

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

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

**In vitro Charakterisierung von Cisplatin-resistenten  
Neuroblastom-Sublinien**

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

vorgelegt von  
Luis Alfredo Patiño Miranda

aus  
Cali, Valle del Cauca, Kolumbien

Frankfurt am Main, 2021

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referent: Prof. Dr. Jindrich Cinatl

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klingebiel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2021

## **Widmung**

Ich widme diese Arbeit meiner geliebten Familie Gloria E. Miranda, Luis A. Patiño und Katherine Patiño, die mich immer liebevoll unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Jindrich Cinatl danke ich sehr für die Annahme des Themas und für die jederzeit gewährte persönliche Beratung und Unterstützung.

Herrn Dr. Florian Rothweiler danke ich für die zahlreichen fachlichen Ratschläge und die konstante freundliche Betreuung.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Neuroblastom.....	1
1.1.1. Klinik und Epidemiologie .....	2
1.1.2. Diagnostik, Stadieneinteilung und Prognose .....	2
1.2. Aktuelle Therapieansätze .....	6
1.3. Die Problematik der Therapieresistenz .....	7
1.4. Die Rolle von Krebsstammzellen beim Neuroblastom.....	10
1.4.1. Charakterisierung durch Co-Expression von Markerproteinen .....	14
1.5. Charakterisierung durch Ausstrom von Hoechst 33342 (Side Population Assay) .....	17
1.6. Neurosphere Assay .....	18
1.7. Rollen der untersuchten Stammzellmarker in dieser Arbeit .....	19
1.7.1. BCRP .....	19
1.7.2. BMI-1 .....	20
1.7.3. CD133 .....	21
1.7.4. GD2 .....	22
1.7.5. MDR-1 .....	23
1.7.6. Nanog .....	24
1.7.7. Necdin .....	27
1.7.8. Nestin .....	30
1.7.9. Oct-4 .....	32
1.7.10. SOX-2 .....	35
1.7.11. ABCC1/MRP1 .....	36
1.8. Apoptose und die Rolle von p53, p21, XIAP und Survivin beim Neuroblastom .....	37
2. Zielsetzung dieser Arbeit .....	42
3. Material .....	43
3.1. Untersuchte Zelllinien .....	43
3.2. Zellkultur und Mediumherstellung .....	46
3.3. Zytostatika .....	47
3.4. MTT Assay .....	48
3.5. Western Blot .....	48



3.5.1. Primäre Antikörper Western Blot .....	52
3.5.2. Sekundäre Antikörper Western Blot .....	52
3.6. Durchflusszytometrie .....	53
3.6.1. Primärantikörper Durchflusszytometrie .....	52
3.6.2. Sekundäre Antikörper Durchflusszytometrie .....	55
3.6.3. Isotypen Durchflusszytometrie .....	55
3.7. Colony Forming Assay .....	56
3.8. Geräte .....	56
3.9. Plastik, Glaswaren und Verschiedenes .....	57
3.10. Software .....	58
4. Methoden .....	59
4.1 Zellkultur .....	59
4.2 MTT .....	59
4.2.1 Grundlagen .....	59
4.2.2. Durchführung .....	61
4.3. Durchflusszytometrie .....	63
4.3.1. Grundlagen .....	63
4.3.2 Durchführung .....	64
4.3.2.1. Intrazelluläre Färbung .....	64
4.3.2.2. Extrazelluläre Färbung .....	67
4.4. Western Blot .....	67
4.4.1. Grundlagen .....	67
4.4.2. Probenvorbereitung .....	68
4.4.2.1 Zellyse und Probenextraktion .....	68
4.4.2.2. Proteinbestimmung nach Biorad .....	68
4.4.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE .....	70
4.4.4. Herstellung der Polyacrylamid Gele .....	71
4.4.5. Elektrophorese .....	72
4.4.6. Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose Membran (Immunoblot) ....	72
4.5. Colony Forming Assay .....	74
5. Ergebnisse .....	76
5.1 Resistenzen gegen unterschiedliche Zytostatika .....	76
5.1.1. Cisplatin .....	76
5.1.2. YM155 .....	77

5.1.3. Doxorubicin .....	80
5.1.4. Melphalan .....	81
5.1.5. Vincristin .....	83
5.1.6. Docetaxel .....	85
5.1.7. Etoposid .....	87
5.1.8. Carboplatin .....	89
5.1.9. Gemcitabin .....	91
5.1.10. Oxaliplatin .....	93
5.1.11. Vinblastin .....	95
5.2. Durchflusszytometrie .....	98
5.2.1. BCRP .....	98
5.2.2. BMI-1 .....	100
5.2.3. CD133 .....	102
5.2.4. GD2 .....	104
5.2.5. MDR1/ABCB1 .....	106
5.2.6. Nanog .....	108
5.2.7. Necdin .....	111
5.2.8. Nestin .....	112
5.2.9. Oct-4 .....	114
5.2.10. SOX-2 .....	116
5.2.11. ABCC1/MRP1 .....	118
5.3. Western Blot .....	121
5.4. Colony forming Assay .....	123
6. Diskussion .....	126
7. Zusammenfassung .....	140
7.1. Abstract .....	141
8. Abbildungsverzeichnis .....	143
9. Literaturverzeichnis .....	146
10. Anhang .....	165
11. Schriftliche Erklärung.....	171

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter.<sup>1</sup> Zytologisch gehört das Neuroblastom zur Gruppe der klein-, blau-, rundzelligen Tumore. Zu dieser Gruppe von zytologisch ähnlichen Tumoren gehören auch das Rhabdomyosarkom, das Ewing-Sarkom, der periphere neuroektodermale Tumor, die Non-Hodgkin-Lymphome und die Leukämien.<sup>2</sup>

Beim Neuroblastom werden 3 histologische Subtypen mit verschiedenen Ausreifegraden und biologischen Eigenschaften unterschieden: Neuroblastom, Ganglioneuroblastom und das Ganglioneurom. Neuroblastome gehören auch zur besonderen Gruppe der embryonalen Tumore.<sup>3</sup> Die Tumorzellen der Blastome zeichnen sich durch ihren gemeinsamen Ursprung aus früh entarteten Vorläuferzellen einer Organanlage aus. Im Fall des Neuroblastoms sind die Vorläuferzellen Zellen aus der Neuralleiste. Dieses Merkmal steht auch im Einklang mit der charakteristischen Lokalisation der Primärtumore zur Zeit der Diagnosestellung. Weil sich Neuroblasten später zum sympathischen Nervensystem entwickeln, können Primärtumore überall dort auftreten, wo sich sympathisches Gewebe im Körper findet: Nebennieren, zervikaler, thorakaler und abdomineller Grenzstrang und Paraganglien, nicht aber im Gehirn.<sup>4</sup>

Weitere biologische Merkmale des Neuroblastoms sind die Heterogenität, sowie die variablen klinischen Verläufe der Erkrankung. Für die Heterogenität spricht das Vorhandensein von unterschiedlich differenzierten Tumoren. Für die variablen Verläufe spricht, dass das Neuroblastom sogar im metastasierten Stadium 4S mit minimaler oder selbst ohne Behandlung spontan regredieren kann. Infolgedessen scheint es so zu sein, dass das Neuroblastom ein diagnostischer Begriff ist, für in Bezug auf ihre Entwicklung verwandte Tumore mit unterschiedlichen genetischen und biologischen Eigenschaften, die mit verschiedenen klinischen Verläufen assoziiert sind.<sup>5</sup>

Aufgrund dieses eigenartigen Verhaltens und obwohl signifikanter Fortschritt in den Bereichen Erkennung von genetischen und molekularen Markern, Therapie

und Diagnostik erreicht wurde, bleibt das Neuroblastom eine rätselhafte Herausforderung.<sup>6</sup>

### **1.1.1 Klinik und Epidemiologie**

Die Klinik des Neuroblastoms ist abhängig von der Lokalisation des Tumors. Mögliche Symptome sind Abdomenvorwölbung, Harnstau, ein Hörner Syndrom (bei Lokalisation im Hals), Husten, Dyspnoe, Atemnot (intrathorakaler Lokalisation), Querschnittslähmung (im Falle eines Sanduhr Tumors) und Lidchymosen (bei Beteiligung der Orbita).<sup>7</sup> Allgemeinsymptome wie Fieber, Schmerzen, Inappetenz, Abgeschlagenheit sowie Knochenschmerzen stehen beim metastasierten Neuroblastom im Vordergrund. Manchmal können Symptome auftreten, die sich durch vom Tumor produzierte Hormone entwickeln, wie arterielle Hypertonie und chronische Diarrhö.<sup>7</sup>

In Deutschland erfasst das Kinderkrebsregister die wichtigsten epidemiologischen Daten des Neuroblastoms. Insgesamt ist die Inzidenz bei Kindern unter 1 Jahr am größten mit einer Rate von 82,4 pro 1 Mio., ab diesem Zeitpunkt sinkt die Inzidenz der Erkrankung immer weiter und nähert sich mit einem Alter von 15 Jahren Richtung Null (altersspezifische Inzidenz 10-14 J. = 0,7). Die geschlechtsspezifische Inzidenz ist bei Jungen höher als bei Mädchen. Die Sex ratio (m/w) beträgt 1,3.<sup>8</sup> 90% der Patienten sind zur Zeit der Diagnosestellung jünger als 5 Jahre.<sup>9</sup>

### **1.1.2 Diagnostik, Stadieneinteilung und Prognose**

Die verschiedenen diagnostischen Maßnahmen haben als Ziel die sichere Unterscheidung des Neuroblastoms von anderen Tumorerkrankungen, präoperativ ein Staging der Patienten zu ermöglichen und im Verlauf die Aktivität der Erkrankung zu erfassen. Sowohl diagnostisch als auch als Verlaufsparemeter ist die Bestimmung von den Katecholaminabbauprodukten Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im Urin unerlässlich. Als weiterer Tumormarker eignet sich die NSE (Neuronspezifische Enolase).<sup>10</sup>

Durch bildgebende Verfahren kann die Ausdehnung der Erkrankung bestimmt werden. Je nach Fragestellung kommen die folgenden Verfahren zum Einsatz:

Sonografie und MRT (Infiltration vom Primärtumor, Lymphknoten und Metastasen), Szintigrafie mit Metajodbenzilguanidin (mIBG) (Metastasensuche) oder ein Technetiumszintigramm (Skelettmastasen). Um einen Befall des Knochenmarks auszuschließen, muss bei jedem Patienten das Knochenmark an mehreren Stellen punktiert werden. Immunfärbungen bzw. neuroblastomspezifische RT-PCR erhöhen die Sensitivität.<sup>4</sup>

Es existieren aktuell zwei Systeme, die eine Stadieneinteilung des Neuroblastoms erlauben: das International Neuroblastoma Staging System (INSS) (1988) und das International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) (2008)<sup>11</sup>. Das erste System INSS ist ein chirurgisches Staging System, das auf dem Ausmaß der Tumorsektion basiert.<sup>12</sup> Die Tabelle 1 fasst das INSS zusammen.

<b>Stadium</b>	<b>Ausdehnung</b>
<b>1</b>	Lokalisierter Tumor, makroskopisch komplette Entfernung.
<b>2</b>	Unilateraler Tumor, makroskopisch inkomplette Entfernung mit oder ohne regionalen Lymphknotenbefall.
<b>3</b>	Nichtresektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie.
<b>4</b>	Disseminierung des Tumors. Befall vom Knochenmark, Knochen, Lymphknoten, Leber, Haut oder andere Organe. Das Befallmuster entspricht nicht den Kriterien des 4S Stadiums
<b>4S</b>	Alter (<1Jahr). Primärtumor wie Stadium 1 oder 2 und Disseminierung nur in Haut, Leber und/oder Knochenmark.

**Tabelle 1.** Stadieneinteilung des Neuroblastoms. Nach International Neuroblastoma Staging System (INSS).<sup>12</sup>

In der neuen Stadieneinteilung des International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS, siehe Tabelle 2) hängt die Stadieneinteilung nicht mehr vom Ausmaß der Resektion, sondern von 20 definierten bildlichen Risikofaktoren (Image-Defined Risk Factors (IDRFs)) ab,<sup>13</sup> die zur Zeit der Diagnosestellung durch bildgebende Verfahren erfasst werden. Örtlich begrenzte Tumore werden in die Kategorien L1/L2 eingeteilt. Disseminierte Tumore werden

in die Kategorien M oder MS eingeteilt. Die Einstufung in Kategorie MS ist nur für disseminierte Tumore erlaubt, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt werden: Alter < 18 Monate (547 Tage), bei lokalisierten Metastasen an der Haut, Leber und oder Knochenmark und wenn der Knochenmarkbefall im Abstrich oder Biopsie < 10% beträgt.<sup>14</sup>

<b>Stadium</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>L1</b>	Lokal begrenzter Tumor, ohne Beteiligung von Vitalstrukturen, wie in der Liste der bildlichen Risikofaktoren definiert. Tumor auf ein Kompartiment begrenzt
<b>L2</b>	Lokal begrenzter Tumor mit einem oder mehreren definierten bildlichen Risikofaktoren
<b>M</b>	Entfernte Filiae (außer wie bei MS Stadium)
<b>MS</b>	Metastasiertes Stadium, Kinder <18 Monate, Metastasen an Haut, Leber und oder Knochenmark

**Tabelle 2.** Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS).<sup>13</sup>

Um eine Therapie im Rahmen von klinischen Studien einzuleiten, ist allein die Erfassung des Staging meist nicht ausreichend. Zusätzlich müssen die biologischen Risikofaktoren und die Histologie des Tumors bekannt sein. Diese Faktoren beeinflussen das Ausmaß der Therapie und die Prognose der Patienten maßgeblich. Aus der Histologie, molekularbiologischen sowie immunhistochemischen Untersuchungen von Tumor und unter Einbezug von klinischen Parametern wird eine Risikostratifizierung der Patienten in verschiedene Risikogruppen erstellt. Risikogruppen sind wichtig für die Behandlung des Neuroblastoms im Rahmen von klinischen Studien. Die klinischen Studien, die eine solche Risikostratifizierung der Patienten vor Therapieeinleitung voraussetzen, sind risikobasierten Studien. Diese Studien ermöglichen die Beurteilung von Risikofaktoren und der Effektivität eines untersuchten Therapieansatzes. Vor allem in der pädiatrischen Onkologie haben diese Studien als Ziel die Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen bei Patienten mit niedrigem Risiko. Nachfolgend werden die 2 gültigen

Klassifikationssysteme für das Neuroblastom vorgestellt, die eine Einteilung in verschiedenen Risikogruppen erlauben.

Auf der einen Seite steht das International Neuroblastoma Pathology Classification System (INPC) (1999).<sup>15</sup> Dieses System prüft folgende morphologische Kriterien: Schwan-Stroma Anteil, Mitose-Karyorrhexis-Index (MKI) und der Ausreifegrad der Neuroblasten. Bei dem INPC System wird auch das Alter des Patienten berücksichtigt. Mit dieser Information werden Patienten in 2 Prognosegruppen eingeteilt: Patienten mit einer günstigen Prognose und mit ungünstiger Prognose.<sup>15</sup> Die prognostische Bedeutung dieses Klassifikationssystems und von verwandten Systemen mit ähnlichen Kriterien wurde durch mehrere Studien bestätigt.<sup>9</sup> Diese Klassifikation wurde in den vergangenen Jahren in mehrere multinationalen Studien der COG (Children Oncology Group) und in europäische Studien einbezogen und nach und nach ergänzt. Die Tabelle 3 fasst das 3-Jahres ereignisfreie Überleben (EFS= Event free Survival) für Patienten in den prognostischen Gruppen des INPC zusammen.

<b>Prognosegruppe</b>	<b>3-Jahres Ereignisfreies Überleben (EFS) (%)</b>
<b>Günstige Histologie</b>	85 %
<b>Ungünstige Histologie</b>	41 %

**Tabelle 3.** Die International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System).<sup>15</sup>

Als Ereignisfreies Überleben (EFS) wird die Zeit definiert bis zur Progression, Auftreten eines Rezidivs, Zweittumore oder Tod. Zahlenangaben in Prozent.

Auf der anderen Seite steht das International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System (2008), kurz INRGCS.<sup>16</sup> Dieses neue Klassifikationssystem setzt sich aus den Faktoren zusammen: INRG Staging, Alter, histologische Kategorie, Grad der Tumordifferenzierung, MYCN Onkogen Status, Chromosom 11q Status und die DNS Ploidität. Das INRGCS ist die Folge der Evaluation von 13 potentiell prognostischen Faktoren aus einer Kohorte von 8800 Patienten aus USA, Europa und Australien und es erlaubt im Vergleich zur INPC eine bessere Einteilung der Patienten in 4 Risikogruppen und 16

Untergruppen: (A,B,C) Sehr niedriges Risiko, (D,E,F) Niedriges Risiko (G,H,I,J) Mittleres Risiko, und (K,N,O,P,Q,R) Hochrisiko. Das INRGCS soll erleichtern Risiko basierte klinische Studien aus verschiedenen Regionen der Welt besser untereinander zu vergleichen.<sup>16</sup> Für die jeweiligen Risikogruppen innerhalb des INRGCS fasst Tabelle 4 das 5-Jahres ereignisfreie Überleben (EFS=Event free Survival) zusammen. Die Tabelle 5 fasst die 5-Jahres Überlebensrate aller Patientengruppen zusammen.

<b>INRG Risikogruppe</b>	<b>5-Jahres EFS %</b>
<b>Sehr niedrig</b>	> 85
<b>Niedrig</b>	>75 bis <85
<b>Mittel</b>	>50 bis <75
<b>Hoch</b>	< 50

**Tabelle 4.** 5 Jahre Überleben nach INRG Risikogruppe. Aus The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report.<sup>16</sup>

Als Ereignisfreies Überleben (EFS) wird die Zeit definiert bis zur Progression, Auftreten eines Rezidivs, Zweitumore oder Tod. Zahlenangaben in Prozent.

<b>Risikogruppe</b>	<b>5 Jahres-Überlebensrate %</b>
<b>Niedrigrisiko</b>	99 – 91. <sup>17</sup>
<b>Mittleres Risiko</b>	99. <sup>18</sup> - 76,4. <sup>19</sup>
<b>Hochrisiko</b>	30 – 40. <sup>4</sup>

**Tabelle 5.** 5-Jahres Überlebensrate nach Risikogruppe.

Die 5 Jahres Überlebensrate gibt an wie viele Krebspatienten 5 Jahre nach Zeitpunkt der Diagnose noch leben. Zahlenangaben in Prozent.

## **1.2 Aktuelle Therapieansätze**

Niedrigrisiko-Patienten können erfolgreich alleine durch Chirurgie behandelt werden. Patienten mit mittlerem Risiko wird ein Therapiekonzept mit einer Kombination von niedrig dosierter Chemotherapie und Chirurgie angeboten. Die Chemotherapie kann entweder vor Chirurgie oder vor und nach Chirurgie gegeben werden. Die verschiedenen Chemotherapieregime umfassen die



kombinierte Gabe von Carboplatin, Etoposid, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Vincristin. Die modernen Therapieregime für Patienten mit hohem Risiko erfolgen in 3 Phasen; Induktionsphase, Konsolidierungsphase und Postkonsolidierungsphase. Die Induktionsphase setzt sich zusammen aus intensiver Chemotherapie und Chirurgie. In der Konsolidierungsphase erfolgt eine myeloablative Chemotherapie, autologe Stammzellrückgabe und Bestrahlung im Bereich des Primärtumors und der Restmetastasen. Die europäische Studie HR-NBL1/SIOPEN (2017) konnte die Überlegenheit einer Konsolidierungstherapie mit Busulfan und Melphalan gegenüber einer Hochdosistherapie mit Carboplatin, Etoposid und Melphalan belegen. Für die Kombination Melphalan und Busulfan wurde eine bessere 3-Jahres ereignisfreie Überlebensrate (50% versus 38 %) und weniger Toxizität beobachtet. In dieser Studie wird diese Kombination als Standard vorgeschlagen.<sup>20</sup>

Die Postkonsolidierungstherapie soll die potenzielle minimale Resterkrankung nach Stammzellrückgabe beseitigen und besteht aus Dinotuximab (Anti GD2 Antikörper) kombiniert mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), Interleukin-2 (IL-2) und Isotretionin.<sup>17</sup> Die Postkonsolidierungstherapie mit Dinotuximab in Kombination mit GM-CSF, IL-2 und Isotretionin erhöhte innerhalb einer Beobachtungszeit von 2 Jahren das ereignisfreie Überleben und das Gesamtüberleben im Vergleich zu einer Postkonsolidierungstherapie mit Isotretionin alleine (66% versus 46%; 86% versus 75%)<sup>21</sup> und ist zur Zeit als Standard anzusehen.<sup>9</sup>

### **1.3 Die Problematik der Therapieresistenz**

Eine besonders schwierige Situation tritt auf im Fall von Tumorprogression oder Metastasierung nach initialer Chemotherapie und/oder Chirurgie. In diesem Fall ist möglich, eine erneute Polychemotherapie zu geben. <sup>131</sup>Iod Meta-Jod-Benzylguanidin (<sup>131</sup>I-MIBIG) allein oder in Kombination mit anderen Substanzen oder gefolgt von Stammzellrückgabe oder eine zweite autologe Stammzelltransplantation sind einige der weiteren Möglichkeiten. Trotz der Fülle an Therapieoptionen konnte bisher keiner der genannten Ansätze eine aussichtsvolle Prognoseverbesserung für den Patienten erzielen. Die Frage nach

dem Ursprung der Therapieresistenz entsteht aus diesem Kontext und auch gleichzeitig die Suche nach den dazugehörigen biologischen Merkmalen.

Als Antwort zu dieser Problematik werden derzeit gezielt neue Wirkstoffe entwickelt. Einige in Erprobung befindliche Wirkstoffe und Therapiekonzepte werden in Tabelle 6 zusammengefasst. Weitere Antworten zu diesen Fragen könnten entstehen durch Erforschung der Bereiche Neuroblastom-Krebsstammzellen und Zytostatika adaptierte Neuroblastom Zelllinien.

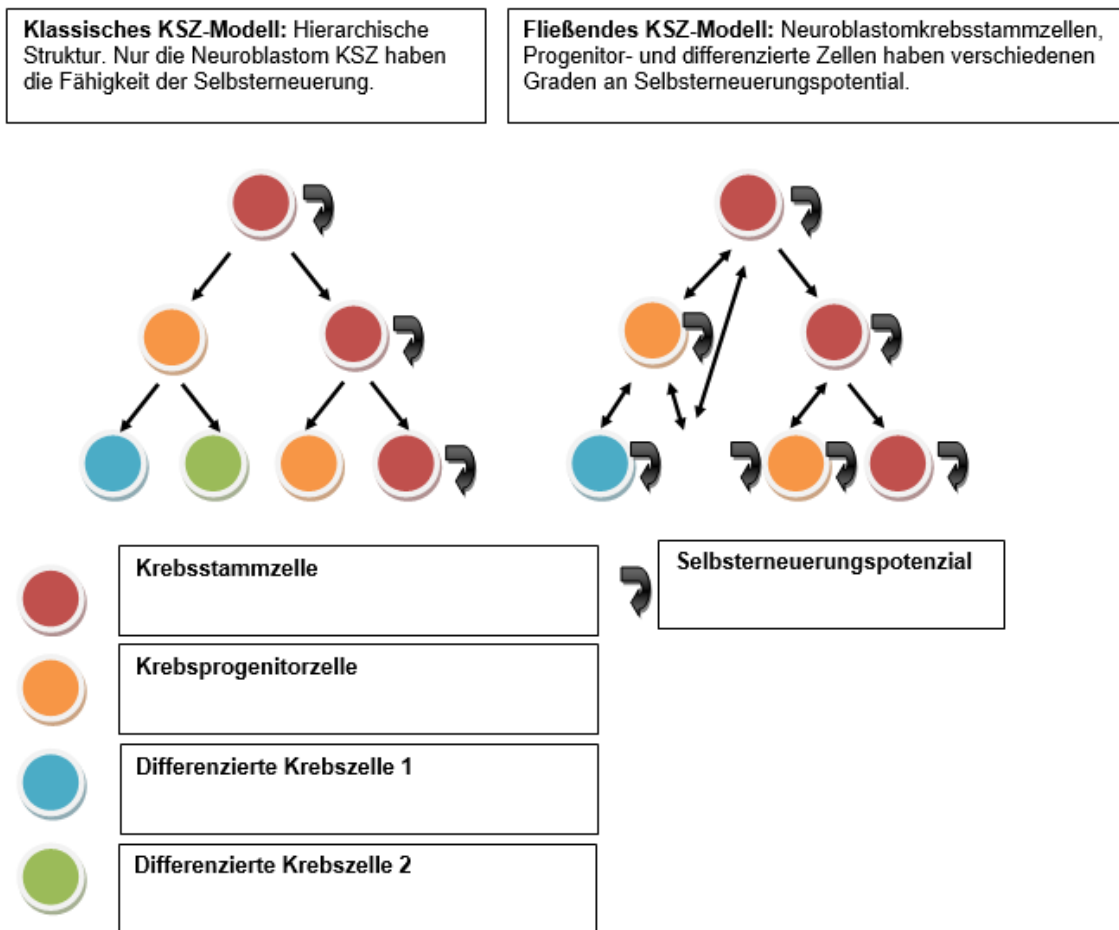
<b>Zielstruktur und Mechanismus</b>	<b>Wirkstoff</b>
<b>Aurora Kinase (Inhibition)</b>	MLN8237 (Alisertib) (in Kombination mit Irinotecan und Temozolomid) <sup>22</sup>
<b>MYCN (Destabilisierung)</b>	JQ1 <sup>23</sup> : BRD4 Bromodomäne Inhibition
<b>Downstream Ziele von MYCN: Ornithidecarboxylase (Inhibition)</b>	DMFO (Difluoromethylornithin) <sup>24</sup> 4MCHA. <sup>25</sup> Polyamidsynthese hemmer SAM486A. <sup>25</sup> S-adenosylmethionine decarboxylase Hemmer.
<b>ALK: Anaplastic lymphoma kinase (Inhibition)</b>	Crizotinib <sup>17</sup> (in Kombination mit Topotecan+ Cyclophosphamid) RXDX-101 (Entrectinib) <sup>26</sup> LDK-378 (Ceritinib) <sup>17</sup>
<b>Angiogenese: VEGF (Inhibition)</b>	Bevacizumab <sup>27</sup> (in Kombination mit Temozolomid +- Irinotecan)
<b>GD2 (Impfung)</b>	Bivalente Impfung (GD2/3) <sup>28</sup>
<b>Zelltherapie: GD2</b>	GD2 Chimeric Antigen Rezeptor T-Zellen <sup>29</sup>

**Tabelle 6.** Gezielte Therapiemöglichkeiten beim Neuroblastom. Zusammenfassung von Zielstrukturen und Wirkstoffen.

MYCN: MYCN Gen (kodiert das Protein N-myc); VEGF: Vascular endothelial growth factor; GD2-3: Ganglioside GD II und GD II; JQ1: [(S)-4-(4-Chlorophenyl) - 2,3,9 – trimethyl - 6H-1-thia-5,7,8,9a-tetraaza-cyclopenta [e]azulen-6-yl]-acetic acid tert-butyl ester; BRD4: Bromodomain-containing protein 4; 4MCHA: Trans-4-methylcyclohexylamine; SAM486A: Sardomozyde HCL.

## 1.4 Die Rolle von Krebsstammzellen beim Neuroblastom

Die verschiedenen Theorien der Krebsstammzellen besagen, dass Krebsstammzellen (KSZ, auch Cancer Stem cells) die Ursache für Entstehung, Wachstum und Metastasen beim Krebs sind.<sup>30</sup> Außerdem wird postuliert, dass Krebsstammzellen chemoresistent sind<sup>31</sup> und Selbsterneuerungspotenzial haben. Darüber hinaus sollen Krebsstammzellen in der Lage sein zu differenzieren und somit sind sie für die zelluläre Tumorerheterogenität verantwortlich.<sup>32</sup> Aktuell werden drei verschiedene Krebsstammzellmodelle postuliert, das klassische, das fließende und das konvergente KSZ-Modell (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2). Diese Modelle könnten auch beim Neuroblastom gültig sein.



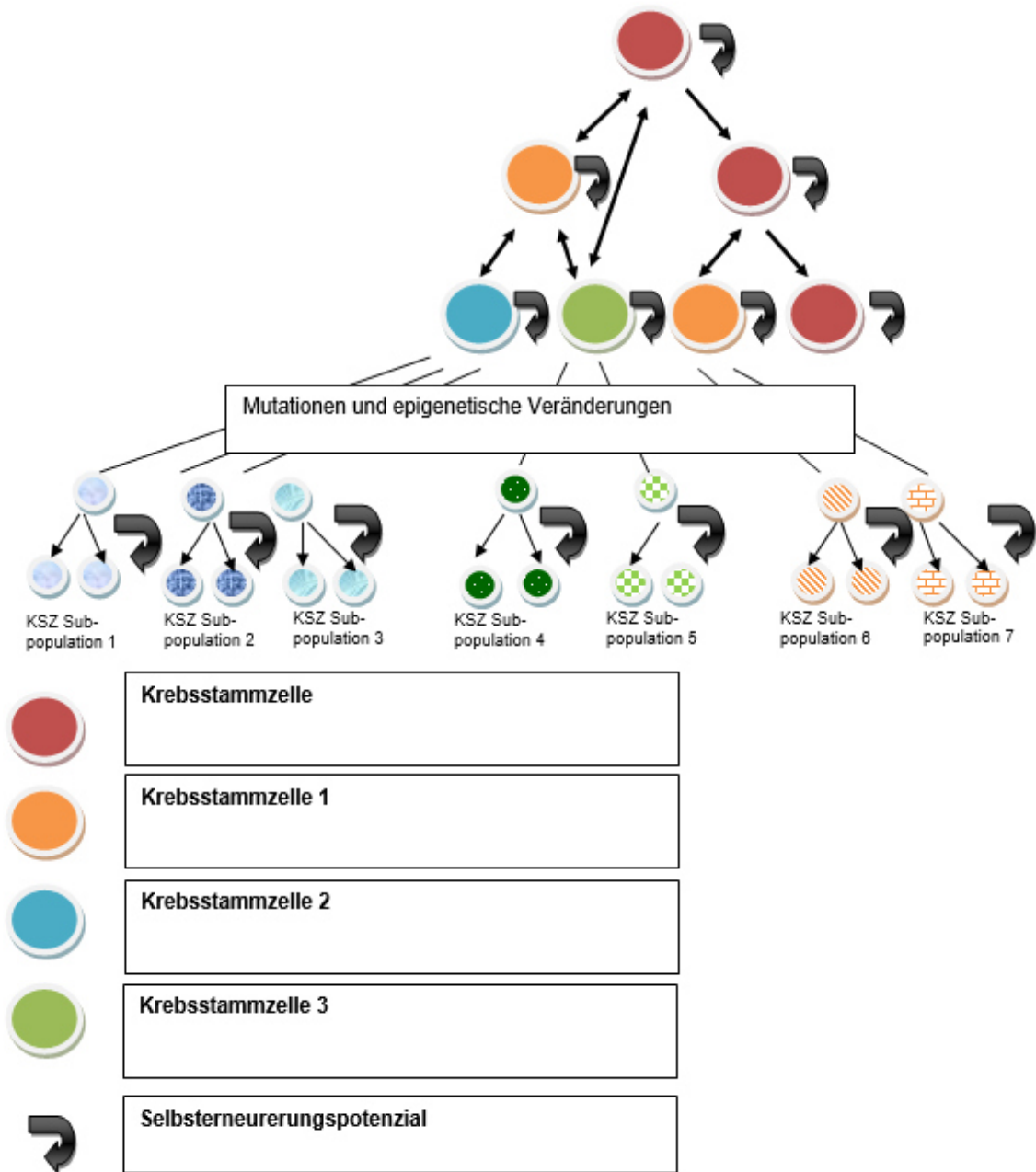
**Abbildung 1.** Das klassische und das fließende KSZ-Modell. Mod. u. übersetzt nach O'Connor, et al.<sup>33</sup>

KSZ: Krebsstammzelle.

Im klassischen KSZ-Modell gibt es nur eine Zellpopulation innerhalb vom Tumor mit der Fähigkeit der Selbsterneuerung, nämlich die Krebsstammzellen. Demgegenüber sind Progenitorzellen und differenzierte Tumorzellen nicht in der Lage sich selbst zu erneuern. Im klassischen Krebsstammzellmodell unterscheiden sich die Krebsstammzellen von gesunden Stammzellen nur durch unkontrolliertes Wachstum. Wenn das klassische KSZ-Modell auf das Neuroblastom übertragen wird, dann ist anzunehmen, dass alleine die Krebsstammzellen die treibende Kraft der Tumorgenese sind. Es würde auch bedeuten, dass nach Chemotherapie nur die Neuroblastomkrebssstammzellen überleben und aus ihnen entstehen erneut Tumore. Wenn diese Hypothese wahr ist, wäre eine gezielte Therapie gegen die Neuroblastomkrebssstammzellen sehr erfolgsversprechend für alle Patienten mit Neuroblastom.

Das fließende Modell unterscheidet sich vom klassischen KSZ-Modell darin, dass sowohl Progenitorzellen als auch differenzierte Tumorzellen ein gewisses Selbsterneuerungspotenzial besitzen und wiedererlangen können.<sup>33</sup> Die Hierarchie der unterschiedlichen Tumorzellen ist in diesem Modell lockerer als im klassischen KSZ-Modell. Das heißt, alle Tumorzellen sind mehr oder weniger fähig den Tumor zu regenerieren. Progenitorzellen sowie differenzierte Tumorzellen können auch zur Progression der Erkrankung führen und Metastasen hervorrufen.

Zuletzt postuliert das konvergente KSZ-Modell, dass die klonale Evolution und die Krebsstammzellen zusammen die zelluläre Hierarchie innerhalb des Tumors bestimmen. Abhängig von Mutationen und epigenetischen Veränderungen in Zellen mit Selbsterneuerungspotenzial entstehen unterschiedliche KSZ-Subpopulationen.<sup>33</sup>



**Abbildung 2.** Das konvergente Krebsstammzellmodell Mod. u. übersetzt. nach Michael L. O'Connor, et al. <sup>33</sup>

**Abkürzungen:** KSZ: Krebsstammzelle.

Zusammengefasst könnten alle vorgestellten Modelle sowohl die Rezidivneigung als auch die Therapieresistenz, die bei Hochrisiko-Patienten beobachtet wird, erklären. Falls die Neuroblastomkrebssstammzellen die Ursache für die Progression der Erkrankung und die Entstehung von Metastasen sind, wäre eine Therapie, die speziell die Neuroblastomkrebssstammzellen und ihre Abstammung beseitigen würde, für Hochrisikopatienten vielversprechend.

Tatsächlich sprechen mehrere Daten aus zahlreiche Publikationen für die Existenz und die entscheidende Rolle von Krebsstammzellen beim Neuroblastom. Diese Neuroblastom Krebsstammzellen sollen nur einen Teil der gesamten Krebszellen ausmachen und konnten bisher sowohl in Schnittpräparaten aus exzidierten Tumoren/Metastasen als auch in etablierten Neuroblastom Zelllinien gefunden werden (Tumor/Metastase<sup>34</sup>: 1%-90%; Zellkultur<sup>35</sup>: 4%-37%). Die von mehreren Autoren postulierten Neuroblastom Krebsstammzellen zeichnen sich aus durch: Multipotenz,<sup>36</sup> höheres Malignitätspotenzial, höhere Tumorigenität (in immun defizienten Mäusen), N-myc Amplifikation unabhängiges Malignitätspotenzial<sup>37</sup> und erhöhte Resistenz zu Zytostatika; im engeren Sinne zu Cisplatin, Etoposid, Doxorubicin und Carboplatin.<sup>30,38</sup> Aus Metastasen isolierte Neuroblastomkrebstammzellen sind in der Lage sowohl in serumfreiem Medium zu wachsen als auch Sphären zu bilden und haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Vieler dieser biologischen Eigenschaften gleichen der der Vorläuferzellen der Neuralleiste<sup>39</sup> oder wurden bisherig als Eigenschaften der Krebsstammzellen beschrieben. Zuletzt zeigten Untersuchungen an Schnittpräparaten von Patienten mit Neuroblastom, dass ein höherer Anteil an Krebsstammzellen mit Erkrankungsprogression, Metastasen und höherem Alter der Patienten (>1,5 J) bei der Diagnosestellung korreliert.<sup>34</sup>

Obwohl diese Daten tiefgreifende Implikationen zu haben scheinen, muss betont werden, dass es bisher noch keine Einigung gibt über die richtige Methode, die eine eindeutige Charakterisierung und Isolierung der Neuroblastom Krebsstammzellen erlaubt. Einige grundlegende Probleme sind:

1. Die unterschiedlichen Methoden zur Isolierung von Krebsstammzellen sind nicht weitreichend miteinander verglichen worden. Dies bedeutet, dass im Moment nicht festgestellt werden kann, ob die unterschiedlichen Methoden die gleichen Tumorstammzellen detektieren.
2. Im Moment ist noch nicht geklärt, welcher der zahlreichen Marker die höchste Spezifität und die höchste klinische Relevanz aufweist.

Somit sind die vorhin beschriebenen Eigenschaften der sogenannten Neuroblastom Krebsstammzellen stets kritisch zu betrachten und es muss gesagt werden, dass in diesem Bereich noch weitere Forschung zwingend notwendig ist.

Bisher benutzten unterschiedliche Autoren hauptsächlich 3 verschiedene Verfahren, mit deren Hilfe die Neuroblastomkrebstammzellen detektiert oder angereichert werden konnten. Das erste Verfahren beruht auf der Co-Expression von Markerproteinen. Das zweite Verfahren beruht auf der durchflusszytometrischen Analyse des Ausstroms von Hoechst 33342.<sup>34</sup> Ein weiteres Verfahren, wodurch neuronale Krebsstammzellen angereichert werden können, ist das Neurosphere Assay. Dieses Verfahren ist insofern anders als die zuletzt erwähnten Verfahren, denn es kann alleine nicht zwischen Neuroblastomkrebstammzellen und nicht-Krebstammzellen unterscheiden. Folgend werden die Hintergründe der verschiedenen Verfahren erläutert.

#### **1.4.1 Charakterisierung durch Co-Expression von Markerproteinen**

In diesem Bereich sind hervorzuheben die Arbeiten der Gruppe von Ross, Robert A. Diese Gruppe charakterisierte zunächst nur innerhalb von Neuroblastomzelllinien 3 unterschiedliche natürlich vorkommende Neuroblastom Zelltypen. Diese Zelltypen wurden nach ihrer Morphologie als N (Neuroblastic Type), I (Intermediate Type) oder S (Substrate-Adherent Type) bezeichnet und unterschieden sich nicht nur morphologisch, sondern auch durch ihre biologischen Eigenschaften.



Der N-Zelltyp zeigte biologische Eigenschaften von embryonalen Sympatoblasten und der S-Zelltyp Eigenschaften von embryonalen Schwann/Glia/Melanozyten-Zellen der Neuralleiste.<sup>40</sup> Die Schlüsselstellung des I-Zelltyps wurde dargelegt als gezeigt werden konnte, dass der I-Zelltyp in der Lage war zum N- oder S-Zelltyp auszudifferenzieren.<sup>40</sup> Auffallend war auch die Tatsache, dass der I-Zelltyp die gleichen Differenzierungsmarker wie die beiden anderen Zelltypen aufwies. Der I-Zelltyp wurde postuliert als die Tumorstammzelle des Neuroblastoms und vorgeschlagen als die Ursache für Tumorgenese und Tumorwachstum bei Patienten.<sup>37</sup> Später konnte der I-Zelltyp auch innerhalb von exzidierten Tumoren nachgewiesen werden, was auf seine klinische Relevanz deutete.<sup>37</sup> Die von dieser Gruppe präsentierte Charakterisierung der Neuroblastomzelltypen stützt sich auf: Morphologie, biochemische und immunhistoschemische Untersuchungen sowie auf bekannte Stammzellmarker. Eine Liste der Marker zur Abgrenzung der Neuroblastomkrebstammzelle I-Zelltyp von den N- und S-Zelltypen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Protein Marker	N (Neuroblastic)	I (Intermediate)	S (Substrat Adherent)
<b>Neuroblastisch</b>			
Neurofilamente 70/16	++	+	-
Dopamin $\beta$ Hydroxylase	++	+	-
Secretogranin II	++	+	-
HuD	+++	++	-
<b>Nicht-Neuronal</b>			
Fibronectin	-	+	++
Thyrosinase	-	+/-	++
EGF Rezeptor	+/-	++	+++
NRSF	-	+	+++
<b>Stammzellmarker</b>			
Nestin*	++	++	++
CD133*	-	++	-
c-Kit*	+/-	++	-

**Tabelle 7.** Expression der Markerproteine in humanen Neuroblastom Zellvarianten. Aus Human Neuroblastoma Stem cells, Ross, et al.<sup>34</sup>

HuD: auch bekannt als ELAV-like protein 4; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; NRSF: Neuron-Restrictive silencer Factor, CD133: auch bekannt als Prominin-1, c-KIT: auch bekannt als Tyrosinkinase KIT oder CD117. +++ Hohe Expression; ++ Mäßige Expression; + wenig Expression; +/- seltene Expression; - Keine Expression.

## 1.5 Charakterisierung durch Ausstrom von Hoechst 33342 (Side population Assay)

Hirschmann et al untersuchten Patientenmaterial durch die Methode des Side population Assays. Hierdurch ließen sich 2 verschiedene Neuroblastom Zellpopulationen von einander abgrenzen: side population Zellen (SP-Zellen) und nicht side population Zellen. Nicht SP-Zellen machten den größten Teil der gesamten Zellpopulation aus und die SP-Zellen nur einen kleinen Anteil. SP-Zellen unterscheiden sich von den nicht SP-Zellen durch asymmetrisches Wachstum<sup>35</sup>, hohe Expression von GD2, c-kit/CD117, sowie niedrige Expression von CD133, CD71/Transferrin Rezeptor 1 und CD56/NCAM als Zeichen für einen frühen undifferenzierten Neuralleistenphänotyp.<sup>35</sup> Weitere Merkmale der SP-Zellen waren höhere Expression von ABCG2/BCRP und ausdauerndes Wachstum *ex Vivo*. Aufgrund dieser Ergebnisse vermutete die Arbeitsgruppe von Hirschmann, dass die Zellen innerhalb der side population Neuroblastomkrebstammzellen sein könnten.

Die biologische Basis der side population-Analyse stammt aus vorhergehenden Beobachtungen aus Tierexperimenten, wo hämatopoetische Stammzellen aussortiert und in lethal bestrahlten Mäusen transplantiert wurden.<sup>41</sup> Erste Untersuchungen mit dem Farbstoff Hoechst 33342 zeigten, dass sich die Methode nicht nur hervorragend zum Aussortieren von Maus-hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark eignete,<sup>41</sup> sondern auch zum Aussortieren von Stammzellen aus Muskelgewebe. Die durch SP-Analyse isolierten Muskelgewebestammzellen zeigten darüber hinaus das Phänomen der Transdifferenzierung, d.h., Stammzellen aus Muskelgewebe konnten erstaunlicherweise auch die unterschiedlichen Zelllinien des Knochenmarks wiederherstellen<sup>42</sup> und somit als hämatopoetische Stammzellen fungieren. Später konnten durch diese Methode viele Stammzellen und Krebsstammzellen aus verschiedenen Geweben isoliert werden. Biochemisch beruht die Methode des side population Assays auf dem stattfindenden Ausstrom des DNS-spezifischen Farbstoffes Hoechst 33342 über die Zellmembran von Zellen der side population.

Die Erklärung für das vergleichsweise hohe Ausströmen dieses Farbstoffes nur innerhalb dieser Population hängt mit der erhöhten Expression des BCRP/ABCG2 Transporters bei den SP-Zellen zusammen.<sup>43</sup> Da durch den side population Assay später auch weitere Stammzellen aus verschiedenen Geweben isoliert werden konnten, wurde BCRP/ABCG2 als genereller Marker der Stammzellen vorgeschlagen.<sup>43</sup>

## 1.6 Neurosphere Assay

Das Neurosphere Assay ist ein spezielles Kulturverfahren. Generell können mit dessen Hilfe Tumorzellen aus Metastasen und Knochenmark *in vitro* angereichert und expandiert werden. Jedoch ist dieses Verfahren nicht so erfolgreich, wenn die Tumorzellen aus Primärtumoren entnommen werden.<sup>44</sup>

Das Kulturmedium des Neurosphere Assays beim Neuroblastom ist serumfrei und enthält bFGF (Basic fibroblast growth factor) und EGF (Epidermal growth factor)<sup>39</sup>. Diese Kulturbedingungen sind die gleichen wie bei der Kultur von Stammzellen aus der Neuralleiste.<sup>45</sup> Die so gewonnenen Neuroblastomzellen werden Tumor initiating cells (TIC) genannt, sind hoch tumorigen, und scheinen nicht hierarchisch organisiert zu sein.<sup>39</sup> Weiterhin wurde gezeigt, dass die Zellen innerhalb der Neurosphaeren sowohl die klassischen Marker des Neuroblastoms aufweisen (NB84, Tyrosin Hydroxylase und Vimentin), als auch Marker von Progenitorzellen der Neuralleiste (Nestin und Fibronectin).<sup>39</sup>

Eine andere Gruppe zeigte, dass diese Zellen auch weitere Stammzellmarker wie BMI-1 und Oct-4 exprimieren. Darüber hinaus können diese Zellen durch Behandlung mit cis- Retinsäure in einen neuronalen Phänotyp differenzieren.<sup>46</sup>

## **1.7 Rollen der untersuchten Stammzellmarker in dieser Arbeit**

### **1.7.1 BCRP**

BCRP/ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein) wurde erstmal 1998 als ein Multidrug-Transporter beschrieben. Dieser ABC-Transporter wird in der Placenta, Blut-Hirn-Schranke, Verdauungstrakt, Brustdrüse, Prostata, Speicheldrüsen sowie in exokrinen Drüsen der Haut exprimiert. In diesen Geweben erfüllt BCRP eine Reihe von physiologischen Aufgaben wie z.B. Entgiftung von Stoffwechselprodukten, Regulation der Homöostase, Absorption von Nährstoffen, und hormonale Regulation.<sup>47</sup>

BCRP ist bei der Erforschung von Resistenzen bei Krebs bekannt geworden, weil es in der Lage ist zahlreiche Anti-Krebs-Medikamente aus der Zelle zu pumpen.<sup>48</sup> Hierunter gehören mehrere klassische Zytostatika wie z. B. Mitoxantron, Etoposid, Doxorubicin (nur bei Gain of Function Mutation: R482G und R482T), 5-Fluoruracil, Methotrexat, sowie Tyrosinkinaseinhibitoren und Photosensibilisatoren.<sup>48</sup> Aufgrund dieser Funktion wird die Expression dieses Transporters bei vielen Tumoren als eine der Ursachen für Chemoresistenz postuliert. Des Weiteren hat dieser Transporter eine wichtige Rolle als Stammzellmarker in der Side-Population-Analyse.

Bekannt regulatorische Elemente der Transkription von BCRP sind HIF1, XBP1, PRB, SP1, Smad2/3, ER $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, AhR, NRF2 und GLI.<sup>47</sup> Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass beim Neuroblastom die Expression von BCRP wie auch die Expression von vielen anderen ABC-Transportern durch MYCN reguliert wird.<sup>49</sup>

Die Rollen von BCRP beim Neuroblastom sind vielfältig und teilweise kontrovers. Hier muss zwingend differenziert werden zwischen der Rolle als Stammzellmarker, prognostischer Faktor und die Rolle bei der Therapieresistenz.

Während der KSZ-Phänotyp in der Zellkultur mit erhöhter Expression von BCRP und ABCA3 verbunden ist,<sup>35</sup> scheint eher eine niedrige Expression von BCRP beim Neuroblastom mit erniedrigtem Überleben zu korrelieren.<sup>49</sup> In dieser Hinsicht ist die Expression von BCRP nur als Merkmal der Neuroblastom KSZ zu sehen und solche Eigenschaften wie Resistenz und Malignität von BCRP positiven Zellen sind unabhängig von diesem Protein zu betrachten. Deshalb kann aktuell noch nicht bestätigt werden, dass BCRP eindeutig in der Entwicklung von Chemoresistenzen involviert ist. Hierfür scheinen eher andere ABC Transporter wie ABCC1 und ABCC4 verantwortlich zu sein.<sup>49</sup>

### **1.7.2 BMI-1**

BMI1 gehört zu der Familie der Polycomb Gruppe (PcG). Die Proteine der Polycomb Gruppe sind Transkriptionshemmer, die das Chromatin epigenetisch modifizieren können und dadurch beteiligt sind an der Etablierung und Aufrechterhaltung des zellulären Schicksals. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle sowohl bei Selbsterneuerung von Stammzellen als auch in der Entwicklung von Krebs<sup>50</sup>. Beim Neuroblastom wird erst in jüngster Zeit die Rolle von BMI1 untersucht. Cui et al zeigten, dass BMI1 nicht nur essentiell für die klonogenische Selbsterneuerung bei Neuroblastom Zelllinien ist, sondern auch, dass das Ausmaß der Expression von BMI1 die Differenzierung der Neuroblastom Zellen reguliert. In dieser Hinsicht förderte das Herunterregulieren von BMI1 durch retrovirale Konstrukte die spontane Differenzierung in einen S-Phänotyp, intermediäre Expression von BMI1 war charakteristisch für den I-Phänotyp und Überregulation von BMI1 führte zur Differenzierung in einen N-Phänotyp.<sup>51</sup>

Mehrere Autoren bestätigen die deutliche Expression von BMI1 sowohl bei Tumorschnitten als auch bei unterschiedlichen Neuroblastom Zelllinien.<sup>52,53</sup> Neue Untersuchungen der Signalwege von BMI1 beim Neuroblastom zeigen, dass BMI1 unwahrscheinlich die Signalwege p14ARF/p16INK4a reguliert, sondern eher in der Regulation der Signalwege von KIF1B $\beta$  und TSLC1 beteiligt ist.<sup>54</sup>

Diese sind wichtige Signalwege von Tumorsuppressorgenen beim Neuroblastom und werden durch die Expression von BMI1 gehemmt. Zusammen sprechen diese Ergebnisse für die Wichtigkeit des Signalweges MYCN/BMI1/Tumorsuppressoren. Dieser Signalweg vermag eine deutliche Auswirkung in der Tumorgenese vom Neuroblastom zu haben und ist somit ein mögliches Ziel für gezielte Therapien beim refraktären Neuroblastom.<sup>55</sup>

### **1.7.3 CD133**

CD133, auch bekannt als Prominin-1, ist ein Membranprotein bestehend aus 5 transmembranären Segmenten und zwei glykosilierten extrazellulären Schleifen. Das Gen PROM1 ist beim Mensch lokalisiert am Chromosom 4p15 und codiert das 120 kD Protein CD133.<sup>56,57</sup> Die Expression von CD133 wird durch 5 alternative Promotoren während der embryonalen Entwicklung reguliert und es zeigen sich auch mehrere Splicevarianten.<sup>58</sup> Obwohl wenig bekannt ist über die natürliche Funktion von CD133, führen beim Mensch manche Mutationen des PROM1 Gens zur Entwicklung einer schweren Makula Dystrophie und zur Degeneration der Retina.<sup>59-61</sup> Charakteristisches Symptom der Patienten ist ein zentraler Visusverlust.

Prominin-1 wird exprimiert bei einer Reihe von normalen Stammzellen sowie Krebsstammzellen, Progenitorzellen, Photorezeptoren und einer Vielfalt von Epithelzellen.<sup>62</sup> Aus diesem Grund wird in einer Reihe von Publikationen CD133 als Stammzellmarker postuliert.<sup>63-66</sup> Dennoch äußerten manche Autoren ihren Zweifel in Bezug auf die Isolierung dieser Stammzellen nur mit der Hilfe von CD133 Antikörpern.<sup>67</sup>

Beim Neuroblastom scheint CD133 eine wichtige Rolle zu spielen, denn CD133 beeinflusst die Differenzierung, die Entstehung von Tumoren in Xenografts und die Ausbildung von Tumorsphären.<sup>55</sup> CD133 scheint diese malignen Eigenschaften der Neuroblastom-KSZ durch einen noch nicht vollständig bekannten Signalweg zu regulieren. Dieser Signalweg führt zur Aktivierung von PI3K/AKT und p38MAPK und zur Suppression der Expression von RET.<sup>62</sup>

Der PI3K/Akt Signalweg ist bei verschiedenen Krebsarten wohlbekannt als einer der potentesten Signalwege zur Aufrechterhaltung des Tumorüberlebens und beim Neuroblastom hängt dieser Signalweg mit niedrigem ereignisfreiem Überleben von Patienten, MYCN Amplifikation, höheres Tumorstadium und ungünstiger Histologie zusammen.<sup>68,69</sup> In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Inhibition dieses Signalweges (durch LY294002) zur Hemmung des Überlebens von CD133+ Zellen führte, darüber hinaus konnte durch die Kombination mit anderen Chemotherapeutika die Anreicherung der CD133+ Subpopulation in Neuroblastom Zelllinien beseitigt werden.<sup>70</sup>

#### **1.7.4 GD2**

GD2 ist ein Glycolipid und gehört zu der Gruppe der Ganglioside. Ganglioside befinden sich an der äußeren Seite der Zellmembran und bestehen aus einem Glycosphingolipid und Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure Neu5Ac oder NANA).<sup>71</sup>

Die chemische Struktur von GD2 wird charakterisiert durch 2 NANA Reste und leitet sich von GD3 ab. GD2 entsteht durch Addition von Gal-NAc durch das Enzym GM2/GD2 Synthase (auch bekannt als  $\beta$ -1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase). Das endterminale Pentaoligosacharid von GD2 bildet das spezifische Epitop, wo die meisten spezifischen Antikörper binden.<sup>72</sup> Physiologisch wird GD2 von neuronalen Stammzellen,<sup>73</sup> mesenchimalen Stammzellen,<sup>74</sup> peripher sympathikoadrenergen Progenitorzellen<sup>75</sup> exprimiert und ist involviert bei der Differenzierung und Proliferation von Neuronen.<sup>76</sup>

GD2 wird aber auch bei embryonalen Tumoren, Knochentumoren, Bindegewebssarkomen, Brustkrebs und bei Tumoren aus der Neuralleiste exprimiert. Außerdem ist GD2 mit der Proliferation, Invasion und Motilität von Krebszellen verknüpft.<sup>72</sup> Diese Eigenschaften könnten sich erklären durch die Interaktion von GD2 mit Rezeptortyrosinkinasen an der Membranoberfläche der Zellen. Während Monosialoganglioside generell negative Regulatoren von Rezeptortyrosinkinasen sind, sind Disialoganglioside (z.B. GD2) meistens Aktivatoren.<sup>77</sup>



GD2 spielt beim Neuroblastom eine entscheidende Rolle als Zielmolekül für die Immuntherapie. Eine Kombinationstherapie bestehend aus gegen GD2 gerichteten monoklonalen Antikörpern, Interleukin-2 (IL-2) oder Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Isotretinoin ist aktuell die Standardtherapie für Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastom. Mehrere Studien konnten die Effektivität dieser Kombination und den Vorteil in Bezug auf das ereignisfreie Überleben und auf das Gesamtüberleben bestätigen.<sup>78,79</sup>

Neue Behandlungsmöglichkeiten und Medikamente könnten entstehen durch die Erforschung von gegen GD2 gerichteten Chimeric Antigen Receptor T-Zellen (CAR T-Zellen), Inhibitoren der Biosynthese von GD2 und Inhibitoren der Interaktion von GD2 mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) an der Membranoberfläche.

### **1.7.5 MDR-1**

MDR-1/ABCB1 ist ein aktives Transporterprotein lokalisiert in der Zellmembran. Unter ATP-Verbrauch kann ABCB1 viele Substanzen aus der Zelle herauspumpen, wie zum Beispiel metabolische Produkte, Lipide, Sterole, Medikamente,<sup>80</sup> Xenotoxine<sup>81</sup> und zelleigene Toxine.<sup>82</sup>

Abgesehen davon scheint ABCB1 auch wichtige Rollen bei verschiedenen humanen Stammzellen zu haben, unter anderem bei hämatopoetischen Stammzellen und neuronalen Stammzellen.<sup>83</sup> Bei den letzteren wird ABCB1 sogar als Stammzellmarker postuliert.<sup>84</sup>

Interessanterweise scheint auch die Side population verschiedener humaner Stammzellen durch einen der beiden ABC Transporter ABCB1 oder BCRP festgelegt zu sein<sup>84</sup> und es ist bekannt, dass Hoechst 33342 ein Substrat von ABCB1 ist.<sup>80</sup>

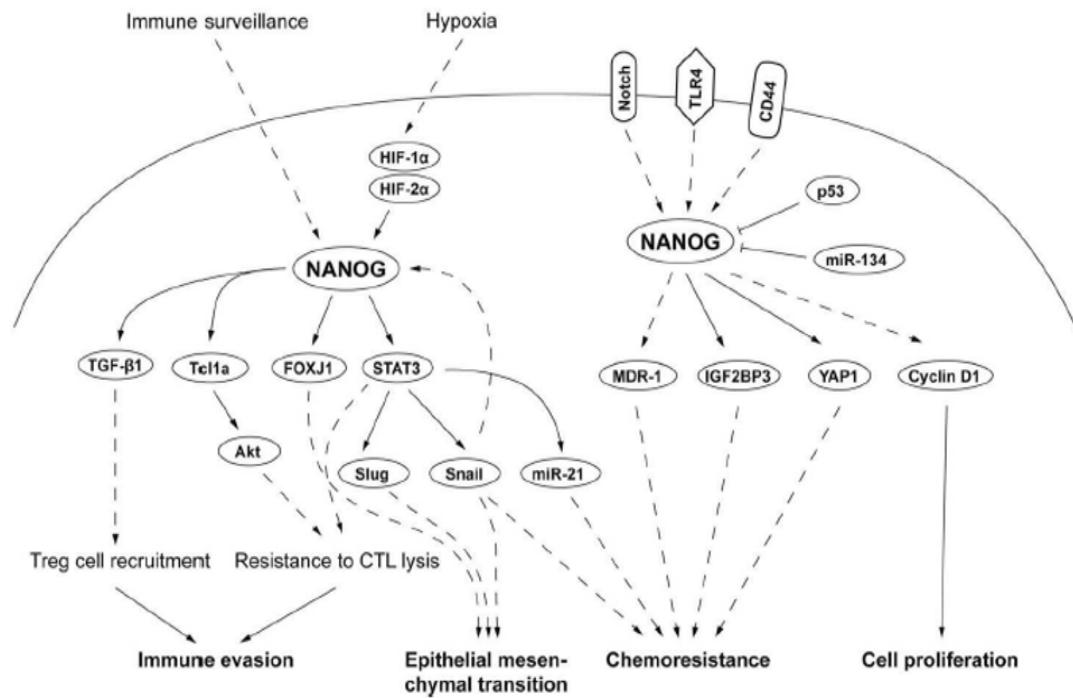
Zahlreiche Zytostatika sind Substrate von ABCB1: Vincaalkaloide (Vincristin, Vinblastin), Anthracycline (Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin), Epipodophyllotoxine (Etoposide, Teniposide), Paclitaxel (Taxol), Actinomycin D, Topotecan, Mithramycin und Mitomycin C.<sup>80</sup> Hiervon sind Vincristin, Doxorubicin, Etoposid und Irinotecan gängige Chemotherapeutika in der Therapie des Neuroblastoms. Zur Zeit ist nicht klar, ob ABCB1 für den Phänotyp der Chemotherapieresistenz beim Neuroblastom ursächlich ist. Obwohl einiges dafür zu sprechen vermag, z.B. erhöhte Expression bei Patienten, die kein Ansprechen nach Chemotherapie hatten<sup>85</sup>, zeigen weitere Studien, dass eine erhöhte Expression von ABCB1 keine Korrelation mit der Prognose hat.<sup>86,87</sup>

Zuletzt scheint bei resistenten Neuroblastomzelllinien die Acetylierung an der DNA die Expression des ABCB1 Transporters zu regulieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem Histon Deacetylase Inhibitor (HDACi) Vorinostat zur Sensibilisierung dieser Zellen führte, als auch zur Verminderung der Expression von verschiedenen Stemness Genen.<sup>88</sup>

### **1.7.6 Nanog**

Das humane Nanog Protein besteht aus 305 Aminosäuren<sup>89</sup> und hat 3 Domänen, eine N-terminale Domäne (ND), eine Homeodomäne (HD), und eine C-terminale Domäne (CD).<sup>90</sup>

Nanog reguliert über mehrere Signalwege als entscheidender Transkriptionsfaktor die Zellproliferation, Chemoresistenz, die Epithelial-Mesenchymale Transition, sowie die Umgehung der Immunantwort bei mehreren Krebserkrankungen und verschiedenen Krebsstammzellen.<sup>91</sup> Darüber hinaus, wenn Nanog zusammen mit OCT4, LIN28, und SOX2 exprimiert wird, ist es in der Lage somatische Zellen in pluripotente ES-like Cells (Embryonic-Stem-like Cells) zu reprogrammieren. Dadurch illustriert Nanog seine zentrale Rolle als Regulator der Stammzellefähigkeit.<sup>92</sup> Wichtige onkogene Signalwege, die Nanog reguliert, sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3.** Regulation verschiedener onkogener Signalwege durch Nanog. Mod.<sup>91</sup>

**Abkürzungen und Symbole:** HIF-1α: Hypoxie-induzierter Faktor 1α-2α, TLR4: Toll-like-Rezeptor 4, CD44: extrazelluläres Matrix Rezeptor III, TGF-β1: Transforming Growth Factor β, Tcl1a: T-cell leukemia/lymphoma Protein 1A, FOXJ1: Forkhead box Protein J1, STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3, MDR-1: Multidrug-Resistance-Protein 1, IGF2BP3: Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3, YAP1: yes-associated protein 1, miR-134: micro RNA134, Akt: Protein kinase B, Slug: Zinc finger protein SNAI2, Snail: Zinc finger protein SNAI1, miR-21: micro RNA 21, CTL: zytotoxischen T-Zellen. Direkte Förderung: —>. Direkte Hemmung: —| . Indirekte Förderung: - -> .

Beim Neuroblastom ist die genaue Funktion von Nanog nicht bekannt. Es ist auch nicht klar inwieweit Nanog den Krebsstammzell-phänotyp regulieren kann und ob die Expression von Nanog einen Einfluss auf Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz hat. Neue Daten belegen, dass in Neuroblastomzelllinien eine positive Korrelation zwischen der Expression von Nanog und NCYM (MYCN Antisense Gene) besteht. Weil Überexpression von OCT4 die Expression von Nanog mRNA induziert, könnte die Korrelation zwischen Nanog und MYCN/NCYM beim Neuroblastom durch den gemeinsamen übergeordneten Regulator OCT4 erklärt werden.<sup>93</sup>

Des Weiteren wurde auch bei Neuroblastom Zelllinien gezeigt, dass eine Behandlung mit CDDP zur Erhöhung von VEGF und Flt1 führt, sowie zur erhöhter Kolonienbildungseffizienz, erhöhter Expression von Stemness-associated Genes, Nanog, BMI1, OCT4 und zur Erhöhung des Side population Anteils<sup>94</sup>. Gewonnene Neuroblastom Zelllinien aus Rezidiven weisen im Vergleich zu gewonnenen Zelllinien vor Chemotherapie eine erhöhte Expression von Nanog und OCT4 auf.<sup>95</sup>

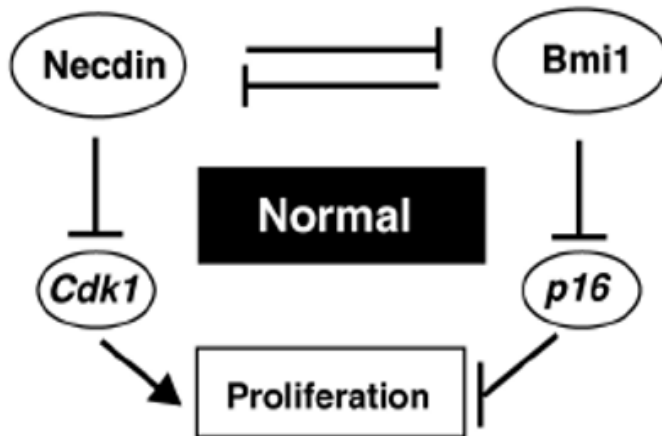
Bisher konnte in einer kleinen Studie keine Korrelation zwischen Nanog und Tumormorphologie, Alter, Mitosis-karyorrhexis Index, NMYC Amplifikation, günstiger oder ungünstiger Histologie, oder höhere Risikogruppen gefunden werden.<sup>96</sup>

Nichtsdestotrotz suggerieren die anderen Beobachtungen, dass die vorhin erwähnten Signalwege die Aufrechterhaltung und Expansion von Neuroblastomkrebsstamm-zellen möglicherweise kontrollieren könnten. Diese Signalwege vermögen auch einen entscheidenden Einfluss auf die Progression des Neuroblastoms zu haben.

### 1.7.7 Necdin

Necdin ist ein Protein das zur MAGE II (Melanoma-associated Antigens) Subgruppe gehört<sup>97</sup> und hat beim Menschen eine Länge von 321 Aminosäuren. Bei der Maus hat Necdin eine etwas längere Aminosäuresequenz mit 325 Aminosäuren.<sup>98</sup> Aufgrund der Ähnlichkeit seiner Interaktion mit anderen Proteinen wird diskutiert, ob Necdin eine ähnliche Funktion wie das Tumorsuppressorprotein Rb (Retinoblastom-Protein) hat. Necdin kann wie Rb die Transaktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors E2F1 binden und somit die E2F1 abhängige Transkription hemmen.<sup>99</sup> Zu den weiteren gemeinsamen Interaktionen gehören Bindung des Simian Virus 40 langen T Antigens und des Adenovirus E1A<sup>100</sup>. Im Unterschied zu Rb scheint Necdin die einzigartige Funktion der Bindung der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53 zu haben und hemmt somit dessen proapoptotische Funktion ohne mit dem p53-abhängigen Zellzyklusarrest zu interferieren.<sup>100</sup> Eine weitere Art wie Necdin z. B. Neurone vor der Apoptose schützt ist durch Rekrutierung der Deacetylase Sirtulin 1, die ihrerseits zur Decetylierung und Inaktivierung von p53 führt.<sup>101</sup>

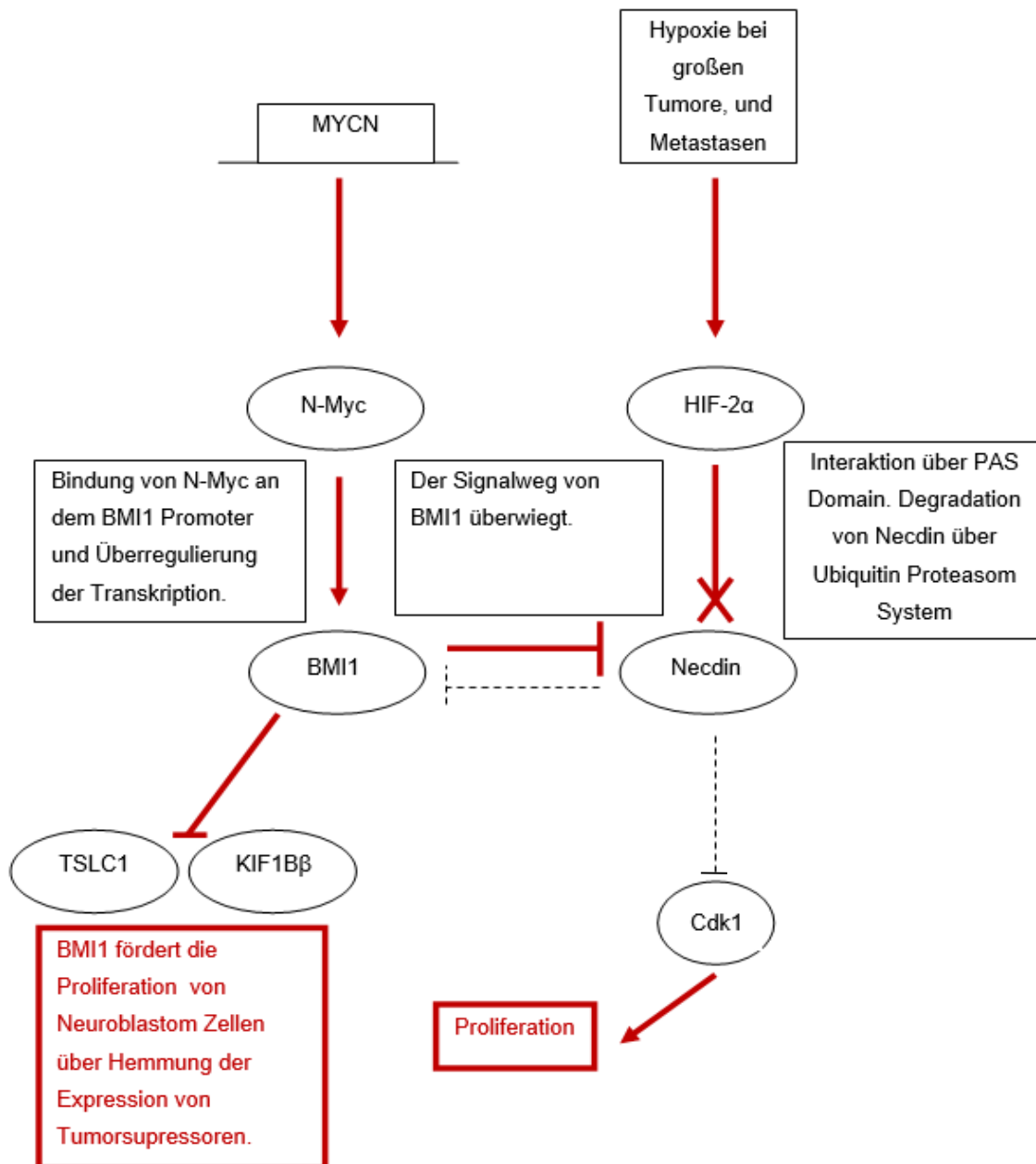
Bei neuronalen Stammzellen scheint Necdin seine besondere Rolle in einer sauerstoffabhängigen Art und Weise auszuüben.<sup>102</sup> Necdin fördert bei Normoxie den Abbau von HIF1 $\alpha$ , während Hypoxie zum Abbau von Necdin führt. Der Abbau erfolgt in diesem Fall durch das HIF abhängige Ubiquitin-Proteasom System<sup>103</sup>. Darüber hinaus scheint bei Stammzellen eine sehr interessante Interaktion zwischen Necdin und BMI1 stattzufinden: BMI1 und Necdin wirken einander bei der Kontrolle der Proliferation von neuronalen Progenitorzellen des sich entwickelnden Neocortex entgegen.<sup>104</sup> Diese Kontrolle der Proliferation geschieht durch Downstreamziele der beiden Proteine. Unter normalen Bedingungen hemmt Necdin die Transkription von Cdk1 und BMI1 unterdrückt die Transkription von p16 (siehe Abbildung 4).<sup>104</sup>



**Abbildung 4.** Der Antagonismus zwischen Necdin und BMI1 kontrolliert die Proliferation von neuronalen Precursor Zellen im embryonalen Mausneokortex.<sup>104</sup>

Cdk1: Cyclin-Abhängige Kinase 1, Bmi1: Polycomb complex Protein BMI-1, p16: Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A.  $\longrightarrow$  :Förderung.  $\text{---|}$  :Hemmung.

Beim Neuroblastom sind die zellulären Funktionen und die Regulation von Necdin relativ wenig erforscht. Allerdings wenn man die vorher erwähnten Interaktionen untersucht und auf das Neuroblastom überträgt entstehen sehr interessante Hypothesen. Beim Neuroblastom könnten die vier Faktoren Hypoxie, BMI1, Necdin und MYCN eine wichtige Rolle in der Proliferation von Krebsstammzellen und Tumorzellen spielen (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Mögliche Signalwege und Interaktionen zwischen HIF-2α, MYCN, BMI1 und Necdin im Neuroblastom.<sup>104,102</sup>

MYCN: Gen für N-myc proto-onkogen Protein, N-Myc: N-myc proto-onkogen Protein, HIF-2α: Hypoxie-induzierbarer Faktor 2α, BMI-1: Polycomb Gruppe RING Finger Protein 4, TSLC1: Gen für cell adhesion molecule 1, KIF1Bβ: Gen für Kinesin 1B β, Cdk1: Cyclin dependent Kinase 1.

→ :Induktion, ⊣ : Hemmung, ⊗ : Degradation über das Proteasom System.  
 - - | : Hemmung aufgehoben.

Ausgehend von diesem theoretischen Modell wäre es sehr interessant zu untersuchen, inwieweit Necdin und BMI1 als gegenseitige Spieler bei der Regulation der Proliferation und Apoptose der Neuroblastom-KSZ fungieren.

### **1.7.8 Nestin**

Nestin (Neuronal stem cell Protein) wurde 1985 durch den monoklonalen Rat-401 Antikörper entdeckt. Die vorübergehende Expression dieses Proteins wurde erstmalig an spezifischen Regionen des sich entwickelnden Gehirnes beobachtet und bei nicht neuronalen Zellen des peripheren Nervensystems.<sup>105</sup> Weitere Untersuchungen des Proteins Nestin führten zur Klassifikation innerhalb der Gruppe der Klasse VI Intermediärfilamente und zunächst zur Anerkennung von Nestin als Stammzellmarker von Zellen des Neuralrohrs.<sup>106</sup> Das humane Nestin Gen ist lokalisiert am langen Arm von Chromosom 1. Bei der Maus beinhaltet der Promoter zwei Sp-1 Bindungsstellen und ist frei von funktionellen TATA-Boxen.<sup>107</sup>

Das humane Nestin Protein besteht aus 1621 Aminosäuren und hat ein prognostiziertes Molekulargewicht von 177,4 kDa, jedoch wird Nestin beim Western Blot mit einem höheren Molekulargewicht zwischen 200-240 kDa detektiert. Dieser Unterschied erklärt sich durch das Vorhandensein von mehreren Phosphorylierungstellen und glykosylierten Seitenketten.<sup>108</sup>

Die Expression von Nestin ist während der Entwicklung und im adulten humanen Organismus weitgehend beschrieben worden. Obgleich Nestin primär als neuronaler Stammzell/Progenitormarker bekannt ist, ist seine Expression auch bei verschiedenen embryonalen Zellen und Geweben, mitsamt Skelettmuskel, Herzmuskel, Nabelschnur, Blutzellen, Sertoli Zellen, Odontoblasten, Haarfollikel, hepatischen Zellen und renalen Progenitorzellen beschrieben worden.<sup>108</sup>



Beim Neuroblastom zeigten Electrophoretic Mobility Shift Assays, dass N-Myc spezifisch an E-Box Sequenzen bindet, die innerhalb des zweiten regulatorischen Intron von Nestin zu finden sind.<sup>109</sup> Des Weiteren sind bei Neuroblastom Zelllinien mit höherer N-Myc Proteinmenge erhöhte Mengen an Nestin nachgewiesen worden und Transfektionsexperimente, die die N-Myc Proteinmenge modulieren, führen zu messbaren Änderungen der Nestin- mRNA und Proteinmenge, sowie zur Änderung der Proliferation und Motilität.<sup>109</sup>

Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis dafür sein, dass die Nestin Expression ein Mechanismus ist, wodurch N-Myc Wachstum, Malignität und Metastasis beim Neuroblastom reguliert.<sup>109</sup> Auf der anderen Seite konnte in 2 unabhängigen Arbeiten keine Korrelation zwischen der Expression von Nestin und Prognose gefunden werden.<sup>110,111</sup> Zusätzlich scheint Nestin auch nicht mit MYCN Amplifikation, INPC, INSS, Proliferationsindex und histopathologischer Prognose zu korrelieren.<sup>111</sup>

Ein anderer Aspekt ist, dass Nestin bei Neuroblaston Zelllinien sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma exprimiert wird.<sup>109</sup> *In vivo* wurde Nestin bisher nur im Cytoplasma beschrieben.<sup>111</sup> Es bleibt zu klären, ob Nestin in den verschiedenen Zellkompartimenten unterschiedliche Funktionen ausübt.

Durch die Methode der Side population (Sp) wurde der Zusammenhang zwischen Nestin und des KSZ Phänotypes untersucht. Zwischen Sp-Zellen und nicht Sp-Zellen konnte kein Unterschied in der Expression von Nestin festgestellt werden<sup>30</sup>. Weitere funktionelle Untersuchungen der Nestin Expression und ihre Auswirkung auf Proliferation, Chemosensitivität und Tumorigenität werden nötig sein, um Nestin in seiner Rolle als Stammzellmarker der Neuroblastom-KSZ zu festigen.

### 1.7.9 Oct-4

Oct-4, auch bekannt als Oct-3/4, Otf3 oder NF-A3, ist ein Transkriptionsfaktor, der durch das Gen Pou5f1 kodiert wird. Das Gen Pou5f1 ist beim Mensch auf Chromosom 6 lokalisiert und bei der Maus auf Chromosom 17. Beim Mensch kann Pou5f1 durch alternatives Splicing drei mRNA Isoformen generieren, OCT4A, OCT4B und OCT4B1. OCT4A mRNA wird nur in ein einziges Protein (OCT4A) translatiert, während OCT4B mRNA durch alternative Initiationsbereiche in 3 verschiedene Proteinisoformen (OCT4B-265, OCT4B-190, OCT4B-164) translatiert werden kann.<sup>112</sup> Alle 3 Isoformen teilen die gleiche Pou DNA Bindungsdomäne und die C-terminale Transaktivierungsdomäne, aber unterscheiden sich durch die N-terminale Region.<sup>113</sup>

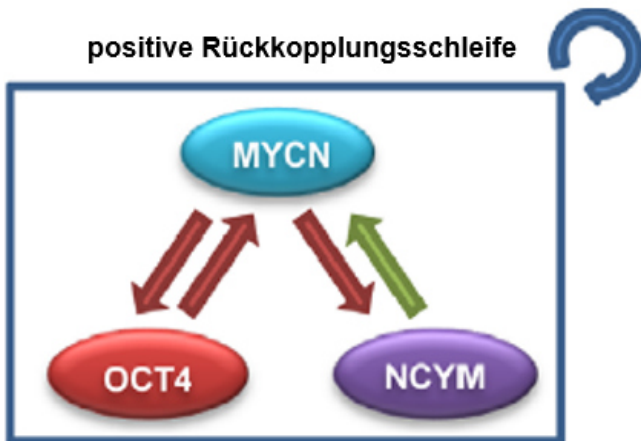
Das Oct-4 Protein gehört zur Pou (Pit, Oct, Unc) Familie von DNA bindenden Proteinen. Diese Proteine regulieren die Expression ihrer Zielgene durch Bindung des octameren Motives ATGCAAT innerhalb von Promoter oder Enhancer Regionen<sup>114</sup>. Oct-4 wurde erstmals bekannt durch seine Funktion als Torhüter der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen (ESC) und später gelang es Yamanaka durch Expression von Oct-4, Sox2, Klf4 und c-Myc humane Fibroblasten in sogenannte iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells) zu reprogramieren<sup>115</sup>. Somit ist Oct-4 nicht nur ein Schlüsselmarker der Stammzellfähigkeit, es ist auch involviert in der Festlegung von Zelldifferenzierung und es fungiert *in vitro* als Rücksetzer bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen.<sup>114</sup>

Abgesehen davon ist Oct-4 bedeutsam bei der Tumorgenese verschiedener Krebsarten. Bei Pancreas-, Lungenkarzinom und hepatozellulärem Karzinom korreliert die Expression von Oct-4 mit schlechter Prognose. Allerdings stellt die Mitexpression von Pseudogenen eine Herausforderung dar, um die Auswirkung dieses Gens beim Krebs zu beurteilen.<sup>112</sup>

*In vitro* Versuche mit BE (2)-C (I-Cell Type) Neuroblastom Zellen zeigten, dass Herunterregulierung von Oct-4 mit erniedrigter Zellproliferation, Verlust der Koloniebildungsfähigkeit und Differenzierung in einen S-Phänotyp korreliert. Überexpression von Oct-4 führte zur Erhöhung der Zellproliferation und steigerte die Koloniebildungsrate. Ferner führte die Induktion der Differenzierung durch 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) zur Erniedrigung der Expression von Oct-4.<sup>116</sup>

Die Daten über die prognostische Wertigkeit von Oct-4 beim Neuroblastom sind kontrovers. Eine Untersuchung konnte keine Korrelation zwischen Oct-4 und Tumormorphologie, Alter, Mitosis-karyorrhexis Index, NMYC Amplifikation, günstiger oder ungünstiger Histologie, oder höherer Risikogruppen finden.<sup>96</sup> Eine andere Gruppe fand eine Korrelation beim MYCN amplifizierten Neuroblastom zwischen Oct-4 und ungünstiger Prognose.<sup>93</sup> Eine weitere Gruppe fand höhere Expression von Oct-4 beim Neuroblastom im Vergleich zu Prekanzerösen Läsionen, sowie Korrelation von Oct-4 mit klinischem Stadium.<sup>117</sup>

Die genaue Funktion von Oct-4 ist beim Neuroblastom längst noch nicht geklärt. Dennoch scheint Oct-4 beim MYCN amplifizierten Neuroblastom zur Aggressivität beizutragen. Dieser Beitrag erfolgt durch die Induktion von NCYM und MYCN.<sup>93</sup> NCYM stabilisiert MYCN und MYCN seinerseits induziert Oct-4, Nanog, Sox2 und LIN29. Die Selbsterneuerungsfähigkeit beim MYCN amplifizierten Neuroblastom soll durch dieses selbstverstärkende Netzwerk von Transkriptionsfaktoren aufrechterhalten werden (siehe Abbildung 6).<sup>93</sup>



**Abbildung 6.** Das MYCN/NCYM-Oct4 Netzwerk beim MYCN amplifizierten Neuroblastom.<sup>93</sup>

Rote Pfeile: Aktivierung der Transkription, grüner Pfeil: Stabilisierung der Transkription. MYCN: N-myc proto-oncogene protein Gen, OCT4: Octamer binding transcription factor 4, NCYM: Cis-Antisense Gene of MYCN.

Die Arbeit von Tsuchida et al (2008) zeigt eine Verbindung zwischen der Behandlung mit Cisplatin (CDDP) und der Expression von Oct-4. CDDP aktiviert die Signalschleife MAPK/ERK1,2 und VEGF/Flt1 und die Aktivierung dieser Signalwege führt zu erhöhter Expression von Oct-4 bei Neuroblastomzelllinien.<sup>94</sup> Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis sein für die Beteiligung von Oct-4 bei der Entwicklung von Therapieresistenz beim Neuroblastom.

### 1.7.10 SOX-2

SOX-2 (Sex determining region of Y-box 2) ist ein Transkriptionsfaktor und ein Mitglied der SOX Familie. Als solches besitzt SOX-2 eine hoch konservierte high-mobility-group (HMG) DNA bindende Domäne.<sup>118</sup> Diese Domäne erkennt die DNA Basensequenz CTTTGTT.<sup>119</sup> Beim Mensch ist das Gen SOX-2 auf Chromosom 3q26.33 lokalisiert.<sup>120</sup> Bei der Maus wird die Transkription unter anderem durch mehrere Enhancer und einen basalen Promoter reguliert.<sup>121</sup> Von Bedeutung ist der SRR2 Enhancer, der die HMG/Pou Cassette enthält und essentiell ist für die Interaktion zwischen SOX-2 und Oct-4.<sup>121</sup> Diese wichtige Interaktion wurde bereits im Abschnitt 1.7.9 besprochen.

SOX-2 ist bekannt durch seine entscheidende Rolle während der embryonalen Entwicklung. In der Aufrechterhaltung der Pluripotenz der embryonalen Stammzellen (ES) besteht seine Funktion. Darüber hinaus ist SOX-2 ein wichtiger Faktor für das Generieren von iPSCs (Induced pluripotent stem cells) und es ist notwendig für die Differenzierung und Aufrechterhaltung von neuronalen Progenitor/ Stammzellen.<sup>118</sup>

In den letzten 10 Jahre wurde die Expression von SOX-2 zumindest in 25 unterschiedlichen Krebsarten bestätigt und bei den meisten dieser Krebsarten wurde SOX-2 mit erhöhtem Tumorwachstum, Metastasis, Chemoresistenz und niedrigem Überleben in Verbindung gesetzt.<sup>121</sup> Beim Neuroblastom korreliert die Expression von SOX-2 mit dem klinischen Stadium der Erkrankung.<sup>117</sup> Überdies scheint eine hohe Anfärbung von SOX-2 bei Primärtumoren mit niedrigem Überleben zu korrelieren.<sup>122</sup>

In Neuroblastomzelllinien führt die Überexpression von SOX-2 durch lentivirale Vektoren zu erhöhter Tumorigenität und verminderter Expression von Differenzierungsmarkern. Gleichwohl führt der Knockdown von SOX-2 zu verminderter Tumorigenität und erhöhter Expression von Differenzierungsmarkern.<sup>123</sup> SOX-2 wird auch bei Klonen aus Metastasen (MSDACs Metastatic site derived aggressive cells) höher exprimiert als bei Neuroblastom Zellen die nicht in der Lage sind zu aggregieren oder Tumorsphären zu bilden.<sup>124</sup>

Uneinigkeit herrscht im Bezug auf den Zusammenhang zwischen SOX-2 und MYCN. Eine Gruppe fand eine negative Korrelation zwischen SOX-2 und MYCN sowie Regulation von SOX-2 durch die Signalwege von GLI1 und FOX.<sup>120</sup> Im Gegensatz dazu fand eine Gruppe, dass Herunterregulation von MYCN (durch ATRA) zur Erniedrigung von SOX-2, Oct-4, Nanog und NCYM führt.<sup>93</sup> Die letzteren Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass Behandlung mit 13-cis retinoic acid (RA) und des Proteasom Inhibitors MG132 zur Erniedrigung von mehreren Stammzellmarkern führt, unter anderem SOX-2, Nestin, und Oct-4.<sup>125</sup> Des Weiteren zeigen Primärtumore mit MYCN Amplifikation eine höhere SOX-2 positive Fraktion (59,5% vs 40,5%, P=0.009) als nicht MYCN amplifizierte Tumore.<sup>122</sup>

Die Regulation von SOX-2 durch RA erfolgt durch upstream Demethylierung von miR-340. miR-340 seinerseits bindet die 3' UTR von SOX-2 und hemmt seine Transkription. Obwohl SOX-2 die Neuroblastomzellen in einem undifferenzierten Stadium aufrechterhält, ist die Herunterregulation durch miR-340 für die Induktion der Differenzierung nicht notwendig.<sup>126</sup> Zuletzt führte die Reprogrammierung von Neuroblastomzelllinien mit den Yamanaka Faktoren (unter anderem SOX-2) zur Ausbildung von Tumoren *in vivo* und diese Zellen zeigten eine Resistenz zu CDDP. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, dass SOX-2 zur de-Differenzierung beim Neuroblastom beiträgt und die Aggressivität fördert.<sup>127</sup>

### **1.7.11 ABCC1/MRP1**

ABCC1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 190 kDa und gehört wie ABCB1 oder BCRP zur Gruppe der ABC-Transporter.<sup>128</sup> Dieses Protein wurde zum ersten Mal aus einer Zelllinie eines kleinzelligen Lungenkarzinom geklont. Einige seiner physiologischen Funktionen sind der Transport von Leukotrienen, Prostaglandinen und Glutathion-konjugierten Molekülen.<sup>129</sup> Darüber hinaus pumpt ABCC1 verschiedene Chemotherapeutika. Hierzu gehören Methotrexat, Doxorubicin, Etoposid, Vincristin, Vinblastin, Paclitaxel, Irinotecan, Flutamid und Hydroxi-flutamid.<sup>130</sup>

Bei Patienten mit Neuroblastom korreliert eine höhere Expression von ABCC1 mit niedrigem Gesamtüberleben und niedrigem ereignisfreiem Überleben.<sup>86</sup> MYCN kontrolliert die Expression von ABCC1 und beim MYCN amplifizierten Neuroblastom wird ABCC1 überexprimiert. Somit trägt ABCC1 bei diesen Tumoren zur Entstehung des multiresistenten Phänotyps bei.<sup>129</sup> Unabhängig von der Multiresistenz trägt ABCC1 zur Tumorgenese und Tumorprogression bei.<sup>129</sup>

## **1.8 Apoptose und die Rolle von p53, p21, XIAP und Survivin beim Neuroblastom.**

Die Apoptose ist ein entscheidender Mechanismus für multizelluläre Organismen, um die Zellproliferation zu kontrollieren und die Homöostase im Gewebe zu gewährleisten. Durch die Apoptose, eine Art programmierter Zelltod, können schädliche oder unnötige Zellen im Organismus eliminiert werden.<sup>131</sup> Allerdings haben Krebszellen verschiedene Strategien entwickelt, um die Apoptose zu umgehen. Dies geschieht durch genetische Mutationen oder durch epigenetische Modifikationen der Schlüsselfaktoren, die die Apoptose kontrollieren.<sup>132</sup>

Die spontane Regression, die bei Neuroblastom Patienten unter 1 Jahr auftreten kann, könnte möglicherweise durch die Aktivierung der Apoptose oder durch die Veränderung der Expression von Molekülen, die die Apoptose regulieren, erklärt werden.<sup>133</sup> Ganz anders sieht es im Fall der Patienten mit fortgeschrittenen Neuroblastomen aus. Bei diesen Patienten tritt keine spontane Remission auf und selbst nach intensiver Chemotherapie können die Tumorzellen nicht eliminiert werden. Durch besseres Verständnis der Apoptosemechanismen und ihre Regulation beim Neuroblastom könnten neue therapeutischen Strategien entwickelt werden.

Es gibt zwei wichtige Signalwege der Apoptose: der extrinsische (Apoptose Typ I) oder Todesrezeptorsignalweg und der intrinsische (Apoptose Typ II) oder mitochondriale Signalweg. Beide Signalwege sind miteinander verbunden und können sich gegenseitig beeinflussen.<sup>134</sup> Ein weiterer Mechanismus der Apoptose ist der Perforin/Granzyme Signalweg.<sup>135</sup>

Die extrinsische Apoptose (Apoptose Typ I) beginnt mit der Bindung von extrazellulären Liganden wie Tumor Necrosis Factor (TNF), Fas Ligand (Fas-L) und TNF-related apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) an den jeweiligen Todesrezeptoren<sup>131</sup>. Nach der Bindung des Liganden mit dem Rezeptor interagiert die intrazelluläre Death-Domain mit der korrespondierenden Domäne von Adapterproteinen wie Fas-associated death domain (FADD) und TNF receptor associated death domain (TRADD).<sup>136</sup> Diese Adapterproteine haben eine weitere Domäne, die Death effector Domain (DED). Procaspase 8 ihrerseits hat auch eine DED und interagiert mit dem DED vom FADD.<sup>137</sup> Durch diese Interaktion wird ein death inducing signaling complex (DISC) induziert, mit der Folge der Selbstaktivierung von Procaspase-8. Aktive Caspase 8 aktiviert die Effektorcaspasen die ihrerseits den Zelltod durchführen.

Die intrinsische Apoptose wird durch verschiedene Stimuli initiiert. Unter anderem können DNA-Schäden, osmotischer Stress oder Wachstumsfaktor-Entzug Auslöser des intrinsischen Signalwegs sein. Verschiedene Proteine reagieren auf diese Stimuli und übermitteln die Signale in das Mitochondrium, mit der Folge der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran.<sup>131</sup> Die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran wird von verschiedenen Proteinen der Familie der B-cell Lymphoma 2 Proteine (BCL-2) reguliert.<sup>138</sup> Nach der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran kommt es zum Austritt mehrerer mitochondrialer Proteine, insbesondere von Cytochrom C. Im Zytosol interagiert Cytochrom C mit Apoptose protease-activating Factor 1 (Apaf-1) und bildet einen großen Komplex, besser bekannt als das Apoptosom.<sup>139</sup> Das Apoptosom führt zur Aktivierung von initialisierenden Caspasen (in der Regel Caspase-9), die ihrerseits die Effektorcaspase (Caspase-3) aktivieren. Durch die Aktivierung von Caspase 3 wird die Caspase Kaskade in Gang gesetzt, die dazu führt, dass die Zelle abstirbt.<sup>140</sup>

Das p53 Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der involviert ist in der Regulation des Zellzyklus sowie in den Ablauf des programmierten Zelltods. Durch die Regulation des Zellzyklus und die Vermittlung der Apoptose verhindert p53 die Entstehung und die Progression von Krebs in verschiedenen Tiermodellen und in unterschiedlichen Zelllinien.<sup>141</sup> Die Aktivierung von p53 induziert eine große



Anzahl an Genen die die Apoptose einleiten. Unter anderem werden die BH3-Domäne pro-apoptischen Proteine (Puma, Noxa, Bad, Bax, Bak, p53AIP1); Todesrezeptoren (Fas, DR4, Killer/Dr5) und Apoptosis execution Factors (Apaf1, Caspase 6, Bnip3L) induziert.<sup>141</sup> Die Tumorsuppressor Aktivität von p53 beim Mensch wird am besten ersichtlich am Beispiel des Li-fraumeni Syndroms. Eine autosomal dominante inaktivierende Mutation von p53 kennzeichnet die betroffenen Individuen, die eine sehr hohe Prädisposition für Krebs vorwiegend in der Kindheit und im frühen Erwachsenenalter haben.<sup>142</sup> Beim Neuroblastom sind die Signalwege und die Funktionen von p53 wenig erforscht. Bekannt ist, dass die Mehrheit der Neuroblastomtumore p53 Wildtyp sind und dass die Aktivität von p53 häufig vermindert ist.<sup>143</sup> Eine Untersuchung konnte zeigen, dass nach Chemotherapie p53-mutationen auftreten. Diese Mutationen könnten ein Grund sein für die Chemoresistenz beim Neuroblastom.<sup>144</sup> Beim Neuroblastom scheint die Expression von p53 einer Gegenregulation durch Focal adhesion kinase (FAK) zu unterliegen. Die genauen Mechanismen dieser Gegenregulation sind nicht bekannt aber es konnte bei Neuroblastom Zelllinien gezeigt werden, dass es durch gleichzeitige Überexpression von p53 und Inhibition von FAK zu vermindertem Zellüberleben kommt.<sup>143</sup> 35 % aller Patienten mit Neuroblastomrezidiven zeigen Defekte der p53 Regulation. In gewissem Grad könnte diese Regulationsstörung über MYCN und die Aktivierung des mTOR Signalweges geschehen, die ihrerseits die proapoptische Funktion von p53 aufheben.<sup>145</sup> Nach zellulärem Stress transkribiert p53 eine Gruppe von negativen Regulatoren des IGF/AKT/mTOR Signalweges wie IGF-BP3, PTEN, TSC2, AMPK  $\beta$ 1, und SESN 1 und 2. Diese Inhibition führt zum Zellzyklusarrest, DNA Reparatur, Zellseneszenz, Apoptose und Autophagie in Tumorzellen.<sup>145</sup> Beim Neuroblastom kann p53 effektiv negative Regulatoren des PI3K/AKT/mTOR Signalweges induzieren und somit potentiell die Antwort nach mTORC1 Inhibition beeinflussen. *In vivo* Daten suggerieren, dass die gleichzeitige Inhibition von MDM2 und mTOR sehr effektiv das Wachstum von Neuroblastomtumoren blockieren kann.<sup>145</sup> Dieser Effekt könnte durch die p53 abhängige Inhibition von Survivin gegeben sein, denn die Kombinationstherapie (Temsirrolimus und RG7388) supprimiert die Expression von Survivin in einer p53 abhängigen Art und begünstigt die Apoptose. Wiederum kann ektopische Expression von

Survivin zur Resistenz gegen eine Behandlung mit der Kombinationstherapie von mTOR und MDM2 Inhibitoren führen.<sup>145</sup>

p21 ist ein universeller Zellzyklusinhibitor und auf genetischer Ebene wird die Expression seines Promoters in hohem Maße durch zahlreiche Signalwege reguliert.<sup>146</sup> Die Funktion von p21 ist abhängig vom zellulären Kontext und kann pro- oder antiapoptotisch sein sowie den Zellzyklus vorantreiben oder stoppen. Beim Neuroblastom scheint die Expression von p21 unabhängig von p53 zu sein. Vielmehr wird p21 in seiner Expression durch zwei unabhängige Mechanismen reguliert. Überexpression von MYCN aktiviert einen onkogenen Signalweg mit der Folge der Dysregulation von p21. Diese Dysregulation geschieht durch die Transkription von miRNA der Gruppe 17-5p-92. Insbesondere kann miR-17-5p an den 3' untranslatierten Bereich von p21 binden und somit p21 in seiner Cyclin/CDK-Komplex inhibitorischen Funktion hindern.<sup>147</sup> Über den autokrinen Signalweg von Gastrin-releasing peptide (GRP) und seinem Rezeptor (GRP-R) findet auch eine veränderte Expression von p21 statt.<sup>148</sup>

Die genaue Funktion von XIAP beim Neuroblastom ist nicht bekannt. XIAP gehört zur Familie der inhibitor of apoptosis proteins (IAP's). XIAP kann direkt die Caspasen 3 und 7 inhibieren durch die Bindung ihrer aktiven Bindungstaschen und Blockierung ihrer Substrate.<sup>149</sup> Diese reversible Inhibition erfolgt Mithilfe der BIR2 Domäne. An dem carboxyterminalen Ende von XIAP befindet sich eine (Really Interesting New Gene) RING Domäne.<sup>150</sup> Die RING Domäne ist entscheidend für die Funktion von XIAP als E3 Ubiquitin Ligase. Durch seine E3 Ubiquitin Ligase Aktivität kann XIAP viele Proteine ubiquitinieren, und somit Caspasen (CASP3, CASP7, CASP8 und CASP9), einige Proteine des MAP Kinase Signalweges (MAP3K2/MEKK2), wichtige Proteine der Apoptose (DIABLO/SMAC, AIFM1, and BIRC5/survivin) und Proteine der Kupfer Homöostase (CCS) regulieren. Ferner kann XIAP durch Ubiquitinierung und Inaktivierung des Ripoptosoms Tumorzellen vor genotoxischem Stress schützen<sup>151</sup>. Beim Neuroblastom bewirkt eine Therapie mit dem CARP-1 funktional Mimetics CFM-4 eine Verminderung der Expression von XIAP und verhindert das Wachstum von Neuroblastomzellen in vitro.<sup>152</sup>

Survivin, auch bekannt als Baculoviral IAP repeat-containing protein 5, ist ein Multifunktionsprotein, das in der Regulation der Zellteilung und bei der Hemmung der Apoptose involviert ist. Das Gen von Survivin liegt auf dem Chromosom 17q25.<sup>153</sup> Survivin hat eine Länge von 142 Aminosäuren und eine molare Masse von 16.390 Da und es sind 5 verschiedene Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicing generiert werden. Mit seiner BIR Domäne gehört Survivin wie auch XIAP zu der Familie der inhibitor of apoptosis proteins (IAP's). Nach einem Apoptosestimulus wird Survivin aus dem Mitochondrium ausgeschüttet und es gelangt ins Cytosol, wo es mit XIAP und Hepatitis B-X interacting Protein (HBXIP) interagiert. Diese Interaktion führt zur Inhibition von Caspasen und ist zytoprotektiv.<sup>154</sup> Auch im Mitochondrium entfaltet Survivin seine antiapoptotische Funktion. Survivin arretiert hier SMAC/DIABLO und verhindert, dass diese Proteine in das Cytosol gelangen können. Auch hierdurch wird die Apoptose inhibiert.<sup>154</sup> Die Acetylierung von Survivin durch CREB-binding Protein CBP reguliert den nukleären Export von Survivin aus dem Zellkern. Wird Survivin am Lys-129 acetyliert, dann kommt es zur Homodimerisierung, während im deacetylierten Zustand Survivin Monomere bildet. Diese Monomere heterodimerisieren mit CRM1 und erleichtern den nukleären Export.<sup>155</sup> Acetyliertes Survivin bindet an STAT3 und unterdrückt die Transaktivierung von STAT3 Ziel promotoren. Durch die Inhibition der Transkription der STAT3 Zielgene inhibiert Survivin das Wachstum in STAT3 aktivierten Tumoren. Wiederum kann deacetyliertes Survivin das Wachstum von Tumoren fördern durch vermehrten Transport ins Cytosol und Deaktivierung von Caspasen.<sup>155</sup> Beim Neuroblastom stabilisieren Hsp60 und der Komplex CCAR2-Hsp60 Survivin im Mitochondrium und verhindern seine Degradation im Proteasom.<sup>154</sup> Darüber hinaus ist Survivin ein prognostischer Marker beim nicht MYCN amplifizierten Neuroblastom.<sup>154</sup> Survivin scheint eine wichtige Rolle bei Signalwegen zu haben, die die Zellproliferation und die Malignität von Neuroblastom Zellen kontrollieren, nämlich die HMGA1, MYC und MYCN und AURKA/B Signalwege.<sup>156</sup> Eine STRING Analyse zeigte Interaktionen von Survivin mit IL3 und HIF-1 $\alpha$ . IL-3 stimuliert die STATs und den AKT Signalweg. HIF-1 $\alpha$  ist ein bekannter Förderer der Angiogenese in soliden Tumoren.<sup>156</sup>

## **2 Zielsetzung dieser Arbeit**

In dieser Arbeit wenden wir uns der Frage nach der Charakterisierung von Cisplatin resistenten Neuroblastomsublinien zu. Konkret wird geschaut, ob die Cisplatin-adaptierten Sublinien weitere Resistenzen zu klassischen Zytostatika aufweisen (Kreuzresistenzen). Hierfür werden die Cisplatin-adaptierten Sublinien mit der parentalen chemosensitiven Neuroblastom Zelllinie UKF-NB-3 verglichen. Des Weiteren wird ein Augenmerk auf 10 beschriebene Stammzellmarker gelegt, die bisher bei verschiedenen Tumoren und teilweise auch beim Neuroblastom als Krebsstammzellmarker postuliert wurden. Geschaut wird, ob es Unterschiede in der Expression dieser Marker gibt, zwischen den Cisplatin-adaptierten Sublinien und der chemosensitiven Neuroblastomzelle UKF-NB-3. Überdies wird die Expression der Proteine P53, P21, XIAP und Survivin bei diesen Zellen untersucht. Zuletzt wird die Kolonienbildungseffizienz der vorhin genannten Neuroblastom Zelllinien untersucht.

## 3 Material

### 3.1 Untersuchte Zelllinien

In dieser Arbeit wird mit den folgenden humanen Neuroblastomzellen gearbeitet: UKF-NB-3, 12 parallel an Cisplatin adaptierte Sublinien von UKF-NB-3 (UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP<sup>1000</sup>, nummeriert von römisch I bis römisch XII), die Neuroblastomzelle UKF-NB-3<sup>MDR-1</sup> und UKF-NB-3<sup>BCRP</sup>.

Die humane Neuroblastom Zelllinie UKF-NB-3 wurde aus einer Knochenmarksmetastase eines Patienten im Stadium INSS IV (Evans Stadium IV) etabliert<sup>157</sup>. Die 12 Neuroblastomsublinien UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP<sup>1000</sup> (I, II, III, (...), XII) sind 12 parallel an Cisplatin adaptierte Sublinien aus der humanen Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3. Durch die schrittweise Adaptierung an Cisplatin sind diese Neuroblastomzellen in der Lage höhere Konzentrationen dieses Zytostatikums zu vertragen. Die 12 Neuroblastomsublinien UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP<sup>1000</sup> (I, II, III, (...), XII) werden in Cisplatin haltigem Medium kultiviert. Die Zellen werden bei jeder Passage mit einer Konzentration von 1000 ng/ml Cisplatin umgesetzt. Alle resistenten Sublinien sind Teil der Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection (<https://research.kent.ac.uk/industrial-biotechnology-centre/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection/>).

Die Neuroblastomzelle UKF-NB-3<sup>MDR-1</sup> (oder UKF-NB-3<sup>ABCB1</sup>) wurde erstmal in Rothweiler et al, Neoplasia, 2010 beschrieben und ist eine mit lentiviralen Vektoren transduzierte UKF-NB-3 Neuroblastomzelllinie. Dabei trägt der Vektor die cDNA für MDR-1/ABCB1. Die Transduktion mit diesem lentiviralen Vektor führt bei dieser Neuroblastomzelle somit zu einer Überexpression von MDR-1. Die lentiviralen Vektoren basieren auf der Lentiviral Gene Ontology (LeGO) Vektor Technologie ([www.lentigo-vectors.de](http://www.lentigo-vectors.de)).<sup>158</sup>

Auch die Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3<sup>BCRP</sup> wurde erstmal in Rothweiler et al, Neoplasia, 2010 beschrieben und überexprimiert BCRP1/ ABCG2 durch Transduktion mit einem lentiviralen Vektor, der für die cDNA für BCRP1 codiert.<sup>158</sup>

Die Tabelle 8 fasst die vor dieser Arbeit bekannten Eigenschaften der in der Arbeit untersuchten Neuroblastomzellen zusammen. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wird in Abbildungen und Tabellen auf die Benutzung des Oberindex verzichtet. Für die Cisplatin resistenten Sublinien wird die verkürzte Form nur mit den römischen Zahlen benutzt, also statt UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> I heißt es nur I oder NB-3-R-CDDP I. Für die weiteren Zelllinien wird die verkürzte Form dargestellt. UKF-NB-3<sup>MDR-1</sup> --> NB-3-MDR1; UKF-NB-3<sup>BCRP</sup> --> NB-3-BCRP. UKF-NB-3 --> NB-3

<b>Neuroblastomzelle</b>	<b>Bekannte biologischen Eigenschaften</b>
<b>UKF-NB-3</b>	MDR-1: Keine Expression, P53 Wildtyp, <sup>159</sup> MYCN Amplifikation, <sup>160</sup> SLC35F2 Expression nicht vermindert. <sup>161</sup>
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I</b>	MDR-1: Keine Überexpression, <sup>161</sup> P53: Wildtyp, <sup>157</sup> SLC35F2 Expression Vermindert, <sup>161</sup> Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin. Im Vergleich zu alle anderen Cisplatin adaptierten Sublinien wurde UKF- NB-3 <sup>r</sup> CDDP <sup>1000</sup> I länger mit Cisplatin in Kultur umgesetzt.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> II</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> III</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> IV</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> V</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> VI</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> VII</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> VIII</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> IX</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> X</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> XI</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> XII</b>	Umsetzung mit 1000 ng/ml Cisplatin.
<b>UKF-NB-3<sup>MDR-1</sup></b>	MDR-1 Überexpression durch LeGO Vektor.
<b>UKF-NB-3<sup>BCRP</sup></b>	BCRP Überexpression durch LeGO Vektor.

**Tabelle 8.** Biologische Merkmale der Neuroblastomsublinien.

MDR-1: Multidrug-Resistance-Protein 1, P53: Gen für p53, MYCN: Gen für N-Myc, SLC35F2: Solute carrier family 35 member F2, BCRP: Breast Cancer Resistance Protein, LeGo: Lentiviral Gene Ontology.

### 3.2 Zellkultur und Mediumherstellung

Aqua ad injectabilia	Delta Select GmbH, Dreieich, Deutschland
Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	
FCS (Fetal Calf Serum)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
Iscove Basal Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
Penicillin	Grünethal GmbH, Aachen, Deutschland
Reinstwasser (Milli-Q Wasser)	Hergestellt im Labor durch Milli-Q System Merk Millipore, Darmstadt, Deutschland
Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten

#### **Iscove's modified Dulbecco's Medium IMDM (Kulturmedium für alle Neuroblastomzellen)**

- 87% Iscove Basal Medium
- 10% FCS
- 2% L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

Lagerung bei 4 °C

#### **Penicillin/Streptomycin Lösung**

(Lagern bei -20°C)

Verdünnen in 1l Milli-Q Wasser

1 Flasche 10g Mega Penicillin



10 g Streptomycinsulfat  
Filtration durch einen 0,22 µm Filter

### **L-Glutamin Lösung**

(Lagern bei -20°C)  
Verdünnen in 1l Milli-Q Wasser  
29,2 g L-Glutamin  
Filtration durch einen 0,22 µm Filter

### **Trypsin Lösung**

(Lagern bei -20°C)  
Verdünnen in 1l PBS  
2 g Trypsin und 0.6 g EDTA  
Filtration durch einen 0,22 µm Filter

### **PBS Lösung**

(Lagern bei Raumtemperatur)  
Verdünnen in 1 l Aqua ad injectabilia  
9,55 g Dulbecco's PBS  
autoklavieren

## **3.3 Zytostatika**

Carboplatin	Hospira, Illinois, Vereinigte Staaten
CDDP	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten, Deutschland
Docetaxel	Accord Healthcare, Tochterunternehmen von Intas Biopharmaceuticals, Ahmedabad, India
Doxorubicin	Cell pharm GmbH, Bad Vilbel, Deutschland
Etoposid	Teva-pharma GmbH, Walldorf, Deutschland
Gemcitabin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Ko143	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
Melphalan	Aspen, Durban, Süd Afrika
Mitoxantron	Teva, Petach Tikwa, Israel
Oxaliplatin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Vincristin	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten, Deutschland
Vinblastin	Teva, Petach Tikwa, Israel
YM-155	Selleckchem, Houston, Vereinigte Staaten

### 3.4 MTT Assay

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- -2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
SDS (Sodium-dodecyl-sulfate)	MP Biomedicals, Santa Ana, Vereinigte Staaten
DMF (N,N-dimethylformamid)	Fisher Scientific, Deutschland

#### MTT Lösung (Lagern bei 4°C)

1 g MTT  
Verdünnen in 500 ml PBS  
Filtration durch einen 0,22 µm Filter

#### SDS-Lösung (Lagern bei Raumtemperatur)

200 g SDS  
verdünnen in 500 ml N,N-dimethylformamid und 500 ml Aqua dest.  
Mit Essigsäure auf pH 4,7 einstellen

### 3.5 Western Blot

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Großbritannien
APS (Amoniumpersulfat)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Detuschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Deutschland

DTT (Dithiotretiol)	Serva Electrophoresis GgmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
HCL (Chlorwasserstoff)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Kit Pierce™ ECL	Thermo Fischer, Vereinigte Staaten
Laemmli Puffer	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaF (Natriumfluorid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaPPi (Natriumdiphosphat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulose Membrane	Whatman, Maidstone, Vereinigte Staaten
Overhead-Farblaserfolie	Soennecken eG, Overath, Deutschland
Protease Inhibitor (Tabletten)	Roche, Penzberg, Deutschland
Protein Ladder	New England Biolabs, Ipswich, Vereinigte Staaten
ColorPlus™ Prestained	
Roentoroll HC	Tetenal, Hamburg, Deutschland
Röntgen Fix Solution	Tetenal, Hamburg, Deutschland
Tetenal Superfix MRP	Tetenal, Hamburg, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris base	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris/HCl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Triton X 100	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

### **TritonX-100 Lysepuffer**

(Lagern bei 4°C)

20 mM Tris/Hcl, pH 7,5

150 mM NaCl

10 mM NaPPi

20 mM NaF

1% (V/V) Triton X-100

Lösung in 1 L Millipore-Wasser, Lagerung bei 4°C

1 Inhibitortablette kommt nachher auf 10 mL Lysepuffer

### **2x SDS-PAGE Probepuffer**

95 % Laemmli-Puffer

5 % Mercaptoethanol

### **10x Laufpuffer**

(Lagern bei 4°C)

30 g TRIS Base (250 mM)

143 g Glycin (1,9M)

10 g SDS (1%)

1L Aqua dest.

### **1x Laufpuffer**

100 mL des 10x Puffers, mit 900 mL Aqua dest

pH bei Verdünnung auf 1x Konzentration mit HCl auf 8,3 einstellen

### **10x Transferpuffer**

(Lagern bei 4°C)

30 g TRIS Base (250 mM)

143 g Glycin (1,9 mM)

1l Aqua dest.

### **1x Transferpuffer**

(Lagern bei 4°C)

1/10 10x Transferpuffer, 2/10 Methanol und 7/10 Millipore-Wasser,  
mit HCl auf pH 8,3 einstellen

### **10x Waschpuffer ohne Tween**

(Lagern bei Raumtemperatur)

60,6 g TRIS Base (500 mM)

87,7 g NaCl (1,5 M)

1l Aqua dest.

### **1x Waschpuffer ohne Tween**

100 mL Waschpuffer ohne Tween 10x, 900 mL Aqua dest

bei Verdünnung auf 1x Konzentration mit HCl auf pH 7,5 einstellen

### **10x Waschpuffer mit Tween**

(Lagern bei Raumtemperatur)

10x Waschpuffer ohne Tween mit 0,3% (v/v) Tween-20 versetzt

### **1x Waschpuffer mit Tween**

100 mL Waschpuffer mit Tween 10x, 900 mL Aqua dest

bei Verdünnung auf 1x Konzentration mit HCl auf pH 7,5 einstellen

### **Blockingpuffer**

(Lagern bei - 20°C)

50 ml von 1M Tris/Hcl (pH 7,5)

11,68 g NaCl (200 mM)

0,5 ml Tween (0,05%)

30 g BSA (3%)

Verdünnen in 1l aqua dest.

### **Blockingpuffer auf Milchpulver Basis**

(Bei jedem Versuch neu ansetzen)

5% Milchpulver (w/v) in 1x Waschpuffer mit Tween gelöst

### **Sammelgel 5%**

(Mengenangaben für 2 Gele):

2,48 ml H<sub>2</sub>O

0,55 ml Acrylamid (30%ig)

0,44 ml Tris/HCl pH 6,8

35 µl SDS (10%ig)

24 µl APS (10%ig)

4,5 µl TEMED

### **Trenngel 15%**

(Mengenangaben für 2 Gele):

1,5 ml H<sub>2</sub>O

6 ml Acrylamid (30 %ig)

4,5 ml Tris/HCl pH 8,8

120 µl SDS (10%ig)

90 µl APS(10 %ig)

15 µl TEMED

### **3.5.1 Primäre Antikörper Western Blot**

p53 Mouse, Monoklonal Verdünnung: 1:200	Alexis Biochemicals a Brand of Enzo Life Sciences Inc. Farmingdale, New York, Vereinigte Staaten
---	--

β-Actin Mouse, Monoklonal Verdünnung: 1:3000	Bio Vision, San Francisco, Vereinigte Staaten
--	---

p21 Rabbit, Polyklonal Verdünnung: 1:500	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
--	--

Survivin Rabbit, Polyklonal Verdünnung: 1:500	R&D Systems, Mineapolis, Vereinigte Staaten
---	---

XIAP Polyklonal Verdünnung: 1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, Rabbit, Vereinigtes Königreich
--	--

### **3.5.2 Sekundäre Antikörper Western Blot**

Goat Anti-rabbit IgG (H & L) Peroxidase-konjugiert (2 mg/ml) 1:20.000 Verdünnen in Blocking Puffer	Calbiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
---	---

Goat Anti-mouse IgG (H & L) Merck, Darmstadt, Deutschland  
Peroxidase-konjugiert  
(2 mg/ml) 1:20.000 Verdünnen  
in Blocking Puffer

### **3.6 Durchflusszytometrie**

Formaldehyd Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  
Perm/Wash BD Biosciences, San Diego, Vereinigte  
Staaten  
Clean BD Biosciences, San Diego, Vereinigte  
Staaten  
Rinse BD Biosciences, San Diego, Vereinigte  
Staaten

#### **Fixierlösung**

4% Formaldehyd  
gelöst in PBS

#### **3.6.1 Primärantikörper Durchflusszytometrie**

Anti-BCRP Kamiya Biomedical company, Seattle,  
Spezies: Monoclonales Vereinigte Staaten  
Mouse IgG<sub>1</sub>  
Verdünnung: 1:20

Anti-BMI-1 Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich  
Spezies: Monoclonales  
Mouse IgG<sub>1</sub>  
Verdünnung: 1:200

Anti-CD133 Macs Miltenyi Biotec, Auburn, Vereinigte  
Spezies: Monoclonales Staaten  
Mouse IgG<sub>2B</sub>, konjugiert  
mit R-phycoerythrin (PE)  
Verdünnung: 1:10

Anti-GD-2 Spezies: Monoclonales Mouse IgG <sub>2A</sub> Verdünnung: 1:20	BD Biosciences, San Diego, Vereinigte Staaten
Anti-MDR-1 / ABCB1 Spezies: Monoclonales Mouse IgG <sub>2A</sub> Verdünnung: 1:20	Abnova, Taipei, Taiwan
Anti-Nanog Spezies: Monoclonales Rabbit IgG Verdünnung: 1:50	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Necdin Spezies: Polyclonales Rabbit IgG Verdünnung: 1:30	Acris Antibodies, San Diego, Vereinigte Staaten
Anti-Nestin Spezies: Monoclonales Mouse IgG <sub>1</sub> Verdünnung: 1:250	R&D Systems, Minneapolis, Vereinigte Staaten
Anti-Oct-4 Spezies: Monoclonales Rabbit IgG Verdünnung: 1:50	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Sox-2 Spezies: Monoclonales Rabbit IgG Verdünnung: 1:100	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich



Anti-MRP1/ ABCC1  
Monoclonales  
Mouse IgG<sub>2A</sub>  
Verdünnung: 1:20

Kamiya Biomedical company, Seattle, Spezies:  
Vereinigte Staaten

### **3.6.2 Sekundäre Antikörper Durchflusszytometrie**

Goat Anti-Mouse  
Spezies: Polyclonal IgG,  
Goat F(ab')<sub>2</sub> + Anti Mouse  
H+L chains, konjugiert  
mit Phycoerythrin  
unverdünnt auf die Proben

R&D Systems, Minneapolis, Vereinigte  
Staaten

Goat Anti- Rabbit  
Spezies: Polyclonal IgG,  
Goat, konjugiert mit  
Phycoerithrin  
unverdünnt auf die Proben

R&D Systems, Minneapolis, Vereinigte  
Staaten

### **3.6.3 Isotypen Durchflusszytometrie**

Anti-Mouse IgG<sub>1</sub>,  
Isotyp konjugiert  
mit Phycoerithrin  
unverdünnt

R&D Systems, Minneapolis, Vereinigte  
Staaten

Anti-Mouse IgG<sub>2B</sub>  
Isotyp konjugiert  
mit Phycoerithrin  
unverdünnt

R&D Systems, Minneapolis, Vereinigte  
Staaten

Anti-Mouse IgG<sub>2A</sub>  
konjugiert  
mit Phycoerithrin  
unverdünnt

R&D Systems, Minneapolis, Vereinigte Isotyp  
Staaten

Anti-Rabbit IgG Isotyp konjugiert mit Phycoerithrin unverdünnt	R&D Systems, Minneapolis, Vereinigte Staaten
---	---

### 3.7 Colony Forming Assay

Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen, Eugene, Vereinigte Staaten

#### Kristallviolett Lösung

1g Kristallviolett (0,5%)  
60 ml 100% Ethanol (30%)  
6g 37% Formaldehyd (3%)  
200ml Destilliertes Wasser

### 3.8 Geräte

Autoklav: Systec V-150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator MCO 20 AIC	Sanyo, Osaka, Japan
Chemikalienschrank	Asecos GmbH, Gründau, Deutschland
Gefrierschränke	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland Sanyo, Osaka, Japan
Kühlschränke	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland Sanyo, Osaka, Japan
Mikroskope:	
CKX41, SZ61, KL1500 LCD	Olympus, Tokio, Japan
Photospectrometer	
Infinite M200	TECAN, Männedorf, Schweiz
Manuelle Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reference 10, 100, 200,1000 µl	
Multipipette Plus	Eppendor, Hamburg, Deutschland
Pipetboy akku	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Pipette-man	Gilson, Middleton, Vereinigte Staaten
(10µl, 20µl, 200µl,1000µl)	
Digitalkamera	Olympus, Tokio, Japan

Camedia C5060 Wide zoom	
Milli-Q Wasseranlage	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbänke:	
Hera Safe KS-12	Kendro, Hanau, Deutschland
Holten S-2010 1,8	Thermo Electron Corporation, Waltham, Vereinigte Staaten
BSB 4A Gelaire	Flowlaboratories, Sydney, Australien
BSK/4 Antair	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge (Rotana 460R)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Tischzentrifuge (Mikro 200)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
pH-Meter: InoLab pH 730	WTW GmbH, Dinslaken, Deutschland
Durchflußzytometer	
FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpen	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Vortexer	Inter Med, Geesthacht, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Biorad, Hercules, Vereinigte Staaten
Spannungsquellen (Power pac HC)	Biorad, Hercules, Vereinigte Staaten

### **3.9 Plastik, Glaswaren und Verschiedenes**

0,22 µm/ 0,45 µm Filter	Millex-HV PVDF Millipore, Hamburg, Deutschland
2, 5, 10, 25 ml Stripette	Corning, Corning, Vereinigte Staaten
5 ml Polystyren	
Round-Bottom Tube	Falcon a Corning Brand, Corning, Vereinigte Staaten
12-75 ml style Falcon	Falcon a Corning Brand, Corning, Vereinigte Staaten
Disposable Serological Pipette	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
12 Multi Well Platten	Falcon a Corning Brand, Corning, Vereinigte

Durchmesser 3,8 cm <sup>2</sup>	Staaten
Combitips Plus 2,5, 5, 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf® Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Glaswaren:	Schott, Mainz, Deutschland
	Duran, Mainz, Deutschland
Kimtec Starling* Nitrile L	Kimberley-Clark, Surrey, Vereinigtes Königreich
Parafilm 4 in x 125 Ft	Rolf Pechiney Plastics Packaging, Chicago, Vereinigte Staaten
PP-Falcon-tubes, 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
TC sonol 25 cm <sup>2</sup> Steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Tip one Rnase, DNAase, DNA and Pyrogen Free	Starlab Group, Hamburg, Deutschland
Tissue Culture Flask, 80 ml, 25 cm <sup>2</sup> canted	Falcon a Corning brand, Corning, Vereinigte Staaten
Neck Blue Plug seal Cap	

### **3.10 Software**

CalcuSyn für Windows	Biosoft, Cambridge, Vereinigtes Königreich
FACS Diva	BD, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
Microsoft Office Excel	Microsoft, Washington, Vereinigte Staaten
Tecan Software	TECAN, Männedorf, Schweiz

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

Alle Neuroblastomzellen werden in IMDM kultiviert (siehe 3.2). Optimale Wachstumsbedingungen sind bei einer feuchten, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre und 37°C gegeben. Diese Bedingungen werden durch einen Inkubator konstant gehalten. Unter diesen Bedingungen und in dem genannten Medium wachsen Neuroblastomzellen auf dem Boden von z. B. 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen adhärent und werden etwa alle 7 Tage passagiert. Die Kultur der Neuroblastomzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank.

Um die Zellen zu ernten wird nach einer Woche das alte Medium abgenommen und der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit einer Trypsin EDTA Lösung vom Boden und von einander gelöst und mit frischem Medium resuspendiert. Nach diesem Schritt befinden sich die Zellen einzeln in der Lösung schwimmend und es können neue Kulturen in der gewünschten Verdünnung angelegt werden. Wenn die Neuroblastomzellen nach 7 Tagen passagiert werden sollen, kann eine Verdünnung von 1:20 gewählt werden. In dieser Arbeit wurden die Kulturflaschen mit einem gesamten Volumen von 8 ml gefüllt. Bei einer 1:20 Verdünnung entspricht dies 0,4 ml Zelllösung und 7,6 ml frischem Medium. Die Neuroblastomzelle UKF-NB-3 par wächst in Abwesenheit von Cisplatin. Für die Umsetzung der Cisplatin adaptierten Neuroblastomsublinien wird zum Kulturmedium Cisplatin hinzugegeben in einer Konzentration von 1µg/ml. Für alle Zellen wurde wöchentlich zusätzlich eine Flasche ohne Zugabe von Zytostatikum angelegt.

### 4.2 MTT

#### 4.2.1 Grundlagen

Mit Hilfe des MTT Viabilitätstestes ist es möglich den Anteil an lebenden Zellen in einer Zellpopulation zu bestimmen. MTT ist das Akronym für die chemische Verbindung 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Diese chemische Verbindung hat eine charakteristische intensive gelbe Farbe und ist ein Vertreter der Tetrazoliumsalze. Durch Reduktion des MTTs entsteht das

wasserunlösliche dunkelblaue Formazan. Mit der Hilfe eines Photospektrometers wird die optische Dichte (OD) der Probe bestimmt. Gibt man das MTT zu einer Probe mit proliferierenden Zellen, dann kann man nach einer Weile einen Farbumschlag beobachten. Je mehr vitale Zellen, desto mehr Formazan entsteht. Sind die Zellen nicht mehr lebensfähig oder metabolisch inaktiv, dann gibt es keinen Farbumschlag. Diesen Effekt macht man sich bei dem MTT Assay zunutze, um die Wirksamkeit von potenziellen Chemotherapeutika *in vitro* zu testen.

1983 konnte Mosman zeigen, dass nur lebendige Zellen aktiv MTT spalten können, während tote Zellen fast komplett negativ sind, auch sogar nach unverzüglicher komplementvermittelter Zellyse.<sup>162</sup> Aufgrund dieser Entdeckung wurde erstmal angenommen, dass die Reduktion von MTT zu Formazan hauptsächlich Succinat abhängig durch die Komplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette erfolgt, die sich auf der inneren Membran der Mitochondrien befindet, aber Berridge und Tan zeigten, dass der Hauptanteil des umgewandelten Formazans NADPH- und NADH- abhängig im Zytosol entsteht<sup>163</sup>. Folglich muss man bedenken, dass das MTT Assay nicht selektiv die mitochondriale Aktivität der Zelle misst, sondern hauptsächlich durch die Glykolyserate der Zellen bestimmt wird.

In dieser Arbeit wurden 12 parallel an Cisplatin adaptierte Neuroblastomsublinien (UKF-NB-3/CDDP I-XII) sowie die Ursprungszelle UKF-NB-3 hinsichtlich der IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> inhibitorischen Konzentration verschiedener Zytostatika untersucht. Die IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> Werte beschreiben die Konzentration eines Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind (Inhibitorische Konzentration).

Um die IC<sub>50</sub> Werte besser vergleichen zu können, werden die IC<sub>50</sub> Werte der Ciplatin adaptierte Sublinien und der IC<sub>50</sub> Wert von UKF-NB-3 in Relation zueinander gesetzt. Durch diese Relation kann festgestellt werden, wie viel Male höher oder niedriger der IC<sub>50</sub> Wert in der Cisplatin adaptierten Sublinie ist, für ein beliebig getesteten Zytostatikum (siehe Abbildung 7). Diese Relation ist die relative Resistenz zum getesteten Zytostatikum im Vergleich zu UKF-NB-3.

$$\begin{aligned} \text{Relative Resistenz zum Zytostatikum X} &= \frac{\text{IC50 für X Zytostatikum der cisplatin adaptierte Sublinie}}{\text{IC50 für X Zytostatikum von UKF – NB – 3}} \\ \text{Quotient IC50 UKF-NB-3} &= \frac{\text{IC50 für X Zytostatikum UKF – NB – 3}}{\text{IC50 für X Zytostatikum UKF – NB – 3}} = 1 \end{aligned}$$

**Abbildung 7.** Berechnung der relativen Resistenz aus den IC50 Werten.

IC50: Konzentration eines Zytostatikums bei de 50 % der Zellen inhibiert werden.

#### 4.2.2 Durchführung

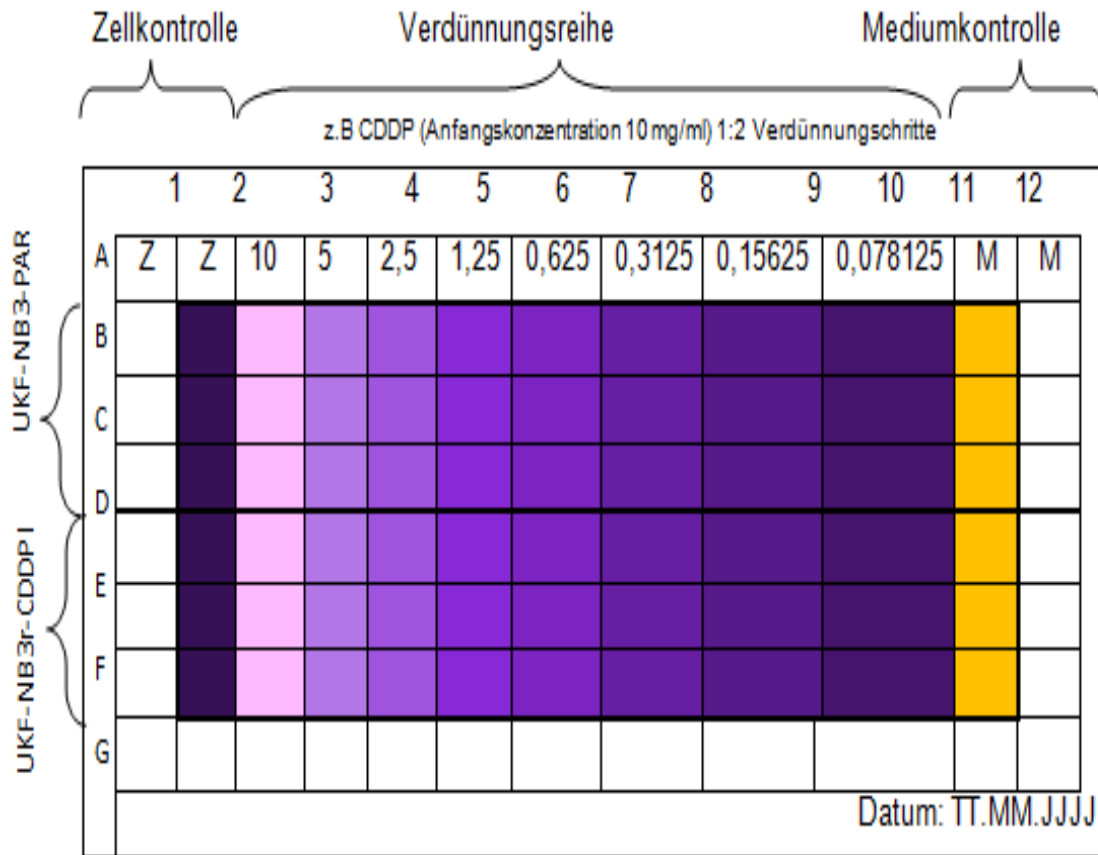
Zuerst werden die Zellen bis zur Konfluenz vorbereitet. Für die Cisplatin adaptierten Neuroblastomsublinien werden Flaschen ohne Zusatz von Cisplatin vorbereitet. Die Platten werden, wie in der Abbildung 8 beschriftet.

Acht kleine Module werden für die Verdünnungsreihe gebraucht. Diese Module werden mit Nährmedium gefüllt. Zuerst wird die höchste zu untersuchende Konzentration im Modul 1 eingestellt. Innerhalb der Verdünnungsreihe wird die Konzentration mit jedem Verdünnungsschritt halbiert. Wenn die Verdünnungsreihe fertig ist, werden mit der Multipette und entsprechend Abb. 8 in den Spalten 3-10 der Platte 50 µl Zytostatikum- Lösung pipettiert. Die Zelllösung wird mit frischem Nährmedium und mit Zellen aus den vorbereiteten Flaschen der Vorwoche hergestellt.

Die ersten zwei Spalten der 96 Loch-Platte werden für Zellkontrollen ausgespart. In diesen Spalten werden die Zellen ohne Zytostatikum bebrütet. Diese Spalten werden mit 50 µl Zelllösung und 50 µl frischem Kulturmedium gefüllt. In den Spalten 3-10 werden die zu untersuchenden Zellen mit einer bestimmten Konzentration an Zytostatikum bebrütet. In die Spalten 3-10 werden 50 µl Zelllösung und 50 µl Lösung mit Zytostatikum aus der Verdünnungsreihe pipettiert. Die Spalten 11-12 werden nur mit 100 µl Medium gefüllt und dienen als Mediumkontrollen.

Auf einer Platte können maximal bis zu 2 unterschiedliche Zellen untersucht werden. Dafür werden die Platten horizontal in Hälften geteilt. Auf den Reihen

A-D wird z. B. UKF-NB-3 getestet und auf den Reihen E-H z. B. UKF-NB-3+CDDP  
 I. Die Abbildung 8 zeigt exemplarisch den Versuchsaufbau einer 96 Lochplatte.



**Abbildung 8.** Aufbau einer 96 Lochplatte für den MTT Test.

Z: Spalten für die Zellkontrolle; M: Spalten für die Mediumkontrolle; CDDP: Cisplatin.

Wenn alle Platten fertig sind, werden sie in den CO<sub>2</sub> Inkubator gelegt und für 5 Tage bebrütet. Am 5. Tag werden 25 µl MTT in jedes Loch pipettiert und die Platten für 4 Stunden inkubiert. Danach werden 100 µl Sodium Dodecyl Sulfate (SDS 20 %) in jedes Loch pipettiert. Das SDS löst die Formazankristalle auf, lysiert die Zellen und beendet die zellabhängige Reduktion von MTT zu Formazan. Anschließend werden die Platten wieder im CO<sub>2</sub> Inkubator für eine weitere Nacht bebrütet. Am 6. Tag werden die Platten mit einem Plattenphotometer hinsichtlich der Absorption bei 560 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Jeder Ansatz wird gemittelt, dann wird der Mittelwert der Mediumkontrolle von allen Ansätze abgezogen (da es eine Art Hintergrundrauschen ist). Der



ermittelte Wert in der Zellkontrolle wird gleich 100 % Viabilität gesetzt und alle anderen Ansätze werden darauf prozentual bezogen. Hat man die Werte für die prozentuale Viabilität, können IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub>-Werte ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden die IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> Werte mit dem Program Calculusyn berechnet.

## **4.3 Durchflusszytometrie**

### **4.3.1 Grundlagen**

Moderne Durchflusszytometer ermöglichen es zahlreiche biologische Vorgänge der Zelle zu untersuchen. Unter anderem können Zellpopulationen charakterisiert werden, auch Zellmembranstrukturen sowie intrazelluläre Moleküle können nachgewiesen werden. Die wichtigste Fähigkeit eines Durchflusszytometers ist es, einzelne Zellen hinsichtlich Größe, Granularität und Fluoreszenz zu untersuchen. Diese Fähigkeit wird größtenteils durch das Fluidics System des Durchflusszytometers bewerkstelligt, denn es sorgt dafür, dass die Zellen hintereinander in einem Strang angeordnet werden. Dieser Vorgang wird hydrodynamic focusing genannt und er gewährleistet den Durchfluss einzelner Zellen durch das Detektionssystem des Durchflusszytometers.<sup>164</sup> Erst nach der hydrodynamischen Fokussierung ist es möglich innerhalb weniger Sekunden die einzelnen Zellen einer Probe zu untersuchen. Nach der hydrodynamischen Fokussierung fließen die Zellen durch unterschiedliche Laserstrahlen, und wenn eine Zelle einen Laserstrahl durchquert, wird das Licht unterschiedlich stark gebrochen. Das Licht, das in der Richtung des Lasers gebrochen wird, wird Vorwärtsstreulicht genannt (Forward Scatter, FSC). Senkrecht zum Laser gebrochenes Licht wird Seitwärtsstreulicht genannt (Side Scatter, SSC). Die Intensität vom FSC und SSC weisen auf physikalische Eigenschaften der Zellen hin.<sup>165</sup> Der FSC hängt von der Größe der Zellen ab. Der SSC hängt von der inneren Beschaffenheit oder Granularität der Zellen ab.<sup>165</sup> Weil für jede Zelle der FSC und SSC nahezu einmalig ist, kann die Kombination aus diesen beiden Parametern benutzt werden, um Populationen innerhalb einer heterogenen Probe wie Blut scharf voneinander abzugrenzen.

Unterschiedliche Detektoren im Durchflusszytometer sind in der Lage FSC, SSC, und Fluoreszenz im Bereich einer definierten Wellenlänge zu erfassen. Die

Messung der Fluoreszenz kann zusätzliche Informationen über eine große Zahl von Proteinen und zellulären Strukturen liefern, wenn diese Proteine in der Zelle durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper markiert sind. Unter anderem kann durch diese Technik eine unbekannte Zellpopulation auf die Expression von Transkriptionsfaktoren, Transporterkanälen, Rezeptoren, Signalproteinen oder Stammzellmarkern untersucht werden.

## **4.3.2 Durchführung**

### **4.3.2.1 Intrazelluläre Färbung**

Die Schritte der Antikörperfärbung variieren, je nachdem ob das gesuchte Protein auf der Zelloberfläche oder im Cytosol zu finden ist. In diesem Abschnitt wird die intrazelluläre Färbung erläutert und anschließend die abweichenden Schritte der extrazellulären Färbung erklärt.

Für diesen Versuch werden mindestens 5 Ansätze pro untersuchte Zelle benötigt. Drei Ansätze werden für die eigentliche Antikörperfärbung (Probe) gebraucht und 2 weitere Ansätze werden für die Isotyp Kontrollen benötigt. Die Zellen in den Isotyp Kontrollen werden mit Isotyp Antikörper behandelt. Isotyp Antikörper sind Antikörper derselben Antikörperklasse wie der verwendete Primärantikörper. Außerdem sind sie gekoppelt mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff wie der Erstantikörper. Die Isotyp Kontrollen sind notwendig, weil der Erstantikörper unspezifisch entweder durch den Fc-Teil oder durch nicht spezifische Zelladhäsion an der Zelle binden kann und diese Art der Bindung führt zum Auftreten von unspezifischer Fluoreszenz in den Proben. Die gemessene Fluoreszenz, der mit der Isotyp Antikörper behandelten Zellen ist das Maß für die unspezifische Antikörperbindung und muss nach der Messung von den Probenwerten abgezogen werden, um die Fluoreszenz zu errechnen, die nur durch die spezifische Bindung des primären Antikörpers am jeweiligen Epitop entsteht.

1. Am 5. Tag nach Ansetzen der Zellen wird das Medium vorsichtig aus den Flaschen abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst

- und eine 10 ml Zellsuspension mit PBS hergestellt. Jedes Röhrchen (3x Proben und 2x Isotypen) wird jeweils mit 2 ml der Zellsuspension gefüllt.
2. Die Proben und Isotypen werden für 5 Min bei 1600-1700 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildet sich ein Zellpellet auf dem Boden der Röhrchen. Das PBS wird jetzt vorsichtig abgegossen. Danach werden die Zellen mit der Hilfe eines Vortexmischers wieder in Lösung gebracht.
  3. Die Fixierung der Proben und Isotypen erfolgt mit 4% Formaldehyd. Es werden 100 µl 4% Formaldehyd pro Röhrchen pipettiert, nachfolgend wieder vortexen und die Lösung bei 4° C im Kühlschrank für 10 Minuten inkubieren lassen.
  4. Proben und Isotypen werden mit PBS gewaschen. Dazu wird 2 ml PBS in jedes Röhrchen gegeben, folgend vortexen, zentrifugieren bei 1600-1700 rpm für 5 Minuten, abgießen und wieder vortexen.
  5. Die Zellmembran wird für die Antikörper permeabel gemacht mit einer Perm/Wash-Lösung. Diese enthält Saponin, was Löcher in die Zellmembranen reißt. Die Perm/Wash-Lösung wird 1:10 verdünnt, davon werden 100 µl in jedes Röhrchen pipettiert, vortexen und bei 4° C für 10 Minuten inkubieren lassen.
  6. Perm/ Wasch abwaschen. Siehe 4.
  7. Die Zielproteine werden jetzt mit dem passenden Antikörper markiert. Der erste Antikörper wird nach Tabelle 9 und Angaben der Hersteller verdünnt und 20 µl der verdünnten Lösung in jede Proben pipettiert, vortexen und 20 - 30 Minuten bei 4° C im Kühlschrank binden lassen. Wenn der erste Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, ist ein zweiter Antikörper nicht nötig.
  8. Ersten Antikörper mit PBS abwaschen. Siehe 4.

9. Der zweite Antikörper wird zu den Proben gegeben. Hierzu werden 20 µl von dem unverdünnten zweiten Antikörper in die Proben pipettiert, dann vortexen und 20-30 Minuten bei 4° C im Kühlschrank binden lassen. Parallel werden die Isotypkontrollen (direkt fluoreszenzmarkiert) zu den entsprechenden Röhrchen hinzugegeben. 20 µl von den unverdünnten Isotypen in die Isotyp Kontrollen pipettieren, vortexen und 20-30 Minuten bei 4° C im Kühlschrank binden lassen.
10. Zweiten Antikörper und Isotypen abwaschen. Siehe 4.
11. Die Zellen für die Messung am Durchflusszytometer in 200 µl PBS resuspendieren und vortexen.
12. Die Proben im Durchflusszytometer messen oder bei Bedarf mit Parafilm abdecken und bei 4 °C max. 24 Stunden lagern.

### 4.3.2.2 Extrazelluläre Färbung

Die Fixierung sowie die Permeabilisierung der Zellen sind bei der extrazellulären Färbung nicht notwendig, das heißt die Schritte 3, 4, 5, 6 können übersprungen werden, die Zellen werden also nach Schritt 2 direkt mit dem ersten Antikörper gefärbt (Schritt 7). Ab dort gilt das Protokoll.

	<b>Bindungsstelle</b>	<b>Spezies</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Zielantigen</b>				
<b>BCRP</b>	intrazellulär	Maus	IgG <sub>1</sub>	1:20
<b>BMI-1</b>	intrazellulär	Maus	IgG <sub>1</sub>	1:200
<b>CD133</b>	extrazellulär	Maus	IgG <sub>2B</sub>	1:10
<b>GD2</b>	intrazellulär	Maus	IgG <sub>2A</sub>	1:20
<b>MDR-1</b>	extrazellulär	Maus	IgG <sub>2A</sub>	1:20
<b>Nanog</b>	intrazellulär	Kaninchen	IgG	1:50
<b>Necdin</b>	intrazellulär	Kaninchen	IgG	1:30
<b>Nestin</b>	intrazellulär	Maus	IgG <sub>1</sub>	1:250
<b>Oct-4</b>	intrazellulär	Kaninchen	IgG	1:50
<b>SOX-2</b>	intrazellulär	Kaninchen	IgG	1:100
<b>MRP-1</b>	Intrazellulär	Maus	IgG <sub>2A</sub>	1:20

**Tabelle 9.** Antikörper für die Durchflusszytometrie.

BCRP: Breast Cancer Resistance Protein, BMI-1: Polycomb Gruppe RING finger protein 4, CD133: Prominin-1, GD2: Disialogangliosid GD2, MDR-1: Multidrug-Resistance-Protein 1, Oct-4: Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4, SOX-2: Sex determining Region Y-box 2, MRP1: Multidrug resistance-associated protein 1.

## 4.4 Western Blot

### 4.4.1 Grundlagen

Durch die Methode des Western Blot werden Proteine mittels einer elektrischen Spannung aufgetrennt, und darauffolgend diese getrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Nach der Übertragung auf die Membran und die Bindung eines spezifischen Antikörpers kann das gesuchte Protein durch eine

Chemolumineszenz Reaktion detektiert und seine Molekülmasse ermittelt werden. Die Trennung der Proteine anhand ihrer Molekülmasse geschieht in dieser Arbeit durch die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese). Ein Western Blot Experiment setzt sich aus den Schritten Zellyse, Probenvorbereitung, Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese, Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran und Proteindetektion auf dem Detektor oder auf dem (Röntgen) Film zusammen. Nachfolgend werden die einzelnen Schritte beschrieben.

## **4.4.2 Probenvorbereitung**

### **4.4.2.1 Zellyse und Probenextraktion**

Um die Proteine von den anderen Zellbestandteilen wie DNA, RNA und Phospholipiden der Zellmembran trennen zu können, müssen zunächst die Zellen lysiert und das Zellysat zentrifugiert werden. Aufgrund der in den Zellen bei Raumtemperatur aktiven Proteasen wird während der Zellyse immer auf Eis gearbeitet. Zusätzlich enthält der benutzte Lysepuffer Proteaseinhibitoren, um der Aktivität dieser Proteine entgegenzuwirken.

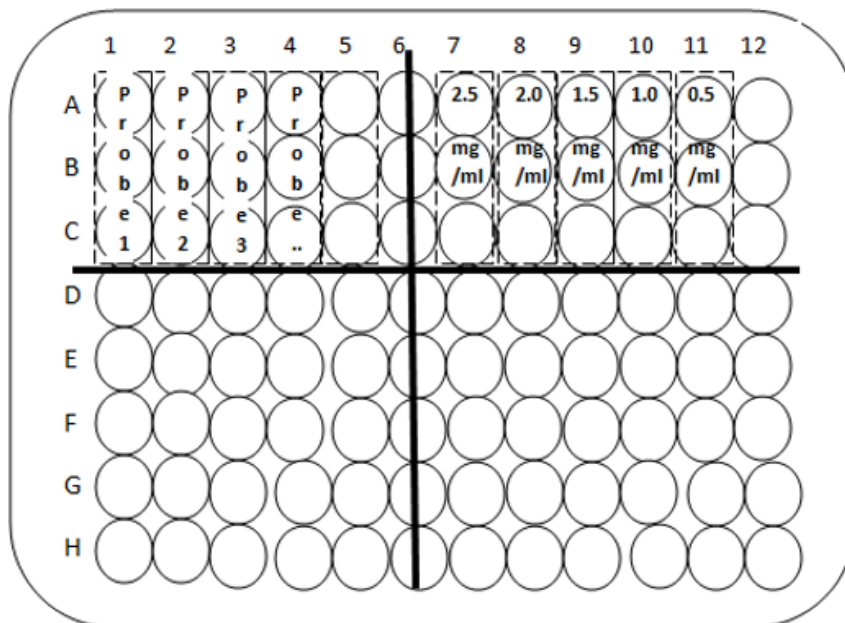
Nach Kultivierung der Zellen (Absch. 4.1.) wird das Medium aus den Kulturflaschen entfernt und der Zellrassen mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Danach werden 10 ml des Lysepuffers Triton-X-100 mit 1 Proteaseinhibitor Tablette gemischt (Absch. 3.5). Anschließend 0,5 ml vom fertigen Lysepuffer auf die Zellen pipettieren und für 10 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubieren lassen. Das entstandene Zellysat wird für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildet sich ein Überstand und ein Pellet, die gesuchten Proteine befinden sich im Lysatüberstand. Dieser Überstand wird mit der Pipette entnommen und in ein neues Röhrchen überführt. Wenn nötig kann das Zellysat bei -20°C für mehrere Wochen zwischengelagert werden.

### **4.4.2.2 Proteinbestimmung nach Biorad**

Die bei der Zellyse gewonnenen Proben haben alle eine unterschiedliche Proteinmenge. Diese Unterschiede sind unter anderem auf die verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen zurückzuführen. Damit der Western

Blot auch quantitative Informationen über ein bestimmtes Protein beim Vergleich mehrerer Proben liefern kann, müssen alle Proben die gleiche Gesamtmenge an Protein haben. Die Proteinbestimmung bei dieser Arbeit erfolgt mit dem "DC Protein Assay" von Biorad (Abschn. 3.5). Dieses Verfahren basiert auf zwei Reaktionen wie das bekannte Verfahren der Proteinbestimmung nach Lowry (erstbeschrieben 1951), gefolgt von einer photometrischen Untersuchung.<sup>166</sup> Bei dem "DC Protein Assay" reagieren Proteine mit einer Lösung alkalischen Kupfer Tartrats und Folin Reagenz. Dadurch bildet sich eine Lösung mit einer intensiven blauen Farbe. Mit einem Photometer kann dann die Absorption gemessen werden.

In einer 96 Loch Mikrotiterplatte werden jeweils 5 µl Proteinlösung (Proben) im Dreifach Ansatz und je 5 µl einer Verdünnungsreihe des Proteinstandards (auch im 3-fach Ansatz) pipettiert. (Siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9.** Proteinbestimmung in einer 96 Loch Platte.

In den Spalten 1-5 werden die Proben pipettiert. Spalte 6 bleibt Frei. In den Spalten 7-11 wird die Verdünnung der Proteinstandards pipettiert. Die Verdünnungsreihe des Standards besteht aus 2,5 mg/ml, 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml und 0,5 mg/ml bovines Serum Albumin.

In jedes Loch werden 25 µl A Mix (bestehend aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S) und 200 µl von Reagenz B pipettiert. Bei Raumtemperatur und nach

15 Minuten ist die Inkubationszeit der Reagenzien um. Jetzt können die Proben und die Proteinstandards mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm untersucht werden. Mithilfe der Proteinstandards wird eine Eichkurve erstellt und mit dieser Eichkurve kann den Proteingehalt der Proben ermittelt werden. Alle Proben werden auf die gleiche Proteinkonzentration (1 mg/ml) eingestellt. Die Verdünnung erfolgt mit Triton-X-100-Lysepuffer auf ein bestimmtes Volumen (z.B. 50-100 µl). Danach wird Lämmli Puffer (Abschn 3.5) in einem Verhältnis von 1:1 hinzugegeben und die Proben für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Durch das Kochen der Proben und die Zugabe des Lämmli Puffers werden die Proteine denaturiert. Auch Disulfidbrücken werden durch Mercapthoethanol und DTT (enthalten im Lämmli Puffer und später im Trenngel bei der SDS-PAGE) zerstört. Die fertigen Proben können für mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden.

#### **4.4.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem angelegten elektrischen Feld erfolgte durch die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE. Das Trenngel besteht aus einem Polymer aus Acrylamidmonomeren und N-N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisation zu einem dreidimensionalen Netz erfolgt durch Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat). Die Lücken dieses polymeren Netzes können von kleinen Proteinen schneller durchquert werden, dagegen erfahren große Proteine beim Durchqueren der kleinen Öffnungen einen höheren Widerstand und legen die Strecke zur Anode langsamer als kleine Proteine zurück. Das wichtige Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat), das im Lämmli Puffer, Laufpuffer und Trenngel enthalten ist, sorgt dafür dass alle Proteine unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz eine negative Ladung erhalten. Nur so können die Proteine während der Elektrophorese durch das Trenngel Richtung Anode wandern.

Um scharfe Banden am Ende des Trennverfahrens zu bekommen wurde 1970 die diskontinuierliche SDS-Elektrophorese von Lämmli eingeführt<sup>167</sup>. Bei diesem Verfahren werden 2 unterschiedliche Gele aufeinander gestapelt. Im ersten Gel (Sammelgel) werden die Proteine fokussiert, das bedeutet, dass die Proteine unabhängig von ihrer Masse zu einer einzelnen Bande angeordnet werden.



Diese Fokussierung geschieht im großporigen Netz des 3-5% Acrylamid Sammelgels durch die Interaktion der im Sammelgel enthaltenen Chloridionen und das im Laufpuffer befindliche Glycin. Im Trenngel erfolgt dann die Trennung anhand der Molekülmasse. Das Trenngel (pH 8,8) ist im Vergleich zu dem Sammelgel (pH 6,8) basischer und kleinporiger (Acrylamid 10-20%). Diese Eigenschaften vom Trenngel erlauben es Proteine mit einer hohen Auflösung zu trennen, auch wenn sich ihre Molekülmassen nur um 2 % von einander unterscheiden.<sup>167</sup>

#### **4.4.4 Herstellung der Polyacrylamid Gele**

Die Herstellung der Polyacrylamid Gele erfolgte in einem speziell geformten Gestell aus Plastik und Glas. Dieses wird als erstes zusammengebaut. Zwei Glasplatten dichten das Gestell nach vorne und hinten ab. Die Seiten und der Boden werden von Gummidichtungen abgedichtet. Zwischen den Glasplatten bildet sich eine Öffnung, wo das Gel hineingegossen wird. Zuerst wird in einem Becherglas das Trenngel vorbereitet (siehe hierzu Absch 3.5). Die gewählte Konzentration des Acrylamids imGel hängt von der Proteinmasse des untersuchten Proteins ab. Je kleiner das Protein, desto engmaschiger muss das Netz sein, desto höher ist also der Acrylamid Anteil im Gel. Als letztes werden APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetramethylethyldiamin) hinzugegeben. Ammoniumpersulfat initiiert die Polymerisation und TEMED wirkt als Katalysator. Die noch flüssige Lösung wird sofort mit Hilfe einer Glaspipette zwischen die Platten gegossen bis zur Markierung. Eine dünne Schicht von Isopropanol wird darauf appliziert, um den oberen Rand des Trenngels zu glätten und um Luftblasen zu vermeiden. Nach 15-20 Minuten ist die Polymerisation abgeschlossen und das Gel fest geworden. Die Isopropanolschicht wird entfernt und das Sammelgel kann nun auf das Trenngel (Absch. 3.5.) gegossen werden. Auch bei dem Sammelgel muss APS und TEMED am Ende zu der Lösung hinzugegeben werden, um einer vorzeitigen Verfestigung des Gels vorzubeugen. Am Ende wird ein vorgefertigter Plastikamm in dem noch flüssigen Sammelgel versenkt. Durch den Kamm bilden sich Taschen, wo später die Proben pipettiert werden. Nach weiteren 10-20 Minuten hat sich das Sammelgel verfestigt.

#### **4.4.5 Elektrophorese**

Die fertigen Polyacrylamidgele werden in eine vertikale Elektrophoresekammer gesteckt und die Trennkammer mit Laufpuffer (siehe Abschn. 3.5) bis zur oberen Markierung gefüllt. Auf einem Gel können bis zu 9 Proben + 1 Proteinstandard gleichzeitig laufen. Weil in dieser Arbeit mit 12 Cisplatin adaptierten Neuroblastomsublinien und mit der Zelle UKF-NB-3 gearbeitet wurde, mussten immer zumindest 2 Gele pro untersuchtem Protein gefertigt werden. In eine Elektrophoresekammer passen maximal 2 Gele. In die Taschen des Sammelgels werden je 15 µl der fertigen Proben pipettiert und 5 µl des Proteinstandards. Die Kammer wird mit dem Deckel abgedeckt und am Power Pac angeschlossen. Das Power Pac erzeugt eine elektrische Spannung, wodurch die negativ geladenen Proteine durch das Gel Richtung Anode wandern. Beim Lauf im Sammelgel wird eine Spannung am Gerät von 90 Volt eingestellt und eine Zeit von 15 Minuten. Für den Lauf im Trenngel wird eine Spannung von 120 Volt eingestellt und die Zeit auf 1,5 - 2 Stunden erhöht. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Lauffront den unteren Rand des Trenngels erreicht hat.

#### **4.4.6 Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose Membran (Immunoblot)**

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid Gel auf eine Nitrozellulose Membran erfolgt mit dem Prinzip der Elektrophorese, nämlich unter einer angelegten elektrischen Spannung. Dieses Mal verläuft das elektrische Feld nicht parallel, sondern senkrecht zur Achse des Gels. Auf diese Weise werden die Proteine jetzt aus dem Gel herausgezogen und wenn man zwischen Gel und Anode die Nitrocellulose Membran legt, werden die Proteine auf die Membran übertragen. Ein Vorteil der Übertragung auf eine Nitrozellulose Membran ist, dass Nitrozellulose widerstandsfähiger und leichter zu präservieren ist als das fragile und schnell austrocknende Polyacrylamid Gel. Nun werden vier eckige Nitrozellulose Stücke von etwa 8 cm x 6 cm Größe vorbereitet. Weil Nitrocellulose DNA, RNA und Proteine binden kann, müssen die Nitrocelluloseblätter immer mit der Pinzette gegriffen werden und der Kontakt mit verunreinigten Oberflächen muss vermieden werden.

Der eigentliche Western Blot erfolgt in einem speziellen Plastik Gestell der Marke Biorad. Die Gele werden zunächst vom oberen Teil, bestehend aus Sammelgel und Taschen, befreit. Das Gel wird vorsichtig in einer Wanne, gefüllt mit destilliertem Wasser, auf das Gestell geladen. Hier ist darauf zu achten, dass der schwarze Teil des Gestells unten zu liegen kommt. Dann wird wie folgt beladen: Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrozellulose, Filterpapier, Schwamm. Danach wird das Gestell zugemacht. Der Blotting Kasten wird mit Transferpuffer bis zur Markierung gefüllt, das beladene Gestell im Puffer versenkt und die Elektroden auf die richtigen Kontakte gesteckt. Für einen Kasten wird die Stromstärke 0,25 A eingestellt, für 2 Kästen 0,5 usw. Die Zeit wird auf 1,5 Stunden eingestellt.

Wenn die Transferzeit um ist, werden die geblotteten Membranen in lichtgeschützte Plastikbehälter verlegt und die Behälter mit Blocking Puffer gefüllt. Der Blocking Puffer enthält bovines Serumalbumin. Durch die Bindung dieses Proteins an der Nitrozellulose Membran wird eine unspezifische Bindung des Antikörpers mit der Membran verhindert. Hierdurch wird das unspezifische Hintergrundsignal beim Nachweis verringert. Nach 40 Minuten auf dem Schüttler ist die Blockierung der Membranen abgeschlossen und die vorher offenen Bindungsstellen durch die Benetzung mit Blocking Puffer (Absch. 3.5) vollständig besetzt.

Der erste spezifische Antikörper wird nach den Angaben des Herstellers verdünnt und dann auf die Membranen gegeben (siehe 3.5.1). Die Inkubation erfolgt über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C oder alternativ für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wird die Antikörperlösung aus dem Behälter entfernt und die Membranen 3 Mal für jeweils 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Eine weitere Blockierung der Membran mit Milchpulver Lösung oder Blocking Puffer erfolgt vor der Inkubation mit dem zweiten Antikörper. Der zweite Antikörper richtet sich nach der Spezies des ersten Antikörpers (siehe 3.5.2) und wird 1:20.000 in Blockpuffer verdünnt. Die Inkubation des 2. Antikörpers dauert 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wird die Antikörperlösung wieder aus dem Behälter entfernt und die Membran 3 Mal mit Waschpuffer gewaschen.

Die Detektion der Proteine erfolgt durch die Chemolumineszenz-Reaktion des Kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Absch 3.5). Das in diesem Kit enthaltene Luminol reagiert mit Wasserstoffperoxid und der konjugierten Meerrettich-Peroxidase des zweiten Antikörpers. Diese Reaktion erzeugt Photonen, die später in einem speziellen Film detektiert werden können. Hierfür wird 0,7 ml aus der 1:1 Mischung von Reagenz 1 und 2 auf jede Membran gegeben. Die Nitrocellulosemembran wird danach in Transparentfolie gepackt und in eine Filmkassette gelegt. Anschließend wird in der Dunkelkammer für ein bis mehrere Minuten ein Film auf die Folie gelegt, welcher danach in den Entwickler gegeben wird. Der Film wird nach Benetzung mit dem Entwickler kurz in Wasser getaucht, dann in Fixierer und erneut in Wasser. Danach wird der Film für ein paar Minuten in der Dunkelkammer getrocknet. Nach der Entwicklung sind jetzt die Banden auf dem Film zu sehen und mit Hilfe des mitgelaufenen Proteinstandards kann das Molekulargewicht des nachgewiesenen Proteins bestimmt werden. Wenn die Filme entwickelt worden sind, werden die Bilder mit einem Scanner digitalisiert.

#### **4.5 Colony Forming Assay**

Durch den Kolonienbildungstest wird die Fähigkeit einzelner Tumorzellen untersucht, Kolonien zu bilden. Diese Technik wurde 1956 von Puck und Markus veröffentlicht<sup>168</sup>. Seitdem sind mehre Variationen nach und nach eingeführt worden, um mit der Methode das Wachstumsverhalten von Tumorzellen und Stammzellen *in vivo*, nach Chemotherapie oder in Tieren zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden alle Neuroblastomsublinien auf 12 Well Platten (Fläche pro Loch 3,8 cm<sup>2</sup>) für eine Woche und ohne Zytostatikum kultiviert. Anschließend werden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Kolonien mit dem Mikroskop gezählt. Eine Kolonie wurde als eine Zellansammlung von mehr als 50 Zellen definiert.

Die Zellen werden wie üblich nach einer Woche geerntet. Die resuspendierten Zellen werden mit Trypanblau (Abschn. 3.7) gefärbt und mit der Bürker Zählkammer wird der Anteil lebendiger Zellen in der Zelllösung festgestellt. Der Farbstoff Trypanblau wird nur von toten Zellen aufgenommen, wenn die Zellmembran im Zuge der Apoptose durchlässig wird. Tote Zellen färben sich

dunkelblau und können somit nach Färbung von viablen Zellen (hell) unterschieden werden.

Bei bekannter Zellzahl wird ein Volumen errechnet, das 500 Zellen enthält. Dieses Volumen (mit 500 Zellen) wird in jedes Loch pipettiert und das Gesamtvolumen in jedem Loch auf 2 ml eingestellt. Jeder Versuch erfolgte im zweifach Ansatz. Nach einer Woche im Inkubator wird das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Färbung mit Kristallviolett für 10 Minuten. Der überschüssige Farbstoff wurde 3 mal mit 2 ml Wasser abgewaschen. Bei allen Pipettierschritten und besonders beim Abwaschen der Färbung mit Kristallviolett ist Vorsicht geboten und es soll keine Flüssigkeit direkt auf die Zellen pipettiert werden, weil sonst die Kolonien vom Boden gelöst werden. Die Platten werden bei Raumtemperatur für 10-20 Minuten getrocknet. Das Auszählen der Kolonien erfolgte manuell mit dem Mikroskop. Aus der Gesamtzahl der Kolonien wird ein Mittelwert errechnet und die Kolonienbildungseffizienz wird mit der folgenden Formel errechnet:

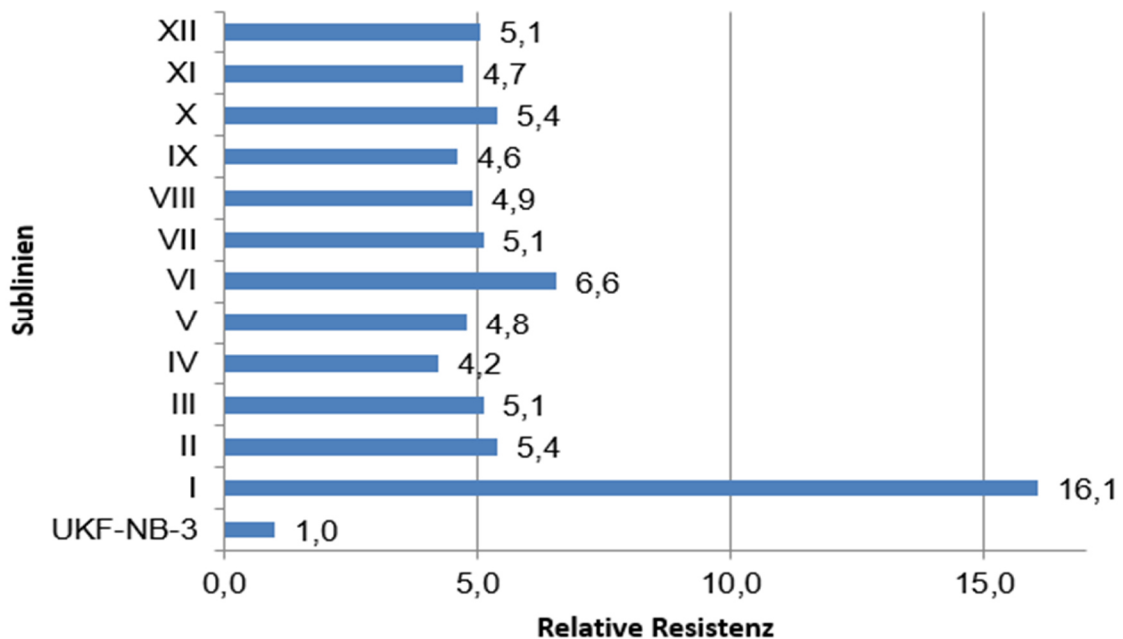
$$\text{Kolonienbildungseffizienz} = \frac{\text{Anzahl an gebildeten Kolonien}}{\text{Anzahl an ausgesäten Zellen}} \times 100$$

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Resistenzen gegen unterschiedliche Zytostatika

#### 5.1.1 Cisplatin

Das Ausmaß der Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin wurde durch die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte und IC<sub>90</sub>-Werte überprüft. Die Cisplatin adaptierten Sublinien UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> I-XII haben einen 4,2 - 16,1 mal höheren IC<sub>50</sub>-Wert gegen Cisplatin als UKF-NB-3. Die Abbildung 10 zeigt die relative Resistenz (IC<sub>50</sub>-Werte der Cisplatin adaptierten Sublinien in Relation zum IC<sub>50</sub>-Wert der sensitiven Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3). Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die IC<sub>50</sub>-Werte und IC<sub>90</sub>-Werte. Der viel höhere Wert der Sublinie UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> I fällt auf. Zu erwähnen ist, dass diese Sublinie länger mit Cisplatin passagiert wurde als alle anderen Cisplatin adaptierten Sublinien.



**Abbildung 10.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien I-XII gegen Cisplatin im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient IC<sub>50</sub> Cisplatin der Cisplatin adaptierten Sublinie/ IC<sub>50</sub> Cisplatin von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem IC<sub>50</sub>). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (weniger resistent).

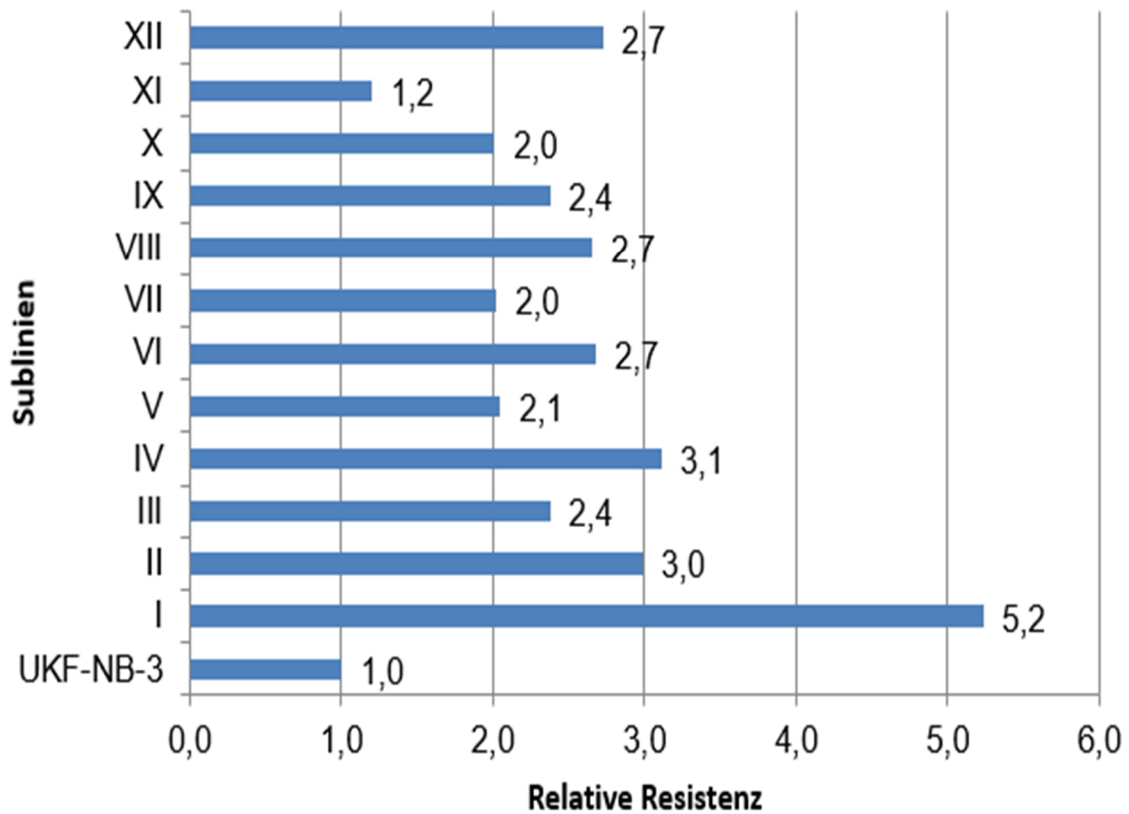
Sublinie	IC50-Wert (µg/ml)	IC90-Wert (µg/ml)
UKF-NB-3	0,18 ± 0,03	0,50 ± 0,08
UKF-NB-3-R-CDDP-I	2,89 ± 0,32	3,86 ± 0,43
UKF-NB-3-R-CDDP-II	0,97 ± 0,08	2,74 ± 0,47
UKF-NB-3-R-CDDP-III	0,92 ± 0,11	1,82 ± 0,26
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	0,76 ± 0,24	1,93 ± 0,56
UKF-NB-3-R-CDDP-V	0,86 ± 0,08	3,18 ± 0,98
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	1,14 ± 0,09	3,03 ± 1,12
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	0,93 ± 0,13	1,94 ± 0,56
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	0,87 ± 0,11	2,06 ± 0,47
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	0,88 ± 0,20	2,46 ± 1,79
UKF-NB-3-R-CDDP-X	0,91 ± 0,18	3,31 ± 1,52
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	0,83 ± 0,08	1,73 ± 0,27
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	0,83 ± 0,26	1,97 ± 0,41

**Tabelle 10.** IC50-Werte und IC90-Werte (in µg/ml) für Cisplatin an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII).

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.2 YM155

Die Cisplatin adaptierten Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I-XII sind resistenter gegenüber dem Survivin-Inhibitor YM-155 als UKF-NB-3. Die IC50-Werte der Sublinien sind 1,2 - 5,2 mal höher als der IC50-Wert der Neuroblastomzelle UKF-NB-3 (siehe Tabelle 11). Der IC50-Wert der Sublinie UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> XI ist nicht viel höher als der IC50-Wert von UKF-NB-3. UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I steht aus der Gruppe heraus und hat den höchsten IC50-Wert gegen YM155. In der Tabelle 11 sind alle IC50- und IC90-Werte für YM-155 aufgeführt.



**Abbildung 11.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen YM-155 im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient IC<sub>50</sub> YM-155 der Cisplatin adaptierten Sublinie/ IC<sub>50</sub> YM-155 von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem IC<sub>50</sub>). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (weniger resistent). YM-155: Sepatronium Bromide.

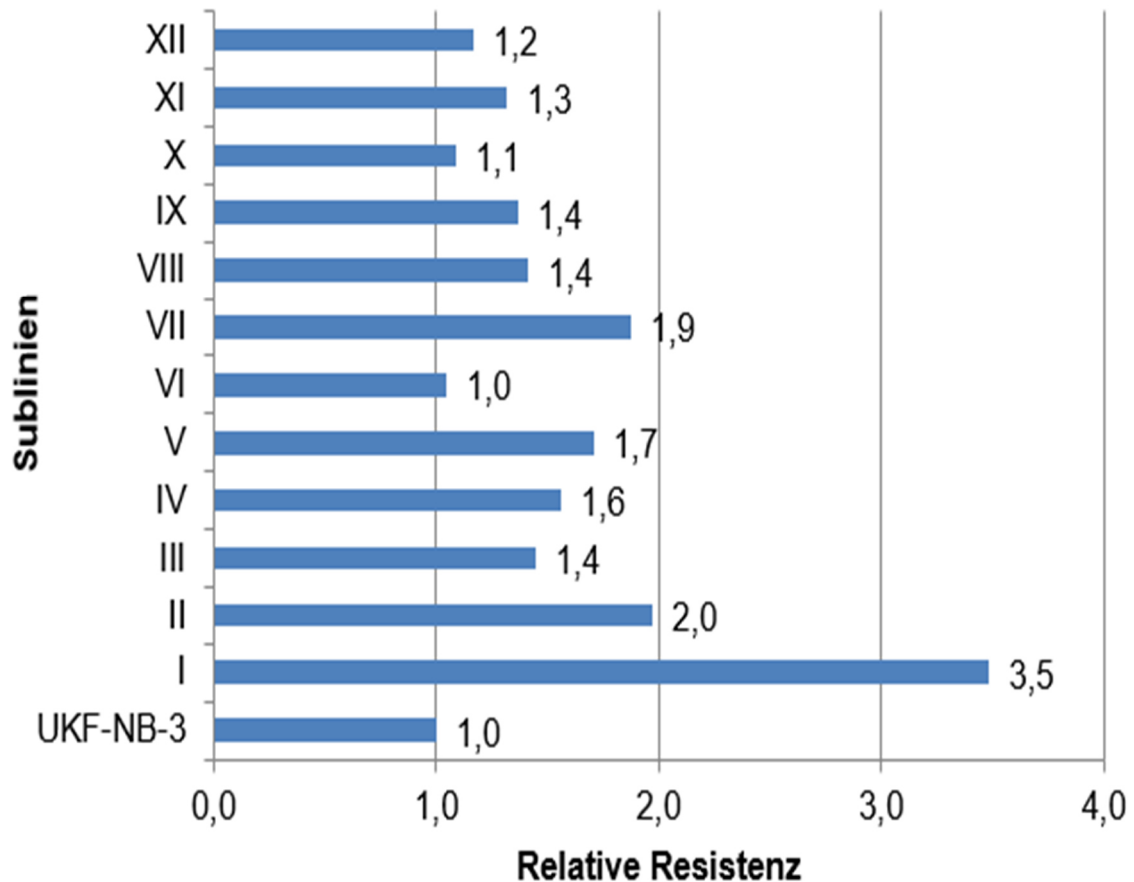


<b>Sublinien</b>	<b>IC50-Wert (nM/ml)</b>	<b>IC90-Wert (nM/ml)</b>
<b>UKF-NB-3</b>	0,81 ± 0,02	1,38 ± 0,09
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-I</b>	4,23 ± 0,87	12,34 ± 2,17
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-II</b>	2,42 ± 0,58	5,50 ± 2,13
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-III</b>	1,92 ± 0,37	5,90 ± 3,46
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-IV</b>	2,52 ± 0,67	8,19 ± 1,56
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-V</b>	1,66 ± 0,10	3,86 ± 1,09
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-VI</b>	2,17 ± 0,24	10,18 ± 7,45
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-VII</b>	1,64 ± 0,44	5,14 ± 1,56
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-VIII</b>	2,15 ± 0,65	5,00 ± 1,07
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-IX</b>	1,92 ± 0,43	4,17 ± 1,69
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-X</b>	1,95 ± 0,23	4,33 ± 1,35
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-XI</b>	0,97 ± 0,03	2,75 ± 0,02
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-XII</b>	2,21 ± 0,72	10,19 ± 3,64

**Tabelle 11.** IC50-Werte und IC90-Werte (in nM/ml) für YM-155 an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien. IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz. YM-155: Sepatronium Bromide.

### 5.1.3 Doxorubicin

Die IC<sub>50</sub>-Werte für Doxorubicin liegen in den Cisplatin-adaptierten Sublinien 1-3,5-fach höher als der IC<sub>50</sub>-Wert in UKF-NB-3. UKF-NB-3<sup>CDDP</sup><sup>1000</sup> I hat den höchsten IC<sub>50</sub>-Wert gegen Doxorubicin. Dieser Wert ist im Vergleich zu UKF-NB-3 um das 3,5-fache höher (siehe Abbildung 12). Die Tabelle 12 fasst die IC<sub>50</sub>- und IC<sub>90</sub>-Werte für Doxorubicin zusammen.



**Abbildung 12.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Doxorubicin im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient IC<sub>50</sub> Doxorubicin der Cisplatin adaptierten Sublinie/ IC<sub>50</sub> Doxorubicin von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem IC<sub>50</sub>). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (weniger resistent).

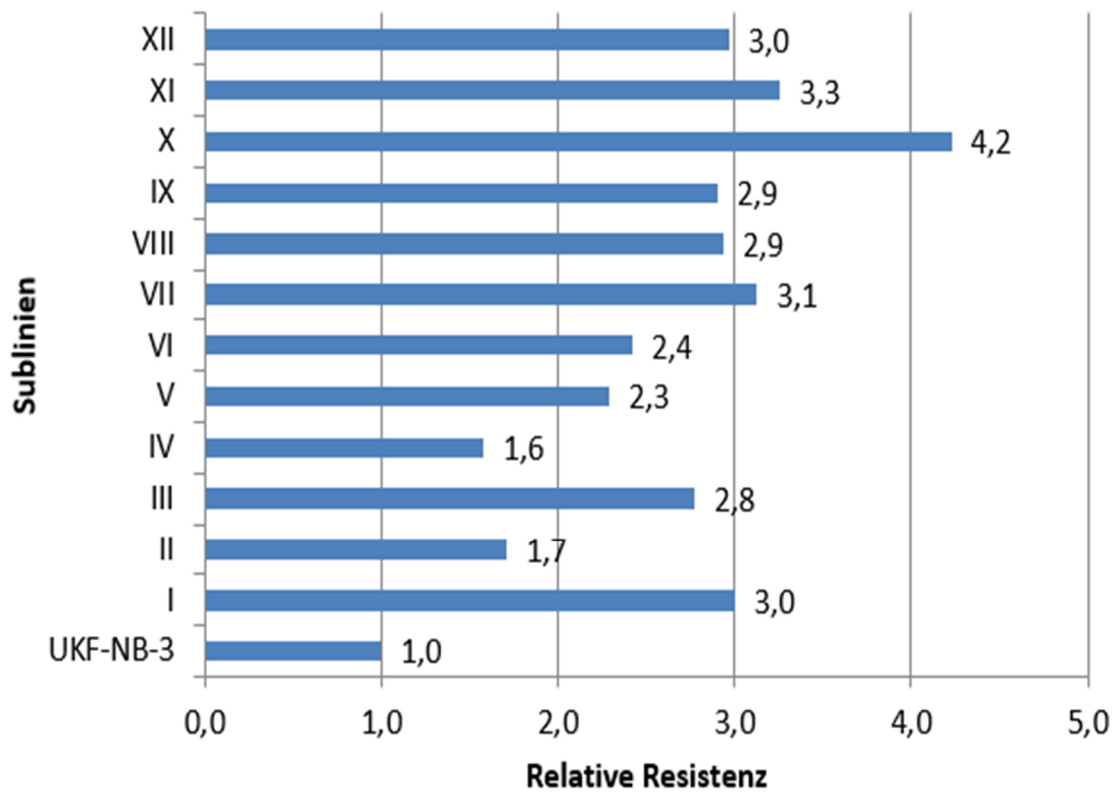
Sublinie	IC50-Wert (ng/ml)	IC90-Wert (ng/ml)
UKF-NB-3	1,50 ± 0,33	3,07 ± 1,29
UKF-NB-3-R-CDDP-I	5,23 ± 1,06	8,59 ± 1,48
UKF-NB-3-R-CDDP-II	2,96 ± 2,69	4,28 ± 1,82
UKF-NB-3-R-CDDP-III	2,17 ± 0,54	3,87 ± 0,63
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	2,34 ± 0,66	3,66 ± 1,10
UKF-NB-3-R-CDDP-V	2,56 ± 0,65	6,13 ± 1,23
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	1,57 ± 0,47	9,58 ± 11,86
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	2,81 ± 0,36	5,32 ± 2,34
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	2,12 ± 0,42	4,82 ± 1,42
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	2,05 ± 0,59	10,86 ± 9,47
UKF-NB-3-R-CDDP-X	1,63 ± 0,55	4,40 ± 2,25
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	1,98 ± 0,46	3,52 ± 0,64
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	1,75 ± 1,13	3,81 ± 2,38

**Tabelle 12.** IC50-Werte und IC90-Werte (in ng/ml) für Doxorubicin an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

#### 5.1.4 Melphalan

Gegen Melphalan zeigen alle Cisplatin-adaptierten Sublinien 1,6 bis 4,2 fach höhere IC<sub>50</sub>-Werte als UKF-NB-3 (siehe Abbildung 13). Die Tabelle 13 fasst die IC<sub>50</sub>- und IC<sub>90</sub>-Werte für Melphalan zusammen.



**Abbildung 13.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Melphalan im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient IC<sub>50</sub> Melphalan der Cisplatin adaptierten Sublinie/ IC<sub>50</sub> Melphalan von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem IC<sub>50</sub>). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (weniger resistent).

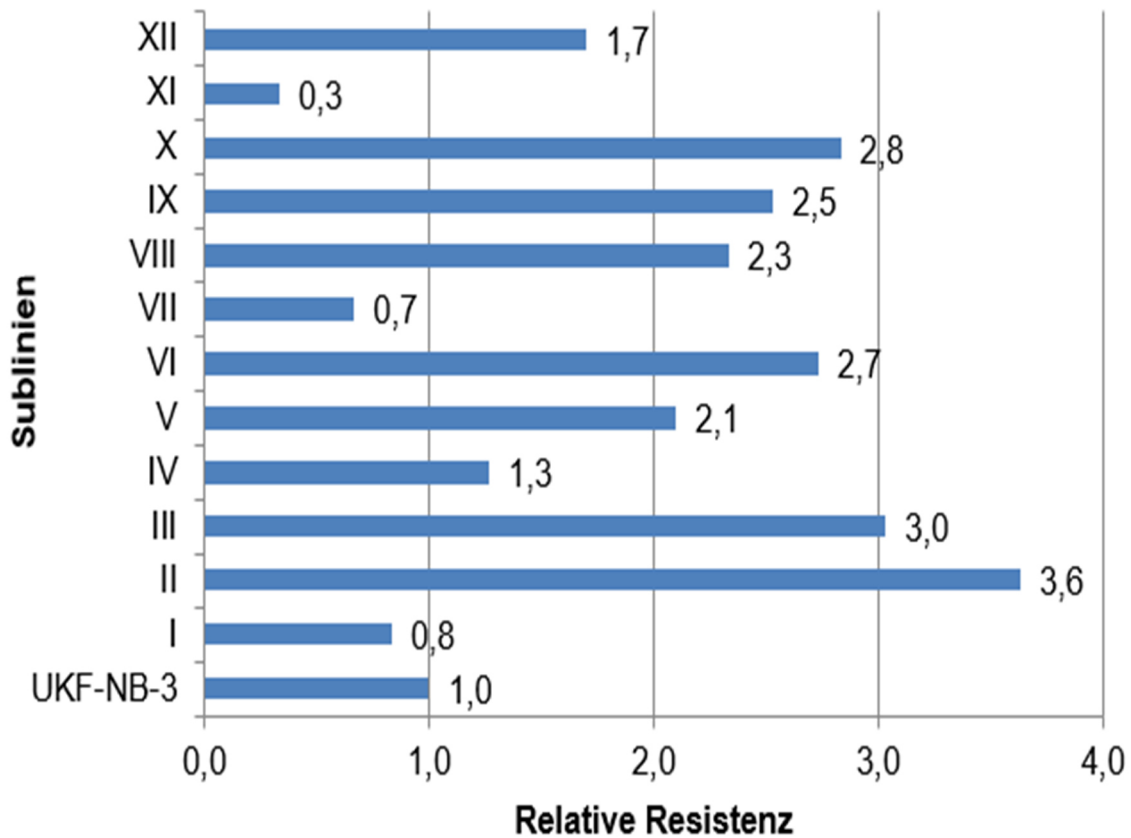
Sublinien	IC50-Wert (µg/ml)	IC90-Wert (µg/ml)
UKF-NB-3	0,31 ± 0,04	0,60 ± 0,06
UKF-NB-3-R-CDDP-I	0,93 ± 0,10	1,08 ± 0,24
UKF-NB-3-R-CDDP-II	0,53 ± 0,20	2,95 ± 2,06
UKF-NB-3-R-CDDP-III	0,86 ± 0,20	2,74 ± 2,20
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	0,49 ± 0,16	2,34 ± 2,20
UKF-NB-3-R-CDDP-V	0,71 ± 0,26	1,95 ± 0,56
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	0,75 ± 0,28	2,20 ± 1,65
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	0,97 ± 0,41	1,98 ± 0,85
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	0,91 ± 0,26	2,20 ± 1,71
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	0,90 ± 0,26	2,19 ± 0,15
UKF-NB-3-R-CDDP-X	1,31 ± 0,21	3,55 ± 1,45
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	1,01 ± 0,12	2,57 ± 0,79
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	0,92 ± 0,02	3,61 ± 1,31

**Tabelle 13.** IC50-Werte und IC90-Werte (in µg/ml) für Melphalan an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.5 Vincristin

Die IC50-Werte für Vincristin schwankten zwischen den Sublinien (siehe Tabelle 5.1.5). Die Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I, VII, XI haben einen niedrigeren IC50-Wert als UKF-NB-3 (0,3 bis 0,8 fach), die restlichen Sublinien zeigen einen höheren IC50-Wert als UKF-NB-3. Im Verhältnis zum IC50-Wert von UKF-NB-3 sind meist die IC50-Werte der Cisplatin adaptierten Sublinien 1,3 - 3,6-fachen höher (siehe Abbildung 14). Die Tabelle 14 fasst die IC50- und IC90-Werte für Vincristin zusammen.



**Abbildung 14.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Vincristin im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient  $IC_{50}$  Vincristin der Cisplatin adaptierten Sublinie/  $IC_{50}$  Vincristin von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem  $IC_{50}$ ). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (weniger resistent).

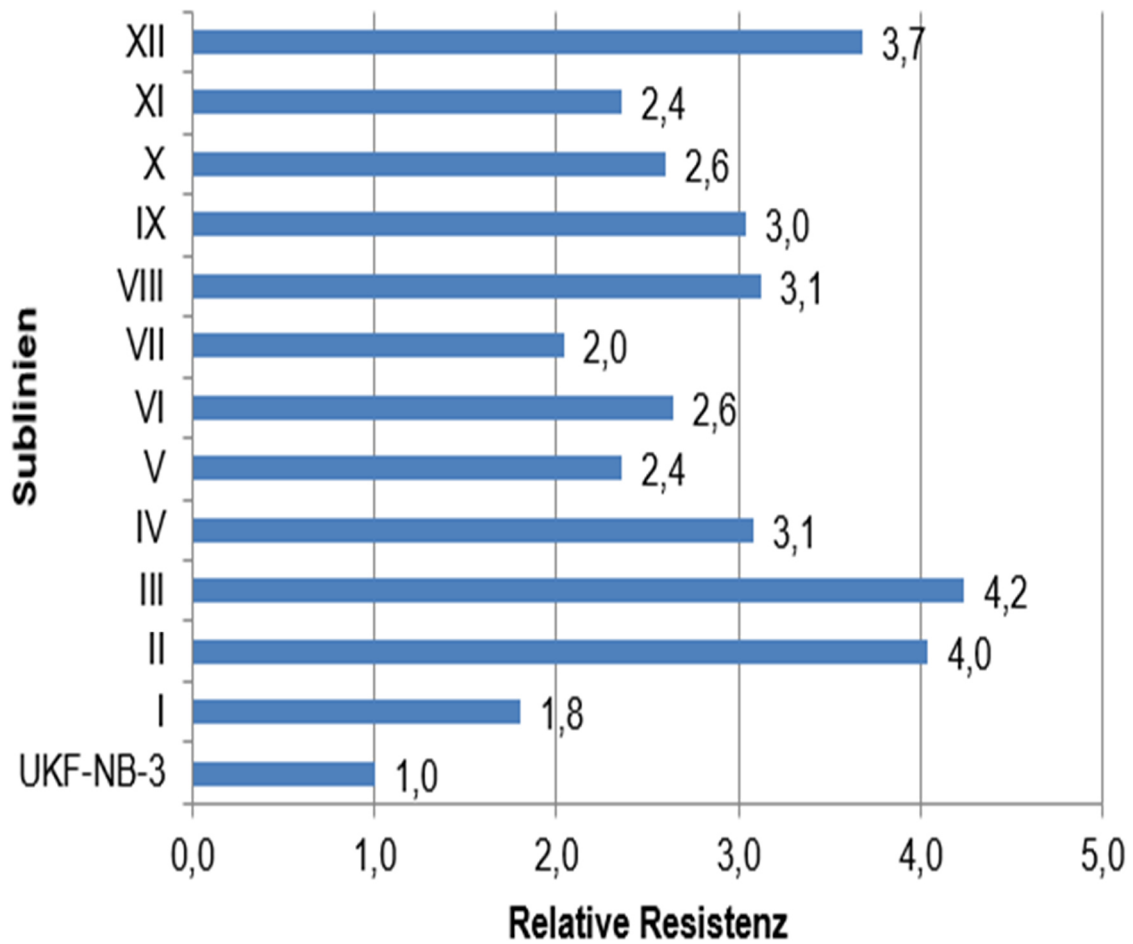
Sublinien	IC50-Wert (ng/ml)	IC90-Wert (ng/ml)
UKF-NB-3	0,30 ± 0,01	0,79 ± 0,07
UKF-NB-3-R-CDDP-I	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,13
UKF-NB-3-R-CDDP-II	1,09 ± 0,11	2,37 ± 0,14
UKF-NB-3-R-CDDP-III	0,91 ± 0,03	2,13 ± 1,02
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	0,38 ± 0,03	0,85 ± 0,12
UKF-NB-3-R-CDDP-V	0,63 ± 0,14	1,50 ± 0,15
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	0,82 ± 0,21	1,30 ± 0,19
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	0,20 ± 0,02	0,85 ± 0,60
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	0,70 ± 0,11	1,63 ± 0,16
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	0,76 ± 0,22	0,98 ± 0,12
UKF-NB-3-R-CDDP-X	0,85 ± 0,24	1,56 ± 0,52
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	0,10 ± 0,02	6,93 ± 8,66
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	0,51 ± 0,04	0,80 ± 0,20

**Tabelle 14.** IC50-Werte und IC90-Werte (in ng/ml) für Vincristin an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.6 Docetaxel

Im Vergleich zu UKF-NB-3 sind alle Cisplatin adaptierten Sublinien resistenter gegen Docetaxel. Die IC50-Werte der Cisplatin adaptierten Sublinien liegen um das 1,8 - 4,2 fache höher als der IC50-Wert von UKF-NB-3 (siehe Abbildung 15). Die Tabelle 15 fasst die IC50- und IC90-Werte für Docetaxel zusammen.



**Abbildung 15.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Docetaxel im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient  $IC_{50}$  Docetaxel der Cisplatin adaptierten Sublinie/  $IC_{50}$  Docetaxel von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem  $IC_{50}$ ). Relative Resistenz  $> 1$ : Jeweilige Sublinie hat ein höheren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz  $< 1$ : jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (weniger resistent).



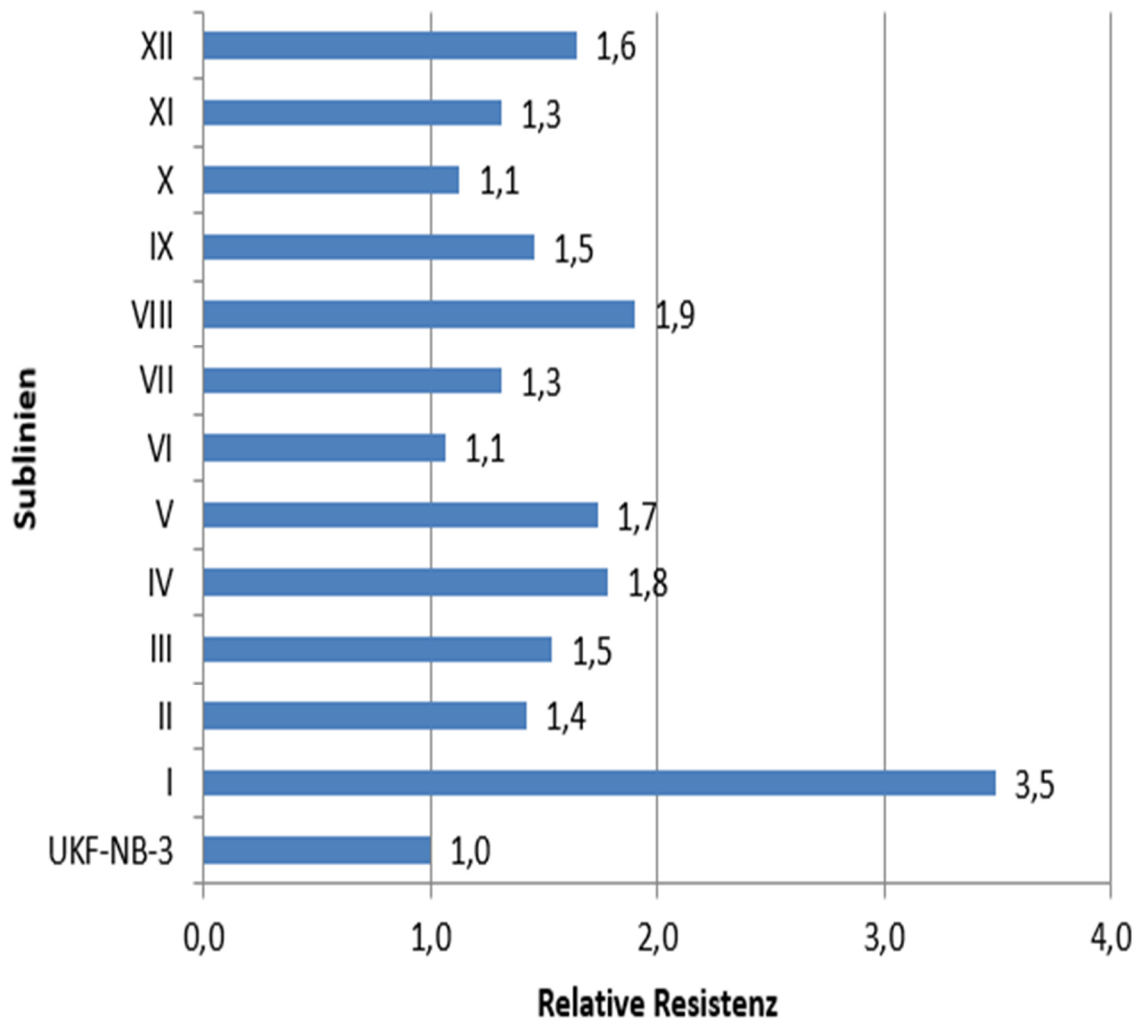
Sublinien	IC50-Wert (ng/ml)	IC90-Wert (ng/ml)
UKF-NB-3	0,25 ± 0,15	0,59 ± 0,47
UKF-NB-3-R-CDDP-I	0,45 ± 0,09	0,67 ± 0,17
UKF-NB-3-R-CDDP-II	1,01 ± 0,64	2,59 ± 1,83
UKF-NB-3-R-CDDP-III	1,06 ± 0,54	2,17 ± 1,30
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	0,77 ± 0,45	1,02 ± 0,44
UKF-NB-3-R-CDDP-V	0,59 ± 0,18	1,04 ± 0,41
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	0,66 ± 0,27	1,32 ± 0,81
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	0,51 ± 0,34	1,05 ± 0,71
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	0,78 ± 0,28	1,60 ± 0,55
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	0,76 ± 0,28	1,13 ± 0,29
UKF-NB-3-R-CDDP-X	0,65 ± 0,31	1,83 ± 1,81
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	0,59 ± 0,27	0,98 ± 0,46
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	0,92 ± 0,16	1,62 ± 0,50

**Tabelle 15.** IC50-Werte und IC90-Werte (in ng/ml) für Docetaxel an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.7 Etoposid

Bei Etoposid fällt vor allem UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> I auf: hier liegt der IC50-Wert gegen Etoposid bei 97,33 ng/ml. Dieser Wert ist im Vergleich zum IC<sub>50</sub>-Wert von UKF-NB-3 (27,89 ng/ml) 3,5-fach höher. Die restlichen Sublinien zeigen 1,1 bis 1,9-fach höhere IC50-Werte gegen Etoposid als UKF-NB-3. Die IC50- und IC90-Werte gegen Etoposid für alle anderen Cisplatin adaptierten Sublinie können aus Tabelle 16 abgelesen werden. Die Relation der IC50-Werte der Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Etoposid zum IC50-Wert von UKF-NB-3 wird in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Etoposid im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient IC<sub>50</sub> Etoposid der Cisplatin adaptierten Sublinie/ IC<sub>50</sub> Etoposid von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem IC<sub>50</sub>). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (weniger resistent).

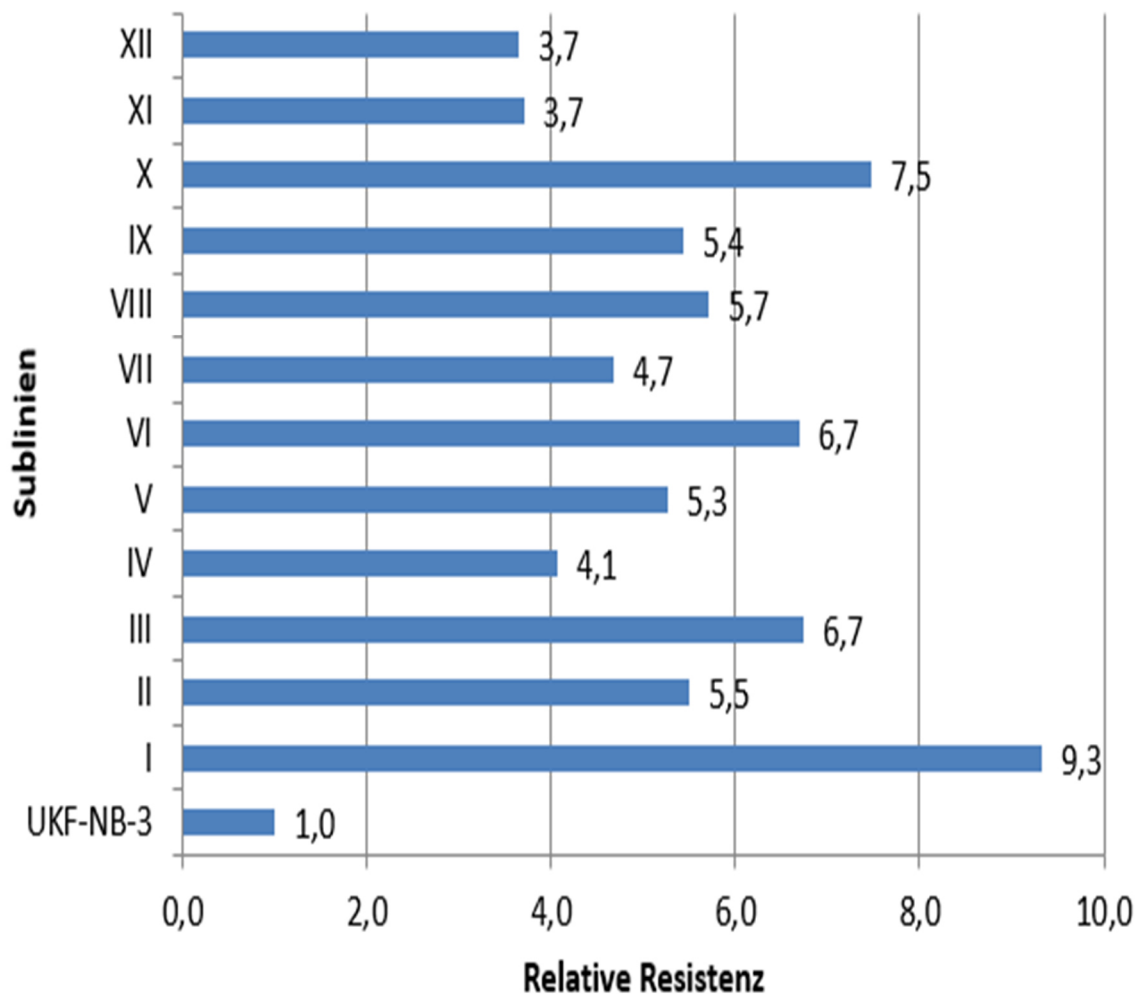
Sublinien	IC50-Wert (ng/ml)	IC90-Wert (ng/ml)
UKF-NB-3	27,8 ± 9,4	63,78 ± 21,8
UKF-NB-3-R-CDDP-I	97,3 ± 14,1	271,17 ± 173,0
UKF-NB-3-R-CDDP-II	39,6 ± 15,5	118,38 ± 22,5
UKF-NB-3-R-CDDP-III	42,9 ± 8,2	122,72 ± 43,8
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	49,7 ± 8,4	102,26 ± 22,8
UKF-NB-3-R-CDDP-V	48,4 ± 8,4	160,32 ± 59,4
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	29,7 ± 10,2	96,52 ± 19,7
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	36,6 ± 7,3	133,11 ± 27,2
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	53,0 ± 5,5	168,68 ± 26,7
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	40,6 ± 3,5	233,13 ± 267,8
UKF-NB-3-R-CDDP-X	31,5 ± 16,9	173,70 ± 94,2
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	36,6 ± 24,5	66,66 ± 11,3
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	45,8 ± 22,6	110,57 80,0

**Tabelle 16.** IC50-Werte und IC90-Werte (in ng/ml) für Etoposid an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.8 Carboplatin

Alle Cisplatin adaptierte Sublinien haben einen deutlich höheren IC50-Wert gegen Carboplatin als UKF-NB-3. Die IC50-Werte der Sublinien sind etwa 3,7-9,3 fach höher als der IC50-Wert von UKF-NB-3 (siehe Abbildung 17). Die Tabelle 17 fasst die IC50- und IC90-Werte gegen Carboplatin zusammen.



**Abbildung 17.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Carboplatin im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient  $IC_{50}$  Carboplatin der Cisplatin adaptierten Sublinie/  $IC_{50}$  Carboplatin von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem  $IC_{50}$ ). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (weniger resistent).

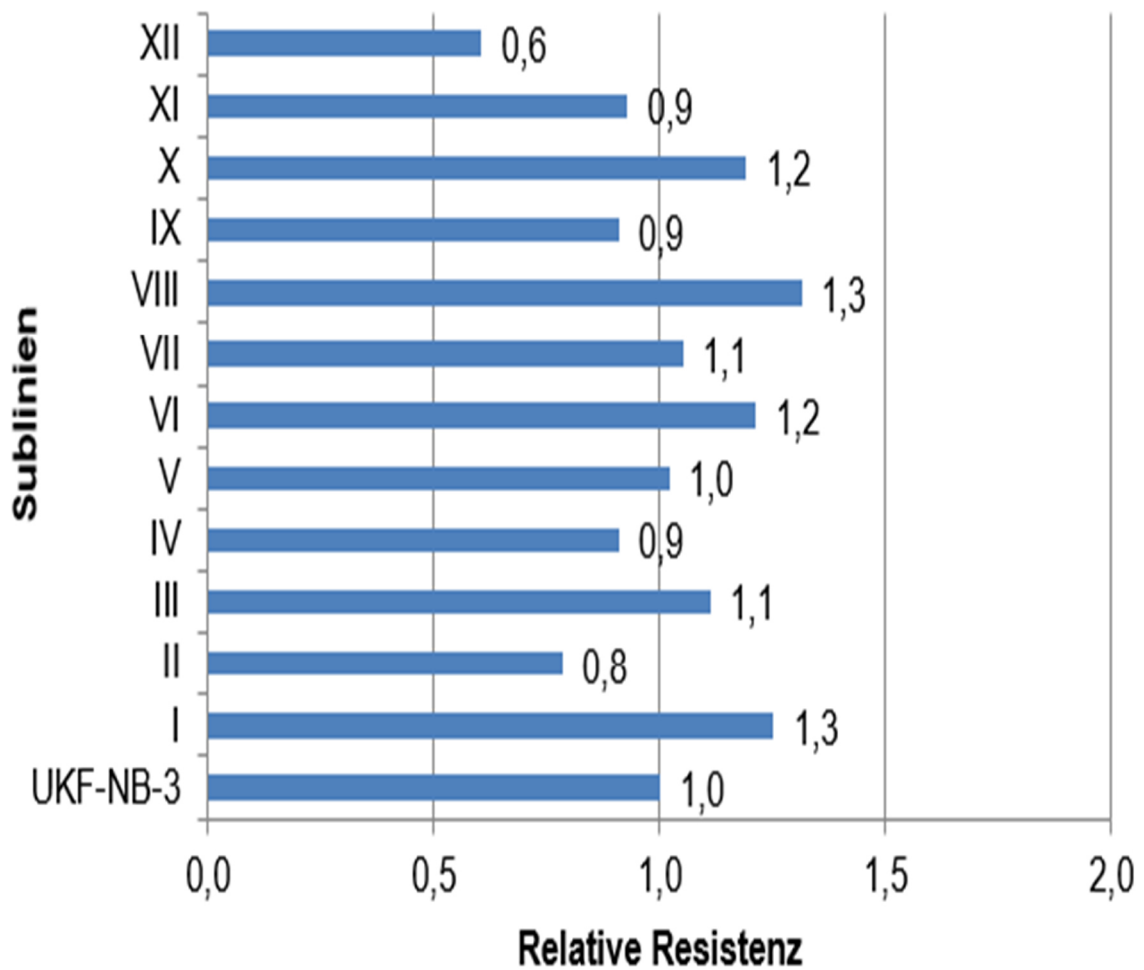
Sublinie	IC50-Wert ( $\mu\text{g/ml}$ )	IC90-Wert ( $\mu\text{g/ml}$ )
UKF-NB-3	$0,80 \pm 0,15$	$2,09 \pm 0,98$
UKF-NB-3-R-CDDP-I	$7,46 \pm 0,09$	$12,45 \pm 0,40$
UKF-NB-3-R-CDDP-II	$4,40 \pm 0,18$	$12,98 \pm 3,61$
UKF-NB-3-R-CDDP-III	$5,39 \pm 0,01$	$11,28 \pm 0,09$
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	$3,25 \pm 0,12$	$7,27 \pm 1,02$
UKF-NB-3-R-CDDP-V	$4,21 \pm 0,07$	$10,59 \pm 0,05$
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	$5,35 \pm 0,23$	$7,13 \pm 0,89$
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	$3,74 \pm 0,22$	$8,63 \pm 0,24$
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	$4,57 \pm 0,05$	$10,91 \pm 1,65$
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	$4,35 \pm 0,07$	$11,49 \pm 1,69$
UKF-NB-3-R-CDDP-X	$5,98 \pm 0,88$	$13,48 \pm 3,50$
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	$2,96 \pm 0,06$	$6,19 \pm 0,16$
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	$2,92 \pm 0,04$	$6,33 \pm 0,19$

**Tabelle 17.** IC50-Werte und IC90-Werte (in  $\mu\text{g/ml}$ ) für Carboplatin an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.9 Gemcitabin

Der IC50-Wert von Gemcitabin liegt in UKF-NB-3 bei  $0,99 \text{ ng/ml}$ . Die IC50-Werte der Cisplatin adaptierten Sublinien liegen in einem Bereich zwischen  $0,6 - 1,3 \text{ ng/ml}$  und unterscheiden sich nicht stark vom IC50-Wert in UKF-NB-3. Die Tabelle 18 fasst die IC50- und IC90-Werte von Gemcitabin zusammen. Die Abbildung 18 zeigt die IC50-Werte der Sublinien gegen Gemcitabin im Verhältnis zum IC50-Wert von UKF-NB-3.



**Abbildung 18.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Gemcitabin im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient  $IC_{50}$  Gemcitabin der Cisplatin adaptierten Sublinie/  $IC_{50}$  Gemcitabin von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem  $IC_{50}$ ). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren  $IC_{50}$  als UKF-NB-3 (weniger resistent).

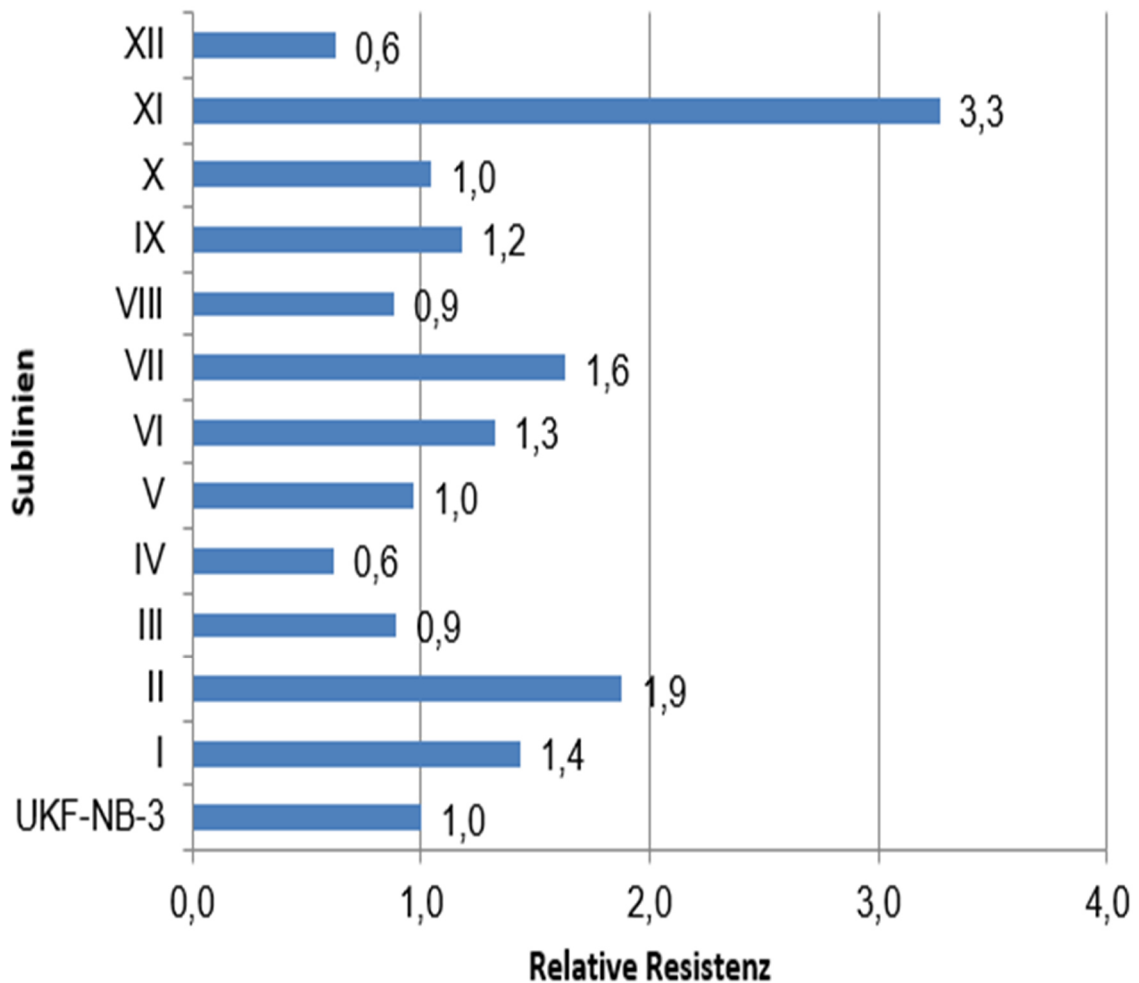
Sublinie	IC50-Wert (ng/ml)	IC90-Wert (ng/ml)
UKF-NB-3	0,99 ± 0,20	1,63 ± 0,61
UKF-NB-3-R-CDDP-I	1,24 ± 0,17	1,52 ± 0,07
UKF-NB-3-R-CDDP-II	0,77 ± 0,17	1,29 ± 0,16
UKF-NB-3-R-CDDP-III	1,10 ± 0,23	1,82 ± 0,64
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	0,90 ± 0,07	1,30 ± 0,16
UKF-NB-3-R-CDDP-V	1,01 ± 0,08	1,49 ± 0,55
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	1,20 ± 0,40	1,79 ± 0,56
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	1,04 ± 0,10	1,61 ± 0,60
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	1,30 ± 0,56	2,11 ± 0,59
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	0,90 ± 0,50	1,49 ± 0,82
UKF-NB-3-R-CDDP-X	1,18 ± 0,13	4,17 ± 4,43
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	0,92 ± 0,49	7,57 ± 11,69
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	0,60 ± 0,23	1,06 ± 0,68

**Tabelle 18.** IC50-Werte und IC90-Werte (in ng/ml) für Gemcitabin an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.10 Oxaliplatin

Der IC50-Wert gegen Oxaliplatin ist in UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> XI besonders hoch (9,18 µg/ml) im Vergleich zu UKF-NB-3 (2,81 µg/ml). Die anderen Cisplatin adaptierten Sublinien haben IC50-Werte zwischen 1,7 - 5,2 µg/ml. Die Sublinien III, IV, VIII und XII haben einen niedrigeren IC50-Wert als UKF-NB-3. Die IC50-Werte der Sublinien UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> V und X liegen sehr nah am IC50-Wert von UKF-NB-3. Tabelle 19 fasst die IC50- und IC90-Werte von Oxaliplatin zusammen. Die Abbildung 19 zeigt die IC50-Werte der Sublinien gegen Oxaliplatin im Verhältnis zum IC50-Wert von UKF-NB-3.



**Abbildung 19.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Oxaliplatin im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient IC<sub>50</sub> Oxaliplatin der Cisplatin adaptierten Sublinie/ IC<sub>50</sub> Oxaliplatin von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem IC<sub>50</sub>). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (weniger resistent).



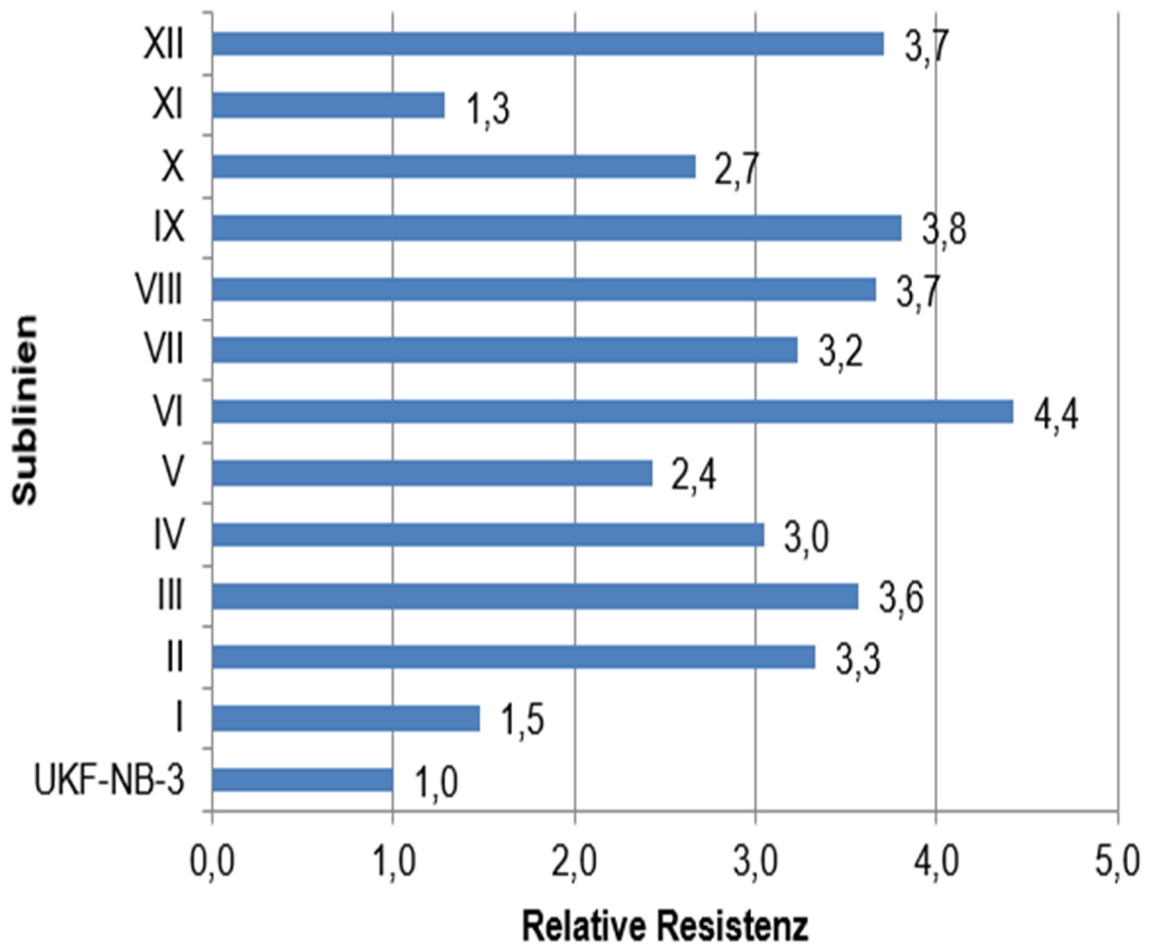
Sublinie	IC50-Wert ( $\mu\text{g/ml}$ )	IC90-Wert ( $\mu\text{g/ml}$ )
UKF-NB-3	$2,81 \pm 0,85$	$11,75 \pm 14,29$
UKF-NB-3-R-CDDP-I	$4,03 \pm 0,06$	$7,08 \pm 2,53$
UKF-NB-3-R-CDDP-II	$5,28 \pm 0,47$	$12,42 \pm 4,26$
UKF-NB-3-R-CDDP-III	$2,51 \pm 0,05$	$3,66 \pm 0,94$
UKF-NB-3-R-CDDP-IV	$1,74 \pm 0,10$	$3,77 \pm 0,38$
UKF-NB-3-R-CDDP-V	$2,72 \pm 0,52$	$6,63 \pm 2,49$
UKF-NB-3-R-CDDP-VI	$3,71 \pm 0,74$	$9,34 \pm 3,48$
UKF-NB-3-R-CDDP-VII	$4,58 \pm 0,60$	$8,21 \pm 0,56$
UKF-NB-3-R-CDDP-VIII	$2,48 \pm 0,26$	$6,93 \pm 0,21$
UKF-NB-3-R-CDDP-IX	$3,31 \pm 0,61$	$7,98 \pm 0,46$
UKF-NB-3-R-CDDP-X	$2,94 \pm 0,46$	$5,15 \pm 0,56$
UKF-NB-3-R-CDDP-XI	$9,18 \pm 0,65$	$21,71 \pm 3,54$
UKF-NB-3-R-CDDP-XII	$1,76 \pm 0,06$	$5,13 \pm 0,22$

**Tabelle 19.** IC50-Werte und IC90-Werte (in  $\mu\text{g/ml}$ ) für Oxaliplatin an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

### 5.1.11 Vinblastin

Die IC50-Werte der Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Vinblastin sind höher als der IC50-Wert in UKF-NB-3. Die Cisplatin adaptierten Sublinien sind 1,3 - 4,4-fach resistenter gegenüber Vinblastin als UKF-NB-3. Die Tabelle 20 fasst die IC50- und IC90-Werte von Vinblastin zusammen. Die Abbildung 20 zeigt die IC50-Werte der Sublinien gegen Vinblastin im Verhältnis zum IC50-Wert von UKF-NB-3.



**Abbildung 20.** Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Vinblastin im Verhältnis zu UKF-NB-3.

Relative Resistenz: Quotient IC<sub>50</sub> Vinblastin der Cisplatin adaptierten Sublinie/ IC<sub>50</sub> Vinblastin von UKF-NB-3. UKF-NB-3 hat eine relative Resistenz von 1 (Quotient aus eigenem IC<sub>50</sub>). Relative Resistenz > 1: Jeweilige Sublinie hat ein höheren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (resistenter). Relative Resistenz < 1: jeweilige Sublinie hat ein niedrigeren IC<sub>50</sub> als UKF-NB-3 (weniger resistent).

<b>Sublinien</b>	<b>IC50-Wert (ng/ml)</b>	<b>IC90-Wert (ng/ml)</b>
<b>UKF-NB-3</b>	0,16 ± 0,06	0,48 ± 0,22
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-I</b>	0,31 ± 0,01	1,25 ± 1,24
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-II</b>	0,70 ± 0,06	1,42 ± 0,66
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-III</b>	0,75 ± 0,15	1,05 ± 0,41
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-IV</b>	0,64 ± 0,001	0,75 ± 0,00
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-V</b>	0,51 ± 0,005	1,17 ± 0,23
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-VI</b>	0,93 ± 0,13	2,29 ± 0,39
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-VII</b>	0,68 ± 0,02	1,37 ± 0,08
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-VIII</b>	0,77 ± 0,10	1,85 ± 0,27
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-IX</b>	0,80 ± 0,19	1,09 ± 0,45
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-X</b>	0,56 ± 0,06	1,52 ± 0,89
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-XI</b>	0,27 ± 0,02	0,81 ± 0,18
<b>UKF-NB-3-R-CDDP-XII</b>	0,78 ± 0,04	1,23 ± 0,28

**Tabelle 20.** IC50-Werte und IC90-Werte (in ng/ml) für Vinblastin an UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien.

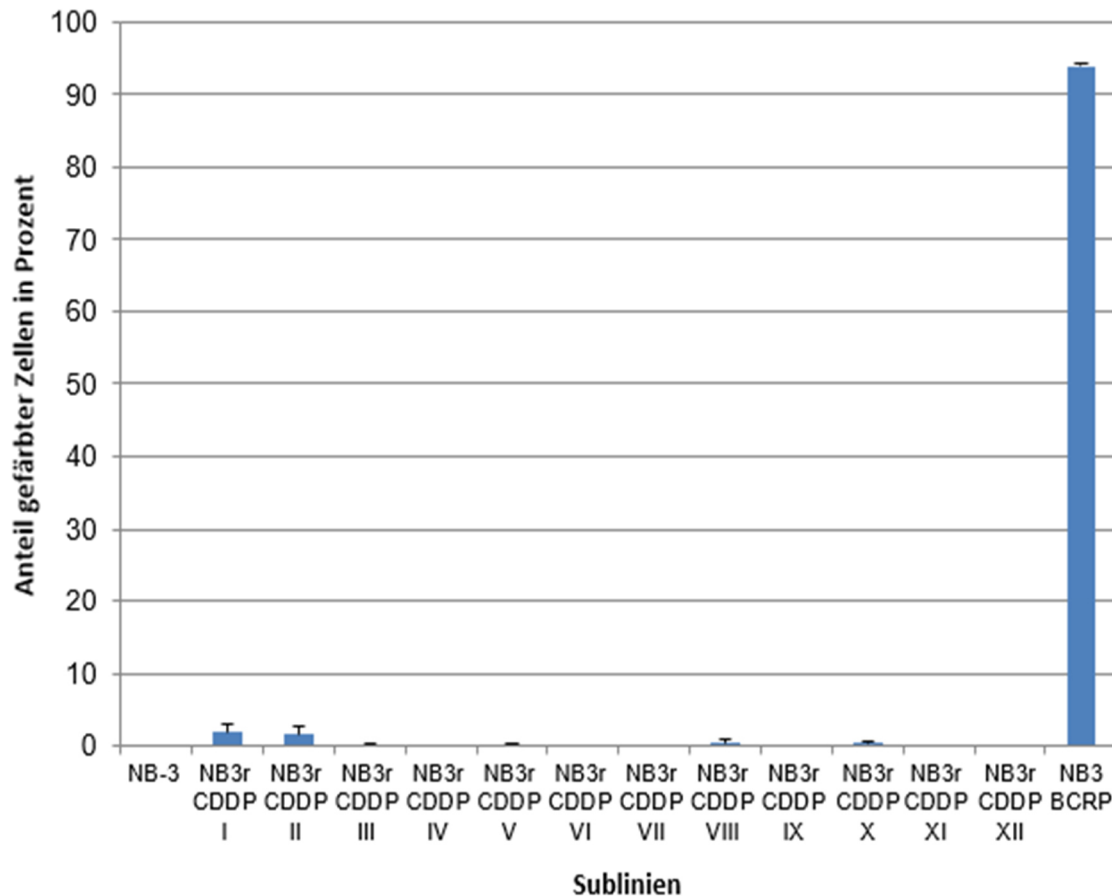
IC50, IC90: Konzentration des Zytostatikums, bei der 50% bzw. 90 % der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert sind. Die Tabelle zeigt die ermittelten Werte als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz.

## **5.2 Durchflusszytometrie**

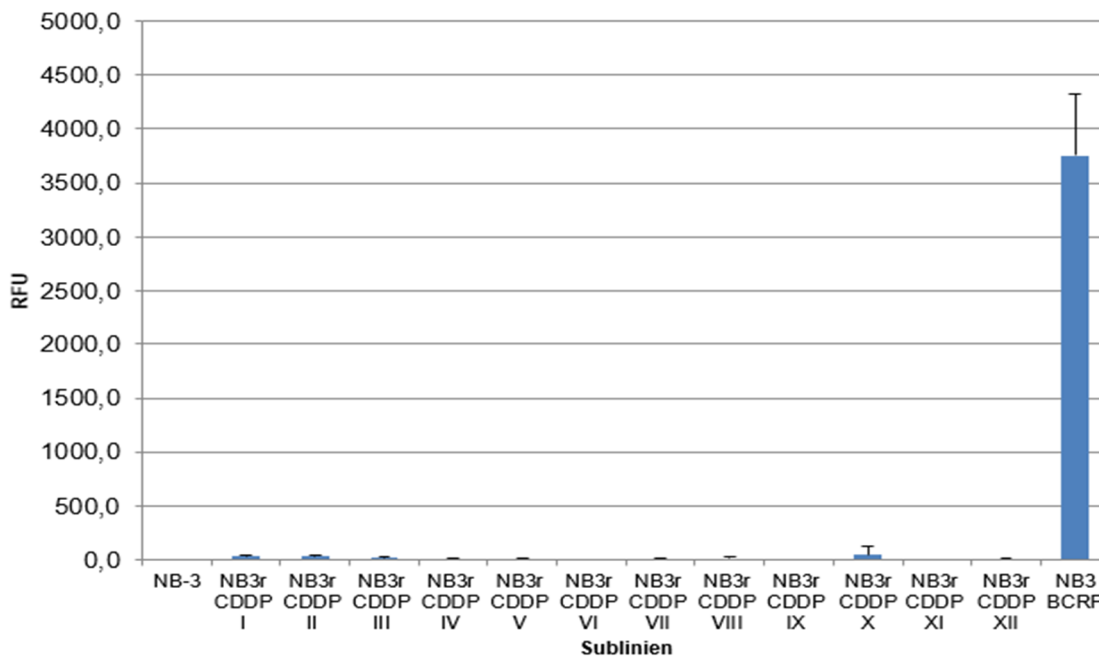
Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen werden in 2 unterschiedlichen Darstellungen präsentiert. Die erste Darstellung zeigt den prozentualen Anteil an gefärbten Zellen innerhalb der gemessenen Probe. Die zweite Darstellung zeigt die gemessene RFU (relative fluorescence units) der Proben. Eine tabellarische Darstellung aller Versuchsdaten ist im Anhang zu finden (siehe Anhang 10).

### **5.2.1 BCRP**

Die Cisplatin-adaptierten Sublinien UKF-NB3rCDDP<sup>1000</sup> I, II, III, IV, VIII und X haben eine kleine Zellpopulation, die BCRP exprimiert. Diese Zellpopulation macht zwischen 0,0 - 1,93% der gesamten Population aus. Die Expression von BCRP in RFU ist innerhalb dieser Zellpopulation vergleichsweise schwach (siehe Abbildung 21 und 22).



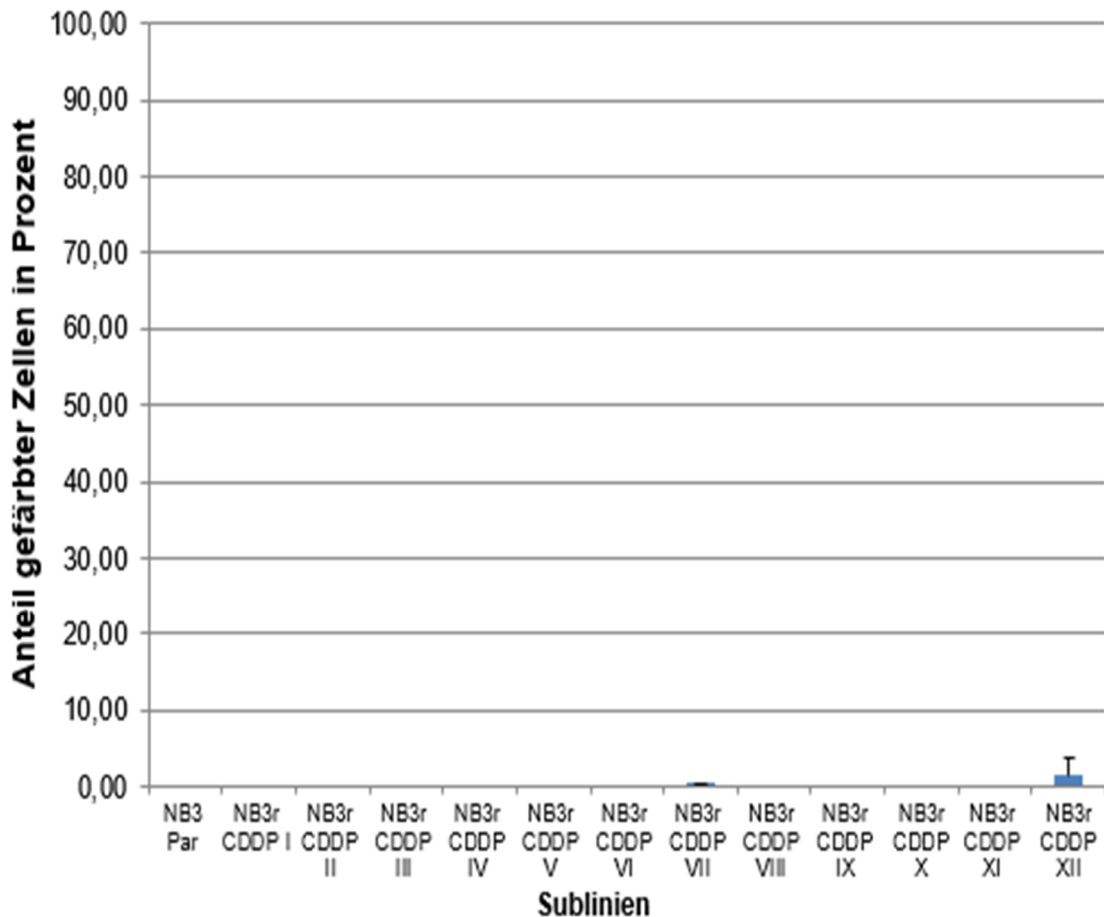
**Abbildung 21.** BCRP-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3<sup>BCRP</sup> am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit BCRP in Prozent (Mittelwert) als dicker Balken. Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Die Neuroblastomzelle UKF-NB-3<sup>BCRP</sup> exprimiert nach Transduktion mit Lentiviren große Mengen an BCRP und diente als Positivkontrolle. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). BCRP: ATP-binding cassette super-family G member 2.



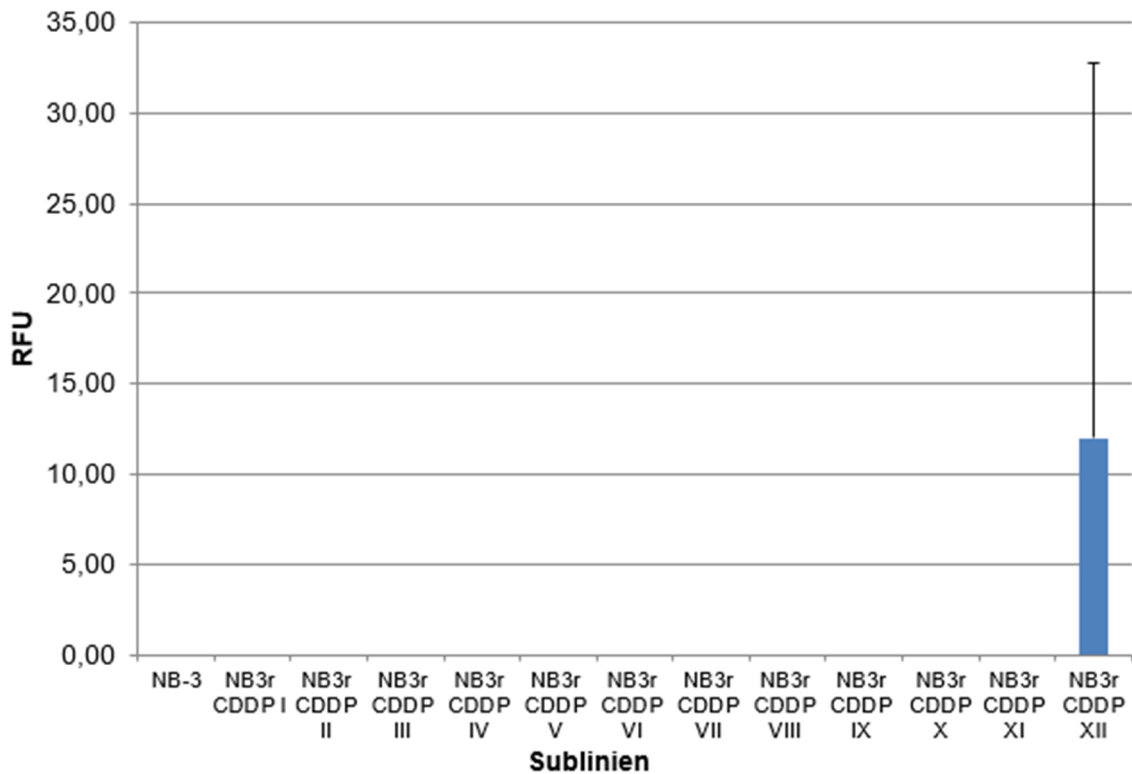
**Abbildung 22.** BCRP-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3<sup>BCRP</sup> am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte in relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Die Neuroblastomzelle UKF-NB-3<sup>BCRP</sup> exprimiert nach Transduktion mit Lentiviren große Mengen an BCRP und diente als Positivkontrolle. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). BCRP: ATP-binding cassette super-family G member 2.

### 5.2.2 BMI-1

Die Expression von BMI-1 zeigte starke Schwankungen. Bei einigen Experimenten exprimierte eine minimale Zellpopulation BMI-1. Bei anderen Versuche war diese Expression nicht vorhanden. Es konnte kein Unterschied in der Expression von BMI-1 zwischen Cisplatin-adaptierten Sublinien und UKF-NB-3 gefunden werden. Weil bei den meisten Versuchen keine Expression von BMI-1 nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass weder UKF-NB-3 noch die Cisplatin adaptierten Sublinien BMI-1 exprimieren. Exemplarisch werden hier die Ergebnisse einer Messung gezeigt (siehe Abbildungen 23 und 24).



**Abbildung 23.** BMI-1-Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit BMI-1 in Prozent als dicker Balken in (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). BMI-1: Polycomb complex protein BMI-1.

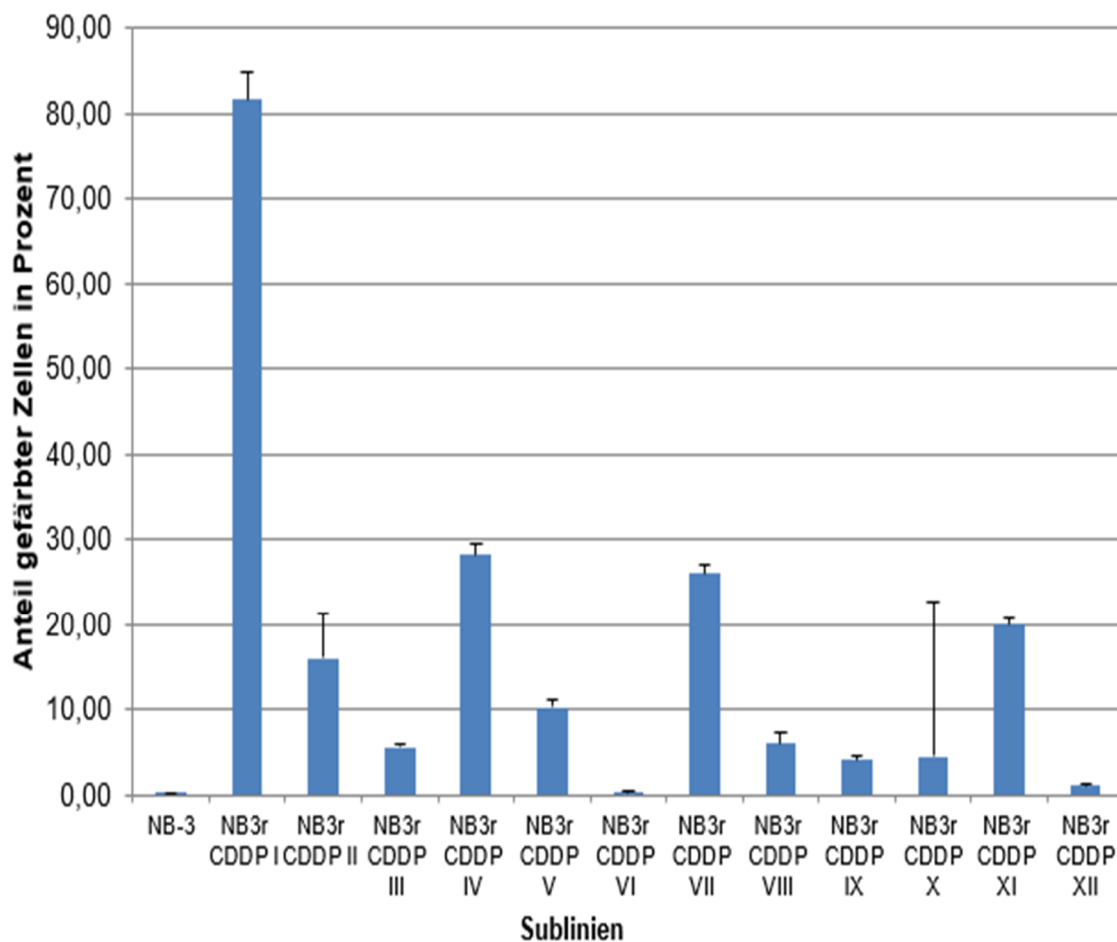


**Abbildung 24.** BMI-1-Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für BMI-1 in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). BMI-1: Polycomb complex protein BMI-1.

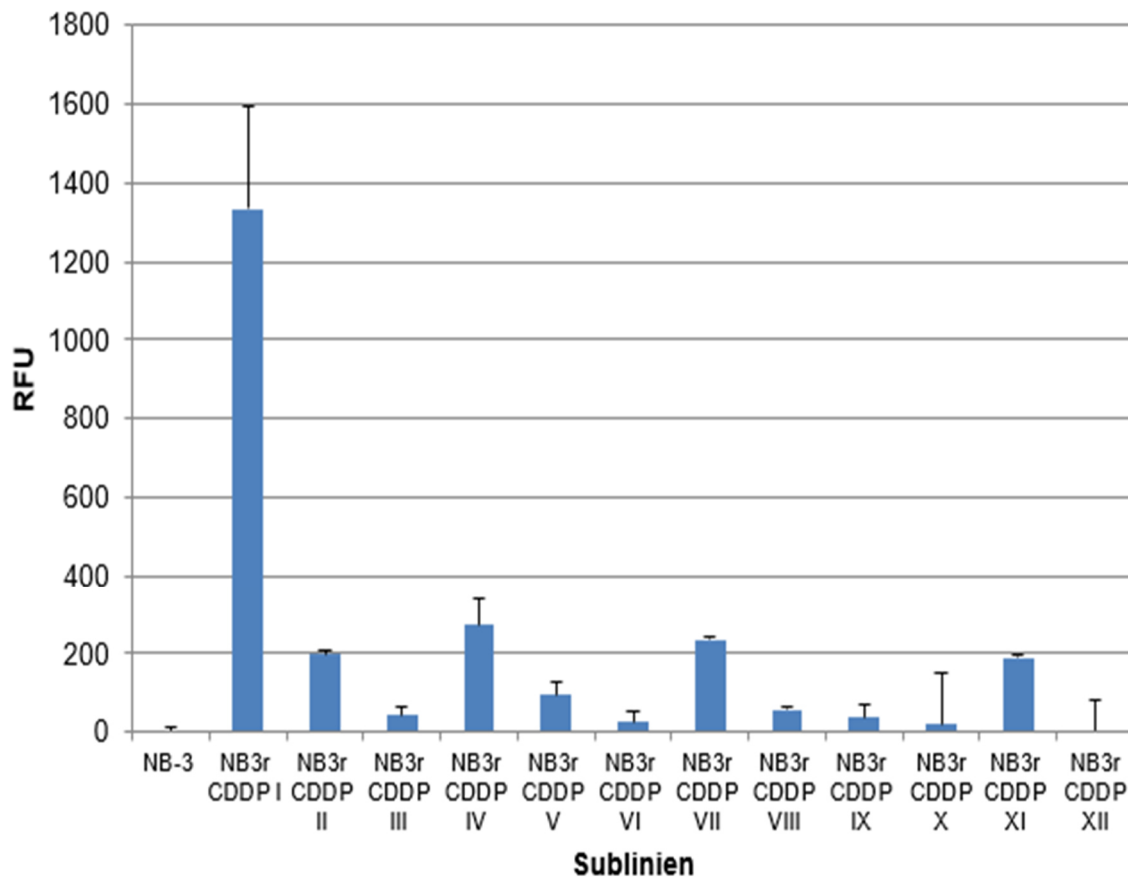
### 5.2.3 CD133

Alle gestesteten Zellen exprimieren den Stammzellmarker CD133. Eine niedrige Expression wurde bei UKF-NB-3 und UKF-NB-3'CDDP<sup>1000</sup> VI und XII beobachtet. Der CD133 positive Zellanteil variiert von 0,03% bis 81,7% je nach Sublinie (Abbildung 25). Die Cisplatin-adaptierten Neuroblastomsublinien scheinen einen höheren Anteil an CD133 positiven Zellen zu haben, sowie eine stärkere Expression als UKF-NB-3. Bemerkenswert ist, dass der höchste CD133 positive Zellanteil bei UKF-NB-3'CDDP I zu finden ist, die Sublinie die meistens den höchsten IC50-Wert gegen verschiedene Wirkstoffe hatte.





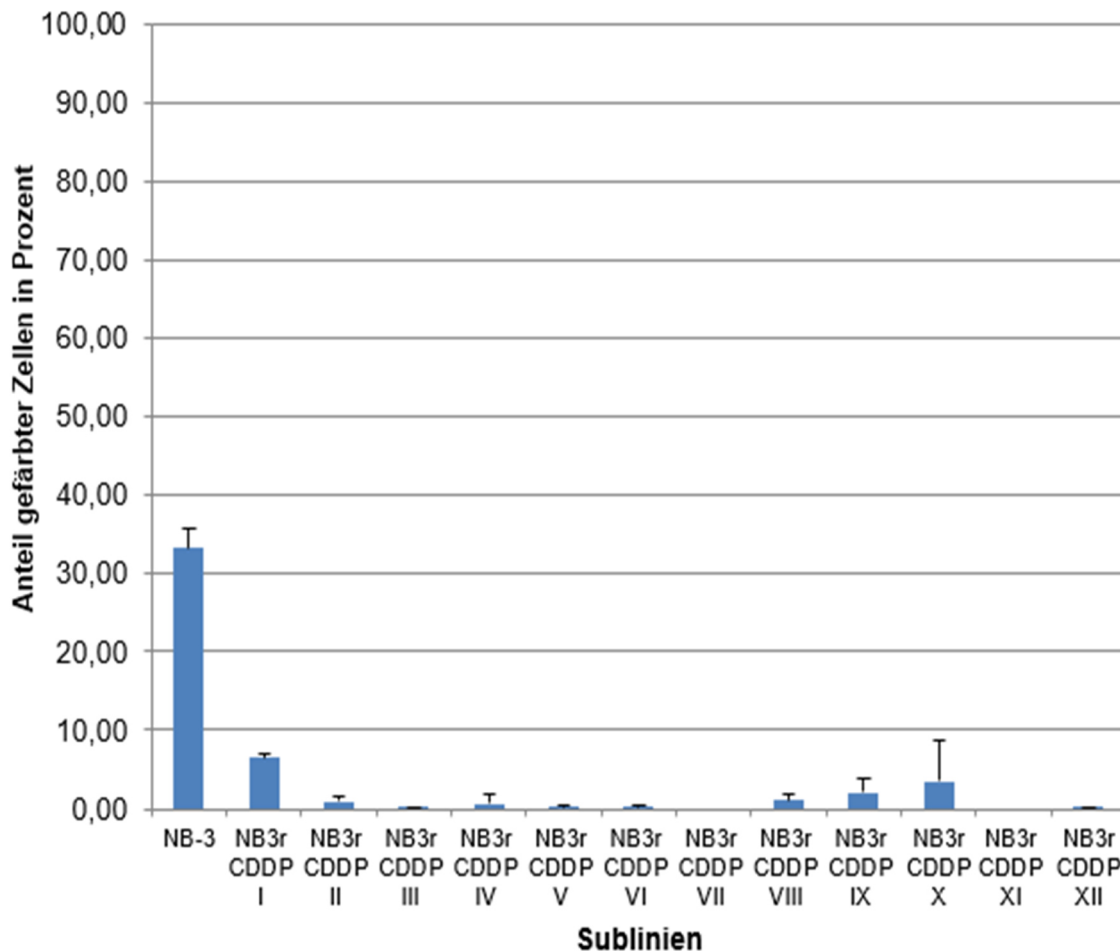
**Abbildung 25.** CD133 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit CD133 in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). CD133: Prominin 1.



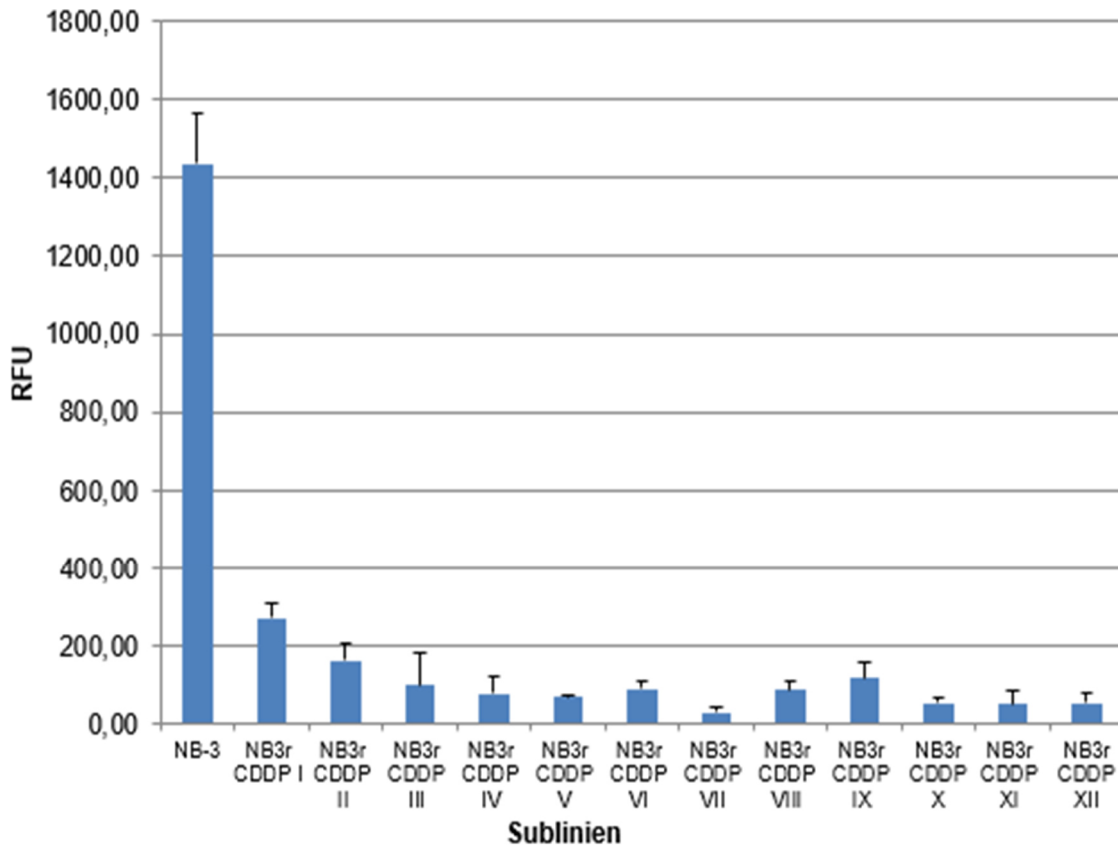
**Abbildung 26.** CD133 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für CD133 in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). CD133: Prominin 1.

#### 5.2.4 GD2

Der GD2 positive Zellanteil beträgt bei UKF-NB-3 um die 33% und ist im Vergleich zu den Cisplatin-adaptierten Neuroblastomsublinien deutlich erhöht (siehe Abb. 27). Die Cisplatin-adaptierten Sublinien haben einen GD2 positiven Zellanteil zwischen 0,00% bis maximal 6,5%. Die Stärke der Expression (RFU) von GD2 ist bei den Cisplatin-adaptierten Sublinien niedriger als bei UKF-NB3 (siehe Abb. 28).



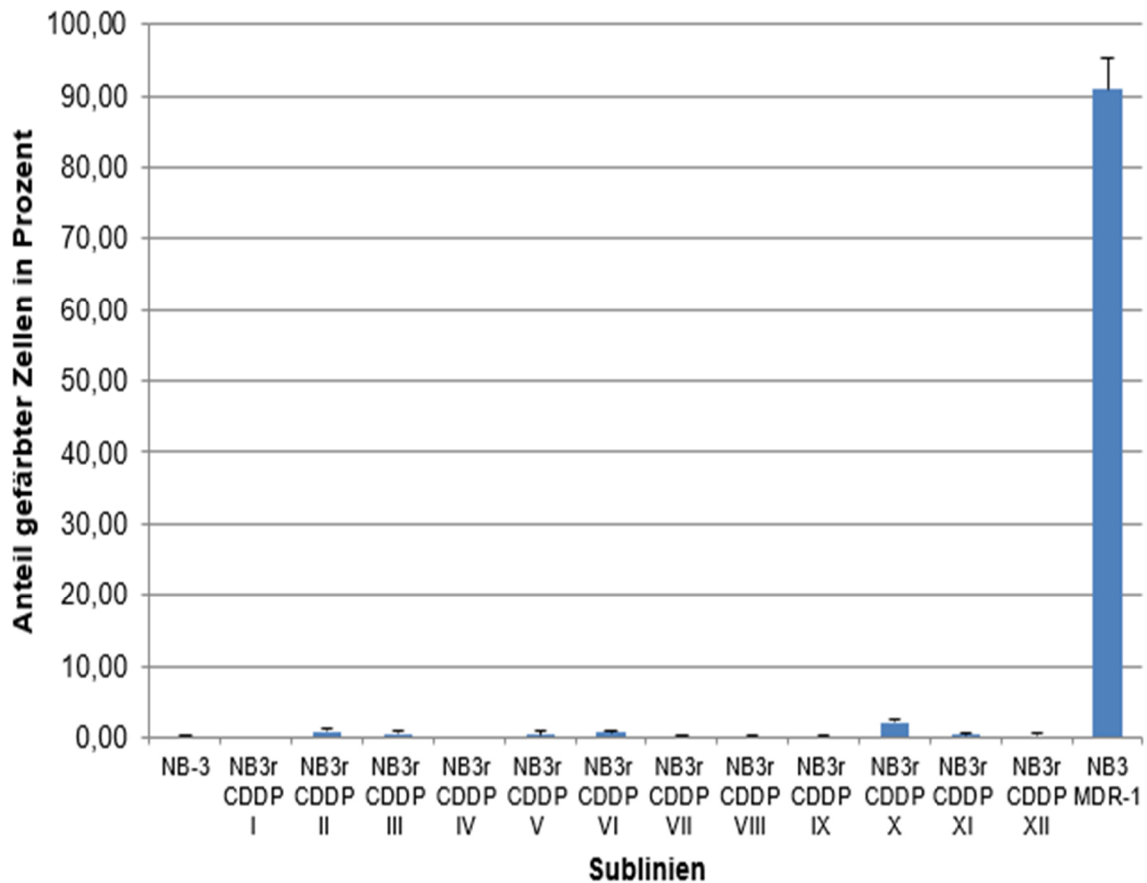
**Abbildung 27.** GD2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit GD2 in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken representiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). GD2: Ganglioside G2.



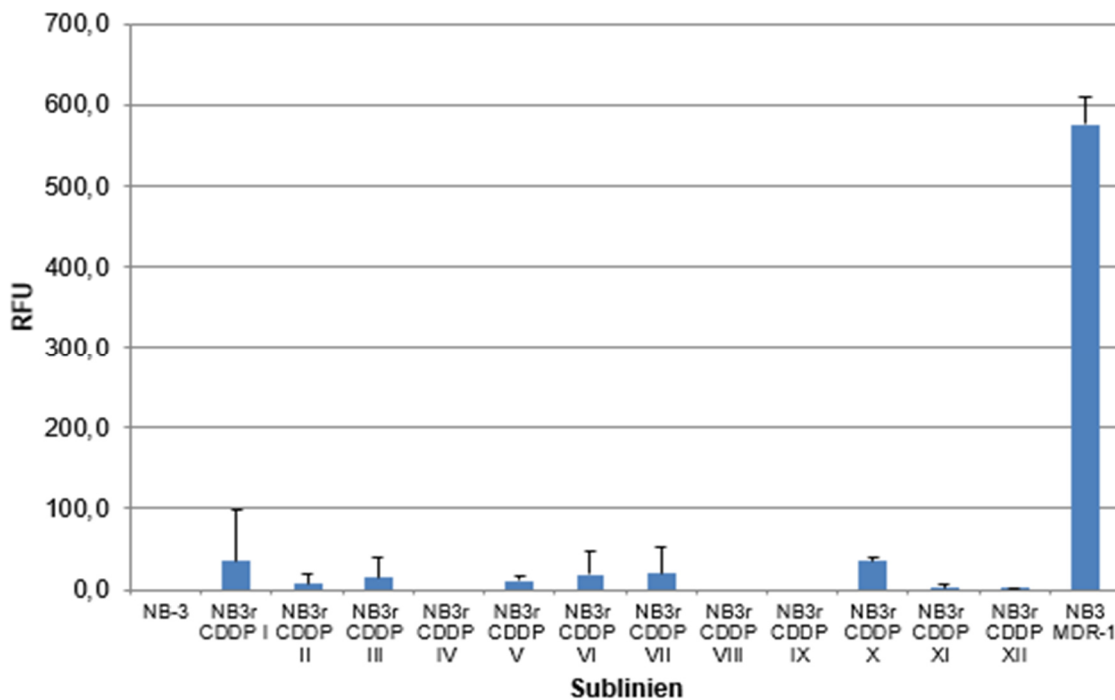
**Abbildung 28.** GD2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für GD2 in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). GD2: Ganglioside G2.

### 5.2.5 MDR1/ABCB1

Die MDR1 positive Zellpopulation beträgt je nach Zelle zwischen 0,00% - 2,1%. Folglich scheint die Expression dieses Proteins schwach zu sein. Die Neuroblastomzelle UKF-NB-3<sup>MDR1/ABCB1</sup> diente als Positivkontrolle und zeigt nach Transduktion mit Lentiviren eine starke Expression von MDR1 (siehe Abb. 29 und 30).



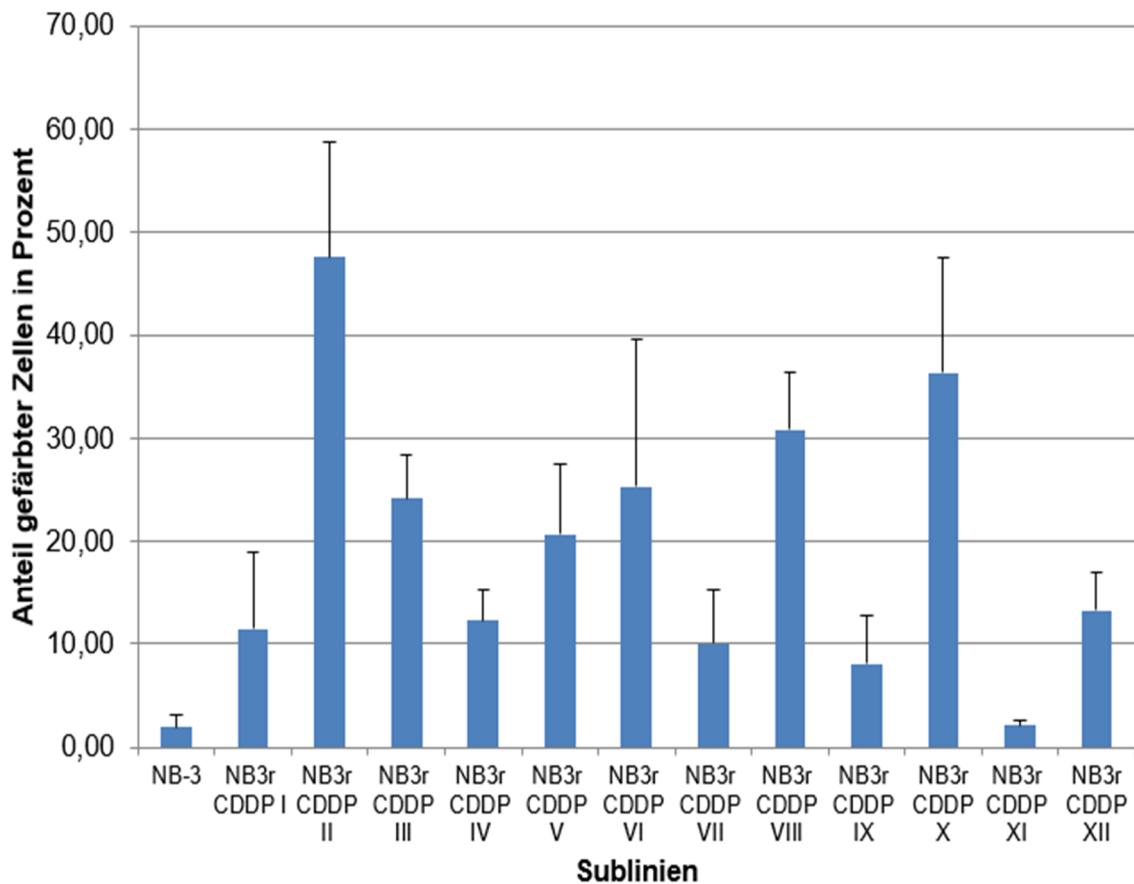
**Abbildung 29.** MDR1-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit MDR1 in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Die Neuroblastomzelle UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> exprimiert nach Transduktion mit Lentiviren große Mengen an MDR1 und diente als Kontrolle für die Expression von MDR1. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). MDR-1: Multidrug-Resistance-Protein 1.



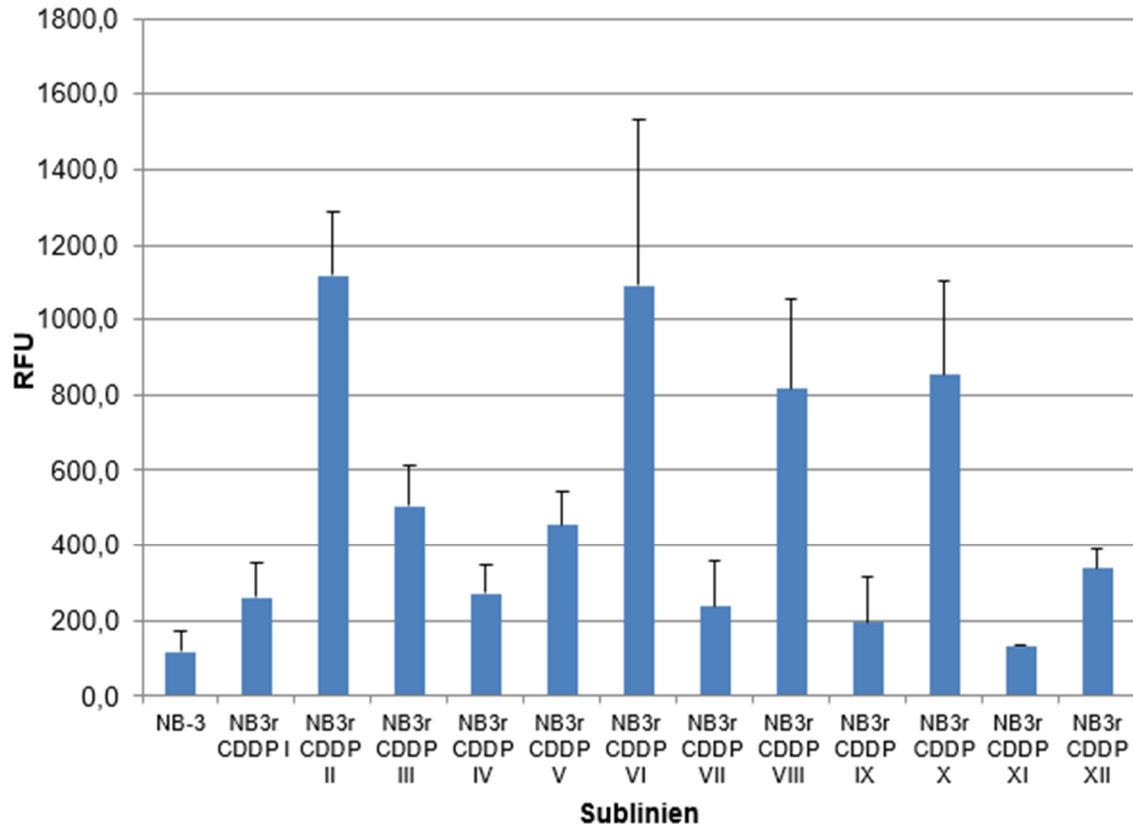
**Abbildung 30.** MDR1-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Die Neuroblastomzelle UKF-NB-3<sup>MDR1</sup> exprimiert nach Transduktion mit Lentiviren große Mengen an MDR1 und diente als Kontrolle für die Expression von MDR1. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). MDR-1: Multidrug-Resistance-Protein 1.

### 5.2.6 Nanog

Alle Neuroblastomsublinien weisen eine Nanog-positive Zellpopulation auf. Die Nanog-positive Zellpopulation schwankte zwischen 1,9% bis 47% (siehe Abb. 31). Die Expression von Nanog in RFU liegt bei den Cisplatin-adaptierten Sublinien höher als bei UKF-NB-3. Auch der Nanog positive Zellanteil liegt bei den Cisplatin-adaptierten Sublinien höher als bei UKF-NB-3. Wobei die Expression der Sublinien stark variiert und die Sublinie XI (RFU 134,5) nicht ersichtlich viel mehr exprimiert als UKF-NB-3 (RFU 118,2).



**Abbildung 31.** Nanog Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit Nanog in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz).

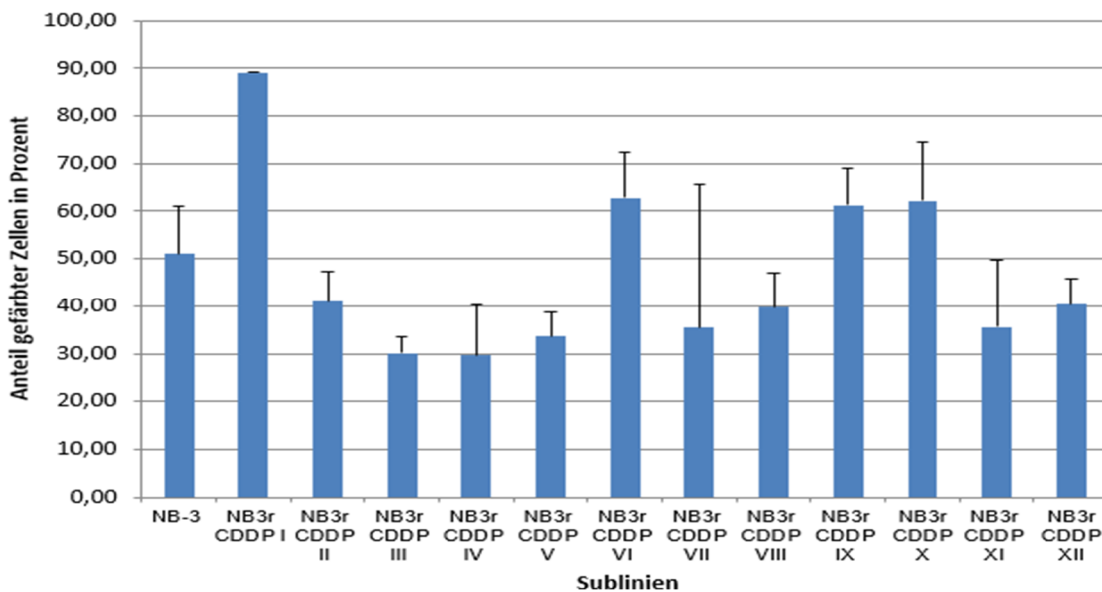


**Abbildung 32.** Nanog Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für Nanog in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz).

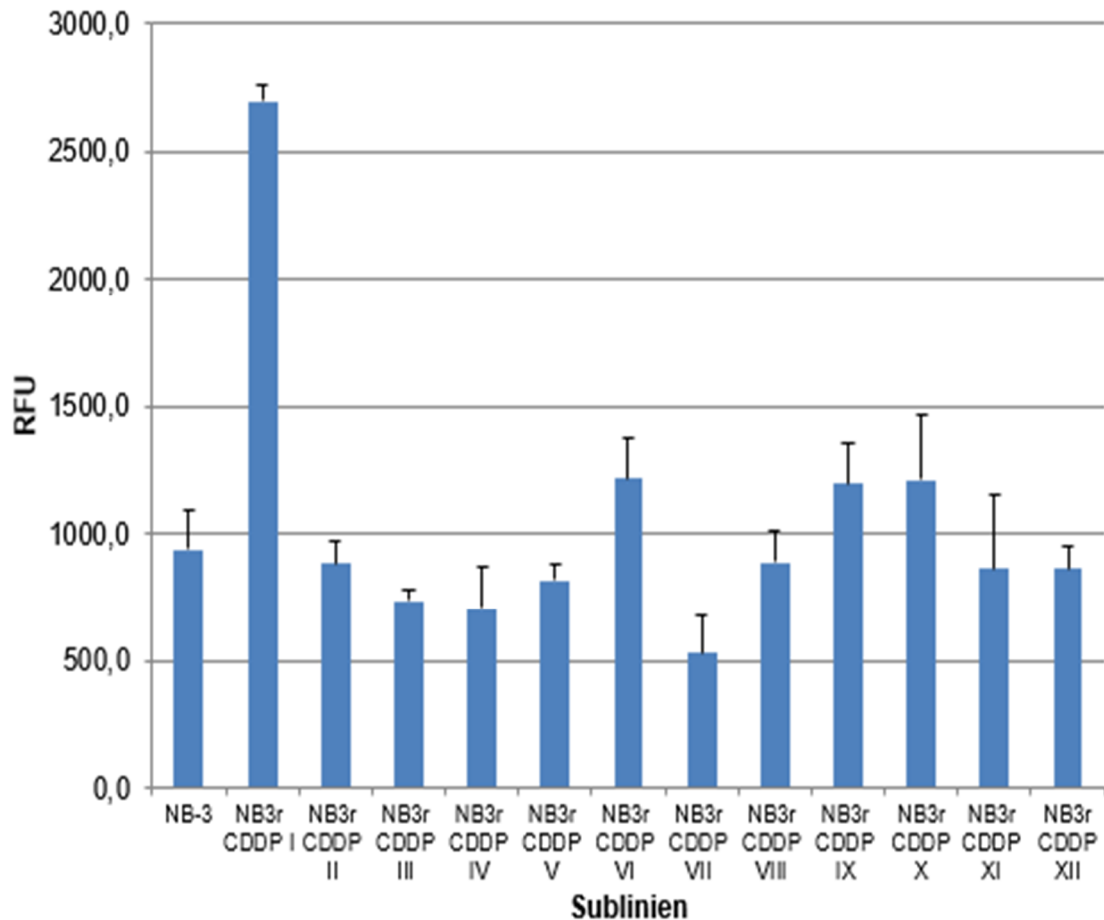


## 5.2.7 Nectin

Alle Neuroblastomsublinen haben eine große Nectin-positive Zellpopulation. Die Cisplatin adaptierten Neuroblastomsublinen zeigen Heterogenität in der Nectin Expression sowie in dem Anteil der Nectin-positiven Zellen (siehe Abb. 33 und 34). Der Anteil an Nectin-positiven Zellen schwankt zwischen 29% bis 89%. Sublinien I, VI, IX und X haben eine höhere Nectin-positive Zellpopulation als UKF-NB-3. Sublinien II, III, IV, V, VII, VIII, XI und XII haben einen niedrigeren Nectin-positiven Zellanteil als UKF-NB-3. UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I fällt mit einer besonderen hohen Expression (2698 RFU) und mit einem hohen Nectin-positiven Zellanteil auf. Die Expression der Sublinien II, III, IV, V, VII, XI und XII ist im Vergleich zur UKF-NB-3 leicht niedriger. Die Sublinie VII zeigt die niedrigste Nectin Expression. Die Sublinien VI, IX, und X exprimieren leicht stärker Nectin als UKF-NB-3.



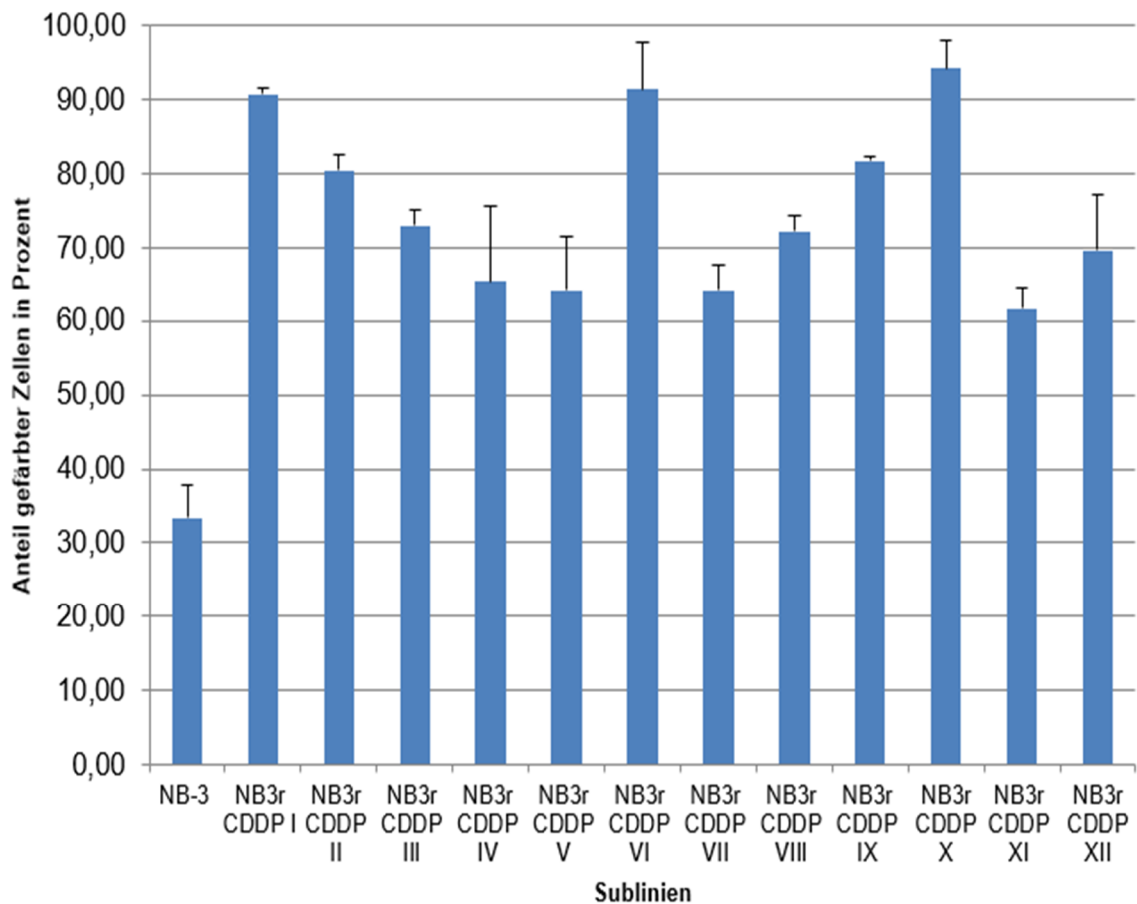
**Abbildung 33.** Nectin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit Nectin in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz).



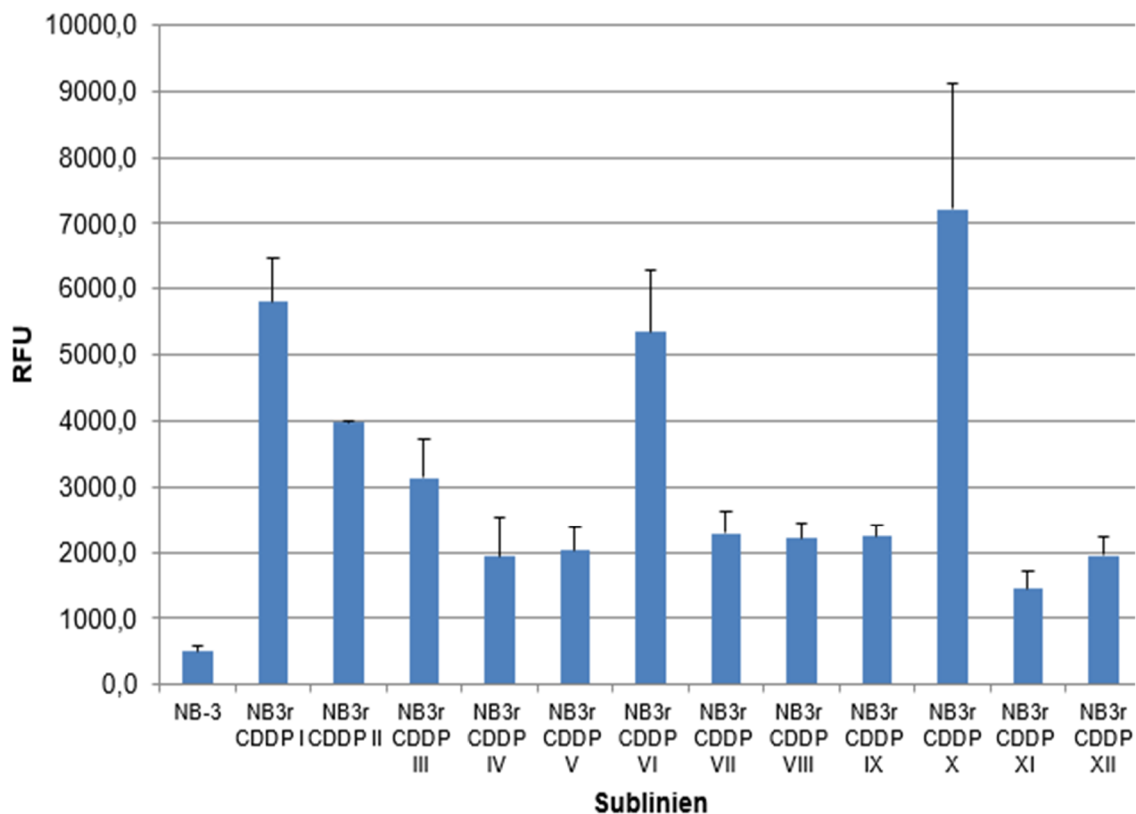
**Abbildung 34.** Nectin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für Nectin in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz).

### 5.2.8 Nestin

Alle getesteten Zellen exprimieren Nestin. Der Nestin-positive Zellanteil schwankte zwischen 33% und 94%. Die Cisplatin-adaptierten Sublinien haben einen höheren Nestin-positiven Zellanteil und exprimieren Nestin stärker als UKF-NB-3 (siehe Abb. 35 und 36). UKF-NB-3<sup>CDDP</sup> XI hat den niedrigsten Nestin-positiven Zellanteil unter den Cisplatin-adaptierten Sublinien.



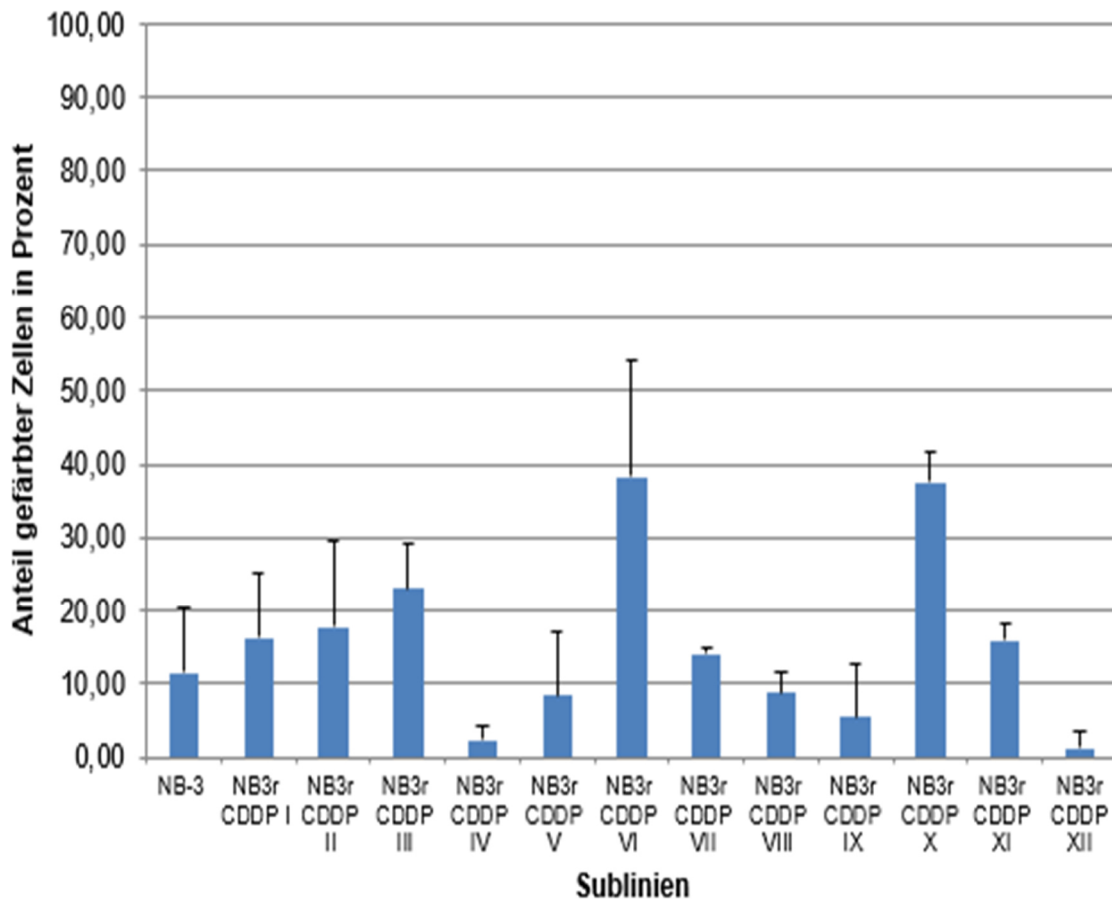
**Abbildung 35.** Nestin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit Nestin in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz).



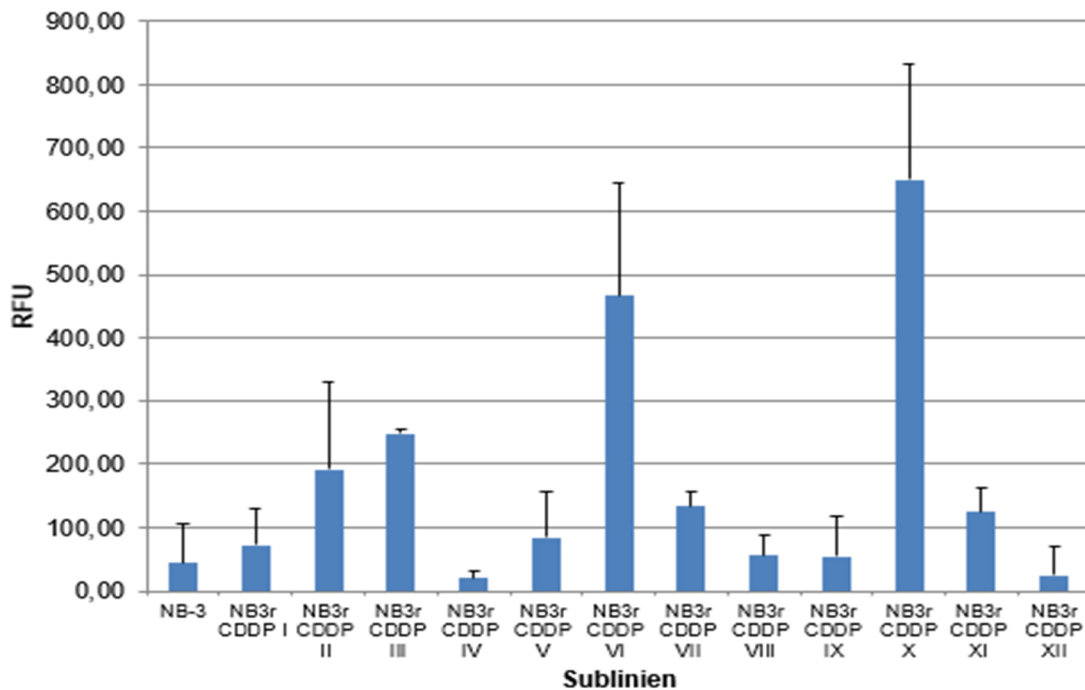
**Abbildung 36.** Nestin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für Nestin in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz).

### 5.2.9 Oct-4

Die Expression von Oct-4 konnte bei allen Neuroblastomlinien bestätigt werden. Der Oct-4 positive Zellanteil innerhalb der unterschiedlichen Sublinien schwankte zwischen 1,23% bis 38% (siehe Abb. 37). Das Ausmaß der Expression in RFU von Oct-4 variierte auch. Die Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, und XI exprimieren stärker Oct-4 als UKF-NB-3, die Sublinien IV und XII exprimieren weniger Oct-4 als UKF-NB-3 (siehe Abb. 38).



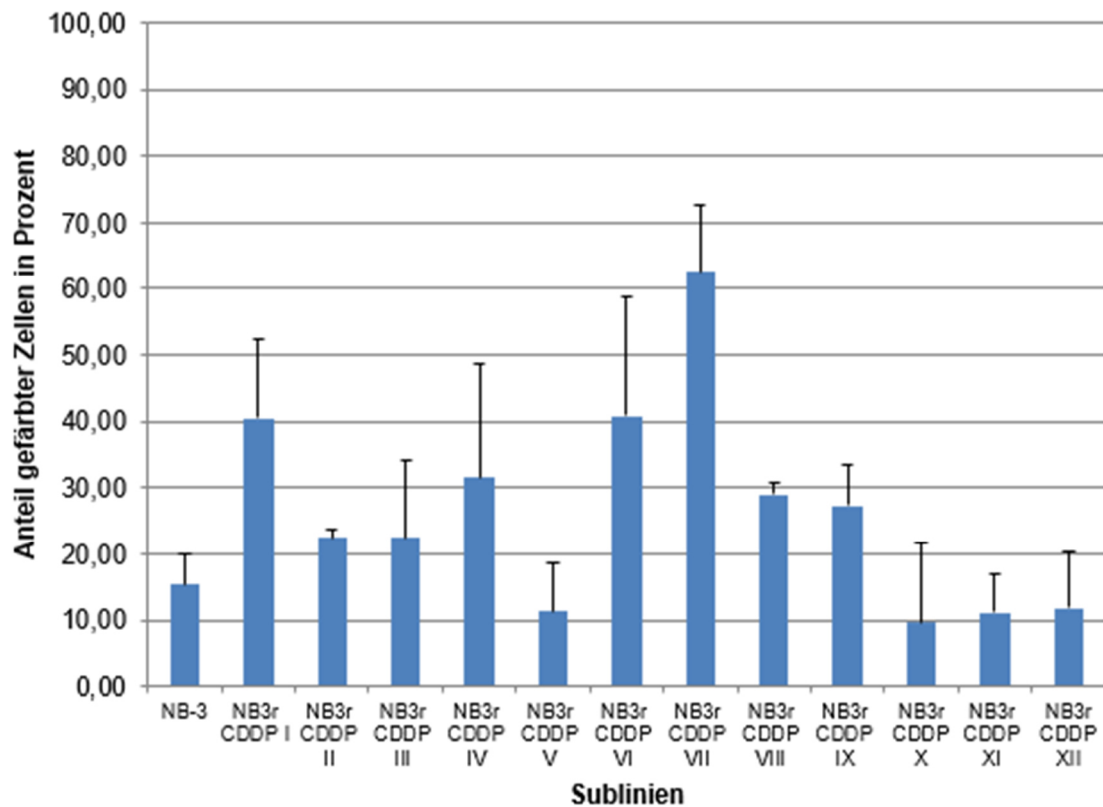
**Abbildung 37.** Oct-4 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit Oct-4 in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). Oct-4: Octamer binding transcription factor 4.



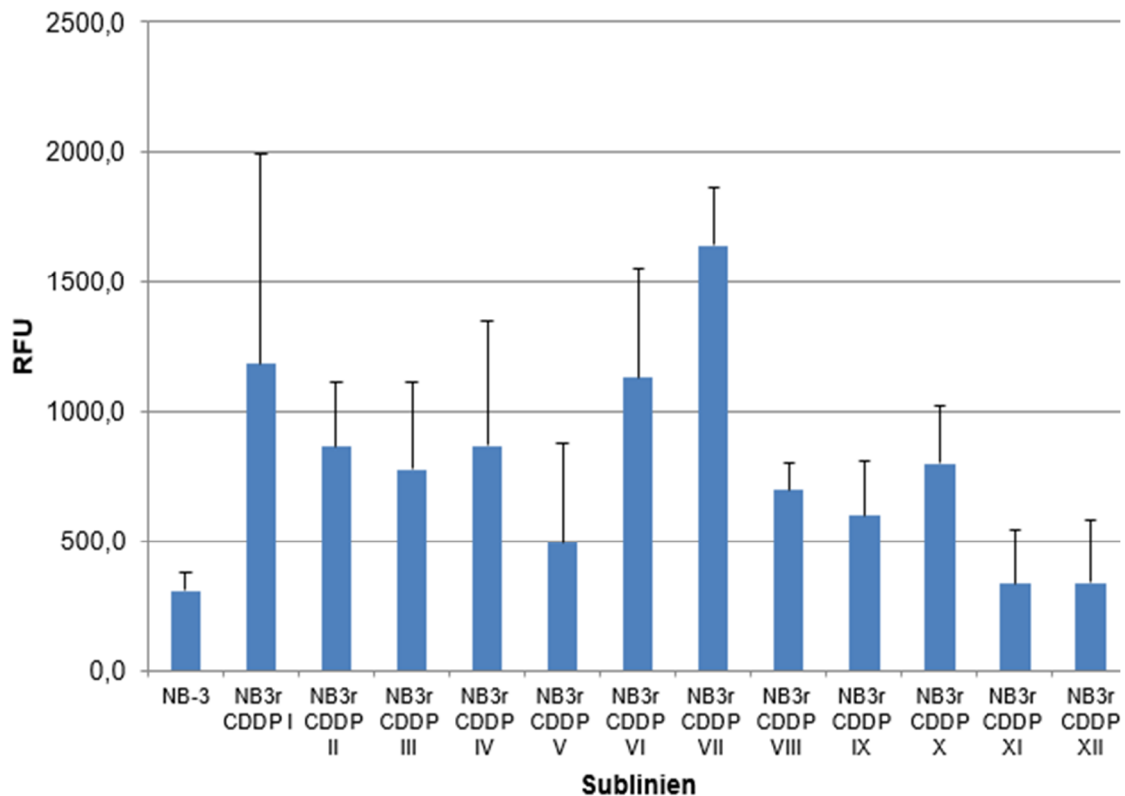
**Abbildung 38.** Oct-4 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für Oct-4 in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). Oct-4: Octamer binding transcription factor 4.

### 5.2.10 SOX-2

Alle untersuchten Neuroblastomsublinien haben einen Anteil an Zellen, die SOX-2 exprimieren. Der SOX-2 positive Zellanteil schwankt von 9,67% bis 62,57% und ist zwischen den einzelnen Sublinien unterschiedlich stark ausgeprägt (siehe Abb. 39) Des Weiteren zeigen die Sublinien V, X, XI und XII im Vergleich zur UKF-NB-3 einen niedrigeren Anteil an SOX-2 positiven Zellen. Die Sublinien I, II, III, IV, VI, VII, VIII und XI haben im Vergleich zur UKF-NB-3 einen höheren Anteil an Zellen die SOX-2 exprimieren. Die RFU von SOX-2 in den Sublinien XI und XII sind nur leicht höher als die RFU bei der Sublinie UKF-NB-3. Das Ausmaß der Expression in RFU schwankt dementsprechend auch und ist generell höher als bei UKF-NB-3 (siehe Abb. 40).



**Abbildung 39.** SOX-2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit SOX-2 in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). Sox-2: Sex determining region Y box 2.

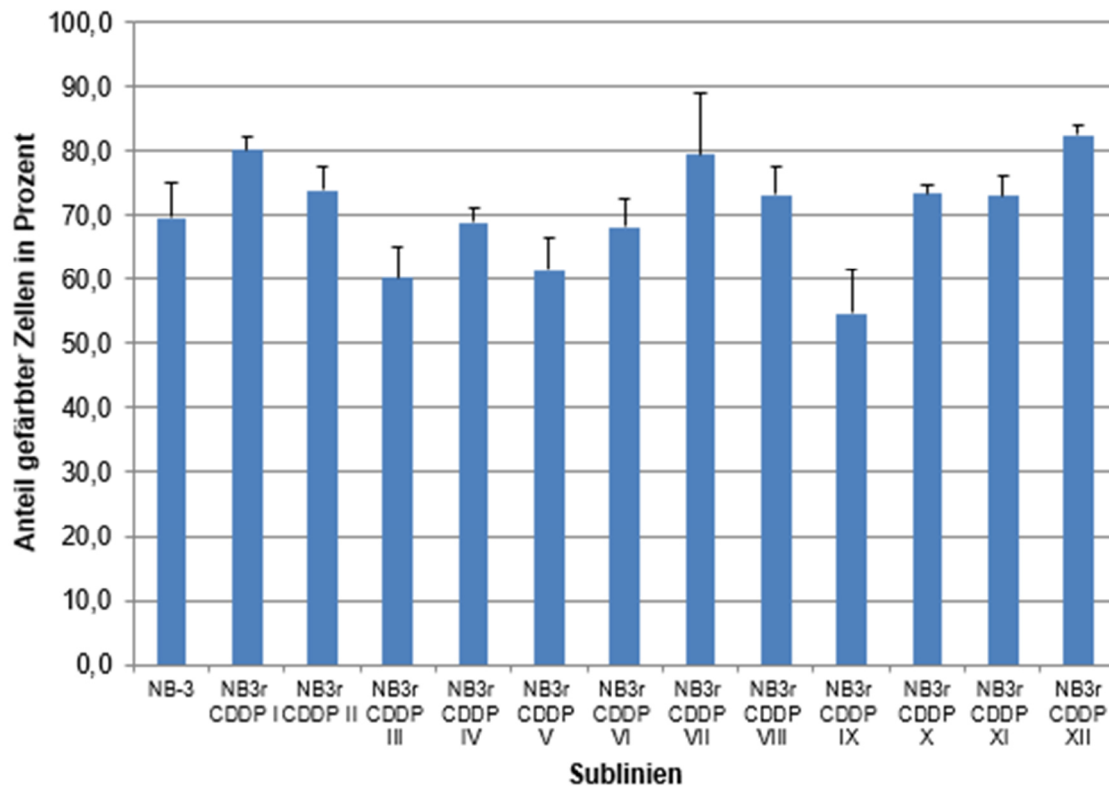


**Abbildung 40.** SOX-2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für SOX-2 in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). Sox-2: Sex determining region Y box 2.

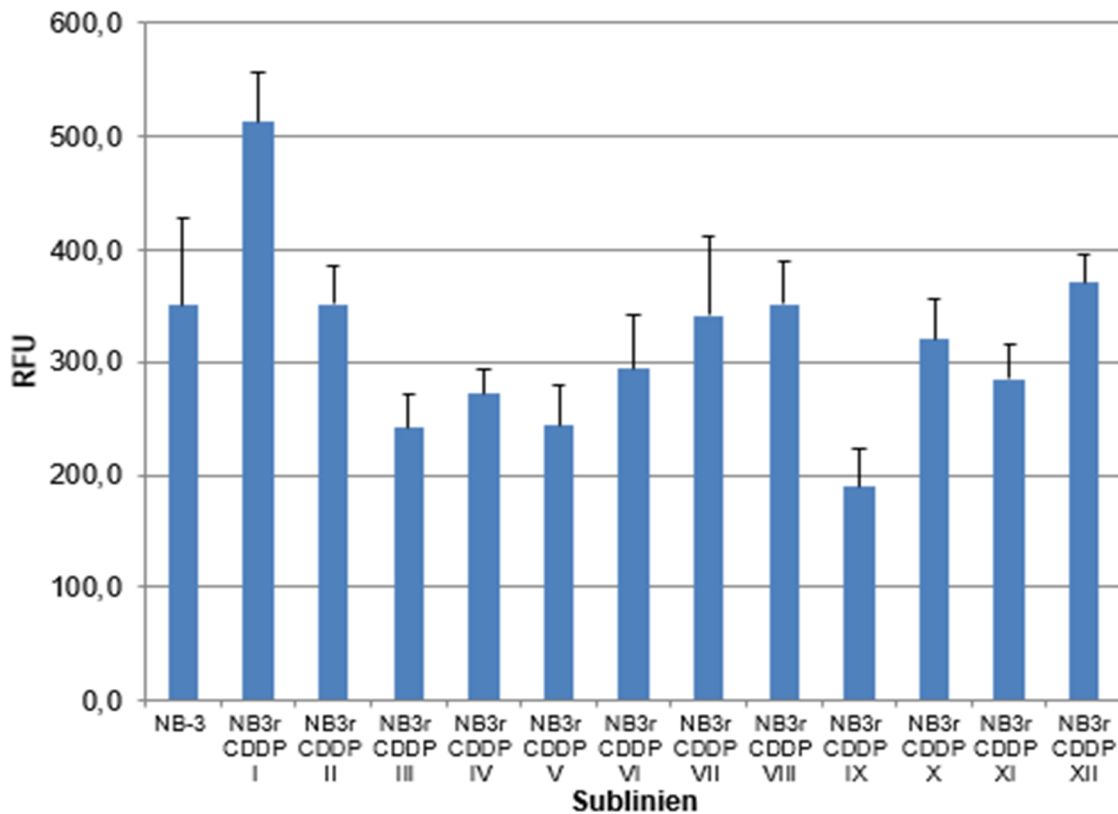
### 5.2.11 ABCC1/MRP1

Alle Neuroblastomlinien exprimieren MRP-1. Der MRP-1 positive Zellanteil beträgt je nach Sublinie zwischen 54% und 82%. UKF-NB3'CDDP<sup>1000</sup> I hat die höchste Expression von MRP-1 (512 RFU) und auch einen relativ hohen Anteil an MRP-1 positiven Zellen (80%). Die Sublinie XII hat einen leicht höheren prozentualen Anteil von MRP-1 gefärbten Zellen als I, aber eine geringere Expression (370 RFU). Außer Sublinien I und XII exprimieren die anderen Sublinien II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X und XI etwa gleich oder leicht weniger MRP-1 als UKF-NB-3 (siehe Abb. 41 und 42).





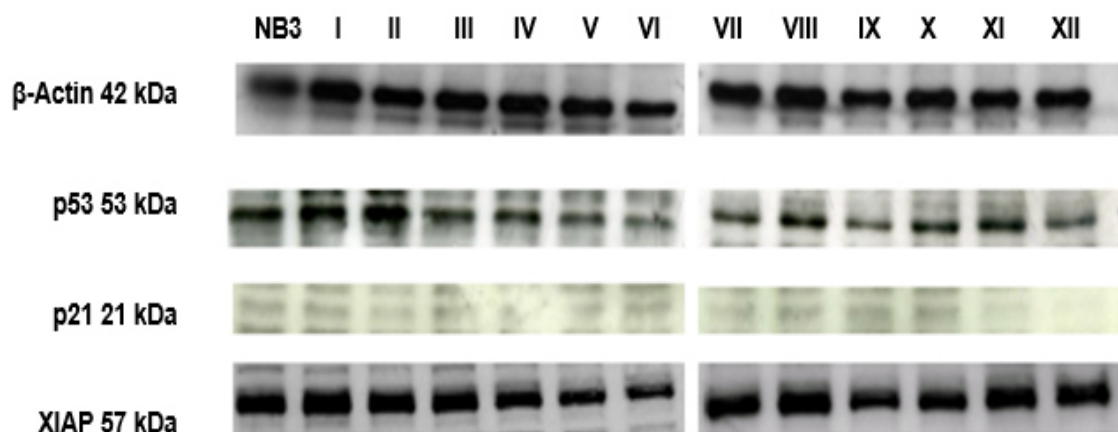
**Abbildung 41.** MRP-1-Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt den Anteil spezifisch gefärbter Zellen mit MRP-1 in Prozent als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). MRP-1: Multidrug resistance-associated protein 1.



**Abbildung 42.** MRP-1 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte in Relative Fluorescence Unit (RFU) als dicker Balken (Mittelwert). Der dünner Balken repräsentiert die Standardabweichung (Zwecks besserer Übersichtlichkeit nur positiver Wert dargestellt). Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Eine tabellarische Aufstellung der Messwerte findet sich in Anhang 10 (als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz). MRP-1: Multidrug resistance-associated protein 1.

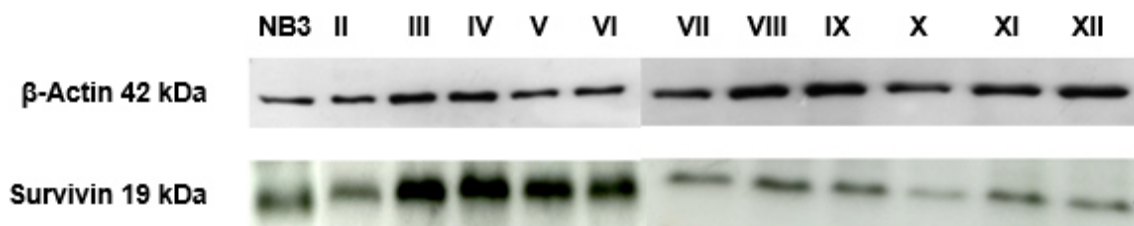
### 5.3 Western Blot

In der chemosensitiven Neuroblastomlinie UKF-NB-3 und den Cisplatin-adaptierten Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I-XII wurde die Expression der Proteine p53, p21 und XIAP untersucht (siehe Abbildung 43). p53 wird bei allen untersuchten Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert und UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP II hat die stärkste p53 Bande gefolgt von UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP I. Die stärkere Bande könnte ein Hinweis sein für eine Mutation und die Akkumulation von p53 bei dieser Sublinie. p21 wurde schwächlich bei den meisten untersuchten Sublinien detektiert. UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP XI und XII scheinen p21 nicht zu exprimieren. Eine andere Möglichkeit ist, dass der Film an der Stelle einen Lichtfleck hat und folglich die Bande bei den Sublinien XI und XII blasser wird. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) ist ebenfalls bei allen Sublinien vorhanden und die Sublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP IV, V und VI haben eine geringere Expression. Als Referenz wurde  $\beta$ -Aktin untersucht.



**Abbildung 43.** Expression von p53, p21 und XIAP in UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) im Western Blot.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. kDa: Kilodalton. XIAP: (X-linked inhibitor of apoptosis protein).

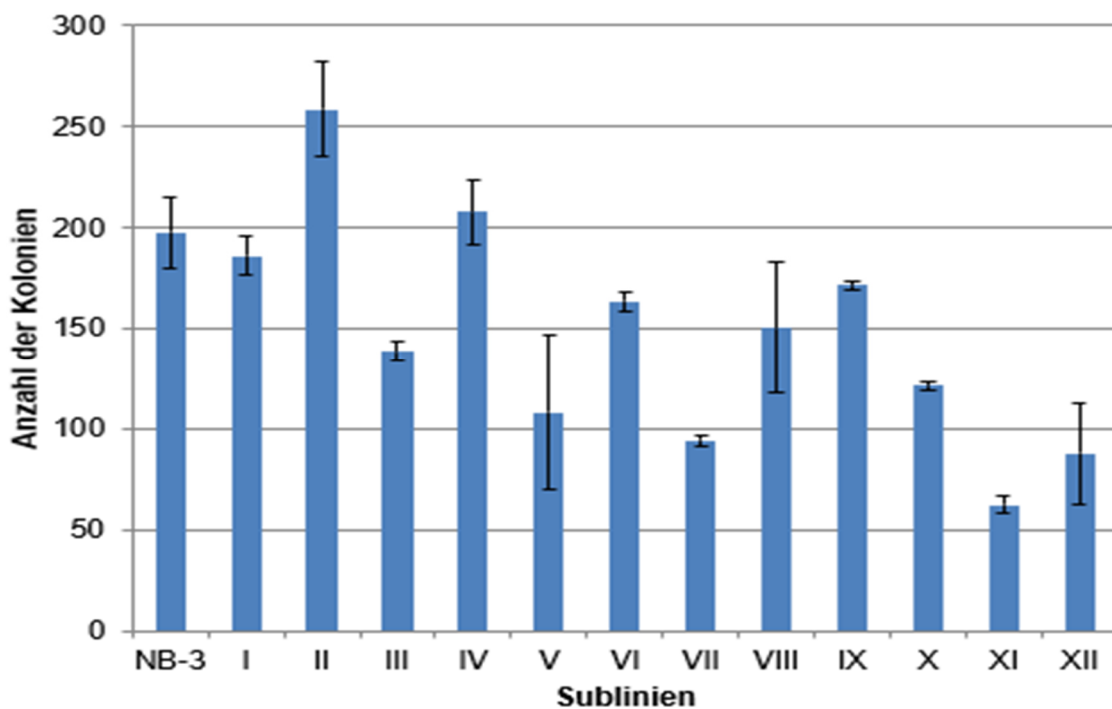
Die Expression des apoptosehemmenden Proteins Survivin (auch bekannt als BIRC5) wurde bei UKF-NB-3 und den Sublinien UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> II-XII untersucht. Bei allen untersuchten Sublinien konnte das Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 44). Die Cisplatin-adaptierten Sublinien UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> III, IV, V und VI scheinen eine etwas höhere Expression von Survivin zu haben. Aus technischen Gründen ist die Bestimmung von Survivin bei UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> I nicht erfolgt. Auch hier wurde als Referenz  $\beta$ -Aktin untersucht.



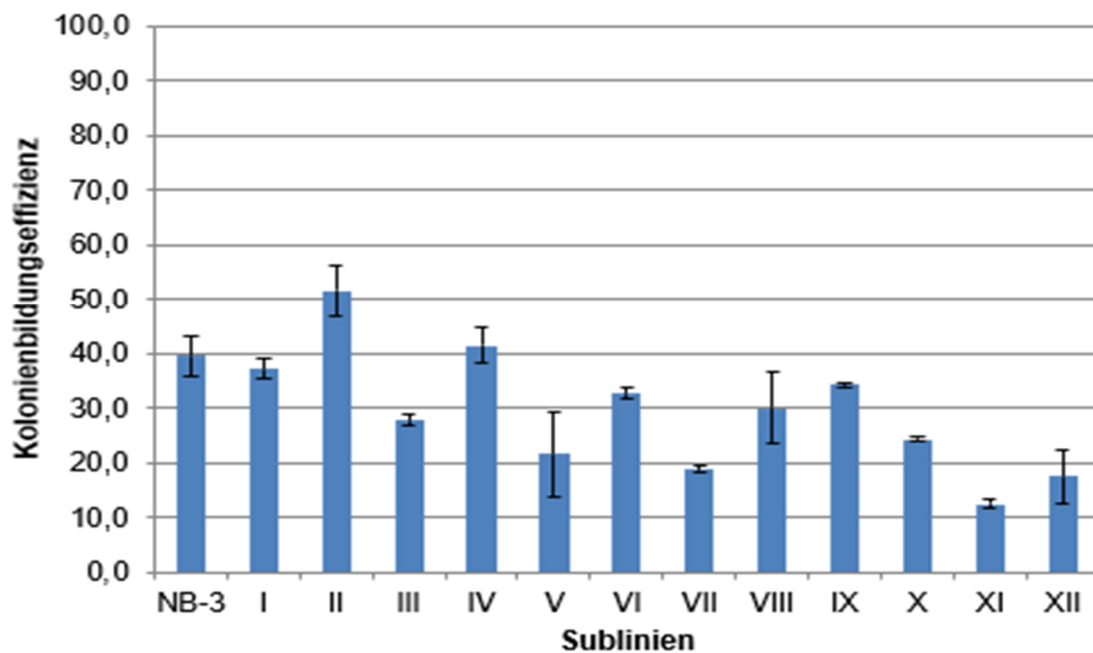
**Abbildung 44.** Expression von Survivin in UKF-NB-3 und den 11 Cisplatin adaptierten Sublinien (II bis XII) im Western Blot. B-aktin diente als Ladekontrolle. Aus technischen Gründen konnte die Sublinie I hier nicht verwendet werden. kDa: Kilodalton.

## 5.4 Colony forming Assay

Alle untersuchten Neuroblastomsublinien sind in der Lage Kolonien auszubilden. Die Kolonienbildungseffizienz schwankt von Sublinie zu Sublinie zwischen 12,4% und 51,7%. Zehn von zwölf Cisplatin adaptierten Neuroblastomsublinien haben eine niedrigere Kolonienbildungseffizienz als UKF-NB-3 (siehe Abbildungen 45 und 46). Nur die Sublinie UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> II bildet mehr Kolonien aus als UKF-NB-3. Sublinie UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> IV bildet genauso viele Kolonien aus wie UKF-NB-3. Die Tabelle 21 fasst alle Daten zusammen. Die Kolonienbildungseffizienz wurde berechnet aus dem Verhältnis der Kolonien zu eingesetzter Zellzahl.



**Abbildung 45.** Colony Forming Assay mit UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII). Die Abbildung zeigt die Anzahl gebildeter Kolonien als als dicker Balken (bei 500 eingesetzten Zellen, nach sieben Tage Bebrütung). Der dünne Balken repräsentiert die Standardabweichung. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Tabellarische Aufstellung der Messwerte in Tabelle 21.



**Abbildung 46.** Colony Forming Assay mit UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII). Die Abbildung zeigt die Kolonienbildungseffizienz (errechnet aus (Anzahl an gebildeten Kolonien/Anzahl an ausgesäten Zellen) x 100) als dicker Balken. Der dünne Balken repräsentiert die Standardabweichung. Aufzählung der Kolonien nach 7 Tagen bei 500 eingesetzten Zellen. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Tabellarische Aufstellung der Messwerte in Tabelle 21.

<b>Neuroblastomsublinie</b>	<b>Gesamtzahl der Kolonien</b>	<b>Kolonienbildungseffizienz (in Prozent)</b>
<b>UKF-NB-3</b>	197,5 ± 17,7	39,5 ± 24,7
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP I</b>	186 ± 9,9	37,2 ± 2,0
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP II</b>	258,5 ± 23,3	51,7 ± 4,7
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP III</b>	138,5 ± 4,9	27,7 ± 1,0
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP IV</b>	207,5 ± 16,3	41,5 ± 3,3
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP V</b>	108 ± 38,2	21,6 ± 7,6
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP VI</b>	163,5 ± 4,9	32,7 ± 1,0
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP VII</b>	94 ± 2,8	18,8 ± 0,6
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP VIII</b>	150 ± 32,5	30,0 ± 6,5
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP IX</b>	171,5 ± 2,1	34,3 ± 0,4
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP X</b>	121,5 ± 2,1	24,2 ± 0,4
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP XI</b>	62 ± 4,2	12,4 ± 0,8
<b>UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP XII</b>	87,5 ± 24,7	17,4 ± 4,9

**Tabelle 21.** Colony Forming Assay mit UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII). Die Tabelle zeigt die Anzahl der gebildeten Kolonien (bei 500 eingesetzten Zellen) sowie die Kolonienbildungseffizienz (errechnet aus (Anzahl an gebildeten Kolonien/Anzahl an ausgesäten Zellen) x 100). Die Werte sind jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung aus Dreifachansatz dargestellt. Aufzählung der Konlonien nach sieben Tage Kultur.

## 6 Diskussion

Mehrere Studien belegen den erheblichen Fortschritt in der Behandlung des Neuroblastoms.<sup>9,169</sup> Für die Patienten in der Hochrisikogruppe hat sich von 1990 bis 2010 die 5-Jahresüberlebensrate von 29% auf 50% verbessert. Darüber hinaus wird ein weiterer Anstieg der 5-Jahresüberlebensrate durch die Einführung der Standardtherapie mit Isotretinoin, Cytokinen und Immuntherapie für die Zeit nach 2010 erwartet.<sup>17</sup> Trotz dieser Fortschritte in der Behandlung des Neuroblastom bleibt die Prognose für Hochrisikopatienten nicht zufriedenstellend. Kinder mit Hochrisiko-Neuroblastomen können Rückfälle sogar 5 Jahre nach Vollendung der Therapie entwickeln.<sup>170,171</sup> Beim Rückfall ist die Prognose trotz intensiver Therapie besonders schlecht.<sup>172,173</sup>

Ein großes Hindernis in der Heilung des Neuroblastoms bleibt das Phänomen der Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapeutika und die sukzessive Entwicklung von Rückfällen bei Hochrisikopatienten. Eine rationale Antwort zu dieser Problematik ist die Charakterisierung von chemoresistenten Neuroblastomzellen aus Patienten mit Rezidiven und Metastasen. Durch die Erforschung dieser Zellen könnten neue Zielstrukturen entdeckt werden, um effektivere Wirkstoffe zu entwickeln. Eine besonders interessante Frage ist, in welchem Maße die Neuroblastom-Krebsstammzellen zur Multiresistenz beitragen und ob sie ursächlich für die Progression der Erkrankung sind. Die Neuroblastomzelllinie UKF-NB-3 und ihre Cisplatin-adaptierten Sublinien verkörpern gleichzeitig das Modell des Hochrisiko-Neuroblastoms sowie das Modell der spezifischen Chemoresistenz nach Therapie mit Cisplatin.

### **Resistenz und Expression von ABC-Transportern**

In dieser Arbeit wurden die Cisplatin adaptierten Neuroblastomsublinien auf die Cisplatinresistenz und auf Kreuzresistenzen untersucht. Ferner wurde im Hinblick auf die Krebsstammzelltheorie untersucht, ob die Adaptierung mit Cisplatin zu Veränderungen oder Ausbildung von Stammzeleigenschaften in den Sublinien führt. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Cisplatin-adaptierten Neuroblastomsublinien von UKF-NB-3 multiresistent sind. Außer der erworbenen Resistenz zu Cisplatin weisen die Sublinien auch deutliche



Kreuzresistenzen zu YM-155, Melphalan, Docetaxel, Carboplatin und Vinblastin auf. Weiterhin sind die Cisplatin-adaptierten Sublinien generell resistenter zu Etoposid, Vincristin und Doxorubicin als die parentale Zelle. Einige Cisplatin-adaptierte Sublinien haben einen erhöhten IC<sub>50</sub>-Wert für Carboplatin, hierzu gehören die Sublinien UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> II, VII, und XI. Keiner dieser Wirkstoffe ist also wirklich geeignet für die Elimination der Cisplatin resistenten Neuroblastomzellen.

Ein besonderer Fall ist die Sublinie UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> I, die bei Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, YM-155 und Carboplatin einen viel höheren IC<sub>50</sub>-Wert aufweist als alle anderen Cisplatin-adaptierten Sublinien. UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> I wurde länger mit Cisplatin passagiert als alle anderen Sublinien und kann morphologisch auch von allen anderen Sublinien unterschieden werden.

Die IC<sub>50</sub> Werte von Gemcitabin liegen bei den Sublinien alle innerhalb eines engen Bereiches. Die Cisplatin-adaptierten Neuroblastomsublinien scheinen keine Kreuzresistenz zu Gemcitabin aufzuweisen. Dieser Wirkstoff könnte also gut geeignet sein zur Bekämpfung der Cisplatin resistenten Neuroblastomzellen.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Efflux-Pumpen BCRP/ABCG2, MDR-1/ABCB1 und ABCC1/MRP1 bei den Cisplatin-adaptierten Neuroblastomsublinien untersucht. In UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> I wurde eine höhere BCRP-positive Zellpopulation gefunden als in allen anderen Sublinien und eine etwas höhere Expression dieses Proteins. Diese Daten könnten eine Erklärung für die erhöhte Resistenz zu Doxorubicin und Etoposid bei dieser Sublinie sein. Des Weiteren könnte das Vorhandensein einer kleinen BCRP-positiven Zellpopulation bei den anderen Cisplatin-adaptierten Sublinien die Kreuzresistenzen zu diesen Zytostatika erklären. Es ist bekannt, dass Überexpression/ Gain of Function von BCRP zu Resistenzen gegenüber Doxorubicin, Etoposid und Mitoxantron führen kann<sup>48</sup>. In zukünftigen Arbeiten wäre es interessant zu untersuchen, ob es Mutationen im BCRP Gen bei Cisplatin adaptierten Zellen und nach Chemotherapie mit Cisplatin häufiger auftreten.

Bei allen Neuroblastomsublinien konnte auch eine sehr kleine ABCB1/MDR-1 positive Zellpopulation gefunden werden. Das Ausmaß der Expression innerhalb dieser Population war vergleichsweise sehr klein. Von den getesteten Stoffen kann ABCB1 folgende Substrate unter ATP Verbrauch aus der Zelle herauspumpen: Vincristin, Vinblastin, Doxorubicin und Etoposid<sup>80</sup>. Weil die chemosensitive Neuroblastomsublinie UKF-NB-3 und auch alle resistenten Sublinien geringfügig dieses Protein exprimieren, scheint allein die Expression dieses Protein nicht die Ursache für die Chemoresistenz zu sein.

Sowohl UKF-NB-3 als auch alle Cisplatin-adaptierten Sublinien haben einen großen ABCC1/MRP1 positiven Zellanteil und von 12 Cisplatin-adaptierten Sublinien haben 7 einen höheren ABCC1 positiven Zellanteil als UKF-NB-3. Dieser erhöhte ABCC1 positiver Zellanteil könnte eine Folge der Selektion mit Cisplatin sein. Interessanterweise ist UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> | die einzige Sublinie mit einer deutlich erhöhten ABCC1 Expression (in RFU) im Vergleich zu UKF-NB-3. UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> | hat einen viel höheren IC<sub>50</sub>-Wert für Doxorubicin und Etoposid, beides Wirkstoffe, die Substrate von ABCC1 sind.<sup>130</sup> Weitere Substrate von ABCC1 sind Vincristin, Vinblastin und Paclitaxel.<sup>130</sup> Funktionelle Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren oder Knock-outs könnten die Rolle dieses Proteins in der Entstehung von Multiresistenzen nach Cisplatinadaptierung abklären. Interessant wäre es zu untersuchen, ob die Empfindlichkeit gegenüber Doxorubicin, Etoposid, Vincristin und Vinblastin durch Inhibition von ABCC1 verbessert werden kann. Die Rolle von ABCC1 beim multiresistenten Neuroblastom ist weit bekannt. Des weiteren ist ABCC1 auch wichtig bei der Tumorgenese und Tumorprogression des Neuroblastoms.<sup>129</sup> Obwohl ABCC1/MRP1 nicht in der Lage zu sein scheint, Resistenzen gegenüber alkylierenden Substanzen wie Cisplatin zu vermitteln, werden diese Substanzen im Körper konjugiert und vorhandene Nachweise suggerieren, dass wichtige Gene dieses Entgiftungsprozesses durch ABCC1 induziert werden können.<sup>86</sup> Aufgrund der großen ABCC1 positiven Zellpopulation sowie der deutlichen Expression dieses Proteins bei den cisplatinresistenten Sublinien scheint die Entwicklung von spezifischen ABCC1 Inhibitoren ein vielversprechender Schritt im Kampf gegen multiresistente Neuroblastome zu sein. Darüber hinaus könnte die Bestimmung des ABCC1 Status von Patienten in der Klinik dazu beitragen,

dass eine individuelle Therapiestrategie entwickelt wird. Patienten mit ABCC1 positiven Neuroblastomzellen könnten profitieren von einer Therapie mit Wirkstoffen, die keine ABCC1 Substrate sind, zum Beispiel Gemcitabin. Des Weiteren gehört Gemcitabin zur Wirkstoffklasse der Nukleosidanaloga und hat somit einen völlig unterschiedlichen Wirkmechanismus als alle anderen in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffe. Diese Eigenschaft könnte eine weitere mögliche Erklärung für die Wirksamkeit von Gemcitabin sein.

### **Expression von Stammzellmarkern**

Die schwach positive Expression des Stammzellmarkers BCRP bei allen getesteten Neuroblastomsublinien scheint alleine nicht mit der Entstehung von Multiresistenz in Verbindung zu stehen. Die Aussage der Positivität ist vor allem beim Nachweis von sehr kleinen Zellpopulationen (<1%) besonders schwierig.

Nach wiederholten Versuchen konnte keine nennenswerte Expression von BMI-1 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Unstimmigkeit mit unveröffentlichten Ergebnissen aus derselben Arbeitsgruppe und mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Es scheint so zu sein, dass die BMI-1 Expression nach Umsetzung der Zellen mit der Zeit abnimmt. Weiterhin gibt es Evidenz für die Expression von BMI-1 in primären Neuroblastomen sowie bei Neuroblastomzelllinien<sup>53</sup>. Diese Nachweise erfolgten zum Teil durch Western Blot. Die unterschiedlichen Nachweismethoden (Western Blot in den anderen Arbeiten/ Durchflusszytometrie in der vorliegenden Arbeit) könnten auch eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz sein. Auf der anderen Seite gibt es auch Evidenz für die Zelltyp-abhängige BMI-1-Expression beim Neuroblastom, mit niedriger Expression bei S-Typ Neuroblastomzellen, mittelmäßiger Expression beim I-Zelltyp und hoher Expression beim N-Zelltyp.<sup>51</sup> Wenn die Expression des Stammzellproteins CD133 in den untersuchten Zelllinien näher betrachtet wird, wird ersichtlich, dass die Zelllinien dieses charakteristische Merkmal vom I-Zelltyp aufweisen. In dieser Hinsicht wäre es interessant weitere Marker vom I-Zelltyp zu messen. Es gibt begrenzte Daten über die Expression von BMI-1 bei Neuroblastomzelllinien aber hier können auch MYCN-amplifizierte Zelllinien gefunden werden, die keine BMI-1 Expression aufweisen<sup>54</sup>. Die Expression von

BMI-1 scheint sowohl in Neuroblastomzelllinien als auch in Tumorpräparate mit der MYCN Expression zu korrelieren.<sup>54</sup> Sowohl die chemosensitive Sublinie UKF-NB-3 als auch alle adaptierten Cisplatin-sublinien sind MYCN amplifiziert.

In dieser Arbeit konnte die Expression des Stammzellmarkers CD133 bei allen Neuroblastomsublinien nachgewiesen werden. Die Expression von CD133 war bei den Cisplatin-adaptierten Sublinien stärker als bei UKF-NB-3. Der CD133 positive Zellanteil war bei den Sublinien ebenfalls angereichert. Der Einfluss von CD133 auf die Entwicklung von Multiresistenzen müsste in folgenden Arbeiten durch Knockouts und Viabilitäts-Assays erfolgen. In vorherigen Arbeiten unserer Forschungsgruppe und in unabhängigen Arbeiten konnte die Expression von CD133 bei UKF-NB-3 nachgewiesen werden.<sup>69</sup> CD133 konnte bisher in mehreren Neuroblastomzelllinien sowie in Neuroblastom-Tumorproben nachgewiesen werden.<sup>62</sup> Ein wichtiger Hinweis für die Beteiligung von CD133 an der Entstehung von Multiresistenzen kommt aus einer Arbeit, wo CD133 positive Neuroblastomzellen aus primären Neuroblastomen herausselektioniert wurden. Diese Zellen waren resistenter zu Doxorubicin, Vincristin und Cisplatin. Des Weiteren führte die Behandlung mit diesen Stoffen zur Anreicherung der CD133 positiven Zellpopulation.<sup>70</sup> Die Ergebnisse der zuletzt genannten Arbeit spiegeln unsere Ergebnisse *in vivo*. CD133 scheint über den AKT Signalweg zu Multiresistenzen zu führen<sup>70</sup> (siehe Absch. 1.7.3). AKT Inhibitoren wie LY2940202 stellen die Empfindlichkeit von CD133 positiven Neuroblastomzellen zu CDDP, Doxorubicin und Vincristin wieder her. Somit kann die Inhibition des AKT Signalweges eine neuartige Möglichkeit sein, um multiresistente Neuroblastomzellen wieder empfindlich zur Chemotherapie zu machen und um die Rezidivrate beim Neuroblastom zu reduzieren.<sup>70</sup> Aufgrund der hohen Expression von CD133, sowie der großen CD133-positiven Zellpopulation innerhalb der adaptierten Neuroblastomsublinien könnte CD133 einen wertvollen Marker des multiresistenten Hochrisiko -Neuroblastoms darstellen.

Die Expression des Disialogangliosid GD2 und die GD2 positive Zellpopulation ist bei allen Cisplatin-adaptierten Sublinien erniedrigt im Vergleich zu UKF-NB-3. Unveröffentlichte Ergebnisse der Forschungsgruppe hatten eine erniedrigte GD2 positive Zellpopulation in UKF-NB-3 (CDDP<sup>1000</sup>) entdeckt. In der jetzigen Arbeit

wurde dieses Ergebnis bestätigt und bei 11 weiteren Cisplatin-resistenten Sublinien überprüft. Die jetzigen Ergebnisse könnten der erste Hinweis sein für die Entwicklung eines weiteren Resistenzmechanismus bei Cisplatin-adaptierten Neuroblastomzellen, nämlich die Umgehung der Immuntherapie mit GD2 gerichteten Antikörpern. Diese Erniedrigung von GD2 konnte in den unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe zwar für UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I gezeigt, aber nicht bei anderen Zytostatika adaptierten Neuroblastomsublinien (UKF-NB-3<sup>r</sup>Doxo<sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup> VCR<sup>10</sup>) gefunden werden. Somit ist die Erniedrigung der Expression von GD2 ein spezifisches Phänomen der Cisplatin adaptierte Sublinien und kein generelles Merkmal von chemoresistenten Neuroblastomzellen. In dieser Hinsicht wäre es interessant zu schauen, ob dieser Zusammenhang auch in der Klinik beobachtet werden kann, also ob es nach Chemotherapie mit Cisplatin zu einer Erniedrigung der GD2 positiven Population kommt und ob dieses Phänomen mit einem schlechten Ansprechen auf die Behandlung mit GD2-Antikörpern einhergeht.

Die Nanog positive Zellpopulation ist im Vergleich zu UKF-NB-3 bei allen Cisplatin-adaptierten Sublinien erhöht (außer in UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> XI). Ebenso ist auch die Expression (in RFU) im Vergleich zu UKF-NB-3 erhöht. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Einklang mit Ergebnissen von anderen Forschungsgruppen, die eine Anreicherung von Nanog positiven Zellen bei chemoresistenten Neuroblastom-zelllinien nachweisen konnten.<sup>95</sup> Aufgrund der Anreicherung von Nanog positiven Zellen bei den multiresistenten Neuroblastomsublinien könnte eine solche Anreicherung von Nanog einen Marker für Multiresistenz beim Neuroblastom darstellen. Es ist noch nicht ganz klar, wie Nanog zum multiresistenten Phänotyp beiträgt. Ein wichtiger Signalweg, der diesen Vorgang steuern könnte, ist der NCYM/ MYCN/ OCT-4, Nanog/ Sox-2 Signalweg.<sup>93</sup> Ein vielversprechender Therapieansatz ist die Kombinationsbehandlung mit Histondeacetylasen-Inhibitoren (MS-275/ Etinostat) und dem pan-Carbonanhydrasen-Inhibitor Acetazolamid. Diese Kombinationsbehandlung führte zur Herunterregulation von OCT-4, SOX-2 und Nanog. Beeindruckend konnte diese Kombination die Tumorigenität erstmalig reduzieren und in mehreren Xenografts sogar eliminieren.<sup>174</sup> Es wurde somit

postuliert, dass diese Kombination die Krebsstammzellen innerhalb vom Neuroblastom eliminieren könnte.

Alle getesteten Neuroblastomsublinien sind Necdin positiv und die Cisplatin adaptierten Sublinien zeigen starke Unterschiede in der Expression. Einige Cisplatin adaptierte Sublinien (II, III, IV, V, VII, VIII, XI und XII) haben eine niedrigere Expression als UKF-NB-3 und andere Sublinien eine höhere Expression (I, VI, IX und X). Die Sublinie UKF-NB-3rCDDP I hat die höchste Necdin-positive Zellpopulation und die höchsten RFU-Werte. Allerdings ist nicht bekannt welche Faktoren die Expression von Necdin regulieren oder ob die Expression zellzyklusabhängig ist. Beim Neuroblastom ist die Rolle von Necdin wenig erforscht. Necdin Knock-outs und darauffolgende Überprüfung der Tumorigenität durch Xenografts könnten den Einfluss von Necdin auf die Tumorigenität entschlüsseln.

Die Cisplatin-adaptierten Neuroblastomsublinien haben im Vergleich zu UKF-NB-3 eine angereicherte Nestin positive Zellpopulation und exprimieren stärker Nestin (außer UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> XI). Nestin ist als Stammzellmarker weitreichend untersucht. Dennoch ist über die Funktion von Nestin beim Neuroblastom wenig bekannt. Beim Neuroblastom könnte Nestin eine Rolle in der Regulation der Proliferation haben (siehe Absch 1.7.8). Als prognostischer Marker konnte sich Nestin bisher nicht durchsetzen (siehe Absch 1.7.8) und die klinische Relevanz bleibt umstritten. Allerdings führen Knock-outs von Nestin zur Erniedrigung der Wachstumsrate und Motilität von Neuroblastomzelllinien<sup>109</sup>. Beim Neuroblastom wird postuliert, dass Nestin ein Vermittler der N-myc-assoziierten Tumoraggressivität ist.<sup>109</sup> Aufgrund der angereicherten Nestin positiven Zellpopulation, sowie der stärkeren Expression bei den cisplatin-resistenten Neuroblastomsublinien könnte Nestin ein Marker für Chemoresistenz und dieses Protein könnte in die Entwicklung von Multiresistenzen involviert sein. Knockouts von Nestin und die Testung von Zytostatika mittels Viabilitätsassays könnten die Rolle von Nestin bei der Entwicklung von Multiresistenzen abklären.

Alle getesteten Neuroblastomsublinien exprimieren Oct-4. Bei dieser Arbeit war das Ausmaß der Oct-4 positiven Zellpopulation bei allen Neuroblastomsublinien

unterschiedlich. Einige Cisplatin adaptierte Sublinien zeigten eine höhere Expression von Oct-4 als die UKF-NB-3 und andere Sublinien eine niedrigere. Aus diesem Grund ist alleine die Expression von Oct-4 kein zuverlässiger Marker der Multiresistenz. Es bleibt zu klären welche Funktion Oct-4 beim Neuroblastom hat und welche Eigenschaften die Oct-4 positiven Zellen innerhalb des Neuroblastoms haben. Erste Untersuchungen dieses Proteins beim Neuroblastom haben gezeigt, dass Oct-4, NCYM und MYCN Zusammenspieler sind und zur Aggressivität des Neuroblastoms beitragen (siehe Absch. 1.7.9).<sup>93</sup> In seiner Rolle als Torhüter der Pluripotenz (siehe Absch 1.7.9) könnte Oct-4 die Heterogenität/ Differenzierung des Neuroblastoms kontrollieren. Diese Hypothese wird unterstützt durch folgende Daten: Herunterregulierung von Oct-4 führt zur Differenzierung,<sup>116</sup> und ein Oct-4 Knock-down führt zur Erhöhung der asymmetrischen Zellteilung.<sup>93</sup>

Die vorliegende Arbeit zeigte eine Expression von SOX-2 bei allen untersuchten Neuroblastomsublinien. Es ist bekannt, dass die Expression von SOX-2 und Oct-4 beim Neuroblastom mit dem klinischen Stadium der Erkrankung und niedrigem Überleben<sup>122</sup> korreliert. In einer Chemotherapie Subgruppe von Neuroblastome in Stadium III und IV konnte gezeigt werden, dass die Expression von SOX-2 und Oct-4 vermindert ist.<sup>117</sup> Auf der anderen Seite führt das Knockdown von SOX-2 zu verminderter Tumorigenität und zur Expression von Differenzierungsmarkern.<sup>123</sup> Die Rolle von SOX-2 ist beim Neuroblastom nicht ausreichend untersucht und es gibt mehr Fragen als Antworten. Als Stammzellmarker eignet sich SOX-2 nicht, da es in den Sublinien zu unterschiedlich exprimiert wird.

Der Nachweis von den meisten dieser Stammzellmarker bei den untersuchten Neuroblastomsublinien ist ein Hinweis dafür, dass die Neuroblastomsublinien eine Krebsstammzellpopulation aufweisen. Die Tatsache, dass diese Marker von jeweils unterschiedlich großen Zellpopulationen innerhalb der Sublinien exprimiert werden, zeigt allerdings, dass die Neuroblastomsublinien recht heterogen sind. Die Adaptierung mit Cisplatin führt bei den meisten Cisplatin adaptierten Neuroblastomsublinien zu einer erhöhten Expression von CD133 sowie zur Anreicherung von CD133-positiven Zellen. Die Adaptierung mit

Cisplatin führt zu einer Veränderung der GD2 Expression in den Sublinien. Die Cisplatin adaptierten Sublinien exprimieren weniger GD2 und haben eine niedrigere GD2-positive Zellpopulation. Wenn dieses Phänomen auch im klinischen Kontext nach der Chemotherapie mit Cisplatin beobachtet werden würde, könnte es möglicherweise eine Therapie mit GD2-Antikörper erschweren. Nach der Adaptierung mit Cisplatin kommt es nicht zu einer ausgeprägten Änderung der Expression von MDR1. Die Expression von Nanog ist nach der Adaptierung mit Cisplatin ersichtlich geändert. Alle adaptierten Sublinien exprimieren Nanog stärker als die chemosensitive UKF-NB-3 und haben eine erhöhte Nanog-positive Zellpopulation (außer Sublinie XI). Die Expression von Necdin ist sehr heterogen in den Cisplatin adaptierten Sublinien. Sublinie UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP I hat die größte Necdin-positive Zellpopulation und zeigt die stärkste Expression. Es gibt aber auch Cisplatin adaptierte Sublinien die etwa gleich oder weniger Necdin exprimieren als UKF-NB-3. Durch die Adaptierung kommt es auch zu einer Änderung der Expression von Nestin. Alle Cisplatin adaptierten Sublinien exprimieren Nestin stärker als die chemosensitive UKF-NB-3 und haben eine deutlich höhere Nestin-positive Zellpopulation. Die Expression von Oct-4 ist bei den adaptierten Sublinien heterogen. Nach der Adaptierung mit Cisplatin kommt es zu einer veränderten Expression von SOX-2. Bei 8 von 12 adaptierten Sublinien zeigt sich eine Anreicherung von SOX-2-positiven Zellen. Alle adaptierten Sublinien exprimieren SOX-2 stärker als UKF-NB-3. Die Expression von ABCC1/MRP1 ist bei den untersuchten Sublinien heterogen und nicht ersichtlich durch die Adaptierung verändert. Die adaptierte Sublinie I sticht aus der Gruppe heraus mit einer erhöhten Expression von MRP1 und einer leicht höheren MRP1-positiven Zellpopulation.

### **Expression von p53, p21, XIAP und Survivin**

Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Sublinien p53 exprimieren und dass die Expression heterogen ist. Qualitativ ist keine generelle Überexpression oder Verminderung der Expression von p53 bei den adaptierten Sublinien zu sehen. UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP II und UKF-NB-3<sup>R</sup>CDDP I haben eine



stärkere p53 Bande als alle anderen adaptierten Sublinien. Die Adaptierung an Cisplatin hatte somit keinen generellen Einfluss auf den p53-Status aller Sublinien, sondern nur punktuell. Der Tumorsuppressor p53 reguliert den Zellzyklus, inhibiert das Wachstum von Tumorzellen und induziert die Apoptose durch Inhibition von Bcl-2 und Aktivierung von BAX.<sup>175</sup> Beim Neuroblastom treten selten p53 Mutationen auf, und wenn sie vorkommen, dann eher bei rezidivierenden Tumoren.<sup>176</sup> Für p21 war bei allen untersuchten Neuroblastomsublinien eine schwache Bande nachweisbar. Die schwache Bande bei den Sublinien XI und XII scheint eher die Folge eines Lichtflecks zu sein als ein Ausdruck einer verminderten Expression. Die Adaptierung an Cisplatin scheint auch hier keinen Einfluss auf die Expression von p21 (auch bekannt als CDK-Inhibitor 1) zu haben.

Alle untersuchte Neuroblastomsublinien exprimieren im Western Blot das anti-apoptotische Protein XIAP und das Ausmaß der Expression ist bei allen Sublinien ähnlich und vor allem nicht höher als in UKF-NB-3. In den Sublinien IV, V und VI ist die Expression tendentiell weniger ausgeprägt. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) ist der potenteste Inhibitor und das am besten definierte Protein der IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) Familie. XIAP kann durch die BIR3 Domäne die Caspase-9 und durch die BIR2 Domäne die Caspase-3/-7 inhibieren.<sup>177</sup> Die nachgewiesene Expression von XIAP könnte ein Mechanismus sein wodurch die Neuroblastomsublinien die Apoptose umgehen und es könnte einen Überlebensvorteil für diese Zellen bedeuten. Beim Neuroblastom führen XIAP Inhibitoren/SMAC-Mimetika zur signifikanten (*in vitro* und *in vivo*) Beeinträchtigung des Wachstums vom Tumor<sup>177</sup> und sensitivieren Neuroblastomzellen gegenüber Chemotherapie.<sup>178</sup> In diesem Zusammenhang wäre es interessant, an den hier untersuchten Cisplatin-adaptierten Sublinien XIAP-Inhibitoren zu testen.

Die Expression von Survivin war im Western Blot zwischen den untersuchten Neuroblastomlinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Wegen technischer Gründe war es nicht möglich, den Survivin Status von UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> I zu bestimmen. UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> III, IV, V und VI weisen eine höhere Expression des anti-apoptotischen Proteins Survivin auf als UKF-NB-3. Diese Sublinien

haben auch im Vergleich zu UKF-NB-3 einen erhöhten IC<sub>50</sub>-Wert für YM-155 (Survivin Inhibitor). UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> VII und X zeigen im Vergleich zu UKF-NB-3 eine niedrigere Expression von Survivin. Trotzdem ist der IC<sub>50</sub>-Wert von YM-155 bei diesen beiden Sublinien im Vergleich zu UKF-NB-3 um das Zweifache erhöht. Unabhängig vom Survivin Status sind alle Cisplatin adaptierten Sublinien resistenter gegenüber YM-155 als die parentale Zelle UKF-NB-3. Die IC<sub>50</sub>-Werte gegen den Survivin-Inhibitor YM-155 scheinen also nicht direkt mit der Expression von Survivin zu korrelieren. Die Adaptierung an Cisplatin führt zu unterschiedlichen Veränderungen in der Survivin-Expression.

### **Colony forming assay**

Im Colony forming assay wurde die Fähigkeit der adaptierten Sublinien Kolonien auszubilden untersucht. Die meisten Cisplatin adaptierten Sublinien haben meist eine niedrigere Kolonienbildungseffizienz als die parentale Zelle UKF-NB-3. Die Ausnahme ist UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> II mit einer um 11 % höheren Kolonienbildungseffizienz als UKF-NB-3. Die Testung der Kolonienbildungseffizienz liefert wichtige Informationen über das langfristige proliferative Potenzial von Zellen.<sup>179</sup> Die Adaptierung an Cisplatin hat die Kolonienbildungseffizienz in den Sublinien nicht verstärkt, sondern tendenziell eher reduziert. Für UKF-NB-3 konnte auch eine erhöhte Neurosphere- und Kolonienbildungsfähigkeit gefunden werden, beim Vergleich mit CD133 negativen Neuroblastomzellen.<sup>69</sup> Die vorherige Kultivierung mit Cisplatin bei den Cisplatin adaptierten Sublinien könnte eine mögliche Erklärung sein für die niedrigere Kolonienbildungsfähigkeit dieser Sublinien. In dieser Hinsicht wäre es interessant zu prüfen, ob die Kolonienbildungsfähigkeit sich im Verlauf verändert, wenn die Cisplatin adaptierten Sublinien für längere Zeit nicht mehr mit Cisplatin umgesetzt werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Adaptierung an Cisplatin zu tiefgreifenden Veränderungen der Stammzeleigenschaften der Neuroblastomsublinien führt. Insbesondere zeigte sich eine Änderung in der Expression der Stammzellmarker CD133, GD2, Nanog, Nestin, und SOX-2. Ferner führt die Adaptierung an Cisplatin zur Ausbildung von Kreuzresistenzen

gegen unterschiedliche Wirkstoffe und generell zu einer niedrigeren Kolonienbildungseffizienz als UKF-NB-3. Nur die Cisplatin adaptierte Sublinie II kann mehr Kolonien bilden als UKF-NB-3, die Sublinie IV bildet etwa gleich so viele Kolonien aus wie UKF-NB-3 und alle anderen Sublinien bilden leicht weniger Kolonien als UKF-NB-3 aus. Die Tabelle 22 fasst die geänderten Stammzeleigenschaften der Cisplatin adaptierten Sublinien zusammen.

<b>Stammzeleigenschaften</b>	<b>UKF-NB-3</b>	<b>Cisplatin adaptierte Sublinien</b>
<b>BCRP</b>		
Expression	+/-	+/-
Zellpopulation	+/-	+/-
<b>BMI-1</b>		
Expression	-	-
Zellpopulation	-	-
<b>CD133</b>		
Expression	+	++, (1)
Zellpopulation	+	++, (1)
<b>GD2</b>		
Expression	++	+
Zellpopulation	++	+
<b>MDR1/ABCB1</b>		
Expression	+/-	+/-
Zellpopulation	+/-	+/-
<b>Nanog</b>		
Expression	+	++, (2)
Zellpopulation	+	++, (2)
<b>Necdin</b>		
Expression	+	+, (3)
Zellpopulation	+	+, (3)
<b>Nestin</b>		
Expression	+	++, (4)
Zellpopulation	+	++, (4)
<b>Oct-4</b>		
Expression	+	+, (5)
Zellpopulation	+	+, (5)
<b>SOX-2</b>		
Expression	+	++
Zellpopulation	+	++
<b>MDR-1/ABCC1</b>		
Expression	+	+, (7)
Zellpopulation	+	+, (7)
<b>Kolonienbildungseffizienz</b>		
	++	+(8)

**Tabelle 22.** Veränderungen der Stammzeleigenschaften in Cisplatin adaptierten Sublinien im Vergleich zu UKF-NB-3.

Expression: +/-: wenig bis nicht vorhanden, -: nicht vorhanden, +: vorhanden, ++: erhöht

1: Niedrige Expression bei VI und XII, höchste Expression bei I

**Fortsetzung auf der nächsten Seite.**

---

**Tabelle 22.** Veränderungen der Stammzeleigenschaften in Cisplatin adaptierten Sublinien im Vergleich zu UKF-NB-3. Fortsetzung.

---

2: XI zeigt etwa die gleiche Expression und den gleichen Nanog+ Zellanteil wie UKF-NB-3

3: I fällt auf mit der größten Nectin+ Zellpopulation und der stärksten Expression

4: XI hat den niedrigsten Nestin+ Zellanteil unter den Cisplatin-adaptierten Sublinien

5: I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, und XI stärkere Expression, IV und XII weniger Expression als UKF-NB-3

6: V, X, XI und XII niedrigerer Anteil an Sox-2 positiven Zellen als UKF-NB-3

7: I höchste Expression von MRP-1, XII höherer prozentualer Anteil von MRP-1+ Zellen als I, aber eine geringere Expression

8: II bildet mehr Kolonien aus als UKF-NB-3. IV bildet etwa gleich so viele Kolonien aus wie UKF-NB-3, alle anderen Sublinien bilden weniger Kolonien als UKF-NB-3

BCRP/ABCG2: ATP-binding cassette super-family G member 2, BMI-1 Polycomb complex protein BMI-1, CD133: prominin-1, GD2: Ganglioside G2, MDR1/ABCB1: Multidrug-Resistance-Protein 1, Oct-4: Octamer binding transcription factor 4, SOX-2: Sex determining region Y box 2, MDR-1/ABCC1: Multidrug-Resistance-Protein 1.

---

## 7 Zusammenfassung

**Grundlagen:** Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter<sup>1</sup>. Die Patienten in der Hochrisikogruppe haben trotz der Weiterentwicklung der Therapie immer noch eine sehr schlechte Prognose. Die Entwicklung von Resistenzen und die darauffolgende Progression der Erkrankung sind kennzeichnende Phänomene innerhalb dieser Patientengruppe. Die hier vorgestellte Charakterisierung von MYCN amplifizierten, Cisplatin adaptierten chemoresistenten Neuroblastomsublinien UKF-NB-3<sup>rCDDP</sup><sup>1000</sup> I bis XII ist eine grundlegende Aufgabe, um den Phänotyp des multiresistenten/ Hochrisiko Neuroblastoms besser zu verstehen. Des Weiteren könnte diese Charakterisierung zu einem besseren Verständnis der Rolle von Krebsstammzellen beim Neuroblastom führen.

**Methoden:** Die Empfindlichkeit zu verschiedenen Zytostatika wurde im Viabilitätsassay untersucht. Die Expression mehrerer Stammzellmarker wurde durch Durchflusszytometrie überprüft. Im Western Blot wurde die Expression der Proteine p53, p21, XIAP und Survivin untersucht. Die Proliferation der verschiedenen Sublinien wurde durch den Kolonienbildungstest untersucht.

**Ergebnisse:** In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Cisplatin adaptierten Sublinien zusätzliche Resistenzen gegenüber weiteren klassischen Zytostatika zeigen. Abgesehen von der erworbenen Cisplatin-Resistenz zeigen die Cisplatinsublinien erhöhte IC<sub>50</sub>-Werte für die Wirkstoffe YM-155, Doxorubicin, Melphalan, Vincristin, Docetaxel, Etoposid, Carboplatin und Vinblastin (jeweils im Vergleich zu UKF-NB-3). Von den getesteten klassischen Zytostatika hat nur Gemcitabin bei den Cisplatin adaptierten Sublinien eine gute Wirksamkeit. In dieser Arbeit konnte die Expression von mehreren Stammzellmarkern, sowohl bei den Cisplatin resistenten Sublinien als auch bei der parentalen Zelle UKF-NB-3, nachgewiesen werden. Durch die Cisplatinadaptierung ergaben sich Unterschiede in der Expression von CD-133, Nanog, Nestin, Sox-2 und GD2. Im Kolonienbildungstest konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden, die Cisplatin-adaptierten Sublinien zeigen tendenziell eine geringere Kolonienbildung als UKF-NB-3.

**Konklusion:** Der Nachweis von unterschiedlichen Stammzellmarkern bei den Neuroblastomsublinien UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I bis XII ist ein wichtiger Hinweis für die Existenz von Zellen mit Stammzellfähigkeiten innerhalb der Sublinien.

Durch ein besseres Verständnis der biologischen Merkmale in resistenten Neuroblastomzellen könnten neuartige gezielte Therapiestrategien entdeckt werden. Viele der bei dieser Arbeit untersuchten Moleküle vermögen einen Effekt bei der Entstehung von Resistenzen und bei Aufrechterhaltung der Proliferation und Überleben von Neuroblastomzellen sowie Neuroblastomkrebsstammzellen zu haben. Folglich könnten diese Zielmoleküle (CD-133, Nanog, Nestin, Sox-2 und GD2) in der Zukunft benutzt werden, um neue therapeutische Strategien zu entwickeln, die sowohl die multiresistenten Neuroblastomzellen als auch die Neuroblastom-krebsstammzellen besser abtöten können. Zusätzlich ist Gemcitabin als Medikament nach Cisplatintherapie klinisch interessant.

## 7.1 Abstract

**Background:** Neuroblastoma is the most frequent occurring solid tumor outside of the brain in infants<sup>1</sup>. Despite the progress in therapy, high risk patients still have a very poor prognosis. The development of chemoresistance and the subsequent progression of the disease are common phenomena within this group of patients. The characterisation of the MYCN amplified and cisplatin adapted chemoresistant Neuroblastoma sublines UKF-NB-3<sup>r</sup>CDDP<sup>1000</sup> I to XII is a fundamental task, with the aim of a better understanding of the multiresistant / High risk Neuroblastoma phenotype. Furthermore, this characterisation could lead to a better understanding of the role of neuroblastoma cancer stem cells.

**Methods:** The sensitivity to different cytotoxic drugs was determined by viability assay. Expression analysis of several stem cell markers was performed by flow cytometry. Verification of the expression levels of p53, p21, XIAP and Survivin was carried out by Western blot. The proliferation rate of the different sublines was examined by colony forming assay.

**Results:** This thesis shows that the cisplatin adapted sublines exhibit additional resistance to other classic cytotoxic drugs. Apart from the acquired resistance against cisplatin, the sublines exhibit higher IC<sub>50</sub> values for the cytotoxic drugs YM-155, doxorubicin, melphalan, vincristine, docetaxel, etoposide, carboplatin and vinblastine (compared to UKF-NB-3). It appears that from all of the tested drugs, gemcitabine is the one to have a good effectiveness on the cisplatin adapted sublines. This thesis was able to detect expression of several stem cell markers, both in the cisplatin resistant sublines as well as in the chemosensitive Neuroblastoma cell line UKF-NB-3. The cisplatin adaptation process resulted in differences in the expression of CD-133, Nanog, Nestin, Sox-2 and GD2. In the colony formation test, no great differences were found but the cisplatin-adapted sublines tend to show less colonization than UKF-NB-3.

**Conclusion:** The detection of different stem cell markers in the cisplatin adapted neuroblastoma sublines UKF-NB-3rCDDP<sup>1000</sup> I to XII is an important clue for the existence of cells with stem cell capacities within the sublines. With a better understanding of the biological features in cisplatin resistant neuroblastoma cells, new targeted therapeutic strategies could be discovered. Many of the molecules studied in this work may play a role in the formation of resistance and in the maintenance of proliferation and survival of the neuroblastoma cells as well as neuroblastoma cancer stem cells. Thus, these molecules (CD-133, Nanog, Nestin, Sox-2 and GD2) could be used in the future to develop new therapeutic strategies that can better target both the multiresistant neuroblastoma cells and the neuroblastoma cancer stem cells. Furthermore, Gemcitabine is still effective in all cisplatin adapted Sublines and could therefore be very interesting for the clinic.



## 8 Abbildungsverzeichnis

1. Abbildung 1. Das klassische und das fließende KSZ-Modell <sup>33</sup> .....	10
2. Abbildung 2. Das konvergente Krebsstammzellmodell <sup>33</sup> .....	12
3. Abbildung 3. Regulation verschiedener onkogener Signalwege durch Nanog Mod <sup>91</sup> .....	25
4. Abbildung 4. Der Antagonismus zwischen Necdin und BMI1 kontrolliert die Proliferation von neuronalen Precursor Zellen im embryonalen Mausneokortex <sup>104</sup> .....	28
5. Abbildung 5. Mögliche Signalwege und Interaktionen zwischen HIF-2 $\alpha$ , MYCN, BMI1 und Necdin im Neuroblastom <sup>102,104</sup> .....	29
6. Abbildung 6. Das MYCN/NCYM-Oct4 Netzwerk beim MYCN amplifizierten Neuroblastom <sup>93</sup> .....	34
7. Abbildung 7. Berechnung der relativen Resistenz aus den IC50 Werte.....	61
8. Abbildung 8. Aufbau einer 96 Lochplatte für den MTT Test .....	62
9. Abbildung 9. Proteinbestimmung in einer 96 Loch Platte.....	69
10. Abbildung 10. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Cisplatin im Verhältnis zu UKF-NB-3. ....	76
11. Abbildung 11. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen YM-155 im Verhältnis zu UKF-NB-3.....	78
12. Abbildung 12. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Doxorubicin im Verhältnis zu UKF-NB-3. ....	80
13. Abbildung 13. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Melphalan im Verhältnis zu UKF-NB-3.....	82
14. Abbildung 14. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Vincristin im Verhältnis zu UKF-NB-3.....	84
15. Abbildung 15. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Docetaxel im Verhältnis zu UKF-NB-3 .....	86
16. Abbildung 16. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Etoposid im Verhältnis zu UKF-NB-3. ....	88
17. Abbildung 17. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Carboplatin im Verhältnis zu UKF-NB-3.....	90
18. Abbildung 18. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Gemcitabin im Verhältnis zu UKF-NB-3. ....	92

19. Abbildung 19. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Oxaliplatin im Verhältnis zu UKF-NB-3. ....	94
20. Abbildung 20. Relative Resistenz der 12 Cisplatin adaptierten Sublinien gegen Vinblastin im Verhältnis zu UKF-NB-3.....	96
21. Abbildung 21. BCRP-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3BCRP am Durchflusszytometer. ....	99
22. Abbildung 22. BCRP-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3BCRP am Durchflusszytometer.....	100
23. Abbildung 23. BMI-1-Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	101
24. Abbildung 24. BMI-1-Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	102
25. Abbildung 25. CD133 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	103
26. Abbildung 26. CD133 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	104
27. Abbildung 27. GD2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	105
28. Abbildung 28. GD2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	106
29. Abbildung 29. MDR1-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3MDR1 am Durchflusszytometer.....	107
30. Abbildung 30. MDR1-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3MDR1 am Durchflusszytometer.....	108
31. Abbildung 31. Nanog Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	109
32. Abbildung 32. Nanog Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	110
33. Abbildung 33. Necdin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	111
34. Abbildung 34. Necdin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	112

35. Abbildung 35. Nestin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	113
36. Abbildung 36. Nestin Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	114
37. Abbildung 37. Oct-4 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	115
38. Abbildung 38. Oct-4 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	116
39. Abbildung 39. SOX-2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	117
40. Abbildung 40. SOX-2 Expression von UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) am Durchflusszytometer .....	118
41. Abbildung 41. MDR-1-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3MDR-1 am Durchflusszytometer .....	119
42. Abbildung 42. MDR-1-Expression von UKF-NB-3, den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) und UKF-NB-3MDR-1 am Durchflusszytometer .....	120
43. Abbildung 43. Expression von p53, p21 und XIAP in UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) im Western Blot .....	121
44. Abbildung 44. Expression von Survivin in UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (II bis XII) im Western Blot .....	122
45. Abbildung 45. Colony Forming Assay mit UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) .....	123
46. Abbildung 46. Colony Forming Assay mit UKF-NB-3 und den 12 Cisplatin adaptierten Sublinien (I bis XII) .....	124

## 9 Literaturverzeichnis

1. Henze G, Klingebiel T, Schlegel PG. Onkologie – KMT. In Speer C, Gahr M, eds. *Pädiatrie*. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009:643-670. Accessed March 28, 2021. <https://link-springer-com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/book/10.1007%2F978-3-662-57295-5>
2. Riede UN, Seufer J. Nebennierenmark. In Riede UN, Werner M, Freudenberg N, eds. *Basiswissen allgemeine und spezielle Pathologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009:547-548. Accessed March 28, 2021. <https://link-springer-com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/book/10.1007%2F978-3-540-79214-7>
3. Roll W, Dirksen U, Weckesser M. Update PET in der Pädiatrischen Onkologie. *Nuklearmedizin*. 2018;41(03):211-221. doi:10.1055/a-0621-3
4. Hero B, Berthold F. S1 Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie Neuroblastom. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/025-008l\\_S1\\_Neuroblastom\\_2011-abgelaufen.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-008l_S1_Neuroblastom_2011-abgelaufen.pdf). Updated 08/2011. Accessed March 3, 2017.
5. Brodeur GM. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur J Cancer*. 1995;31(4):505-510. doi:10.1016/0959-8049(95)00040-P.
6. Jiang M, Stanke J, Lahti JM. The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94:77-127. doi:10.1016/B978-0-12-380916-2.00004-8.
7. Graf N, Muntean W, Sutor A. Hämatologische und onkologische Erkrankungen. In: Gortner L, Meyer S, Sitzmann FC, eds. *Duale Reihe Pädiatrie*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2012:429-514. Accessed April 2, 2021. [https://eref-thieme-de.proxy.ub.uni-frankfurt.de/ebooks/pdf/943130/149320104\\_002\\_015\\_006.pdf](https://eref-thieme-de.proxy.ub.uni-frankfurt.de/ebooks/pdf/943130/149320104_002_015_006.pdf)
8. Kaatsch P, Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry – Annual Report 2016 (1980-2015). Deutsches Kinderkrebsregister. 2016. Updated 29.05.2018. Accessed April 2, 2021. [https://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure\\_downloads/34102/0/17aa97a18ea4a834424f1eb1a46e6ada9829b582/jb2016\\_s.pdf](https://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/34102/0/17aa97a18ea4a834424f1eb1a46e6ada9829b582/jb2016_s.pdf)
9. PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board. PDQ Neuroblastoma Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2002. Updated: December

- 2, 2020. Accessed April 2, 2021. <https://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq>
10. Christmann D. Neuroblastom – Diagnose. Onko Internetportal. Updated April 14, 2020. Accessed April 04, 2021. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/neuroblastom/diagnose.html#:~:text=Bei%20Verdacht%20auf%20ein%20Neuroblastom,im%20Bauchraum%20oder%20im%20Halsbereich.>
11. Pohl A, Erichsen M, Stehr M, et al. Image-defined Risk Factors Correlate with Surgical Radicality and Local Recurrence in Patients with Neuroblastoma: Image-defined Risk Factors korrelieren mit chirurgischer Radikalität und Lokalrezidiven bei Neuroblastom-Patienten. *Klin Padiatr.* 2016;228(3):118-123. doi:10.1055/s-0041-111175.
12. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1988;6(12):1874-1881. doi:10.1200/JCO.1988.6.12.1874.
13. 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.
14. Kremens B, Eggert A. Neuroblastom. In Rübben H, ed. *Uroonkologie*. 5th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009;771-778. Accessed April 4, 2021 [https://link-springer-com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/chapter/10.1007/978-3-642-01382-9\\_30](https://link-springer-com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/chapter/10.1007/978-3-642-01382-9_30)
15. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer.* 1999;86(2):364-372. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19990715)86:2<364:AID-CNCR21>3.3.CO;2-7.
16. Cohn SL, Pearson ADJ, 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.
17. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL, et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):3008-3017. doi:10.1200/JCO.2014.59.4648.

18. Rubie H, Bernardi B de, Gerrard M, et al. Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: Results of the prospective INES 99.1. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):449-455. doi:10.1200/JCO.2010.29.5196.
19. Kohler JA, Rubie H, Castel V, et al. Treatment of children over the age of one year with unresectable localised neuroblastoma without MYCN amplification: Results of the SIOOPEN study. *Eur J Cancer*. 2013;49(17):3671-3679. doi:10.1016/j.ejca.2013.07.002.
20. Ladenstein R, Pötschger U, Pearson ADJ, et al. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOOPEN): An international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017. Apr;18(4):500-514. doi:10.1016/S1470-2045(17)30070-0.
21. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324-1334. doi:10.1056/NEJMoa0911123.
22. DuBois SG, Marachelian A, Fox E, et al. Phase I Study of the Aurora A Kinase Inhibitor Alisertib in Combination With Irinotecan and Temozolomide for Patients With Relapsed or Refractory Neuroblastoma: A NANT (New Approaches to Neuroblastoma Therapy) Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(12):1368-1375. doi:10.1200/JCO.2015.65.4889.
23. Puissant A, Frumm SM, Alexe G, et al. Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discov*. 2013;3(3):308-323. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0418.
24. Saulnier Sholler GL, Gerner EW, Bergendahl G, et al. A Phase I Trial of DFMO Targeting Polyamine Addiction in Patients with Relapsed/Refractory Neuroblastoma. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127246. doi:10.1371/journal.pone.0127246.
25. Gamble LD, Hogarty MD, Liu X, et al. Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma. *Front Oncol*. 2012;2:162. doi:10.3389/fonc.2012.00162.
26. Drilon A, Siena S, Ou S-HI, et al. Safety and Antitumor Activity of the Multi-Targeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib (RXDX-101): Combined

Results from Two Phase 1 Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov.* 2017. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-1237.

27. Modak S, Kushner BH, Basu E, Roberts SS, Cheung N-KV. Combination of bevacizumab, irinotecan, and temozolomide for refractory or relapsed neuroblastoma: Results of a phase II study. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(8):e26448. doi:10.1002/pbc.26448.

28. Kushner BH, Cheung IY, Modak S, Kramer K, Ragupathi G, Cheung N-KV. Phase I trial of a bivalent gangliosides vaccine in combination with beta-glucan for high-risk neuroblastoma in second or later remission. *Clin Cancer Res.* 2014;20(5):1375-1382. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1012.

29. Heczey A, Louis CU. Advances in chimeric antigen receptor immunotherapy for neuroblastoma. *Discov Med.* 2013;16(90):287-294. Accessed April 05, 2021. <https://www.discoverymedicine.com/Andras-Heczey/2013/12/06/advances-in-chimeric-antigen-receptor-immunotherapy-for-neuroblastoma/>

30. Xing L-L, Sha Y-L, Wu Y-M, Hu J-M, Zhang M, Lv F. Preliminary analysis of stem cell-like cells in human neuroblastoma. *World J Pediatr.* 2015;11(1):54-60. doi:10.1007/s12519-014-0529-2.

31. Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol.* 2005;45(8):872-877. doi:10.1177/0091270005276905.

32. Ward RJ, Dirks PB. Cancer stem cells: At the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:175-189. doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.091847.

33. O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, et al. Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett.* 2014;344(2):180-187. doi:10.1016/j.canlet.2013.11.012.

34. Ross RA, Spengler BA. Human neuroblastoma stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(3):241-247. doi:10.1016/j.semcancer.2006.04.006.

35. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(39):14228-14233. doi:10.1073/pnas.0400067101.

36. Mahller YY, Williams JP, Baird WH, et al. Neuroblastoma cell lines contain pluripotent tumor initiating cells that are susceptible to a targeted oncolytic virus. *PLoS ONE*. 2009;4(1):e4235. doi:10.1371/journal.pone.0004235.
37. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*. 2004;6(6):838-845. doi:10.1593/neo.04310.
38. Vangipuram SD, Wang ZJ, Lyman WD. Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(3):361-368. doi:10.1002/pbc.22351.
39. Hansford LM, McKee AE, Zhang L, et al. Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. *Cancer Res*. 2007;67(23):11234-11243. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0718.
40. Ross RA, Spengler BA, Domenech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ*. 1995;6(4):449-456. Accessed April 25, 2021. <http://cgd.aacrjournals.org/cgi/reprint/6/4/449>
41. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183(4):1797-1806. Accessed April 25, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192511/>
42. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999;401(6751):390-394. doi:10.1038/43919.
43. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7(9):1028-1034. doi:10.1038/nm0901-1028.
44. Cao D, Kishida S, Huang P, et al. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One*. 2014;9(1):e86813. doi:10.1371/journal.pone.0086813.



45. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005;23(6):727-737. doi:10.1634/stemcells.2004-0134.
46. Liu Q-X, Tang J-Y, Cai J-Y, Yin M-Z, Li B-S. The cultivation and identification of tumor stem cells from neuroblastoma derived tumor spheres. *Chin J Cancer*. 2010;29(12):1012-1017. doi: 10.5732/cjc.010.10319
47. Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(8):1084-1103. doi:10.1016/j.bcp.2012.01.002.
48. Westover D, Li F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:159. doi:10.1186/s13046-015-0275-x.
49. Porro A, Haber M, Diolaiti D, et al. Direct and coordinate regulation of ATP-binding cassette transporter genes by Myc factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19532-19543. doi:10.1074/jbc.M109.078584.
50. Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):299-313. doi:10.1016/j.stem.2010.08.002.
51. Cui H, Ma J, Ding J, Li T, Alam G, Ding H-F. Bmi-1 Regulates the Differentiation and Clonogenic Self-renewal of I-type Neuroblastoma Cells in a Concentration-dependent Manner. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34696-34704. doi:10.1074/jbc.M604009200.
52. Cui H, Hu B, Li T, et al. Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Am J Pathol*. 2007;170(4):1370-1378. doi:10.2353/ajpath.2007.060754.
53. Nowak K, Kerl K, Fehr D, et al. BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(6):1745-1754. doi:10.1093/nar/gkl119.
54. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, et al. Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene*. 2010;29(18):2681-2690. doi:10.1038/onc.2010.22.

55. Kamijo T. Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatr Res.* 2012;71(4 Pt 2):511-515. doi:10.1038/pr.2011.54.
56. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood.* 1997;90(12):5013-5021. Accessed May 05, 2021. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120549689?via%3Dihub>
57. Corbeil D, Fargeas CA, Huttner WB. Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(4):939-944. doi:10.1006/bbrc.2001.5271.
58. Tabu K, Kimura T, Sasai K, et al. Analysis of an alternative human CD133 promoter reveals the implication of Ras/ERK pathway in tumor stem-like hallmarks. *Mol Cancer.* 2010;9:39. doi:10.1186/1476-4598-9-39.
59. Zhang Q, Zulfiqar F, Xiao X, et al. Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene. *Hum Genet.* 2007;122(3-4):293-299. doi:10.1007/s00439-007-0395-2.
60. Yang Z, Chen Y, Lillo C, et al. Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2908-2916. doi:10.1172/JCI35891.
61. The UniProt Consortium. UniProtKB - O43490 (PROM1\_HUMAN). Updated April 07, 2021. Accessed April 10, 2017. [www.uniprot.org/uniprot/O43490](http://www.uniprot.org/uniprot/O43490).
62. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, et al. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene.* 2011;30(1):97-105. doi:10.1038/onc.2010.383.
63. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;90(12):5002-5012. Accessed May 05, 2021. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120549677?via%3Dihub>
64. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14720-14725. doi:10.1073/pnas.97.26.14720.

65. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-5828. Accessed April 25, 2021 <https://cancerres.aacrjournals.org/content/63/18/5821.full-text.pdf>
66. Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):504-514. doi:10.1038/sj.cdd.4402283.
67. Irollo E, Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res.* 2013;5(6):563-581. Accessed April 25, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3786264/>
68. Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin K-M, Fulda S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2007;67(2):735-745. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2201.
69. Khalil MA, Hrabeta J, Groh T, Prochazka P, Doktorova H, Eckschlager T. Valproic Acid Increases CD133 Positive Cells that Show Low Sensitivity to Cytostatics in Neuroblastoma. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162916. doi:10.1371/journal.pone.0162916.
70. Sartelet H, Imbriglio T, Nyalendo C, et al. CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology.* 2012;60(7):1144-1155. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04191.x.
71. Svennerholm L. Ganglioside designation. In: Svennerholm L., Mandel P., Dreyfus H., Urban PF. eds. Structure and Function of Gangliosides. *Adv Exp Med Biol. vol 125.* Springer, Boston;1980:11. doi: 10.1007/978-1-4684-7844-0\_2.
72. Suzuki M, Cheung N-KV. Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(3):349-362. doi:10.1517/14728222.2014.986459.
73. Yanagisawa M, Yoshimura S, Yu RK. Expression of GD2 and GD3 gangliosides in human embryonic neural stem cells. *ASN Neuro.* 2011;3(2):e00054. doi:10.1042/AN20110006.
74. Jin HJ, Nam HY, Bae YK, et al. GD2 expression is closely associated with neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(11):1845-1858. doi:10.1007/s00018-010-0292-z.

75. Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS One*. 2013;8(5):e64454. doi:10.1371/journal.pone.0064454.
76. Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Mansson JE, Rosengren B, Rynmark BM. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1005(2):109-117. doi:10.1016/0005-2760(89)90175-6.
77. Julien S, Bobowski M, Steenackers A, Le Bourhis X, Delannoy P. How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling? *Cells*. 2013;2(4):751-767. doi:10.3390/cells2040751.
78. Yu Alice L., Gilman Andrew L., Ozkaynak M. Fevzi, et al. Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324-34. doi: 10.1056/NEJMoa0911123.
79. Cheung N-KV, Cheung IY, Kushner BH, et al. Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3264-3270. doi:10.1200/JCO.2011.41.3807.
80. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361-398. doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361.
81. van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, et al. MDR1 P-Glycoprotein Is a Lipid Translocase of Broad Specificity, While MDR3 P-Glycoprotein Specifically Translocates Phosphatidylcholine. *Cell*. 1996;87(3):507-517. doi:10.1016/S0092-8674(00)81370-7.
82. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res*. 2001;11(7):1156-1166. doi:10.1101/gr.184901.
83. Yamamoto A, Shofuda T, Islam MO, et al. ABCB1 is predominantly expressed in human fetal neural stem/progenitor cells at an early development stage. *J Neurosci Res*. 2009;87(12):2615-2623. doi:10.1002/jnr.22094.

84. Lin T, Islam O, Heese K. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis--a different perspective. *Cell Res.* 2006;16(11):857-871. doi:10.1038/sj.cr.7310107.
85. Goldstein LJ, Fojo AT, Ueda K, et al. Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastomas. *J Clin Oncol.* 1990;8(1):128-136. doi:10.1200/JCO.1990.8.1.128.
86. Haber M, Smith J, Bordow SB, et al. Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(10):1546-1553. doi:10.1200/JCO.2005.01.6196.
87. Dhooge CR, Moerloose BMD, Benoit YC, van Roy N, Philipp J, Laureys GG. Expression of the MDR1 gene product P-glycoprotein in childhood neuroblastoma. *Cancer.* 1997;80(7):1250-1257. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19971001)80:7<1250:AID-CNCR8>3.0.CO;2-O.
88. Zheng X, Naiditch J, Czurylo M, et al. Differential effect of long-term drug selection with doxorubicin and vorinostat on neuroblastoma cells with cancer stem cell characteristics. *Cell Death Dis.* 2013;4(7):e740. doi:10.1038/cddis.2013.264.
89. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell.* 2003;113(5):631-642. doi:10.1016/S0092-8674(03)00393-3.
90. Pan GJ, Pei DQ. Identification of two distinct transactivation domains in the pluripotency sustaining factor nanog. *Cell Res.* 2003;13(6):499-502. doi:10.1038/sj.cr.7290193.
91. Wong OGW, Cheung ANY. Stem cell transcription factor NANOG in cancers--is eternal youth a curse? *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(4):407-417. doi:10.1517/14728222.2016.1112791.
92. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-1920. doi:10.1126/science.1151526.
93. Kaneko Y, Suenaga Y, Islam SMR, et al. Functional interplay between MYCN, NCYM, and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas. *Cancer Sci.* 2015;106(7):840-847. doi:10.1111/cas.12677.

94. Tsuchida R, Das B, Yeger H, et al. Cisplatin treatment increases survival and expansion of a highly tumorigenic side-population fraction by upregulating VEGF/Flt1 autocrine signaling. *Oncogene*. 2008;27(28):3923-3934. doi:10.1038/onc.2008.38.
95. Newton TC, Wolcott K, Roberts SS. Comparison of the Side Populations in Pretreatment and Postrelapse Neuroblastoma Cell Lines. *Transl Oncol*. 2010;3(4):246-251. doi:10.1593/tlo.09301.
96. Monajemzadeh M, Soleimani V, Vasei M, Koochakzadeh L, Karbakhsh M. Expression and prognostic significance of Oct4 and Nanog in neuroblastoma. *APMIS*. 2014;122(9):734-741. doi:10.1111/apm.12207.
97. Xiao J, Chen H-S. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol*. 2004;10(13):1849-1853. doi:10.3748/wjg.v10.i13.1849.
98. Yoshikawa K. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res*. 2000;37(1):1-14. doi:10.1016/S0168-0102(00)00101-2.
99. Taniura H, Matsumoto K, Yoshikawa K. Physical and Functional Interactions of Neuronal Growth Suppressor Necdin with p53. *J Biol Chem*. 1999;274(23):16242-16248. doi:10.1074/jbc.274.23.16242.
100. Taniura H, Taniguchi N, Hara M, Yoshikawa K. Necdin, A Postmitotic Neuron-specific Growth Suppressor, Interacts with Viral Transforming Proteins and Cellular Transcription Factor E2F1. *J Biol Chem*. 1998;273(2):720-728. doi:10.1074/jbc.273.2.720.
101. Hasegawa K, Yoshikawa K. Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons. *J Neurosci*. 2008;28(35):8772-8784. doi:10.1523/JNEUROSCI.3052-08.2008.
102. Huang Z, Fujiwara K, Minamide R, Hasegawa K, Yoshikawa K. Necdin controls proliferation and apoptosis of embryonic neural stem cells in an oxygen tension-dependent manner. *J Neurosci*. 2013;33(25):10362-10373. doi:10.1523/JNEUROSCI.5682-12.2013.
103. Daniel G, Schmidt-Edelkraut U, Spengler D, Hoffmann A. Imprinted Zac1 in neural stem cells. *World J Stem Cells*. 2015;7(2):300-314. doi:10.4252/wjsc.v7.i2.300.
104. Minamide R, Fujiwara K, Hasegawa K, Yoshikawa K. Antagonistic interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells

- in the embryonic mouse neocortex. *PLoS One*. 2014;9(1):e84460. doi:10.1371/journal.pone.0084460.
105. Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*. 1985;5(12):3310-3328.
106. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585-595. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90662-x.
107. Cheng L, Jin Z, Liu L, et al. Characterization and promoter analysis of the mouse nestin gene. *FEBS Letters*. 2004;565(1-3):195-202. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.097.
108. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*. 2015;106(7):803-811. doi:10.1111/cas.12691.
109. Thomas SK, Messam CA, Spengler BA, Biedler JL, Ross RA. Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279(27):27994-27999. doi:10.1074/jbc.M312663200.
110. Martinez-Criado Y, Cabello R, Fernandez-Pineda I, et al. Estudio de expresion de marcadores de celulas madre neurales en neuroblastoma y correlacion con factores pronostico. *Cir Pediatr*. 2013;26(3):112-118. Accessed May 05, 2021. [https://scipe.org/coldata/upload/revista/2013\\_26-3\\_112-118.pdf](https://scipe.org/coldata/upload/revista/2013_26-3_112-118.pdf)
111. Korja M, Finne J, Salmi TT, et al. Chromogenic in situ hybridization-detected hotspot MYCN amplification associates with Ki-67 expression and inversely with nestin expression in neuroblastomas. *Mod Pathol*. 2005;18(12):1599-1605. doi:10.1038/modpathol.3800462.
112. Villodre ES, Kipper FC, Pereira MB, Lenz G. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer Treat Rev*. 2016;51:1-9. doi:10.1016/j.ctrv.2016.10.003.
113. Zhao S, Yuan Q, Hao H, et al. Expression of OCT4 pseudogenes in human tumours: lessons from glioma and breast carcinoma. *J Pathol*. 2011;223(5):672-682. doi:10.1002/path.2827.
114. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*. 2014;3(2):74-82. Accessed May 05, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163606/>

115. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
116. Yang L, Zheng J, Xu T, Xiao X. Downregulation of OCT4 promotes differentiation and inhibits growth of BE (2)-C human neuroblastoma I-type cells. *Oncol Rep*. 2013;29(6):2191-2196. doi:10.3892/or.2013.2356.
117. Yang S, Zheng J, Ma Y, et al. Oct4 and Sox2 are overexpressed in human neuroblastoma and inhibited by chemotherapy. *Oncol Rep*. 2012;28(1):186-192. doi:10.3892/or.2012.1765.
118. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*. 2014;6(3):305-311. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.305.
119. Remenyi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Scholer HR, Wilmanns M. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev*. 2003;17(16):2048-2059. doi:10.1101/gad.269303.
120. Bao J, Qin L, Cui L, et al. Microarray data analysis of neuroblastoma: Expression of SOX2 downregulates the expression of MYCN. *Mol Med Rep*. 2015;12(5):6867-6872. doi:10.3892/mmr.2015.4311.
121. Wuebben EL, Rizzino A. The dark side of SOX2: Cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget*. 2017;8(27): 44917-44943. doi:10.18632/oncotarget.16570.
122. Gomez-Mateo MDC, Piqueras M, Pahlman S, Noguera R, Navarro S. Prognostic value of SOX2 expression in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(5):374-377. doi:10.1002/gcc.20859.
123. Yang S, Zheng J, Xiao X, et al. SOX2 promotes tumorigenicity and inhibits the differentiation of I-type neuroblastoma cells. *Int J Oncol*. 2015;46(1):317-323. doi:10.3892/ijo.2014.2713.
124. Pandian V, Ramraj S, Khan FH, Azim T, Aravindan N. Metastatic neuroblastoma cancer stem cells exhibit flexible plasticity and adaptive stemness signaling. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:2. doi:10.1186/s13287-015-0002-8.



125. Hammerle B, Yanez Y, Palanca S, et al. Targeting neuroblastoma stem cells with retinoic acid and proteasome inhibitor. *PLoS One*. 2013;8(10):e76761. doi:10.1371/journal.pone.0076761.
126. Das S, Bryan K, Buckley PG, et al. Modulation of Neuroblastoma Disease Pathogenesis By An Extensive Network of Epigenetically Regulated MicroRNAs. *Oncogene*. 2012;32(24):2927-2936. doi:10.1038/onc.2012.311.
127. Islam SMR, Suenaga Y, Takatori A, et al. Sendai virus-mediated expression of reprogramming factors promotes plasticity of human neuroblastoma cells. *Cancer Sci*. 2015;106(10):1351-1361. doi:10.1111/cas.12746.
128. Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP. The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16076-16082. doi:10.1074/jbc.M100176200.
129. 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.
130. Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 2007;59(12):752-757. doi:10.1080/15216540701736285.
131. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(6):2129-2144. doi:10.7314/APJCP.2015.16.6.2129.
132. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015;14:48. doi:10.1186/s12943-015-0321-5.
133. Li LC, Sheng JR, Mulherkar NN, Prabhakar BS, Meriggioli MN. Regulation of Apoptosis and Caspase-8 Expression in Neuroblastoma Cells by Isoforms of the IG20 Gene. *Cancer Res*. 2008;68(18):7352-7361. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6311.
134. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-288. doi:10.1038/nrc776.

135. Elmore S. Apoptosis A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
136. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2129-2144. doi:10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.
137. Khosravi-Far R, Degli Esposti M. Death Receptor Signals to Mitochondria. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(11):1051-1057. doi: 10.4161/cbt.3.11.1173.
138. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303(5660):1010-1014. doi:10.1126/science.1092734.
139. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997;90(3):405-413. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80501-2
140. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(2):139-163. doi: 10.4161/cbt.4.2.1508.
141. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(3):a026104. doi:10.1101/cshperspect.a026104.
142. Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res.* 2015;75(23):5001-5007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0563.
143. Gillory LA, Stewart JE, Megison ML, Waters AM, Beierle EA. FAK and p53 Synergistically Decrease Neuroblastoma Cell Survival. *J Surg Res.* 2015;196(2):339-349. doi:10.1016/j.jss.2015.03.021.
144. Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J. Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 2001;61(1):8-13. Accessed May 05, 2021. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/61/1/8.long>
145. Moreno-Smith M, Lakoma A, Chen Z, et al. p53 Nongenotoxic Activation and mTORC1 Inhibition Lead to Effective Combination for Neuroblastoma Therapy. *Clin Cancer Res.* 2017;23(21):6629-6639. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0668.

146. El-Deiry WS. p21(WAF1) Mediates Cell-Cycle Inhibition, Relevant to Cancer Suppression and Therapy. *Cancer Res.* 2016;76(18):5189-5191. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2055.
147. Fontana L, Fiori ME, Albini S, et al. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One.* 2008;3(5):e2236. doi:10.1371/journal.pone.0002236.
148. Qiao L, Paul P, Lee S, Qiao J, Wang Y, Chung DH. Differential regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;435(2):295-299. doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.023.
149. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(15):8662-8667. doi:10.1073/pnas.161506698.
150. Wilkinson JC, Wilkinson AS, Galbán S, Csomos RA, Duckett CS. Apoptosis-Inducing Factor Is a Target for Ubiquitination through Interaction with XIAP. *Mol Cell Biol.* 2007;28(1):237-247. doi:10.1128/MCB.01065-07.
151. Tenev T, Bianchi K, Darding M, et al. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell.* 2011;43(3):432-448. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.006.
152. Muthu M, Cheriyan VT, Munie S, et al. Mechanisms of neuroblastoma cell growth inhibition by CARP-1 functional mimetics. *PLoS One.* 2014;9(7):e102567. doi:10.1371/journal.pone.0102567.
153. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem.* 1998;273(18):11177-11182. doi:10.1074/jbc.273.18.11177.
154. Kim W, Ryu J, Kim J-E. CCAR2/DBC1 and Hsp60 Positively Regulate Expression of Survivin in Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1). doi:10.3390/ijms20010131.
155. Wang H, Holloway MP, Ma L, et al. Acetylation directs survivin nuclear localization to repress STAT3 oncogenic activity. *J Biol Chem.* 2010;285(46):36129-36137. doi:10.1074/jbc.M110.152777.
156. Zaatiti H, Abdallah J, Nasr Z, Khazen G, Sandler A, Abou-Antoun TJ. Tumorigenic proteins upregulated in the MYCN-amplified IMR-32 human

neuroblastoma cells promote proliferation and migration. *Int J Oncol*. 2018;52(3):787-803. doi:10.3892/ijo.2018.4236.

157. Michaelis M, Rothweiler F, Barth S, et al. Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells. *Cell Death & Dis*. 2011;2:e243. doi:10.1038/cddis.2011.129.

158. Rothweiler F, Michaelis M, Brauer P, et al. Anticancer Effects of the Nitric Oxide-Modified Saquinavir Derivative Saquinavir-NO against Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Neoplasia*. 2010;12(12):1023-1030. doi: 10.1593/neo.10856.

159. Michaelis M, Rothweiler F, Klassert D, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3. *Cancer Res*. 2009;69(2):416-421. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1856.

160. Prochazka P, Hrabeta J, Vicha A, et al. Changes in MYCN expression in human neuroblastoma cell lines following cisplatin treatment may not be related to MYCN copy numbers. *Oncol Rep*. 2013;29(6):2415-2421. doi:10.3892/or.2013.2383.

161. Voges Y, Michaelis M, Rothweiler F, et al. Effects of YM155 on survivin levels and viability in neuroblastoma cells with acquired drug resistance. *Cell Death Dis*. 2016;7(10):e2410. doi:10.1038/cddis.2016.257.

162. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

163. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82. doi: 10.1006/abbi.1993.1311

164. Flow Cytometry Basics Guide (Full edition — online only). Flow Cytometry Bio-Rad, the place to go for flow. <https://info.bio-rad.com/Flow-Cytometry-Guides-LP.html> Accessed March 1, 2017.

165. Digioseppe JA. Flow Cytometry. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, eds. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. 2nd ed. Humana Press; 2005:163-172. doi: 10.1385/1592599281

166. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
167. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Western-Blot. In Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D, eds. *Der Experimentator: Immunologie*. 4th ed. Berlin: Springer; 2014:133-150. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>.
168. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956;103(5):653-666. doi: 10.1084/jem.103.5.65.
169. Smith MA, Altekruse SF, Adamson PC, Reaman GH, Seibel NL. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer.* 2014;120(16):2497-2506. doi:10.1002/cncr.28748.
170. Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, et al. Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 2001;19(13):3163-3172. doi:10.1200/JCO.2001.19.13.3163.
171. Cotterill SJ, Pearson A, Pritchard J, Kohler JA, Foot A. Late relapse and prognosis for neuroblastoma patients surviving 5 years or more: A report from the European Neuroblastoma Study Group „Survey“. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36(1):235-238. doi:10.1002/1096-911X(20010101)36:1<235:AID-MPO1057>3.0.CO; 2-N.
172. London WB, Castel V, Monclair T, et al. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Onc.* 2011;29(24):3286-3292. doi:10.1200/JCO.2010.34.3392.
173. Lau L, Tai D, Weitzman S, Grant R, Baruchel S, Malkin D. Factors influencing survival in children with recurrent neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26(4):227-232. doi: 10.1097/00043426-200404000-00003
174. Bayat Mokhtari R, Baluch N, Ka Hon Tsui M, et al. Acetazolamide potentiates the anti-tumor potential of HDACi, MS-275, in neuroblastoma. *BMC Cancer.* 2017;17(1):156. doi:10.1186/s12885-017-3126-7.
175. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994;9(6):1799-1805.

176. Megison ML, Gillory LA, Beierle EA. Cell Survival Signaling in Neuroblastoma. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(4):563-575. doi:10.2174/1871520611313040005.
177. Obexer P, Ausserlechner MJ. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein – A Critical Death Resistance Regulator and Therapeutic Target for Personalized Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2014;4:197. doi:10.3389/fonc.2014.00197.
178. Eschenburg G, Eggert A, Schramm A, Lode HN, Hundsdoerfer P. Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF- $\alpha$ -independent apoptosis. *Cancer Res*. 2012;72(10):2645-2656. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4072.
179. Crowley LC, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(8):721-724 doi:10.1101/pdb.prot087171.

## 10 Anhang

### Tabellen mit Messwerte der Durchflusszytometrie

#### BCRP. ATP-binding cassette super-family G member 2.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit BCRP in Prozent	Sublinien	RFU
UKF-NB-3	0,00 ± 0,00	UKF-NB-3	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP I	1,93 ± 1,22	NB-3r CDDP I	37,33 ± 8,62
NB-3r CDDP II	1,60 ± 1,18	NB-3r CDDP II	33,67 ± 12,34
NB-3r CDDP III	0,10 ± 0,10	NB-3r CDDP III	18,67 ± 17,62
NB-3r CDDP IV	0,12 ± 0,06	NB-3r CDDP IV	12,17 ± 3, 51
NB-3r CDDP V	0,00 ± 0,30	NB-3r CDDP V	15,17 ± 6,11
NB-3r CDDP VI	0,00 ± 0,00	NB-3r CDDP VI	2,50 ± 4,33
NB-3r CDDP VII	0,00 ± 0,00	NB-3r CDDP VII	3,83 ± 6,66
NB-3r CDDP VIII	0,37 ± 0,47	NB-3r CDDP VIII	12,67 ± 11,86
NB-3r CDDP IX	0,00 ± 0,00	NB-3r CDDP IX	6,67 ± 2,52
NB-3r CDDP X	0,55 ± 0,07	NB-3r CDDP X	46,67 ± 79,10
NB-3r CDDP XI	0,00 ± 0,00	NB-3r CDDP XI	2,00 ± 2,65
NB-3r CDDP XII	0,00 ± 0,00	NB-3r CDDP XII	6,67 ± 6,75
NB-3 BCRP	93,96 ± 0,20	NB-3 BCRP	3753,5 ± 564,49

**Tabelle 23.** Expression von BCRP am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

**Tabelle 24.** Expression von BCRP am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

#### BMI-1. Polycomb complex protein BMI-1.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit BMI-1 in Prozent	Sublinien	RFU
UKF-NB-3	0,00 ± 0,00	UKF-NB-3	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP I	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP I	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP II	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP II	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP III	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP III	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP IV	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP IV	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP V	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP V	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP VI	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP VI	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP VII	0,07 ± 0,12	NB3r CDDP VII	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP VIII	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP VIII	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP IX	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP IX	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP X	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP X	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP XI	0,00 ± 0,00	NB3r CDDP XI	0,00 ± 0,00
NB-3r CDDP XII	1,37 ± 2,28	NB3r CDDP XII	12,00 ± 20,78

**Tabelle 25.** Expression von BMI-1 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

**Tabelle 26.** Expression von BMI-1 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## CD-133. Prominin-1.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit CD133 in Prozent
UKF-NB-3	0,12 ± 0,06
NB3r CDDP I	81,70 ± 3,21
NB3r CDDP II	15,97 ± 5,43
NB3r CDDP III	5,57 ± 0,42
NB3r CDDP IV	28,12 ± 1,50
NB3r CDDP V	10,20 ± 0,95
NB3r CDDP VI	0,03 ± 0,35
NB3r CDDP VII	26,00 ± 1,15
NB3r CDDP VIII	6,00 ± 1,31
NB3r CDDP IX	4,08 ± 0,49
NB3r CDDP X	4,45 ± 18,10
NB3r CDDP XI	20,02 ± 0,64
NB3r CDDP XII	1,17 ± 0,15

**Tabelle 27.** Expression von CD133 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	0 ± 10,1
NB3r CDDP I	1335,3 ± 258,2
NB3r CDDP II	198,0 ± 11,5
NB3r CDDP III	42,2 ± 23,7
NB3r CDDP IV	272 ± 69,4
NB3r CDDP V	95,5 ± 29,5
NB3r CDDP VI	26 ± 28
NB3r CDDP VII	236,2 ± 9,3
NB3r CDDP VIII	56,5 ± 7,5
NB3r CDDP IX	38,5 ± 33,9
NB3r CDDP X	20,5 ± 130,8
NB3r CDDP XI	189,3 ± 5,03
NB3r CDDP XII	0 ± 84,1

**Tabelle 28.** Expression von CD133 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## GD2. Ganglioside G2.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit GD2 in Prozent
UKF-NB-3	33,27 ± 2,48
NB3r CDDP I	6,50 ± 0,61
NB3r CDDP II	0,95 ± 0,69
NB3r CDDP III	0,13 ± 0,15
NB3r CDDP IV	0,70 ± 1,04
NB3r CDDP V	0,22 ± 0,15
NB3r CDDP VI	0,17 ± 0,25
NB3r CDDP VII	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP VIII	1,05 ± 0,79
NB3r CDDP IX	2,08 ± 1,88
NB3r CDDP X	3,43 ± 5,19
NB3r CDDP XI	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP XII	0,02 ± 0,03

**Tabelle 29.** Expression von GD2 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	1436,33 ± 127,22
NB3r CDDP I	271,67 ± 37,75
NB3r CDDP II	163,17 ± 42,10
NB3r CDDP III	100,67 ± 80,16
NB3r CDDP IV	78,67 ± 44,38
NB3r CDDP V	72,50 ± 4,58
NB3r CDDP VI	92,83 ± 16,26
NB3r CDDP VII	30,83 ± 13,43
NB3r CDDP VIII	90,00 ± 21,93
NB3r CDDP IX	118,67 ± 39,51
NB3r CDDP X	56,00 ± 13,44
NB3r CDDP XI	53,67 ± 35,47
NB3r CDDP XII	54,50 ± 28,99

**Tabelle 30.** Expression von GD2 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).



## MDR-1/ ABCB1. Multidrug-Resistance-Protein 1.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit MDR-1 in Prozent
UKF-NB-3	0,17 ± 0,15
NB3r CDDP I	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP II	0,83 ± 0,49
NB3r CDDP III	0,50 ± 0,50
NB3r CDDP IV	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP V	0,47 ± 0,38
NB3r CDDP VI	0,70 ± 0,20
NB3r CDDP VII	0,28 ± 0,06
NB3r CDDP VIII	0,13 ± 0,15
NB3r CDDP IX	0,12 ± 0,12
NB3r CDDP X	2,10 ± 0,56
NB3r CDDP XI	0,4 ± 0,1
NB3r CDDP XII	0,23 ± 0,25
NB3r MDR 1	90,95 ± 4,24

**Tabelle 31.** Expression von MDR-1 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP I	36,00 ± 62,35
NB3r CDDP II	6,67 ± 11,55
NB3r CDDP III	14,83 ± 25,69
NB3r CDDP IV	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP V	10,67 ± 6,51
NB3r CDDP VI	19,33 ± 28,45
NB3r CDDP VII	19,67 ± 32,77
NB3r CDDP VIII	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP IX	0,00 ± 0,00
NB3r CDDP X	35,50 ± 4,95
NB3r CDDP XI	2,50 ± 4,33
NB3r CDDP XII	1,00 ± 1,73
NB3r MDR1	575,50 ± 33,05

**Tabelle 32.** Expression von MDR-1 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## Nanog.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit Nanog in Prozent
UKF-NB-3	1,93 ± 1,20
NB3r CDDP I	11,45 ± 7,47
NB3r CDDP II	47,63 ± 11,15
NB3r CDDP III	24,15 ± 4,25
NB3r CDDP IV	12,25 ± 2,90
NB3r CDDP V	20,70 ± 6,78
NB3r CDDP VI	25,33 ± 14,21
NB3r CDDP VII	10,05 ± 5,11
NB3r CDDP VIII	30,85 ± 5,59
NB3r CDDP IX	8,08 ± 4,65
NB3r CDDP X	36,28 ± 11,25
NB3r CDDP XI	2,15 ± 0,42
NB3r CDDP XII	13,25 ± 3,76

**Tabelle 33.** Expression von Nanog am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	118,2 ± 56,3
NB3r CDDP I	261,2 ± 93,2
NB3r CDDP II	1116,5 ± 173,4
NB3r CDDP III	506,2 ± 108,1
NB3r CDDP IV	271,5 ± 74,2
NB3r CDDP V	454,8 ± 88,7
NB3r CDDP VI	1089,0 ± 445,5
NB3r CDDP VII	238,5 ± 118,0
NB3r CDDP VIII	817,5 ± 234,8
NB3r CDDP IX	194,2 ± 119,6
NB3r CDDP X	854,0 ± 248,0
NB3r CDDP XI	134,5 ± 0,0
NB3r CDDP XII	338,5 ± 54,5

**Tabelle 34.** Expression von Nanog am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## Necdin.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit Necdin in Prozent
UKF-NB-3	51,03 ± 10,11
NB3r CDDP I	89,15 ± 0,00
NB3r CDDP II	40,93 ± 6,35
NB3r CDDP III	30,03 ± 3,52
NB3r CDDP IV	29,67 ± 10,45
NB3r CDDP V	33,67 ± 4,92
NB3r CDDP VI	62,83 ± 9,47
NB3r CDDP VII	35,38 ± 30,34
NB3r CDDP VIII	39,73 ± 7,23
NB3r CDDP IX	61,25 ± 7,63
NB3r CDDP X	62,23 ± 12,34
NB3r CDDP XI	35,60 ± 14,12
NB3r CDDP XII	40,28 ± 5,41

**Tabelle 35.** Expression von Necdin am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	940,17 ± 151,66
NB3r CDDP I	2698,50 ± 57,98
NB3r CDDP II	883,33 ± 88,71
NB3r CDDP III	737,83 ± 39,55
NB3r CDDP IV	705,83 ± 166,66
NB3r CDDP V	815,83 ± 67,72
NB3r CDDP VI	1215,00 ± 158,38
NB3r CDDP VII	527,50 ± 155,56
NB3r CDDP VIII	886,67 ± 120,96
NB3r CDDP IX	1195,50 ± 158,50
NB3r CDDP X	1210,00 ± 255,68
NB3r CDDP XI	864,00 ± 287,56
NB3r CDDP XII	864,67 ± 85,45

**Tabelle 36.** Expression von Necdin am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## Nestin.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit Nestin in Prozent
UKF-NB-3	33,37 ± 4,47
NB3r CDDP I	90,75 ± 0,75
NB3r CDDP II	80,43 ± 2,20
NB3r CDDP III	73,00 ± 2,23
NB3r CDDP IV	65,35 ± 10,16
NB3r CDDP V	64,25 ± 7,22
NB3r CDDP VI	91,42 ± 6,24
NB3r CDDP VII	64,27 ± 3,33
NB3r CDDP VIII	72,20 ± 2,25
NB3r CDDP IX	81,68 ± 0,55
NB3r CDDP X	94,27 ± 3,69
NB3r CDDP XI	61,63 ± 2,82
NB3r CDDP XII	69,65 ± 7,55

**Tabelle 37.** Expression von Nestin am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	503,50 ± 90,42
NB3r CDDP I	5807,17 ± 656,05
NB3r CDDP II	3966,67 ± 30,02
NB3r CDDP III	3143,50 ± 578,96
NB3r CDDP IV	1929,83 ± 593,24
NB3r CDDP V	2029,50 ± 343,91
NB3r CDDP VI	5351,33 ± 920,03
NB3r CDDP VII	2278,50 ± 334,66
NB3r CDDP VIII	2215,50 ± 243,99
NB3r CDDP IX	2240,83 ± 168,53
NB3r CDDP X	7223,67 ± 1888,49
NB3r CDDP XI	1449,17 ± 257,42
NB3r CDDP XII	1949,50 ± 266,82

**Tabelle 38.** Expression von Nestin am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## Oct-4. Octamer binding transcription factor 4.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit OCT-4 in Prozent
UKF-NB-3	11,43 ± 9,01
NB3r CDDP I	16,20 ± 9,10
NB3r CDDP II	17,75 ± 11,71
NB3r CDDP III	23,02 ± 6,21
NB3r CDDP IV	2,30 ± 2,07
NB3r CDDP V	8,30 ± 8,66
NB3r CDDP VI	38,35 ± 15,84
NB3r CDDP VII	14,00 ± 0,75
NB3r CDDP VIII	8,73 ± 2,99
NB3r CDDP IX	5,55 ± 7,07
NB3r CDDP X	37,63 ± 4,18
NB3r CDDP XI	15,95 ± 2,36
NB3r CDDP XII	1,23 ± 2,14

**Tabelle 39.** Expression von OCT-4 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	44,67 ± 61,26
NB3r CDDP I	72,00 ± 58,51
NB3r CDDP II	191,33 ± 138,40
NB3r CDDP III	248,33 ± 7,09
NB3r CDDP IV	19,67 ± 12,06
NB3r CDDP V	84,33 ± 73,28
NB3r CDDP VI	467,67 ± 177,27
NB3r CDDP VII	132,83 ± 22,81
NB3r CDDP VIII	56,67 ± 32,25
NB3r CDDP IX	54,67 ± 64,63
NB3r CDDP X	649,33 ± 181,95
NB3r CDDP XI	124,67 ± 38,00
NB3r CDDP XII	25,50 ± 44,17

**Tabelle 40.** Expression von OCT-4 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## Sox-2. Sex determining region Y box 2.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit SOX-2 in Prozent
UKF-NB-3	15,42 ± 4,52
NB3r CDDP I	40,47 ± 11,80
NB3r CDDP II	22,45 ± 1,45
NB3r CDDP III	22,38 ± 11,74
NB3r CDDP IV	31,63 ± 17,11
NB3r CDDP V	11,32 ± 7,23
NB3r CDDP VI	40,92 ± 17,85
NB3r CDDP VII	62,57 ± 10,19
NB3r CDDP VIII	29,12 ± 1,63
NB3r CDDP IX	27,35 ± 6,05
NB3r CDDP X	9,67 ± 12,18
NB3r CDDP XI	11,13 ± 5,92
NB3r CDDP XII	11,90 ± 8,52

**Tabelle 41.** Expression von SOX-2 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	307,67 ± 72,71
NB3r CDDP I	1184,00 ± 809,84
NB3r CDDP II	866,67 ± 248,39
NB3r CDDP III	777,67 ± 335,29
NB3r CDDP IV	869,00 ± 483,43
NB3r CDDP V	492,17 ± 389,79
NB3r CDDP VI	1130,67 ± 421,67
NB3r CDDP VII	1643,33 ± 223,03
NB3r CDDP VIII	697,17 ± 102,28
NB3r CDDP IX	600,17 ± 208,50
NB3r CDDP X	799,67 ± 224,13
NB3r CDDP XI	335,00 ± 207,30
NB3r CDDP XII	338,33 ± 246,07

**Tabelle 42.** Expression von SOX-2 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## MRP-1. Multidrug resistance-associated protein 1.

Sublinien	Anteil gefärbter Zellen mit MRP-1 (ABCC1) in Prozent
UKF-NB-3	69,58 ± 5,57
NB3r CDDP I	80,18 ± 2,12
NB3r CDDP II	73,90 ± 3,70
NB3r CDDP III	60,18 ± 4,85
NB3r CDDP IV	68,82 ± 2,20
NB3r CDDP V	61,45 ± 5,07
NB3r CDDP VI	68,25 ± 4,31
NB3r CDDP VII	79,47 ± 9,45
NB3r CDDP VIII	73,13 ± 4,53
NB3r CDDP IX	54,72 ± 6,93
NB3r CDDP X	73,32 ± 1,37
NB3r CDDP XI	73,07 ± 3,20
NB3r CDDP XII	82,38 ± 1,53

**Tabelle 43.** Expression von MRP-1 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Prozent.

Sublinien	RFU
UKF-NB-3	350,67 ± 77,69
NB3r CDDP I	512,50 ± 43,86
NB3r CDDP II	350,83 ± 34,53
NB3r CDDP III	242,33 ± 28,36
NB3r CDDP IV	271,83 ± 20,74
NB3r CDDP V	243,83 ± 36,53
NB3r CDDP VI	294,00 ± 48,38
NB3r CDDP VII	341,50 ± 70,00
NB3r CDDP VIII	351,17 ± 37,82
NB3r CDDP IX	190,17 ± 32,53
NB3r CDDP X	319,83 ± 35,35
NB3r CDDP XI	284,50 ± 31,51
NB3r CDDP XII	370,33 ± 25,54

**Tabelle 44.** Expression von MRP-1 am Durchflusszytometer. Darstellung der Messwerte als Mittelwert ± Standardabweichung (aus Dreifachansatz). Zahlenangaben in Relative Fluorescence Unit (RFU).

## Schriftliche Erklärung

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

In vitro Charakterisierung von Cisplatin-resistenten Neuroblastom-Sublinien

am Zentrum der Hygiene im 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