S, Zhu Y, Li S. Serine/Threonine Kinase 35, a Target Gene of STAT3, Regulates the Proliferation and Apoptosis of Osteosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(2):808-818. doi:10.1159/000487172.
267. Yasuda Y, Miyamoto Y, Yamashiro T, et al. Nuclear retention of importin alpha coordinates cell fate through changes in gene expression. *EMBO J.* 2012;31(1):83-94. doi:10.1038/emboj.2011.360.
268. Vallenius T, Makela TP. Clik1: a novel kinase targeted to actin stress fibers by the CLP-36 PDZ-LIM protein. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 10):2067-2073.
269. Kong D-S, Kim J, Lee I-H, et al. Integrative radiogenomic analysis for multicentric radiophenotype in glioblastoma. *Oncotarget.* 2016;7(10):11526-11538. doi:10.18632/oncotarget.7115.
270. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. PDLIM1 PDZ and LIM domain 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/proxy/ub.uni-frankfurt.de/gene/9124>. Accessed February 5, 2020.
271. Hohmann T, Dehghani F. The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells.* 2019;8(4). doi:10.3390/cells8040362.
272. Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 2003;5(7):599-609. doi:10.1038/ncb0703-599.
273. Goyal P, Behring A, Kumar A, Siess W. Identifying and characterizing a novel protein kinase STK35L1 and deciphering its orthologs and close-homologs in vertebrates. *PLoS One.* 2009;4(9):e6981. doi:10.1371/journal.pone.0006981.



274. Goyal P, Behring A, Kumar A, Siess W. STK35L1 associates with nuclear actin and regulates cell cycle and migration of endothelial cells. *PLoS One*. 2011;6(1):e16249. doi:10.1371/journal.pone.0016249.
275. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. FNBP1L formin binding protein 1 like [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/54874>. Accessed July 3, 2018.
276. Weizmann Institute of Science. FNBP1L Gene - GeneCards | FBP1L Protein | FBP1L Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FNBP1L>. Accessed July 3, 2018.
277. The Human Protein Atlas. Tissue expression of FNBP1L - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000137942-FNBP1L/tissue>. Accessed May 3, 2019.
278. UniProt Consortium. FNBP1L - Formin-binding protein 1-like - Homo sapiens (Human) - FNBP1L gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q5T0N5>. Updated May 8, 2019. Accessed June 6, 2019.
279. Weizmann Institute of Science. WASL Gene - GeneCards | WASL Protein | WASL Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WASL>. Accessed May 7, 2019.
280. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. WIPF1 WAS/WASL interacting protein family member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/7456>. Accessed May 31, 2019.
281. UniProt Consortium. WASL - Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein - Homo sapiens (Human) - WASL gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/O00401>. Updated May 8, 2019. Accessed June 4, 2019.
282. Pichot CS, Arvanitis C, Hartig SM, et al. Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp. *Cancer Res*. 2010;70(21):8347-8356. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4149.

283. Chander H, Brien CD, Truesdell P, et al. Toca-1 is suppressed by p53 to limit breast cancer cell invasion and tumor metastasis. *Breast Cancer Res.* 2014;16(6):3413. doi:10.1186/s13058-014-0503-x.
284. UniProt Consortium. CDC42 - Cell division control protein 42 homolog precursor - Homo sapiens (Human) - CDC42 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P60953>. Updated May 8, 2019. Accessed June 4, 2019.
285. Stengel K, Zheng Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal.* 2011;23(9):1415-1423. doi:10.1016/j.cellsig.2011.04.001.
286. Valentijn LJ, Koppen A, van Asperen R, Root HA, Haneveld F, Versteeg R. Inhibition of a new differentiation pathway in neuroblastoma by copy number defects of N-myc, Cdc42, and nm23 genes. *Cancer Res.* 2005;65(8):3136-3145. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2469.
287. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Cellosaurus cell line Tet21N (CVCL\_9812). [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_9812](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_9812). Accessed June 4, 2019.
288. Hirsch DS, Shen Y, Wu WJ. Growth and motility inhibition of breast cancer cells by epidermal growth factor receptor degradation is correlated with inactivation of Cdc42. *Cancer Res.* 2006;66(7):3523-3530. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1547.
289. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. TPM2 tropomyosin 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/gene/7169>. Accessed July 3, 2018.
290. Weizmann Institute of Science. TPM2 Gene - GeneCards | TPM2 Protein | TPM2 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TPM2>. Accessed July 3, 2018.
291. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. (TPM2) AND "Homo sapiens"[porgn:\_\_txid9606] - Protein - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/protein>. Accessed June 18, 2019.

292. The Human Protein Atlas. Tissue expression of TPM2 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198467-TPM2/tissue>. Accessed June 7, 2019.
293. UniProt Consortium. TPM2 - Tropomyosin beta chain - Homo sapiens (Human) - TPM2 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P07951>. Updated May 8, 2019. Accessed June 14, 2019.
294. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. "TPM2 protein, human" [Supplementary Concept] - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.ub.uni-frankfurt.de/pubmed?term=%22TPM2+protein%2C+human%22+%5BSupplementary+Concept%5D>. Accessed June 20, 2019.
295. Mitchell CB, Black B, Sun F, et al. Tropomyosin Tpm 2.1 loss induces glioblastoma spreading in soft brain-like environments. *J Neurooncol.* 2019;141(2):303-313. doi:10.1007/s11060-018-03049-z.
296. Zhang J, Zhang J, Xu S, et al. Hypoxia-Induced TPM2 Methylation is Associated with Chemoresistance and Poor Prognosis in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(2):692-705. doi:10.1159/000487162.
297. Groth-Pedersen L, Aits S, Corcelle-Termeau E, Petersen NHT, Nylandsted J, Jaattela M. Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(10):e45381. doi:10.1371/journal.pone.0045381.
298. Groth-Pedersen L, Ostensfeld MS, Høyer-Hansen M, Nylandsted J, Jäätelä M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res.* 2007;67(5):2217-2225. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3520.
299. Assinder SJ, Au E, Dong Q, Winnick C. A novel splice variant of the beta-tropomyosin (TPM2) gene in prostate cancer. *Mol Carcinog.* 2010;49(6):525-531. doi:10.1002/mc.20626.

## 9 Anhang

### 9.1 small interfering RNA-Zielsequenzen:

Kandidatengene:

1. *ACTR1A* (ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)):  
GUAAGGAGGGCUACGACUU  
GACAACGGAUCCGGUGUGA  
GUACUCAGCCUUUACGCUA  
GGAACGAGCUGCCGAAGUU
2. *ACTR1B* (ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast)):  
CGACAGGAGUGGUUCUAGA  
UCAAAGAGCGAGCGUGCUA  
CGGCUGAGUUUGAGGUUGU  
GGAGACCGAUUACUCAGUG
3. *ARPC1A* (actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa):  
ACGAAGUGCACAUCUAUAA  
UCACUCAAGUCUCUAUUUA  
GCACAACGGACACAUCACA  
GAAAGAUGGUGUUUGGAAG
4. *ARPC3* (actin related protein 2/3 complex, subunit 3):  
GAUGAGAGCCUAUUUACAA  
AAAUGUAUACGCUGGGAAU  
GAAUGAAGCUGAUAGGACC  
AUACAGAUUUUGUGGAUGA
5. *ATP2C1* (ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, type 2C, member 1):  
GAAAGGUGCUUACGAACAA  
CAUAAUGUCUGCAAUCGAA

GGAAUGAGUUUGAUUUUAG  
GAUCUUGCAUCGAGAAGUA

6. *BIN3* (bridging integrator 3):

GAAGAAGAGCACCGACGCA  
GUUGUGUACUACUCGGAAA  
CCAUGGGCUUCGUUGGCUA  
GCUGUGAAGAGGCGGGAAC

7. *CALR* (calreticulin):

CCUAUGAGGUGAAGAUUGA  
GCACGGAGACUCAGAAUAC  
GAAGCUGUUUCCUAAUAGU  
GCAAGGAUGAUGAGUUUAC

8. *DAPK1* (death-associated protein kinase 1):

GAAUGGAGUUGGCGAUUUC  
GUUUGUCGCUCCUGAGAU  
AUACGAAGCCAGAUUGUUU  
AUACUACAGUUGCUCAUUA

9. *DST* (dystonin):

GACCUAAGGACUCGAUUA  
CAGCAGAUUCUCAUUAUUC  
GAAUUGAGCAACAGUAUCA  
GCAGAUUGACAACAGGUUA

10. *FMN* (formin 1):

CUAUUUGGGUUUACGAGUA  
GACCAUCACGGAAAUUAAA  
GAACGUUGAUAAUUCUCUG  
GGUCUCGGGUUUCACCUGA

11. *FMN2* (formin 2):

GGGAGUAGCACUUUACCAA  
CCGAAGAGGUGUGUAGACA  
GCUUCAGGGAACCGUGUAA  
GCUCGGACACGGACAUCUA

12. *FNBP1* (formin binding protein 1):

GGAAGUGCCUGGAUGGAAU  
AAAGAAUGUUUAGCGAGU  
GAUUUGAACGCGAUUGCAA  
CAGAAUGAAGGAACGAUUU

13. *FOXJ1* (forkhead box J1):

GAUCCCACCUGGCAGAAUU  
CCACCAAUCCGCACGUGAA  
UCACGGACAACUUCUGCUA  
GAGAAGGACGAACCAGGCA

14. *ITSN1* (intersectin 1 (Sarcoma (Src) homology 3  
(SH3) domain protein)):

GAUAUCAGAUGUCGAUUGA  
GAACGAAAGAUCAUAGAAU  
CGACAAGGCCGGAGUCUUC  
GCACAGAUUUGGGCACUAG

15. *ITSN2* (intersectin 2):

GAUCAAACGUGACAAGUUG  
CCAAACAUGUGGGCUAUUA  
CCUCAUGGGUCAUCUUAUA  
GGUGAAUUUAGAGCAUUA

16. *KRAS2* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene  
homolog):

GGAGGGCUUUCUUUGUGUA  
UCAAAGACAAAGUGUGUAA  
GAAGUUAUGGAAUCCUUU  
GAGUAACACGAUGCGUAU

17. *LCP1* (lymphocyte cytosolic protein 1 (L-  
plastin)):

GGAAGAAUCAAGCGAAGUU  
GAGCGGACAUUUAGGAACU  
GAGGAUCAGUGUCCGAUGA  
GUACAAGUCUGCCUGUUCU

18. *MAEA* (macrophage erythroblast attacher):

GUACGACAACUACCGACUA  
CAAGAUUUCUGGCGACGUG  
GAACUCAUCCGGCAGAAUA  
GGAUCGAGCACCUCAAAGA

19. *MAP2K1* (mitogen-activated protein kinase kinase 1):

CCAUGCUGCUGGCGUCUAA  
GAGGUUCUCUGGAUCAAGU  
CGACGGCUCUGCAGUUAAC  
GCACAAGGUCCUACAUGUC

20. *MAP2K2* (mitogen-activated protein kinase kinase 2):

CGACAGCGCAUGCAGGAAC  
GAUCAGCAUUUGCAUGGAA  
GGUCCGAGGUGGAAGAAGU  
UCUUUGAACUCCUGGACUA

21. *MAPK1* (mitogen-activated protein kinase 1):

UCGAGUAGCUAUCAAGAAA  
CACCAACCAUCGAGCAAU  
GGUGUGCUCUGCUUAUGAU  
ACACCAACCUCUCGUACAU

22. *NF1* (neurofibromin 1):

GAACAAACCAUAGCUAUAA  
CAGAUAAUCCGUAUUCUUA  
CGAAGUCGCUGCAGCCUAA  
GCAAGUACUUACAUCAAUU

23. *NFYA* (nuclear transcription factor Y, alpha):

CGACAGAGCAGAUUGUUGU  
GAGGCAAGCCCGAGCUAAA  
CAUCGUCUAUCAACCAGUU  
GAGGCCAGCUAAUCACAUC

24. *NFYB* (nuclear transcription factor Y, beta):

GAUAUUCUCUUUGCUAUGU

GUAAGUGAGUUCAUCAGUU  
GAAUGUGUCAGGUGCAUAA  
UAUGCAAGCUCCCAUGUUA

25. *NFYC* (nuclear transcription factor Y, gamma):

GAACUCCCACUGGCUCGUA  
GAUAUCGCCAUGGCAAUUA  
GCUGCAGUAUAUCCGCUUA  
GUCCACAGAAGGAGGAUUU

26. *NRAS* (neuroblastoma RAS viral (v-ras)  
oncogene homolog):

GAGCAGAUUAAGCGAGUAA  
GAAAUACGCCAGUACCGAA  
GUGGUGAUGUAACAAGUA  
GCACUGACAAUCCAGCUAA

27. *PAK4* (p21 protein (cell division control protein  
42 homolog (Cdc42)/rat-sarcoma(Ras)-related-  
C3-botulinum-toxin-substrate(Rac))-activated-  
kinase-4):

GGGACUACCAGCACGAGAA  
CCAUGAAGAUGAUUCGGGA  
GGAUAAUGGUGAUUGAGAU  
GAGUAUCCCAUGAGCAGUU

28. *PAK6* (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated  
kinase 6):

GAAGUGAUCUCCAGGUCUU  
CCACCGACCCAGACAUGUA  
CCUCUGACCACUUCGGAUA  
CCAAUGGGCUGGCUGCAA

29. *PAK7* (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated  
kinase 7):

GACAAGCGAUGGCCGGAUA  
GGGAAUACUUGGCCAACUU  
CAAAGCAAUUCGGGCUAUU



CAAACCAAGUGAAUACAGU

30. *RICS* (Ras homology (Rho) GTPase activating protein 32):

GAGCAUAUCUGAGCCAAUU  
GAUAAGGCCUAUUUCCAAA  
GGAGAGGACCGCUUCUAUA  
GGUAGUAGCCAAUGUCAGA

31. *SMARCA1* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1):

UAACAUAGCUCGAGAGGUA  
GAAGAAACCAGUACGUGUA  
CAACGAGAAUGGUUAUACAA  
GGCGAUACCUGGUCAUUGA

32. *SMARCA5* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5):

GGAAUGGUUAUACUCGGAUA  
GGGCAAUAGAUUCGAGUA  
GGAUUUACCAAUUGGAAUA  
GUUCUUUCCUCCACGUUUA

33. *SMARCB1* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1):

GUGACGAUCUGGAUUUGAA  
GAAACUACCUCCGUAUGUU  
GAUGACGCCUGAGAUGUUU  
GGCAGAAGCCCGUGAAGUU

34. *SMARCC1* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1):

GAGCAGACCAAUCACAUUA  
GUACUGACAUUUACUCCAA

GAACAUUUACGGAUGAGAA  
CAACACCUGUACCCAAUUAU

35. *SMARCC2* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2):

UCACUAAACUGCCGAUCAA  
GAGAAGCACUGGAGUAUCA  
GCUACUAUCCUGACAGUUA  
UAAGAAAGGUCCUCAACA

36. *STK35* (serine/threonine kinase 35):

GCUACGGCGUGGUUUAUGA  
GCAAAGAGGGCAAUCAAGA  
GGUCACAUGUGCUGCUUAA  
CAACAAAAGUUUCAUGCUA

37. *TOCA1* (formin binding protein 1-like):

GUAACACAGGGACGAGAAA  
GAUGAAGAGCCACGGUUUA  
GGACAAAGGUGACGGAUGG  
CAGAGUGUAUGGUGAAUUA

38. *TPM2* (tropomyosin 2 (beta)):

GCACAUCGCUGAGGAUUCA  
AAGAGGAGAUCAAACUGUU  
CCGACAAGAAGCAAGCUGA  
GCCGAGAGGUCUGUGGCAA

39. *TRIP10* (thyroid hormone receptor interactor 10):

GGAGAAUAGUAAGCGUAAA  
CCAUUUACACGGAGUUUGA  
GAAAGAACGCACCGAAGUG  
CAACAGUCCUUCGUACAGA

40. *WASPIP* (Wiskott-Aldrich syndrome/Wiskott-Aldrich syndrome like (WAS/WASL) interacting protein family, member 1):

UAGCAUUCCUCCUCCAGUA  
UGACAGAAGUGCACCAAUA  
GGAUAAUGAUUCUGGAGGA  
UAAAGAAGACGGUCACCAA

Positivkontrolle:

41. *ABCB1* (ATP-binding cassette subfamily B  
member 1):

CCAGGUAUGCCUAUUUAUUA  
GACCAUAAAUGUAAGGUUU  
GAAAGUAUACCUCCAGUUU  
GAGCUU AACACCCGACUUA

Negativkontrolle:

42. Non-target:

UGGUUUACAUGUCGACUAA  
UGGUUUACAUGUUGUGUGA  
UGGUUUACAUGUUUUCUGA  
UGGUUUACAUGUUUCCUA

42,77-80

## 9.2 Gesamttabelle relative Zellviabilitäten bei Viabilitätstests nach Transfektion

Tabelle 18. Gesamttabelle relative Zellviabilitäten bei Viabilitätstests nach Transfektion bei Kandidatengenen und Kontrollen als Prozentwerte in Relation zur Zellviabilität der -siRNA-Kontrolle ohne Zugabe von Vincristin (Darstellung % Viabilität; bei Vorliegen mehrerer Ergebnisse gemittelt  $\pm$  Standardabweichung).

	Vincristin (ng/ml)				
	0	12,5	25	50	100
-siRNA	100,00 $\pm$ 0,00	90,48 $\pm$ 7,27	74,52 $\pm$ 11,20	42,57 $\pm$ 9,55	21,74 $\pm$ 7,96
non-target	97,56 $\pm$ 9,81	90,70 $\pm$ 10,91	73,64 $\pm$ 16,89	40,50 $\pm$ 14,77	21,00 $\pm$ 9,84
<i>ABCB1</i>	80,29	19,83	10,73	4,40	0,00
<i>ACTR1B</i>	102,77 $\pm$ 5,95	89,24 $\pm$ 0,30	78,56 $\pm$ 2,59	51,08 $\pm$ 1,72	24,84 $\pm$ 0,16
<i>ARPC1A</i>	103,03 $\pm$ 11,87	93,53 $\pm$ 19,16	86,62 $\pm$ 14,21	50,30 $\pm$ 9,49	23,33 $\pm$ 3,54
<i>ARPC3</i>	93,41 $\pm$ 13,20	84,96 $\pm$ 10,88	61,94 $\pm$ 9,48	31,91 $\pm$ 7,75	16,24 $\pm$ 3,14
<i>ATP2C1</i>	113,31 $\pm$ 2,77	93,53 $\pm$ 3,78	81,36 $\pm$ 1,33	48,75 $\pm$ 5,75	27,61 $\pm$ 6,58
<i>BIN3</i>	99,89 $\pm$ 4,35	97,57 $\pm$ 4,59	81,75 $\pm$ 6,37	53,18 $\pm$ 14,60	25,42 $\pm$ 9,65
<i>CALR</i>	99,12 $\pm$ 7,29	95,37 $\pm$ 10,97	79,10 $\pm$ 13,98	52,54 $\pm$ 14,14	28,11 $\pm$ 7,16
<i>DAPK1</i>	97,06 $\pm$ 6,90	84,58 $\pm$ 4,04	72,11 $\pm$ 1,82	43,00 $\pm$ 0,71	21,78 $\pm$ 0,13
<i>DST</i>	93,67 $\pm$ 12,56	93,61 $\pm$ 14,82	79,60 $\pm$ 19,30	49,63 $\pm$ 20,78	24,60 $\pm$ 12,30
<i>FMN</i>	109,10 $\pm$ 6,98	94,90 $\pm$ 0,57	82,81 $\pm$ 5,80	52,87 $\pm$ 14,74	24,09 $\pm$ 7,85
<i>FMN2</i>	100,23	84,75	79,02	52,95	32,35

	± 19,26	± 10,23	± 13,19	± 22,26	± 16,57
<i>FNBP1</i>	95,37	91,53	77,72	41,86	22,87
	± 15,78	± 12,71	± 10,11	± 2,99	± 4,93
<i>FOXJ1</i>	105,93	96,03	88,63	67,19	38,87
	± 7,29	± 5,62	± 2,91	± 3,93	± 4,19
<i>ITSN1</i>	108,14	95,03	85,73	52,82	26,43
	± 2,42	± 11,54	± 11,96	± 4,19	± 5,63
<i>ITSN2</i>	100,68	92,13	69,65	43,10	19,41
	± 10,81	± 19,72	± 0,12	± 2,77	± 1,98
<i>KRAS2</i>	86,46	75,69	51,19	25,98	13,31
	± 6,69	± 6,60	± 5,18	± 1,32	± 3,19
<i>LCP1</i>	108,05	91,52	71,67	47,30	25,57
	± 0,41	± 1,11	± 9,10	± 18,14	± 9,50
<i>MAEA</i>	108,05	98,40	84,73	57,64	37,76
	± 10,94	± 1,83	± 5,25	± 8,95	± 5,06
<i>MAP2K1</i>	85,98	70,22	46,56	23,19	9,21
	± 29,04	± 34,71	± 27,66	± 16,18	± 7,32
<i>MAP2K2</i>	110,84	95,41	81,14	54,58	23,49
	± 6,62	± 6,32	± 13,68	± 17,20	± 13,53
<i>MAPK1</i>	114,68	99,63	90,65	43,64	22,91
	± 23,00	± 24,32	± 23,78	± 11,33	± 2,38
<i>NF1</i>	102,70	86,44	79,85	55,05	32,35
	± 1,16	± 1,62	± 4,64	± 2,16	± 2,05
<i>NFYA</i>	113,70	100,05	90,48	54,80	25,62
	± 9,42	± 11,52	± 12,45	± 8,64	± 11,09
<i>NFYB</i>	87,25	70,58	46,90	26,04	12,59
	± 1,06	± 1,49	± 2,08	± 0,55	± 1,12
<i>NFYC</i>	93,58	79,22	69,93	44,08	22,32
	± 14,61	± 10,44	± 4,58	± 9,60	± 4,10
<i>NRAS</i>	90,40	88,69	79,39	50,65	27,29
	± 5,96	± 5,33	± 5,01	± 0,69	± 0,93
<i>PAK4</i>	107,12	103,01	88,28	48,46	23,21
	± 7,85	± 12,58	± 5,59	± 1,13	± 0,68

<i>PAK6</i>	104,57 ± 11,11	92,15 ± 5,19	83,91 ± 4,15	57,09 ± 7,32	32,50 ± 5,82
<i>PAK7</i>	114,18 ± 1,92	90,42 ± 11,62	65,30 ± 8,92	41,51 ± 0,93	13,21 ± 1,45
<i>RICS</i>	110,80 ± 19,74	96,09 ± 8,28	84,33 ± 8,54	67,35 ± 20,95	39,91 ± 13,10
<i>SMARCA1</i>	69,86 ± 6,59	55,46 ± 13,04	36,57 ± 11,75	20,99 ± 10,01	10,64 ± 4,45
<i>SMARCA5</i>	116,52 ± 1,48	90,58 ± 0,76	65,68 ± 0,43	36,69 ± 0,96	14,67 ± 1,46
<i>SMARCB1</i>	84,26 ± 7,84	61,93 ± 13,58	39,61 ± 13,60	21,83 ± 11,77	7,49 ± 8,95
<i>SMARCC1</i>	44,08 ± 0,03	22,56 ± 2,68	8,00 ± 1,70	2,15 ± 1,00	0,00
<i>SMARCC2</i>	109,63 ± 5,38	104,29 ± 25,72	86,89 ± 11,77	62,60 ± 7,00	38,94 ± 0,95
<i>STK35</i>	88,25 ± 18,56	72,87 ± 21,51	52,52 ± 26,69	25,02 ± 24,94	9,62 ± 17,68
<i>TOCA1</i>	92,14 ± 16,63	72,25 ± 12,07	46,27 ± 12,80	24,65 ± 11,65	8,94 ± 5,36
<i>TPM2</i>	86,00 ± 10,89	72,62 ± 6,35	43,06 ± 5,63	19,27 ± 3,08	5,84 ± 1,95
<i>TRIP10</i>	78,79 ± 18,15	70,15 ± 19,65	52,98 ± 19,08	27,81 ± 11,32	16,05 ± 6,45
<i>WASPIP</i>	110,13 ± 5,06	93,58 ± 3,17	82,28 ± 14,95	54,07 ± 19,25	29,29 ± 14,38

## 9.3 Ergebnisse Durchflusszytometrie zur Optimierung der Transfektion

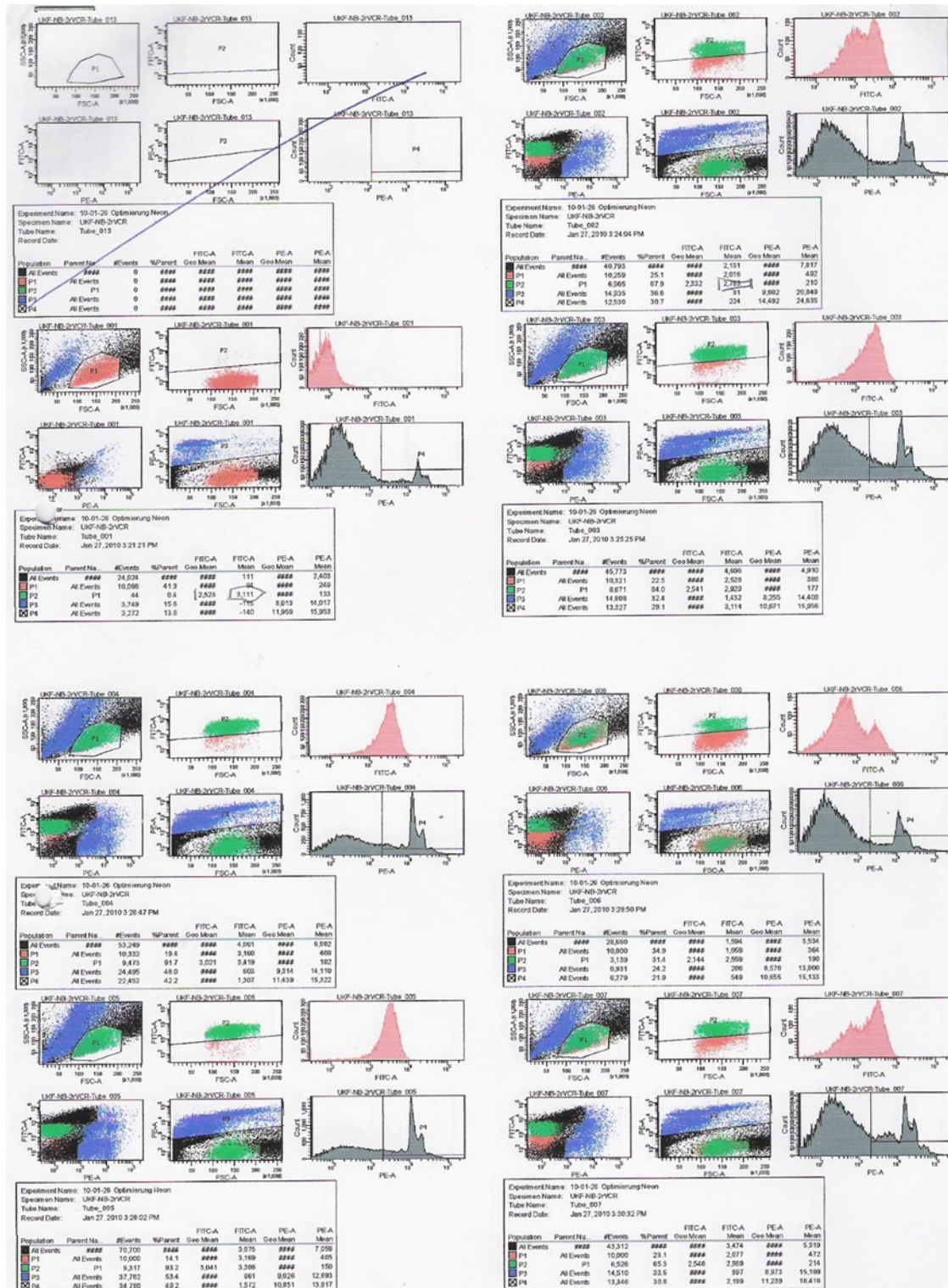


Abbildung 20. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2<sup>V</sup>CR<sup>20</sup>-Zellen Teil 1: getestete Programme 1 bis 7

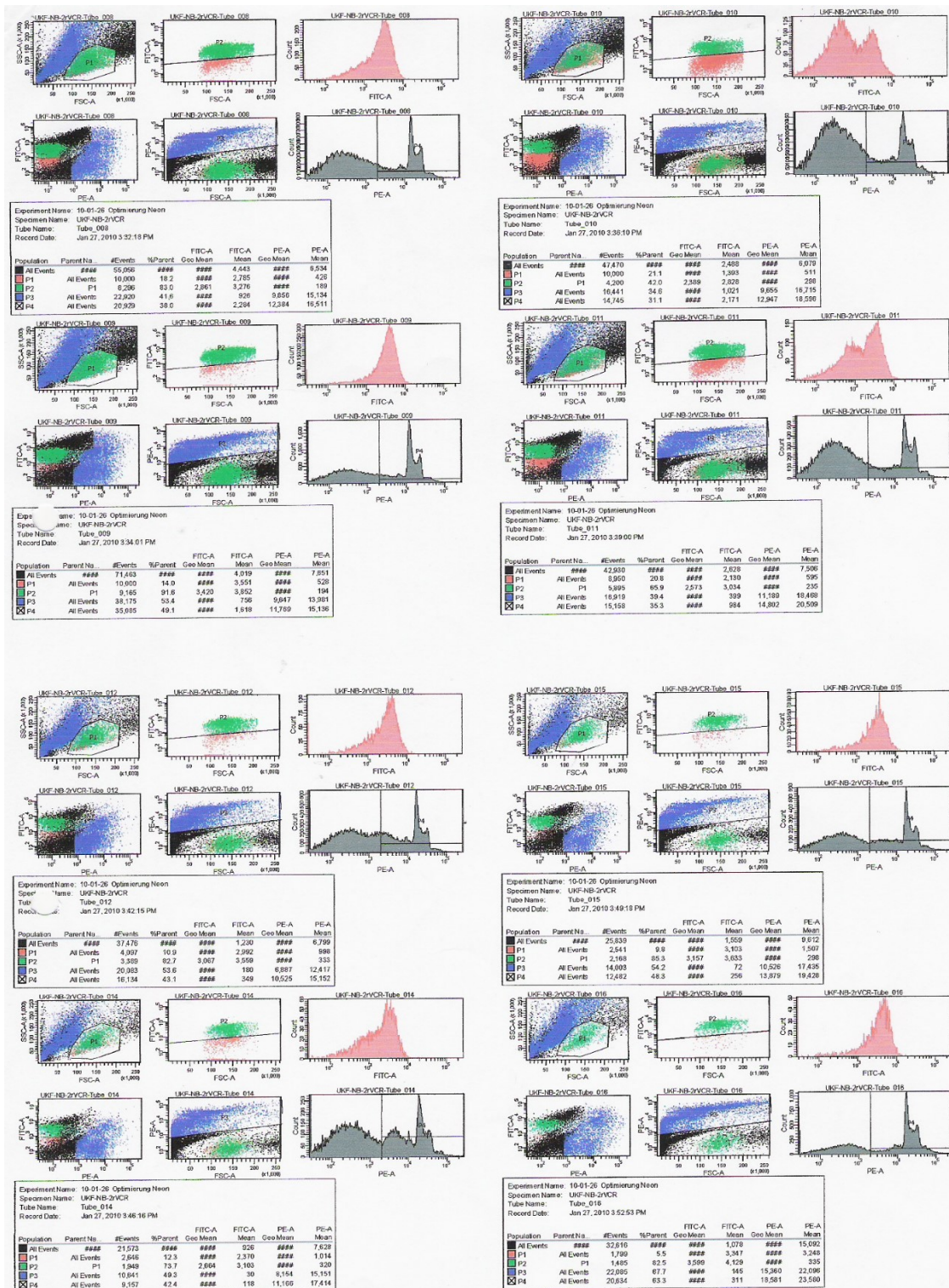


Abbildung 21. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2VCR<sup>20</sup>-Zellen Teil 2: getestete Programme 8 bis 15



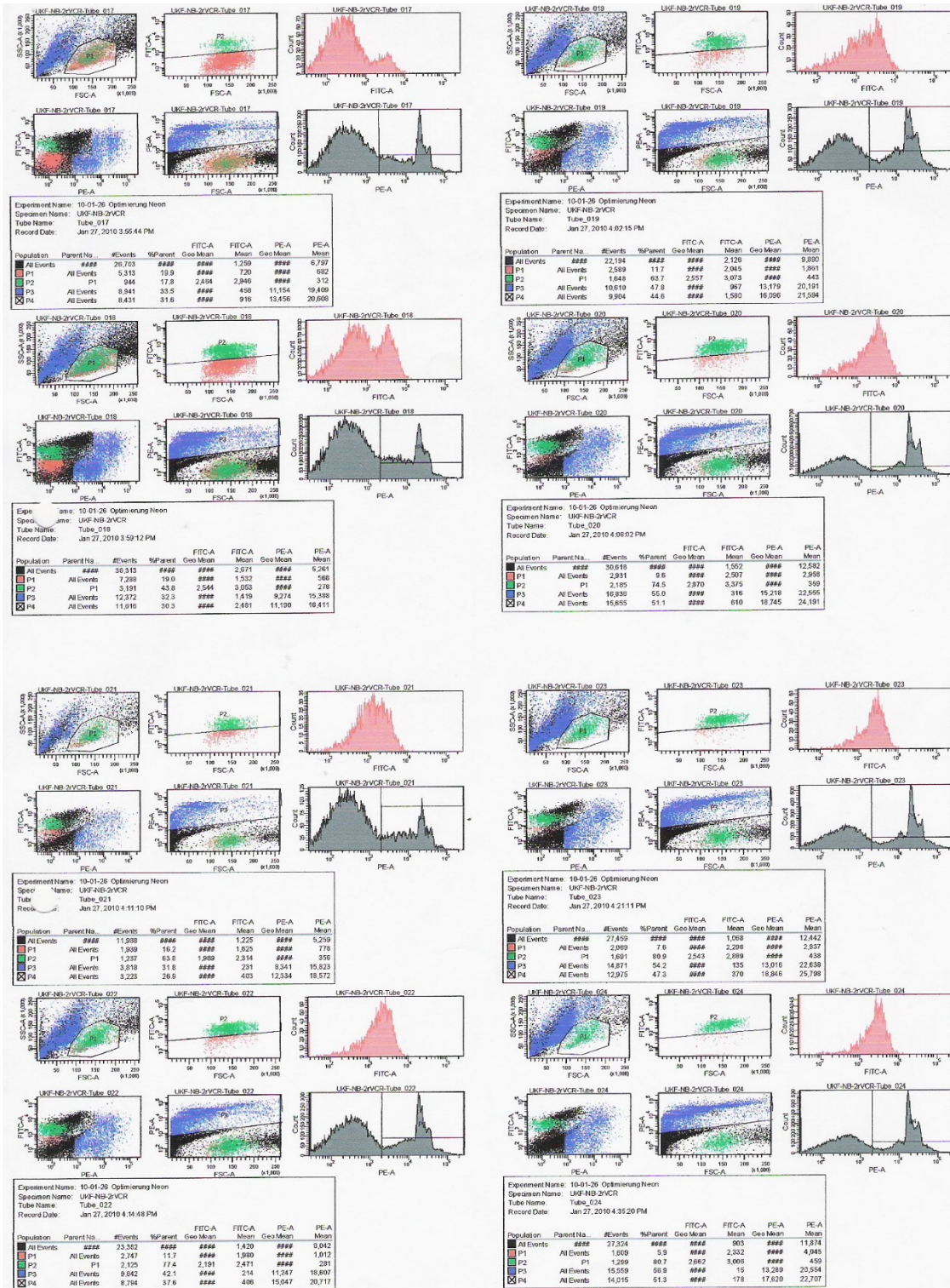
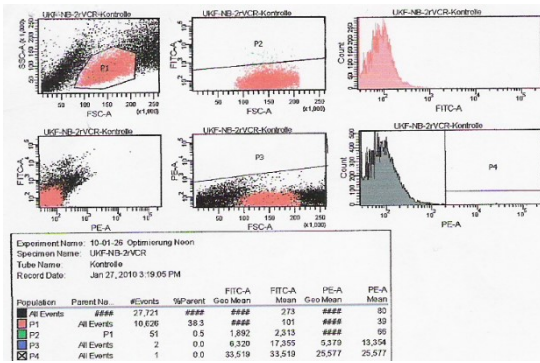


Abbildung 22. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2<sup>V</sup>CR<sup>20</sup>-Zellen Teil 3: getestete Programme 16 bis 23



**Abbildung 23. Ergebnisse Durchflusszytometrie: Effizienz, Intensität und Zellviabilität bei den 24 Transfektionsprogrammen bei UKF-NB-2<sup>r</sup>VCR<sup>20</sup>-Zellen Teil 4: getestetes Programm**

24

## 10 Danksagung

## 11 Lebenslauf

## 12 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

Untersuchung synthetischer Letalität in Vincristin-resistenten Neuroblastomzellen

in dem Institut für Medizinische Virologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Jindrich Cinatl mit Unterstützung durch 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)

\*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen