Aus dem Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Leiter: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

*In-vitro*-Untersuchungen zur Wirkung von Cisplatin, einem Checkpoint-Kinase-Inhibitor und Olaparib auf Neuroblastomzellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation sowie ihre Wirkung auf hippocampale Rattenneurone

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Dennis Jansen 2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als Inauguraldissertation gedruckt

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

# Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist für 15% aller onkologischen Todesfälle im Kindesalter verantwortlich und zählt zum häufigsten extrakraniellen Tumor bei <15-jährigen 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten. Die Patienten mit metastasiertem Neuroblastom ist mit etwa 50 % noch immer sehr ungünstig. Das Medikament Cisplatin wird als Teil der Induktionschemotherapie für Patienten der Hochrisikogruppe des Neuroblastoms eingesetzt. Die Nebenwirkungen von Cisplatin sind zahlreich. Es wirkt häufig nephrotoxisch, neurotoxisch und ototoxisch, insbesondere bei jungen Patienten, die an einem Neuroblastom erkranken. Das Ziel dieser Forschungsarbeit besteht darin, die Auswirkungen von drei Chemotherapeutika, dem Cisplatin, dem CHK1-Inhibitior LY2603618 (Rabusertib) und dem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza), auf die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y zu erfassen und zu untersuchen, ob die jeweilige Kombinationsbehandlung die Sensibilität der Neuroblastomzellen *in-vitro* auf eine Cisplatin-Therapie erhöhen kann.

In dieser Arbeit konnte eine Zytotoxizität dieser drei Chemotherapeutika auf Neuroblastomzellen ermittelt werden. Die *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Neuroblastomzellen zeigen für diese drei Chemotherapeutika eine höhere Sensibilität im Vergleich zu den nicht MYCN-amplifizierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. Zudem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Cisplatin in IMR-32-Neuroblastomzellen Zellzyklusarreste in der G1- und S-Phase induziert und in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y eine dosisabhängige Apoptose verursacht. Des Weiteren konnte darauf hingewiesen werden, dass eine Kombinationsbehandlung aus LY2603618 und Cisplatin die IMR-32-Neuroblastomzellen für Cisplatin nicht sensibilisiert. Die Versuche unter Verwendung hippocampaler Neurone ergeben den Hinweis, dass LY2603618 sowie auch Cisplatin in der Einzelbehandlung neurotoxisch wirkt. Die Neurotoxizität einer Kombinationsbehandlung aus LY2603618 und Cisplatin scheint bei hippocampalen Neuronen nicht höher zu sein als im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin. Die Kombination aus Olaparib und Cisplatin weist in IMR-32-Neuroblastomzellen auf einen additiven oder synergistischen zytotoxischen Effekt hin. Eine Neurotoxizität von Olaparib konnte nicht sicher ausgeschlossen werden.

Es konnte in dieser Arbeit der Hypothese, dass die CHK1-Inhibition oder die PARP-Inhibition die Sensibilität der Neuroblastomzellen auf eine Cisplatin-Therapie erhöhen kann, bei der CHK1-Inhibition für die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien nicht bestätigt werden. Diese Hypothese konnte bei der PARP-Inhibition für die IMR-32-

L

Neuroblastomzellen bestätigt werden und für die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nicht bestätigt werden.

# Summary

Neuroblastoma accounts for 15% of all childhood oncologic deaths and is the most common extracranial tumor in < 15-year-old patients. The 5-year survival rate of patients with metastatic neuroblastoma is still very unfavorable at approximately 50%. The drug cisplatin is used as part of induction chemotherapy for patients in the high-risk neuroblastoma group. The side effects of cisplatin are numerous. It often has nephrotoxic, neurotoxic, and ototoxic effects, especially in young patients who develop neuroblastoma. The aim of this research is to assess the effects of three chemotherapeutic agents, cisplatin, the CHK1 inhibitor LY2603618 (*rabusertib*), and the PARP inhibitor olaparib (*Lynparza*), on the tumor cells of neuroblastoma cell lines IMR-32 and SH-SY5Y, and to investigate whether the respective combination treatment can increase the sensitivity of neuroblastoma cells to cisplatin therapy *in vitro*.

In this work, cytotoxicity of these three chemotherapeutic agents on neuroblastoma cells was determined. *MYCN*-amplified IMR-32 neuroblastoma cells showed higher sensitivity to these three chemotherapeutic agents compared with non-*MYCN*-amplified SH-SY5Y neuroblastoma cells. In addition, the results indicate that cisplatin induces cell cycle arrest in G<sub>1</sub> and S phase in IMR-32 neuroblastoma cells and causes dose-dependent apoptosis in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line. Furthermore, it was indicated that combination treatment of LY2603618 and cisplatin did not sensitize IMR-32 neuroblastoma cells to cisplatin. Experiments using hippocampal neurons provide evidence that LY2603618, as well as cisplatin, is neurotoxic in single treatment. The neurotoxicity of combination treatment of LY2603618 and cisplatin does not appear to be higher in hippocampal neurons compared with single treatment with cisplatin. The combination of olaparib and cisplatin indicates an additive or synergistic cytotoxic effect in IMR-32 neuroblastoma cells. Neurotoxicity of olaparib could not be excluded with certainty.

It was not possible in this work to confirm the hypothesis that CHK1 inhibition or PARP inhibition may increase the sensitivity of neuroblastoma cells to cisplatin therapy in the case of CHK1 inhibition for tumor cells of both neuroblastoma cell lines. This hypothesis could be confirmed for PARP inhibition for the IMR-32 neuroblastoma cells and could not be confirmed for the SH-SY5Y neuroblastoma cells.

# Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	volume-volume percentage; Volumenprozent
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Akt kinase
AML	akute myeloische Leukämie
ALDH18A1	aldehyde dehydrogenase 18 family member A1
ALK	ALK receptor tyrosine kinase; anaplastische Lymphom-Kinase
ANOVA	analysis of variance; Varianzanalyse
ApG	Adenin-Guanin
АТМ	<i>ATM serine/threonine kinase, Ataxia Telangiectasia Mutated;</i> Serin/Threonin-Proteinkinase
ATR	ATR serine/threonine kinase, Ataxia telangiectasia and Rad3 related, Serin/Threonin-Proteinkinase
ATRX	ATRX chromatin remodeler
BAX	BCL2 associated X
BCL2	BCL2 apoptosis regulator; B-cell lymphoma 2
BET	bromodomain family member proteins (BET-Proteine)
β-NAD⁺	Beta-Nicotinamidadenindinukleotids
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
BRCA1	BRCA1 DNA repair associated; breast cancer associated gene 1
BRCA2	BRCA2 DNA repair associated; breast cancer associated gene 2
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CCNE1	cyclin E1
CDC25A	cell division cycle 25 A; Phosphatase
CDK	cyclin-dependent kinase; Cyclinabhängige Kinasen
CDK1	cyclin-dependent kinase 1
CDK2	cyclin-dependent kinase 2
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A, p21 <sup>cip</sup>
CHK1	checkpoint kinase 1; Checkpoint-Kinase 1
CHK2	checkpoint kinase 2; Checkpoint-Kinase 2
CIP/KIP	cyclin inhibitor protein/kinase inhibitor protein
CisPt	Cisplatin ( <i>cis</i> -Diammindichloridoplatin(II))
CKI	spezifische CDK-Inhibitoren
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COG	Children´s Oncology Group
СТ	Computertomografie
CTR1	high-affinity Cu transporter CTR1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA damage response; DNA-Schadensantwort

Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dimethylsulfoxid
deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
Desoxyribonukleinsäure
Desoxyribonuklease
double strand breaks; Doppelstrangbruch
E2F transcription factor 1
Ethylendiamintetraacetat
5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
European Medicines Agency; Europäische Arzneimittelagentur
Fluorescence-Activated Cell Sorting; fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
Fas cell surface death receptor
F-box and WD-40 domain-containing protein 7
fetal calf serum; fetales Kälberserum
<i>gap-0-Phase</i> ; Ruhephase des Zellzyklus
gap-1-Phase; postmitotische Phase des Zellzyklus
gap-2-Phase; prämitotische Phase des Zellzyklus
Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Disialogangliosid 2
Glial fibrillary acidic protein; gliales fibrilläres Protein
Glomeruläre Filtrationsrate
Guanin-Guanin
glycogen synthase kinase 3 beta
Guanosintriphosphat-bindendes Protein
H2A.X variant histone
Salzsäure
histone deacetylase 8
humane Leukozyten Antigene
high mobility group AT-hook 1
heat-shock protein
HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
Inhibitory-Concentration-50 %; inhibitorische Konzentration 50 %
Inhibitory-Concentration-80 %; inhibitorische Konzentration 80 %
image defined risk factor
inhibitor of kinase 4
International Neuroblastoma Staging System
International Neuroblastoma Pathology Classification
International Neuroblastoma Risk Group Staging System
Kaliumchlorid
Kaliumdihydrogenphosphat
Ku80 family protein
Laktatdehydrogenase
lin-28 homolog B

LK	Lymphknoten				
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus				
MAP2	microtubule associated protein 2; Mikrotubuli assoziiertes Protein 2				
MAPK	mitogen-activated protein kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase				
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint 1				
MDM2	mouse double minute 2 protein				
MDS	Myelodysplastisches Syndrom				
MIAT	myocardial infarction associated transcript				
MKI	Mitose- <i>Karyorrhexis</i> -Index				
MMEJ	microhomology-mediated end joining				
MMR	DNA mismatch repair; Mismatch-Reparatur				
MRE11	homolog, double strand break repair nuclease				
MRT	Magnetresonanztomografie				
MTOR	mechanistic target of rapamycin kinase				
MYC	MYC proto-oncogene; myelocytomatosis oncogene				
MYCN	MYCN proto-oncogene				
n	Anzahl der unabhängigen Versuche				
Ν	Anzahl der technischen Replikate pro Versuch				
$Na_2HPO_4$	Dinatriumhydrogenphosphat				
NaCl	Natriumchlorid				
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid				
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat				
NaOH	Natriumhydroxid				
NBS1	Mre11 complex subunit Nbs1				
NCYM	MYCN opposite strand; MYCNOS				
NGS	next-generation sequencing				
NHEJ	non-homologous end joining				
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog; rat sarcoma (Ras)				
NSCLC	non-small-cell lung cancer; nicht kleinzelliges Lungenkarzinom				
NUMB	NUMB endocytic adaptor protein				
OCT2	organic cation/carnitine transporter 2				
OCT4	POU class 5 homeobox 1				
p-	phospho-				
p53	Tumorsuppressorprotein				
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase				
PBS	phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung				
PBST	PBS mit 0,3 % Triton X-100				
PCNA	proliferating cell nuclear antigen				
PI	Propidiumiodid				
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase				
POLQ	DNA polymerase theta				
Pt	Platin				
PTPN11	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11				
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis				

RAD50	RAD50 double strand break repair protein
RAD51	RAD recombinase
RB1	RB transcriptional corepressor 1, pRB (Retinoblastomprotein)
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
ROS	reactive oxygen species; reaktive Sauerstoffspezies
RPA	replication protein A
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SESN1	sestrin 1
SHH	sonic hedgehog signaling molecule
SLC47A2	solute carrier family 47 member 2, MATE-2K (Multidrug And Toxin Extrusion-type transporter-2 Kidney)
sol.	solution
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSA	single strand annealing
SSB	single strand breaks; Einzelstrangbrüche
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i> ; Telomerase-Reverse- Transkriptase-Gen
TGFβ	transforming growth factor beta
TP53	tumor protein p53
TP53BP1	tumor protein p53 binding protein 1
TRAILR2	TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-receptor-2
TRIM32	tripartite motif containing 32
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
VOD	veno-occlusive disease (Lebervenenverschlusskrankheit)
VS.	versus
WEE1	Wee 1 kinase
WNT	Wnt family member, wingless
XRCC1	X-ray repair cross complementing 1
YM155	Sepantroniumbromid
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

ZusammenfassungI				
SummaryII				
At	okürzung	jsverzeichnisIII		
At	bildung	sverzeichnisIX		
Та	bellenve	rzeichnisXI		
1.		Einleitung1		
	1.1.	Neuroblastom1		
	1.2.	Einteilung des Neuroblastoms2		
	1.3.	Prognose des Neuroblastoms5		
	1.4.	Stratifizierung des Neuroblastoms		
	1.5.	Therapie des Neuroblastoms10		
	1.6.	Der Zellzyklus15		
	1.7.	Die Bedeutung der Zellzykluskontrolle16		
	1.8.	Signalweg von MYCN und seine Bedeutung für das Neuroblastom18		
	1.9.	Die Rolle von CHK1 in der DNS-Schadensantwort19		
	1.10.	Die Bedeutung der PARP-Inhibition in Neuroblastomzellen23		
	1.11.	Wirkweise und Stellenwert von Cisplatin in der Therapie des Neuroblastoms		
	1.12.	Cisplatin-bedingte unerwünschte Arzneimittelreaktionen		
	1.13.	Cisplatin-bedingte Neurotoxizität		
	1.14.	Zielsetzung der Arbeit		
2.		Material und Methoden32		
	2.1.	Materialien32		
	2.2.	Kultivierung der Neuroblastomzelllinien		
	2.3.	Präparation primärer Zellen (hippocampale Neurone) aus Rattenembryonen40		
	2.4.	Kultivierung der primären Zellen (hippocampale Neurone)40		
	2.5.	Alamar Blue Assay41		
	2.6.	Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung43		
	2.7.	Immunzytochemische Bestimmung der Zellausbeute der primären Zellen (hippocampale Neurone)45		
	2.8.	Statistische Auswertung46		
3.		Ergebnisse48		
	3.1.	Wachstumsverhalten der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y48		
	3.2.	Isolation und Identifizierung von primären Zellen (hippocampale Neurone) aus Rattenembryonen51		

	3.3.	Cisplatin induziert eine dosis- und teilweise behandlungsdauerabhängige Reduktion der Zellviabilität in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH SY5Y	e <del>1</del> - .54
	3.4.	Cisplatin induziert einen Arrest in der G1-Phase und S-Phase bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 sowie eine dosisabhängige Apoptose in de Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y	ər .61
	3.5.	Cisplatin induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in der primären Zellen (hippocampale Neurone)	n .64
	3.6.	CHK1-Inhibitor LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> ) induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH SY5Y	<del> </del> - .66
	3.7.	CHK1-Inhibitor LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> ) induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in den primären Zellen (hippocampale Neuro	ne) .70
	3.8.	CHK1-Inhibition kann die Neuroblastomzelllinie IMR-32 und die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für Cisplatin nicht sensibilisieren	.72
	3.9.	CHK1-Inhibition sensibilisiert primäre Zellen (hippocampale Neurone) für Cisplatin nicht	r .78
	3.10.	PARP-Inhibitor Olaparib ( <i>Lynparza</i> ) induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH SY5Y	<del> </del> - .82
	3.11.	PARP-Inhibitor Olaparib ( <i>Lynparza</i> ) führte zu keinem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in den primären Zellen (hippocampale Neurone)	.87
	3.12.	PARP-Inhibition kann die Neuroblastomzelllinie IMR-32 im Gegensatz zu Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für Cisplatin sensibilisieren	ır .89
	3.13.	Eine durch PARP-Inhibition induzierte Sensibilisierung hippocampaler Neurone gegenüber einer Cisplatin-Behandlung kann nicht sicher ausgeschlossen werden	.95
4.		Diskussion	.99
	4.1.	Wachstumsverhalten der Neuroblastomzellen	.99
	4.2.	Interpretation der Auswirkungen von Cisplatin auf Neuroblastomzellen1	00
	4.3.	Interpretation der Auswirkungen der CHK1-Inhibition und der Auswirkungen auf Neuroblastomzellen in Bezug zur Kombination mit Cisplatin1	108
	4.4.	Interpretation der Auswirkungen der PARP-Inhibition sowie der Auswirkungen auf Neuroblastomzellen in Bezug zur Kombination mit Cisplatin1	115
	4.5.	Interpretation der Auswirkungen der verwendeten Chemotherapeutika au primäre Zellen (hippocampale Neurone)1	uf 121
Lit	teraturve	erzeichnis1	27
5.		Anhang1	40

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1	Übersicht der Zellzyklusphasen	16
Abbildung	2	Übersicht der DNS-Schadensantwort	23
Abbildung	3	Reduktion des Resazurins in Resorufin	42
Abbildung	4	Wachstumsverhalten der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH- SY5Y	50
Abbildung	5	Kultivierung primärer Zellen (hippocampale Neurone) aus 18 Tage alten Rattenembryonen	52
Abbildung	6	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung primärer Zellen (hippocampale Neurone) und Gliazellen nach Verwendung der entsprechenden Primärantikörper	53
Abbildung	7	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR- 32 und SH-SY5Y nach Behandlung mit Cisplatin	56
Abbildung	8	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin	58
Abbildung	9	Analyse der Zellzyklusverteilung der Neuroblastomzelllinien IMR- 32 und SH-SY5Y mittels Durchflusszytometrie nach einer 24 h Behandlung mit Cisplatin	63
Abbildung	10	Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Cisplatin	65
Abbildung	11	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Cisplatin	66
Abbildung	12	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR- 32 und SH-SY5Y nach Behandlung mit Checkpoint-Kinase- Inhibitor LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> )	68
Abbildung	13	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> )	69
Abbildung	14	Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Checkpoint- Kinase-Inhibitor LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> )	71
Abbildung	15	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY 2603618 ( <i>Rabusertib</i> ).	72
Abbildung	16	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR- 32 und SH-SY5Y nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des Checkpoint-Kinase-Inhibitors	
Abbildung	17	LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> ) und Cisplatin Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Finzel- und Kombinationsbehandlungen mit Checkpoint-Kinase-	76
Abbilduna	18	Inhibitor LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> ) und Cisplatin	78
	10	(hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des Checkpoint-Kinase-Inhibitors LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> ) und Cisplatin	80
Abbildung	19	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY2603618 ( <i>Rabusertib</i> ) und Cisplatin.	81

Abbildung 20	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR- 32 und SH-SY5Y nach Behandlung mit PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza)	83
Abbildung 21	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit PARP-Inhibitor Olaparib ( <i>Lynparza</i> )	85
Abbildung 22	Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit dem PARP- Inhibitor Olaparib (Lynparza)	87
Abbildung 23	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit dem PARP-Inhibitor Olaparib ( <i>Lynparza</i> )	88
Abbildung 24	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR- 32 und SH-SY5Y nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) und Cisplatin	92
Abbildung 25	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit PARP-Inhibitor Olaparib ( <i>Lynparza</i> ) und Cisplatin.	94
Abbildung 26	Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) und Cisplatin	96
Abbildung 27:	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit PARP- Inhibitor Olaparib ( <i>Lynparza</i> ) und Cisplatin	98

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	INSS-Klassifikation und INRG-Klassifikation zur Einteilung der Krankheitsstadien beim Neuroblastom	. 3
Tabelle 2	Einteilung der Malignitätsgrade des Neuroblastoms nach Hughes	. 4
Tabelle 3	Unterscheidung günstiger und ungünstiger histologischer Eigenschaften nach der INPC-Klassifikation	. 5
Tabelle 4	Übersicht ungünstiger molekulargenetischer Eigenschaften des Neuroblastoms und Gene mit somatischer Mutationshäufigkeit	. 8
Tabelle 5	Übersicht zur Stratifizierung des Neuroblastoms	9
Tabelle 6	Übersicht der Zytostatikatherapie-Optionen zur Behandlung des Neuroblastoms entsprechend der nationalen Studie NB2004-HR	. 15
Tabelle 7	Übersicht der verwendeten Zelllinien	32
Tabelle 8	Übersicht der verwendeten Chemotherapeutika	32
Tabelle 9	Übersicht der verwendeten Medien und Medienzusätze	32
Tabelle 10	Übersicht der verwendeten Chemikalien	33
Tabelle 11	Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer	33
Tabelle 12	Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien	. 34
Tabelle 13	Auflistung der Primärantikörper	35
Tabelle 14	Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper	35
Tabelle 15	Übersicht der verwendeten Enzyme	35
Tabelle 16	Übersicht der verwendeten Geräte	36
Tabelle 17	Übersicht der verwendeten Computersoftware	. 37
Tabelle 18	Übersicht weiterer verwendeter Materialien	. 37
Tabelle 19	Übersicht der Herstellerhauptsitze	. 37
Tabelle 20	Zytotoxischer Effekt von Cisplatin auf Neuroblastomzellen und primären Zellen (hippocampale Neurone)	. 59
Tabelle 21	Übersicht der statistischen Auswertungen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin	. 60
Tabelle 22	Zytotoxischer Effekt des Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY 2603618 ( <i>Rabusertib</i> ) auf Neuroblastomzellen und primäre Zellen (hippocampale Neurone)	. 70
Tabelle 23	Zytotoxischer Effekt des PARP-Inhibitors Olaparib ( <i>Lynparza</i> ) auf Neuroblastomzellen und primären Zellen (hippocampale Neurone)	. 86

# 1. Einleitung

### 1.1. Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein dysontogenetischer, maligner Tumor des sympathischen Nervensystems und entwickelt sich aus den Zellen der Neuralleiste. Es zählt nach den Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) zum häufigsten malignen soliden Tumor im Kindesalter und damit zum häufigsten extrakraniellen Tumor bei Kindern und Jugendlichen < 15 Jahren (1). Es macht 15 % aller onkologischen Todesfälle im Kindesalter aus (2). Die Inzidenz bei den < 15-Jährigen liegt bei 8,7 Erkrankungen pro eine Million Kinder. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei zwei Jahren (1). Spontane Tumorrückbildungen (Regressionen) zeigen sich, insbesondere bei neonatalen Kindern (bis 28 Tage nach Geburt), aber auch bei Patienten im Krankheitsstadium 4S (siehe Tabelle 1). Selbst bei einer Metastasierung ist in den ersten 15 Lebensmonaten eine spontane Regression möglich (1). Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit diagnostiziertem Neuroblastom beträgt allgemein etwa 75 %. Rund die Hälfte der Patienten haben zum Diagnosezeitpunkt ein Krankheitsstadium 4 (siehe Tabelle 1).

Eine Metastasierung tritt bei 60 % der Betroffenen zum Diagnosezeitpunkt auf. Das Neuroblastom zeigt tendenziell ein lokal infiltratives Wachstum und metastasiert frühzeitig, insbesondere in das Knochenmark (70,5 %) und in die Knochen (55,7 %). Aber auch die Lymphknoten (30,9 %) und die Leber (29,6 %) können von Metastasen infiltriert sein (3,4). Seltener ist die Augenhöhle (*Orbita*) oder die Haut von Metastasen betroffen. In höchst seltenen Fällen können auch die Lunge oder das ZNS von Metastasen befallen sein. Bei ca. einem Prozent der Patienten sind ausschließlich Metastasen und kein Primärtumor zu identifizieren (3,4). Die Ätiologie ist bislang unklar.

Das Proto-Onkogen *MYC proto-oncogene (MYCN)* trägt zu einer Vergrößerung des Neuroblastoms bei (5,6). Es ist an der Entstehung des Neuroblastoms, an der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum, dem Energiestoffwechsel und der *Apoptose* (Zelltod) der Neuroblastomzellen beteiligt und dient als wichtigster genetischer Marker für eine schlechte Prognose (7,8). Daher werden Patienten, bei denen sowohl ein Neuroblastom als auch eine *MYCN*-Amplifikation (starke Expression) festgestellt wurde, nach aktueller Leitlinie in die Hochrisikogruppe (siehe Tabelle 5) eingeschlossen (9). Das Neuroblastom ist am häufigsten im Nebennierenmark sowie am Grenzstrang (*Truncus symphaticus*) beidseits der Wirbelsäule lokalisiert. Bei einer Infiltration des Grenzstranges kann das Neuroblastom in jeder Höhe der Wirbelsäule lokalisiert sein, am häufigsten jedoch auf Höhe des Bauchraumes (10,11).

Die Symptomatik ist vielseitig. Neben Allgemeinsymptomen können, je nach Tumorlage, auch lokalisierte Symptome auftreten. Zu den Allgemeinsymptomen zählen Fieber, Schmerzen, plötzliche Gewichtsabnahme, Inappetenz und Abgeschlagenheit. Des Weiteren können durch die erhöhte Katecholaminbildung auch sekundäre Symptome, wie Hypertonie oder chronische Diarrhoe entstehen. Bei einer Lokalisation im Halsbereich, von der weniger als 20 % der Patienten betroffen sind, kann das Neuroblastom durch Kompression auf das Ganglion cervicale inferius oder das Ganglion stellatum zum Horner-Syndrom führen, das durch die Horner-Trias aus Miosis, Enophthalmus und Ptosis gekennzeichnet ist (10,11). Bei der Miosis kommt es zur Pupillenverengung und beim Enophthalmus zum Einsinken der Augäpfel (Bulbus oculi) in die Augenhöhlen (Orbitae). Die Ptosis ist gekennzeichnet durch das Herabhängen des Oberlids über dem Auge (12). Des Weiteren können bei einer Lokalisation im Halsbereich mit fortschreitender Erkrankung periorbitale Ekchymosen (Hauteinblutungen) entstehen. Periorbitale Ekchymosen zeigen sich klinisch als Monokel-bzw. Brillenhämatom. Bei einer Lokalisation im Thoraxbereich, die bei ca. 20 % der Patienten vorhanden ist, können Husten, Dyspnoe (Kurzatmigkeit) und Stridor ("zischendes" Nebengeräusch der Lunge) in der Auskultation auftreten. Zudem kann bei Vorliegen eines Sanduhrtumors, bei dem es zur Infiltration durch die Foramina intervertebralia (Zwischenwirbellöcher) kommt, eine Querschnittslähmung auftreten (10,11). Der Begriff Sanduhrtumor leitet sich von den bildgebenden Verfahren ab, wie bspw. die Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT). Hierbei zeigt das Neuroblastom eine intraspinale, extradurale Infiltration. Bei mehr als 60 % der Betroffenen ist das Neuroblastom im Bereich des Abdomens lokalisiert. Hierbei können neben Lymphknotenschwellungen und diffusen Knochenschmerzen bei Infiltration des Knochenmarks ein aufgetriebener Bauch, Bauchkoliken, Obstipation (Verstopfung) und Ischurie (Harnverhalt) auftreten (10,11).

### 1.2. Einteilung des Neuroblastoms

Die Einteilung des Neuroblastoms nach Krankheitsstadien erfolgt nach verschiedenen Kriterien. Wichtige Kriterien zur Klassifikation (Stadieneinteilung) des Neuroblastoms ist die Größe des Tumorgewebes, eine Lymphknoteninfiltration, eine Metastasierung und das Ausmaß einer initial chirurgischen Tumorresektion (9). Es werden derzeit die Klassifikationen *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) und die *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRG) in der Klinik parallel verwendet (siehe Tabelle 1). Die INRG-Klassifikation hat den Vorteil, dass das Krankheitsstadium zeitlich vor der Operation anhand spezieller Risikofaktoren festgelegt wird. Diese Risikofaktoren werden in der radiologischen Bildgebung *image defined risk* 

*factor* (IDRF) genannt (6). Hierzu zählen bspw. die Ummantelung des *Plexus brachialis* oder großer Blutgefäße durch das Neuroblastomgewebe, die *ipsilaterale* Tumorausdehnung in zwei Körperkompartimenten, die Kompression der *Trachea* (Luftröhre) und eine Infiltration in das *Ligamentum hepatoduodenale*, in die Nierenstiele oder in den Intraspinalraum. Diese speziellen Risikofaktoren können mit bildgebenden radiologischen Verfahren, wie dem CT oder MRT, sichtbar gemacht werden (1,6).

Eine exakte Einteilung der Krankheitsstadien ist bei der INSS-Klassifikation erst nach der chirurgischen Intervention möglich, während die INRG-Klassifikation sich auf die Bildgebung zeitlich vor der chirurgischen Intervention stützt. Daher ist zwar heutzutage die INSS-Klassifikation noch in Gebrauch, jedoch erlangte die INRG-Klassifikation inzwischen eine internationale Gültigkeit (6,9).

INSS-Stadium	Definition	INRG-Stadium	Definition
1	Lokalisiertes Neuroblastom mit R0- <i>Resektion</i> unabhängig von mikroskopischen Resten, kein Befall von <i>ipsi-</i> <i>lateralen</i> und <i>kontra-</i> <i>lateralen</i> LK, Befall von LK nahe Neuroblastom- gewebe	L1	Auf einer Körperhöhle begrenztes Neuroblastom ohne nachgewiesenen IDRF
2a	<i>Ipsilaterales</i> Neuroblastom mit R1-Resektion, kein Befall von <i>ipsilateralen</i> und <i>kontralateralen</i> LK		
2b	<i>Ipsilaterales</i> Neuroblastom mit R0/-R1- <i>Resektion</i> mit Befall <i>ipsilateraler</i> LK	L2	Nachweis von mindestens einem IDRF
3	Bilaterales, nicht resektables Neuroblastom, sowie Befall kontra- lateraler LK oder überschreitende Aus- Dehnung der Mittellinie (kontralateral begrenzend zur Wirbelsäule)		
4	Metastasierung unabhängig von der Tumorausdehnung bei einem Alter ≥ 1 Jahr bei Diagnosefeststellung	M	Metastasierung unabhängig von der Tumorausdehnung (kein Stadium MS)

Tabelle 1	INSS-Klassifikation	und	INRG-Klassifikation	zur	Einteilung	der
	Krankheitsstadien be	im Ne	uroblastom		-	

48	Neuroblastom im Stadium 1, 2a und 2b mit Metastasierung bei einem Alter < 1 Jahr bei Diagnosefeststellung	MS	Metastasierung, begrenzt auf Haut, Leber und Knochenmark bei einem Alter < 18 Monaten bei Diagnosefeststellung
Μ	Multifokale Tumore		

In dieser Tabelle sind die INSS-Klassifikation (*International Neuroblastoma Staging System*) und die INRG-Klassifikation (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*) dargestellt. Die INSS-Klassifikation differenziert zwischen den lokal beschränkten Stadien 1–3, dem metastasierten Stadium 4 und dem metastasierten Neuroblastom 4S (Alter < 1 Jahr). Die INRG-Klassifikation differenziert zwischen den lokal beschränkten Stadien L1 und L2, wobei spezifische Risikofaktoren, sog. IDRF (*image defined risk factor*) und das Stadium M (Metastasen) und MS (Metastasen im Alter < 18 Monaten) berücksichtigt werden. (Abkürzungen: LK = Lymphknoten, R0 = vollständige Tumorresektion, R1 = Tumorresektion mit Resttumor) (6,9)

Auch unter histologischen Kriterien ist eine Einteilung des Neuroblastoms möglich. Aufgrund des seltenen Vorkommens dieser Erkrankung wird eine Beurteilung des Neuroblastomgewebes, insbesondere bei älteren Patienten, durch einen Pathologen dringend empfohlen. Das histologische Grading-System nach Hughes (siehe Tabelle 2) findet auch noch heutzutage, vor allem in der Klinik Deutschlands, Verwendung. Es orientiert sich anhand von morphologischen Kriterien, die Auskunft darüber geben, wie differenziert (ausgereift) die einzelnen Zellen des Neuroblastomgewebes sind (13). Je größer der Anteil an undifferenzierten (unreifen) Zellen im Neuroblastomgewebe ist, desto schneller ist das Tumorwachstum in der Regel. Je schneller das Tumorgewebe wächst, desto größer ist grundsätzlich die Malignität (13).

Tabelle 2	Einteilung der Malignitätsgrade des Neuroblastoms nach Hughes
-----------	---------------------------------------------------------------

Grad 1	Grad 1 a: Diffuses Ganglioneuroblastom: diffuse Mischung aus differenziertem und undifferenziertem Neuroblastomgewebe
	Grad 1 b: Ganglioneuroblastom vom Kompositionstyp: Übergang
	zwischen wechselnd großen Arealen aus differenziertem und
	undifferenziertem Neuroblastomgewebe
Grad 2	Undifferenziertes Neuroblastomgewebe mit partieller Differenzierung
	einzelner Ganglienzellen ( <i>Nucleoli</i> , Anstieg der Kern-Plasma Relation,
	Zytoplasmafortsätze)
Grad 3	Undifferenziertes, klein- und rundzelliges Neuroblastomgewebe, geleg.
	Rosettenbildung

In dieser Tabelle ist die histologische Einteilung des Neuroblastoms nach Hughes dargestellt, die anhand morphologischer Kriterien erfolgt. Je höher der Malignitätsgrad nach Hughes des Neuroblastomgewebes ist, desto größer ist in der Regel die Malignität des Neuroblastoms (13).

International wird weitgehend die *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC)-Klassifikation zur histologischen Einteilung verwendet, in der zwischen günstigen und ungünstigen histologischen Eigenschaften unterschieden wird (siehe Tabelle 3). In

dieser Klassifikation werden der Neuroblastomtyp oder das Differenzierungsverhalten der einzelnen Zellen eingeschätzt, sowie das Patientenalter und der Mitose-*Karyorrhexis-Index* (MKI) berücksichtigt. Ein hoher MKI oder ein mittlerer MKI ab einem Alter von 1,5 Jahren zählt dabei zu den ungünstigen histologischen Eigenschaften (14).

Tabelle 3Unterscheidung günstiger und ungünstiger histologischer Eigenschaften<br/>nach der INPC-Klassifikation

Günstige Histologie	Ungünstige Histologie
<ul> <li>Ganglioneuroblastom oder Ganglioneurom</li> <li>Alter &lt; 1,5 Jahre: gering differenziert, differenziert, niedriger MKI, mittlerer MKI</li> <li>Alter 1,5–5 Jahre: differenziert,</li> </ul>	<ul> <li>Noduläres Ganglioneuroblastom</li> <li>Alter &lt; 1,5 Jahre: undifferenziert, hoher MKI</li> <li>Alter 1,5–5 Jahre: undifferenziert, gering differenziert, mittlerer MKI, hoher MKI</li> </ul>
niedriger MKI	<ul> <li>Alter &gt; 5 Jahre: unabhängig weiterer</li> </ul>
	Faktoren

In dieser Tabelle ist eine vereinfachte Übersicht günstiger und ungünstiger histologischer Eigenschaften bzgl. der Prognose nach der INPC-Klassifikation (*International Neuroblastoma Pathology Classification*) dargestellt. (Abkürzungen: MKI = Mitose-*Karyorrhexis*-Index, niedriger MKI < 2 % = <100 von 5000 Zellen, mittlerer MKI  $\ge$  2 % = 100-200 von 5000 Zellen, hoher MKI  $\ge$  4 % =  $\ge$  200 von 5000 Zellen) (14)

# 1.3. Prognose des Neuroblastoms

Wichtige prognostische Faktoren im Rahmen der INSS-Klassifikation und INRG-Klassifikation sind die Ausbreitung des Neuroblastoms zum Diagnosezeitpunkt, das Metastasierungsverhalten und das Ausmaß der Tumorresektion. Nicht nur die Einteilung der Krankheitsstadien des Neuroblastoms mithilfe der INSS-Klassifikation und der **INRG-Klassifikation** unter Berücksichtigung des Patientenalters bei der Diagnosefeststellung dienen der Einschätzung der Prognose, sondern auch die molekulargenetischen Eigenschaften des Neuroblastomgewebes (siehe Tabelle 4) und die INPC-Klassifikation zur Erfassung günstiger und ungünstiger histologischer Eigenschaften (siehe Tabelle 3). Je niedriger das Krankheitsstadium des Patienten bei der Diagnosefeststellung ist, desto besser ist in der Regel die Prognose, mit Ausnahme der Patienten im Krankheitsstadium 4S (INSS) oder MS (INRG) (6,9). Daher kann bspw. bei Patienten in den Krankheitsstadien 1 und 2 nach der INSS-Klassifikation eine chirurgische Resektion des Neuroblastoms ausreichen. Patienten in fortgeschrittenen Stadien oder Patienten mit Metastasierungen im Krankheitsstadium 4 (INSS) benötigen intensivere und komplexere Therapieansätze (6,9). Es lassen sich nach der Diagnosefeststellung eines Neuroblastoms die Heilungsaussichten für die jeweiligen Patienten im Allgemeinen sehr schwierig einschätzen.

Patienten im Krankheitsstadium 4S oder MS, in den Krankheitsstadien 1 und 2 mit lokal begrenztem Neuroblastom, im Alter < 18 Monaten sowie Patienten im Krankheitsstadium 3 ohne ungünstige molekulargenetische Eigenschaften haben mit einer 10-Jahresüberlebensrate von zum Teil > 90 %, eine sehr gute Prognose (6,9). Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit metastasiertem Neuroblastom ist mit etwa 50 % noch immer sehr ungünstig (15). Je älter die Patienten bei der Diagnosefeststellung sind, desto schlechter ist in der Regel die Prognose (6,9). Die ereignisfreie 5-Jahresüberlebensrate bzgl. des Alters unabhängig weiterer prognostischer Einflussfaktoren ist bei Patienten < 18 Monaten mit 82,1 % im Vergleich zu 63,5 %. bei Patienten ≥ 18 Monaten deutlich höher. Die richtige Einteilung des Neuroblastoms in die jeweiligen Krankheitsstadien nach INSS und INRG unter Berücksichtigung des Patientenalters sind daher unerlässlich zur Einschätzung der Prognose.

Unter Berücksichtigung der histologischen Differenzierung des Neuroblastomgewebes unabhängig weiterer prognostischer Einflussfaktoren ist die ereignisfreie 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit differenziertem Neuroblastomgewebe mehr als 15 % höher als bei Patienten mit undifferenziertem Neuroblastomgewebe. Die ereignisfreie 5-Jahresüberlebensrate bzgl. des MKI unabhängig weiterer prognostischer Einflussfaktoren ist bei Patienten mit einem niedrigen MKI knapp mehr als 20 % höher als bei Patienten mit einem hohen MKI. Aus diesen Daten lässt sich die prognostische Bedeutung histologischer Eigenschaften des Neuroblastomgewebes einschätzen (6,9,11,16).

Eigenschaften Die molekulargenetischen sind derzeit Gegenstand vieler Forschungsarbeiten und gewinnen zunehmend an Bedeutung hinsichtlich der Einteilung des Neuroblastoms und der Einschätzung der Prognose. Aktuell gibt es mehrere molekulargenetische Eigenschaften der Desoxyribonukleinsäure (DNS) des Neuroblastoms, die bei der Therapieplanung einen besonderen Stellenwert haben. Hierzu zählt insbesondere die Amplifikation des Proto-Onkogens MYCN und die 1p-Deletion. Die 11q-Deletion ist eine weitere segmentale chromosomale Aberration, die im Zusammenhang mit dem Neuroblastom einen ungünstigen Prognosefaktor darstellt. Das Proto-Onkogen MYCN ist ein kleiner Abschnitt auf Chromosom 2. Bei einer Amplifikation kommt es zur gesteigerten Expression dieses Chromosomenabschnittes (6,9,17,18). Bei einer 1p-Deletion kommt es zu einem Verlust von Genmaterial auf dem kurzen Arm (p-Arm) des Chromosoms 1. Eine 11q-Deletion ist gekennzeichnet durch den Verlust eines kleinen Teils des langen Arms (q-Arm) des Chromosoms 11 (19). Die MYCN-Amplifikation und die strukturellen Chromosomenaberrationen führen unabhängig vom Patientenalter zu einer ungünstigen Heilungsaussicht. Die ereignisfreie 5-

Jahresüberlebensrate ist bei Patienten ohne *MYCN*-Amplifikation oder ohne 1p-Deletion bzw. 11q-Deletion jeweils, unabhängig weiterer prognostischer Einflussfaktoren, ca. 25 % größer als bei Patienten mit einer *MYCN*-Amplifikation oder einer strukturellen Chromosomenaberration wie der 1p-Deletion bzw. 11q-Deletion. Aus diesen Daten lässt sich die prognostische Bedeutung molekulargenetischer Eigenschaften des Neuroblastomgewebes einschätzen (16,17,20).

Des Weiteren existieren noch andere molekulargenetische Eigenschaften, die mit einer schlechten Prognose korrelieren. Hierzu zählen die Mutation der ALK receptor tyrosine kinase (ALK) und die Telomerase-Aktivierung (6). Die ALK ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, deren Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist, die aber scheinbar an der Neurogenese beteiligt ist (21). Die ereignisfreie 5-Jahresüberlebensrate unabhängig weiterer prognostischer Einflussfaktoren ist bei Patienten mit einer ALK-Mutation ca. 15% niedriger als bei Patienten ohne eine ALK-Mutation (21). Die Telomerase ist ein Enzym, das durch Hinzufügen guaninreicher repetetiver Sequenzen zur Erhaltung der Telomerlänge der Zellen beiträgt, denn die DNS-Polymerase ist nicht in der Lage, die DNS an den äußersten Enden vollständig zu kopieren. Dadurch kommt es zu einem Verlust von Nukleotiden im Verlauf des Zellzyklus, was zu einer allmählichen Verkürzung der Telomerlänge führt, wodurch im weiteren Verlauf die Apoptose eingeleitet wird. Die Telomerase-Aktivierung in Tumorzellen führt zu einer Erhaltung der Telomerlänge, wodurch die Tumorzelle der Apoptose entgeht und sich somit schützt (22). Die Telomerase-Aktivierung wird durch die Induktion des Gens telomerase reverse transcriptase (TERT) durch MYCN-Amplifikation oder durch eine genomische Umlagerungen des TERT-Lokus verursacht (23). Weitere Gene mit einer somatischen Mutationshäufigkeit sind protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11 (PTPN11), ATRX chromatin remodeler (ATRX) und neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS). Es wird derzeit weiter geforscht, welche Bedeutung diese Gene für die Entstehung des Neuroblastoms und für die Prognoseeinschätzung haben (24). Das Gen PTPN11 ist an der Tyrosinphopsphorylierung und somit an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt (25). Das ATRX-Gen ist an der Chromatin-Remodellierung beteiligt und wurde häufig in pädiatrischen Tumoren gefunden (26). Das Proto-Onkogen NRAS codiert für Guanosintriphosphat-bindendes Protein (GTPase)-Proteine, die an der Differenzierung und der Proliferation (Wachstum, Vermehrung) von Zellen beteiligt sind Nach einer aktuellen Studie stehen auch eine Überexpression des (27). Tumorsuppressorgens tumor protein p53 (TP53), sowie cyclin E1 (CCNE1), Cyclinabhängige Kinasen (CDK), aber auch Checkpoint kinase 1/2 (CHK1/2), ATR serine/threonine kinase (ATR), RAD recombinase (RAD51), BRCA1 DNA repair

associated (BRCA1) und BRCA2 DNA repair associated (BRCA2) als ungünstige prognostische Marker im Fokus der Wissenschaftler. Die Überexpression des TP53assoziierten Gens sestrin 1 (SESN1) war in dieser Studie mit einem günstigen prognostischen Effekt verbunden (28,29). Das Gen TP53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren (28). Bei Neuroblastomen jedoch ist das Gen TP53 selten mutiert, wodurch der Einsatz als prognostischer Marker in der Klinik fragwürdig ist (28). Das Protein p53 kann sowohl über einen G1-Zellzyklus-Arrest oder einer Checkpoint-Kontrolle während des G<sub>2</sub>/M Übergangs den Zellzyklus (siehe Abb. 1) unterbrechen, **DNS-Schäden** über DNS-Reparaturmechanismen wie die Nukleotiddamit Exzisionsreparatur, Basen-Exzisionsreparatur (BER) und non-homologous end-joining (NHEJ) repariert werden können. Im Falle eines irreparablen DNS-Schadens kann über das Protein p53 eine Apoptose induziert werden (30). Bei einem Defekt des TP53 Gens kann eine entartete Zelle diese Schutzfunktion umgehen, wodurch Zellen mit einer geschädigten DNS sich unkontrolliert teilen können. Durch diesen Vorgang kommt es Tumorbildung bei vielen menschlichen Tumoren (30). Ein triploider zur Chromosomensatz, aber auch eine Hyperploidie im Allgemeinen korreliert mit einer guten Prognose (6,9).

Des Weiteren dienen auch Laborparameter als Prognosefaktor. Ein hoher Wert der Laborparameter Ferritin und *Lactatdehydrogenase* (LDH) im Blutserum ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (6,9). Ferritin dient als Eisenspeicherprotein und LDH ist ein Enzym, das zur Energiegewinnung an der anaeroben Glykolyse beteiligt ist (11,31).

Tabelle 4Übersicht ungünstiger molekulargenetischer Eigenschaften des<br/>Neuroblastoms und Gene mit somatischer Mutationshäufigkeit

Ungünstige Molekulargenetik	Gene mit somatischer Mutationshäufigkeit
<ul> <li>MYCN-Amplifikation</li> <li>1p-/11q-Deletion</li> <li>ALK-Mutation</li> <li>Telomerase-Aktivierung</li> <li>Überexpression von TP53, CCNE1, BRCA1/2, CDK, CHK1/2, ATR, RAD51</li> </ul>	<ul> <li>PTPN11</li> <li>ATRX</li> <li>NRAS</li> </ul>

In dieser Tabelle ist sowohl eine Übersicht von ungünstigen molekulargenetischen Eigenschaften bzgl. der Prognose des Neuroblastoms und von Genen mit somatischer Mutationshäufigkeit beim Neuroblastom dargestellt. Die Tabelle wurde nach entsprechender Literaturrecherche angefertigt (24,28,29).

# 1.4. Stratifizierung des Neuroblastoms

Nach einer Diagnosefeststellung des Neuroblastoms werden nicht alle Patienten auf dieselbe Art behandelt, sondern es folgt eine Zuteilung der Patienten in risikoangepasste

Behandlungsgruppen, in denen unter Berücksichtigung der Prognose unterschiedliche Behandlungskonzepte vorgesehen sind. Dieser Vorgang der Einteilung wird in der Medizin Stratifizierung genannt. Die Stratifizierung berücksichtigt alle bekannten prognostischen Faktoren, wie die Einteilung in das jeweilige Krankheitsstadium, das Alter bei der Diagnosefeststellung und die histologischen und molekulargenetischen Eigenschaften des Patienten (6,9). Nach den aktuellen Behandlungsrichtlinien ist eine Einteilung in drei Therapiegruppen vorgesehen. Zu diesen drei risikoangepassten Behandlungsgruppen gehören derzeit die niedrige Risikogruppe, die mittlere Risikogruppe und die Hochrisikogruppe (siehe Tabelle 5) (6,9). Patienten mit lokalem Neuroblastomwachstum ohne Metastasierung und mit günstigem Alter bei der Diagnosefeststellung werden in die niedrige Risikogruppe eingeordnet. Für die Zuordnung eines Patienten in die niedrige Risikogruppe ist entscheidend, dass keine MYCN-Amplifikation oder 1p-Deletion vorliegen (6,9). Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, einem ungünstigen Alter bei der Diagnosefeststellung und einer 1p-Deletion werden der mittleren Risikogruppe zugeordnet. Für die Zuordnung eines Patienten in die mittlere Risikogruppe ist entscheidend, dass keine MYCN-Amplifikation vorliegt (6.9). In die Hochrisikogruppe werden sowohl alle Patienten mit den Krankheitsstadien 1, 2, 3 oder 4S (INSS) einschließlich einer MYCN-Amplifikation als auch Patienten mit dem Krankheitsstadium 4 (INSS), die älter als 18 Monate sind, eingeordnet (6,9).

 Tabelle 5
 Übersicht zur Stratifizierung des Neuroblastoms

Kuan khaita ata diuwa	Alton		1 Deletien
Krankneitsstadium	Alter	MYCN-Amplifikation	Tp-Deletion
1–2 (INSS)	0–21 J	Nein	Nein
3 (INSS)	0–2 J	Nein	Nein
MS (INRG)	< 18 M	Nein	Nein

#### Niedrige Risikogruppe

#### Mittlere Risikogruppe

Krankheitsstadium	Alter	MYCN-Amplifikation	1p-Deletion
2 (INSS)	0–21 J	Nein	Ja
3 (INSS)	>2 J	Nein	Nein
3 (INSS)	0–21 J	Nein	Ja
MS (INRG)	< 18 M	Nein	Ja

Krankheitsstadium	Alter	MYCN-Amplifikation	1p-Deletion
1–4S (INSS)	0–21 J	Ja	Ja/Nein
4 (INSS)	> 18 M	Ja/Nein	Ja/Nein

Hochrisikogruppe

In dieser Tabelle ist eine Übersicht zur Zuordnung der Patienten in risikoangepasste Behandlungsgruppen (Stratifizierung) dargestellt. Die Tabelle wurde entsprechend der aktuellen Leitlinien selbstständig angefertigt. (Abkürzungen: INSS = *International Neuroblastoma Staging System*, INRG-Klassifikation = *International Neuroblastoma Risk Group Staging System*, J = Jahre, M = Monate) (6,9)

## **1.5.** Therapie des Neuroblastoms

Die Therapie der Neuroblastompatienten wird umso komplexer, je größer der Krankheitsfortschritt bzw. je aggressiver das Wachstum des Neuroblastoms ist (9,32,33). Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich von Patienten mit metastasierten Neuroblastomen in den letzten Jahrzehnten von < 20% auf etwa 50% verbessert (15). Zu den Behandlungsmethoden gehören nach aktueller Leitlinie die chirurgische Tumorresektion, eine Chemotherapie, eine Strahlentherapie, eine Hochdosis-Chemotherapie einschließlich darauffolgenden einer autologen Stammzell-Transplantation Immuntherapie und eine mit Antikörpern (6.9). Weitere Therapieverfahren, z. B. die <sup>131</sup>I-MIBG-Therapie (Methyljodbenzylguanidin), können zusätzlich zum Einsatz kommen (6,9). Die <sup>131</sup>I-MIBG-Therapie ist eine Therapie mit radioaktiv markiertem Methyljodbenzylguanidin, bei der das Neuroblastomgewebe von "innen" bestrahlt wird (34).

Bei Patienten der niedrigen Risikogruppe ist häufig lediglich eine Gewebeentnahme (Biopsie) zur Einschätzung histologischer Eigenschaften erforderlich, da eine hohe Rate an spontanen Regressionen vorhanden ist. Im Optimalfall wird bei Patienten der niedrigen Risikogruppe lediglich eine chirurgische Tumorresektion durchgeführt, ohne dass komplexere Therapieansätze nötig sind. Im Falle eines Resttumors (sog. R1-*Resektion*) innerhalb des Zeitfensters von zwölf Monaten nach einer Operation, eines *Rezidivs* (Krankheitsrückfall), eines erneuten Tumorwachstums oder eines erneuten Auftretens behandlungsbedürftiger Symptome, wird bei Patienten der niedrigen Risikogruppe, entsprechend der nationalen Studien NB95-S und NB97, eine milde Chemotherapie bestehend aus vier Zyklen der *Zytostatika* (Chemotherapeutika) Doxorubicin, Vincristin und Cyclophosphamid (N4) (Doxorubicin 15 mg/m<sup>2</sup> × d 30-Minuten-Infusion an Tag 1, 3, 5 und Vincristin 0,75 mg/m<sup>2</sup> × d i. v. an Tag 1, 3, 5 und Cyclophosphamid 300 mg/m<sup>2</sup> × d 30-Minuten-Infusion Tag 1–7) appliziert (gegeben). Als alternative *Zytostatika* können hierbei auch Carboplatin und Etoposid verwendet werden

(siehe Tabelle 6) (6,9,35,36). Wenn ein weiteres Wachstum des Neuroblastoms verhindert wird, kann die Chemotherapie beendet werden.

Patienten der mittleren Risikogruppe erhalten in der Regel eine Kombination aus der chirurgischen Tumorresektion und einer adjuvanten (unterstützenden) Chemotherapie. Eine adjuvante Chemotherapie wird im Anschluss an die Operation durchgeführt, um das Auftreten eines Rezidivs zu vermeiden. Bei einer neoadjuvanten Chemotherapie erfolgt die Chemotherapie zeitlich vor der chirurgischen Tumorresektion (6,9,37). Wenn aufgrund der Ausdehnung des Tumorwachstums und der Infiltration des Neuroblastoms eine chirurgische Tumorresektion zu riskant oder nicht möglich ist, wird im Anschluss einer Biopsie zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt, um das Neuroblastomgewebe vorerst zu verkleinern. Im Anschluss erfolgt dann in der Regel eine chirurgische Tumorresektion, wenn aufgrund einer Verkleinerung des Neuroblastomgewebes eine Operabilität gewährleistet ist. Auf die chirurgische Tumorresektion kann anschließend wieder eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Die Chemotherapie bei Patienten der mittleren Risikogruppe, entsprechend der nationalen Studie NB2004-HR und nach der Therapieempfehlung der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), setzt sich aus sechs Zyklen einer intensiven Induktionschemotherapie und vier Zyklen einer milderen Erhaltungszusammen. Das Ziel dieser Induktionschemotherapie ist Chemotherapie die Verkleinerung des Tumorvolumens (6,9,38). In der Induktionschemotherapie werden zwei Zytostatikakombinationen aus Carboplatin, Etoposid und Vindesin (N5c) (Carboplatin  $160 \text{ mg/m}^2 \times d$  Dauerinfusion > 96 Stunden ab Tag 1, Etoposid  $100 \text{ mg/m}^2 \times d$  Dauerinfusion > 96 Stunden ab Tag 1, Vindesin  $3 \text{ mg/m}^2$  Infusion > 1 Stunde an Tag 1) und Vincristin, Dacarbazin, Ifosfamid und Doxorubicin (N6) (Vincristin  $1,5 \text{ mg/m}^2 \times d$  Infusion > 1 Stunde an Tag 1 und 8, Dacarbazin 200 mg/m<sup>2</sup> × d Infusion > 1 Stunde an Tag 1–5, Ifosfamid 1500 mg/m<sup>2</sup> × d Dauerinfusion > 120 Stunden ab Tag 1, Doxorubicin 30 mg/m<sup>2</sup> × d Infusion > 4 Stunden an Tag 6 und 7) alternierend (im Wechsel) intravenös appliziert. Die Erhaltungschemotherapie besteht meist aus der oralen Applikation (Medikamentengabe) von Cyclophosphamid (N7) (siehe Tabelle 6)  $(150 \text{ mg/m}^2 \times \text{d} \text{ als Einzelgabe} \text{ an Tag } 1-8)$ . Sollte nach der intensiven Induktionschemotherapie noch ein Resttumor vorhanden sein, so wird bei Patienten im Alter > 18 Monaten eine Bestrahlung des Resttumors (Strahlendosis 36-40 Gy) während der Erhaltungschemotherapie mit Cyclophosphamid durchgeführt. Alternativ zur Bestrahlung kann aber auch im Falle einer Operabilität des Resttumors eine chirurgische Resektion nach zwei bis vier Chemotherapiezyklen angestrebt werden. Die

Behandlungsdauer eines Patienten der mittleren Risikogruppe beträgt ca. ein Jahr (6,9,33).

Bei einer Stratifizierung in die Hochrisikogruppe sollte eine intensive multimodale Therapie durchgeführt werden. Diese besteht aus einer Induktionschemotherapie, einer konsolidierenden Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation und einer nachfolgenden Post-Konsolidierungstherapie. Eine chirurgische Tumorresektion im Sinne einer gross total resection (> 95% des Primärtumors), eine Immuntherapie und eine <sup>131</sup>I-MIBG-Therapie gehören ebenfalls zum Behandlungskonzept der Hochrisikogruppe. Da Nebenwirkungen der Therapieansätze auftreten können, finden in der Regel bei den erkrankten Patienten sowohl Maßnahmen zur Therapieüberwachung als auch unterstützende Supportivtherapien in der Klinik Anwendung. Die aktuelle Induktionschemotherapie in der Hochrisikogruppe beinhaltet, entsprechend der nationalen Studie NB2004-HR und der Therapieempfehlung der GPOH, sechs Zyklen alternierender Zytostatikakombinationen aus Cisplatin, Etoposid und Vindesin (N5) (Cisplatin 40 mg/m<sup>2</sup> × d Dauerinfusion > 96 Stunden ab Tag 1, Etoposid 100 mg/m<sup>2</sup> × d Dauerinfusion > 96 Stunden ab Tag 1, Vindesin  $3 \text{ mg/m}^2$  Infusion > 1 Stunde an Tag 1) und Vincristin, Dacarbazin, Ifosfamid und Doxorubicin (N6) (Vincristin 1,5 mg/m<sup>2</sup> × d Infusion > 1 Stunde an Tag 1 und 8, Dacarbazin 200 mg/m<sup>2</sup> × d Infusion > 1 Stunde an Tag 1–5, Ifosfamid 1500 mg/m<sup>2</sup> × d Dauerinfusion > 120 Stunden ab Tag 1, Doxorubicin  $30 \text{ mg/m}^2 \times d$  Infusion > 4 Stunden an Tag 6 und 7). In der Regel erfolgt eine erneute chirurgische Tumorresektion während oder im Anschluss dieser Induktionschemotherapie (6,9,33). Nach der erneuten chirurgischen Tumorresektion erhalten die Patienten eine Hochdosischemotherapie aus Busulfan und Melphalan (siehe Tabelle 6), auf die eine autologe (zum selben Individuum gehörend) Stammzelltransplantation folgt. Diese myeloablative (knochenmarkschädigende) Chemotherapie aus Busulfan und Melphalan ist als Standard für eine Hochdosis-Chemotherapie zu wählen, da sie der Kombination aus Melphalan, Etoposid und Carboplatin überlegen zu sein scheint (6,9,33,39,40). Die amerikanische Children's Oncology Group (COG) konnte in der Studie ANBL0532 zeigen, dass eine Tandemhochdosischemotherapie (zweifache Durchführung) gegenüber einer einzelnen Hochdosischemotherapie überlegen ist. Eine Bestätigung dieser Überlegenheit wird derzeit erforscht (41). Nachteil der Kombination aus Busulfan (9,6 mg/kg) und Melphalan (140 mg/m<sup>2</sup>) ist eine relativ hohe Inzidenz der Lebervenenverschlusskrankheit (venoocclusive disease, VOD), die mit einem relativ hohen Sterberisiko einhergeht. Eine Prophylaxe mit dem Fibrinolytkium Defibrotid konnte das Risiko für VOD jedoch reduzieren (38,40,42). Bei Patienten mit MIBG-positivem Resttumor kann zeitlich vor der

Hochdosischemotherapie eine MIBG-Therapie erfolgen. Bei der Hochdosis-Chemotherapie werden im Rahmen einer *myeloablativen* Therapie nicht nur die Neuroblastomzellen geschädigt, sondern es kann auch das blutbildende *Medulla ossium* (Knochenmark) geschädigt werden. Daher werden bei diesen Patienten vor Beginn der Hochdosischemotherapie die hämatopoetischen Stammzellen über eine Blutabnahme oder seltener einer Knochenmarkpunktion entnommen (6,9,43).

Nach Abschluss der Hochdosischemotherapie folgt eine autologe Stammzell- oder Knochenmarktransplantation, in dem die hämatopoetischen Stammzellen der Patienten durch eine Infusion verabreicht werden. Es folgt eine Zellmigration der infundierten hämatopoetischen Stammzellen aus der Peripherie wieder in das Knochenmark, wo sie neue funktionstüchtige Blutzellen bilden können. Die Patienten sind in der Phase der Neubildung des Knochenmarks hochgradig für Infektionen gefährdet. Daher sind entsprechende präventive Maßnahmen erforderlich (6,9,43). Wenn eine erneute autologe Stammzelltransplantation erforderlich sein sollte, kann stattdessen auch eine haploidente [50 % Übereinstimmung der humanen Leukozyten Antigene (HLA) zwischen Spender und Empfänger] Stammzelltransplantation durchgeführt werden (44). Nach Abschluss der konsolidierenden Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation erfolgt eine Post-Konsolidierungstherapie (Erhaltungs-Therapie), die durch die Bestrahlung des Neuroblastomgewebes und einer Immuntherapie mit dem Antikörper Anti-Disialogangliosid 2 (GD2)-Antikörper Dinutuximab beta (10 mg/m<sup>2</sup> × d über 10 Tage als Dauerinfusion) gekennzeichnet ist, um eventuell verbliebene Neuroblastomzellen zu lysieren (6,9). Zwischen der Bestrahlung und der Immuntherapie sollte ein zeitliches Intervall von 4 Wochen eingehalten werden (45). Der Antikörper bindet spezifisch an einen Kohlenhydratanteil von GD2, das auf Neuroblastomzellen überexprimiert wird, wodurch immunologische Effektorzellen, wie mononukleäre Blutzellen und Granulozyten die Neuroblastomzellen lysieren können. Die Therapie der Patienten der Hochrisikogruppe kann in der Regel bis zu 2 Jahren andauern. Die Heilungsaussicht ist noch immer ungünstig (6,9,38,46).

Aufgrund der zunehmenden Erforschung neuer molekularer Marker könnten neue Therapieansätze entwickelt werden, die eventuell eine bessere Überlebensrate erzielen können. Dieser Abschnitt widmet sich dem aktuellen Forschungsstand in der Therapie des Neuroblastoms. Es befinden sich bspw. ALK-Inhibitoren zurzeit in der klinischen Prüfung (47). Aber auch Topoisomerase-Inhibitoren, Nukleosidanaloga und Inhibitoren, die auf bestimmte zelluläre Signalwege "phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt kinase/ mechanistic target of rapamycin kinase" (PI3K/AKT/MTOR), Wnt family member (WNT) oder den "RAS p21 protein activator / mitogen-activated protein kinase" (RAS/MAPK)

abzielen, sind derzeit im Fokus der Wissenschaft (siehe 1.8) (48). Eine Hemmung der Interaktion des p53 mit dem mouse double minute 2 protein (MDM2) über p53-MDM2-Antagonisten stellt ebenfalls eine potenzielle therapeutische Strategie für Neuroblastome dar (49). Auch Antagonisten von cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) stellen potenzielle Therapeutika für das Neuroblastom mit MYCN-Amplifikation dar (28). Des Weiteren wird derzeit auch eine Kombination aus dem Telomerase-Inhibitor Imetelstat und dem Zytostatikum Etoposid erforscht. Diese Kombination konnte das Überleben von Mäusen mit Neuroblastom-Xenotransplantaten verbessern (23). Ein weiterer Therapieansatz könnte die lange nicht-kodierende IncRNA "myocardial infarction associated transcript" (MIAT) sein. MIAT ist in mehreren MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien hochreguliert und ist zusammen mit dem Proto-Onkogen MYCN an der Zellzyklusprogression (Steigerung), der Zellproliferation und dem Energie-Stoffwechsel in Neuroblastomzellen beteiligt. Ein In-vitro-Experiment konnte zeigen, dass ein Knock-down (Niederschlag) von MIAT die Apoptose in MYCN-amplifizierten Zelllinien auslöste und die Proliferation und Migration (Zellwanderung) inhibierte (hemmte). Eine Verringerung der Expression von MIAT könnte demnach einen neuen Therapieansatz darstellen. Zudem könnte MIAT als neuer molekularer Marker in der Diagnostik und Stratifizierung zukünftig eine Rolle spielen (8). Eine Ausrichtung auf das Proto-Onkogen MYCN stellt eine wichtige therapeutische Strategie zur Bekämpfung von Neuroblastomen dar (siehe 1.8). Eine Erhöhung der Konzentration der Ligasen F-box and WD-40 domain-containing protein 7 (FBXW7) oder HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (HUWE1), die MYCN abbauen können oder Medikamente, die eine Hemmung von histone deacetylase 8 (HDAC8) oder einer Minderung der Transkriptionsaktivität von MYCN hervorrufen können, stellen eine weitere therapeutische Strategie dar (50). Es könnte zukünftig auch der "Baculoviral IAP repeat containing 5" (BIRC5) /Survivin-Inhibitor Sepantroniumbromid (YM155) eingesetzt werden, das den Abbau des Proto-Onkogens MYCN in mehreren MYCNamplifizierenden Zelllinien, u.a. der IMR-32-Neuroblastomzelllinie, fördert (51). Auch der Abbau der Aurora Kinase A (AURKA), das als Enzym an der Stabilisierung des Proto-Onkogens MYCN beteiligt ist, liefert einen neuen möglichen Therapieansatz beim Neuroblastom (52). Zudem wurden auch Inhibitoren (Hemmstoffe) der oxidativen Phosphorylierung (Energiegewinnung) als neuer Therapieansatz vorgeschlagen (53). Ein neuer immunologischer Therapieansatz könnte zukünftig ebenfalls eingesetzt werden. Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) mit einem M2-Phänotyp, die zur Förderung der Metastasierung beitragen, könnten durch ihre Hemmung, Apoptose oder der Umprogrammierung in einen immunstimulierenden Phänotyp, einen solchen immunologischen Therapieansatz darstellen (54).

Tabelle 6Übersicht der Zytostatikatherapie-Optionen zur Behandlung des<br/>Neuroblastoms entsprechend der nationalen Studie NB2004-HR

Niedrige Risikogruppe	<u>Standardchemotherapie:</u> 4 Zyklen Doxorubicin, Vincristin und Cyclophosphamid (N4) <u>Alternativchemotherapie:</u> 4 Zyklen Carboplatin und Etoposid
Mittlere Risikogruppe	Induktionschemotherapie: Alternierend 6 Zyklen Carboplatin, Etoposid und Vindesin (N5c) und Vincristin, Dacarbazin, Ifosfamid und Doxorubicin (N6) Erhaltungschemotherapie: 4 Zyklen Cyclophosphamid (N7)
Hoch- Risikogruppe	<u>Induktionschemotherapie:</u> Alternierend 6 Zyklen Cisplatin, Etoposid und Vindesin (N5) und Vincristin, Dacarbazin, Ifosfamid und Doxorubicin (N6) <u>Hochdosischemotherapie:</u> Busulfan, Melphalan

In dieser Tabelle ist eine Übersicht zu den Zytostatikatherapien in den einzelnen Risikogruppen nach aktueller Leitlinie dargestellt (6,9,36).

## 1.6. Der Zellzyklus

Bei jedem Lebewesen finden Zellteilungen statt, um neue Gewebe zu bilden und abgestorbene Zellen zu ersetzen. Dieser biologische Prozess findet im Zellzyklus statt. Ein wichtiges Ziel des Zellzyklus ist die Zellteilung, in der die Chromosomen des Zellkerns auf zwei Zellhälften verteilt werden, um eine neue Tochterzelle zu schaffen. Der Zellzyklus besteht aus insgesamt vier Phasen, der M-Phase und der anschließenden Interphase, die sich in die G<sub>1</sub>-, S-, und G<sub>2</sub>-Phase untergliedert (siehe Abb. 1) (55). Daneben existieren noch insgesamt vier Kontrollpunkte (Checkpoints). Zu diesen Kontrollpunkten gehören der G1-Checkpoint, der G2-Checkpoint, der M-Checkpoint und der Intra-S-Phase-Checkpoint (siehe Abb. 1). Der G1-Checkpoint ist abhängig von p53, während die anderen Kontrollpunkte von der checkpoint kinase 1 (CHK1) und checkpoint kinase 2 (CHK2) abhängig sind (56-59). An den Kontrollpunkten wird geprüft, ob die nächste Zellzyklusphase begonnen werden kann und ob die bisherige oder vorhergehende Phase regelrecht abgelaufen ist. Des Weiteren sorgen sie dafür, dass sich die Zellen nicht unkontrolliert teilen und nur so viele Zellen gebildet werden, wie auch gebraucht werden. Nichtbrauchbare oder geschädigte Zellen werden durch die Apoptose eliminiert. Die G1-Phase (gap-1) ist durch den Beginn des Zellwachstums gekennzeichnet, in dem ein einfacher Chromosomensatz vorliegt, sowie durch eine vermehrte Proteinbiosynthese und der Bildung von Nukleotiden für die DNS-Replikation (Verdopplung des Erbgutes) (55). In der späten G1-Phase des Zellzyklus befindet sich der G1-Checkpoint. In der S-Phase findet die Replikation der DNS statt. Hier verdoppelt sich der Chromosomensatz, sodass am Ende der Replikation ein zweifacher Chromosomensatz vorliegt. Die G<sub>2</sub>-Phase (*gap*-2) dient der Vorbereitung der Mitose, an deren Ende wieder ein einfacher Chromosomensatz vorliegt (55). Der G<sub>2</sub>-*Checkpoint* befindet sich am Ende der G<sub>2</sub>-Phase. Die M-Phase ist durch die mitotische Zellteilung (Mitose) gekennzeichnet und gliedert sich in die Phasen Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Cytokinese. Des Weiteren existieren noch eine SubG<sub>1</sub>-Fraktion und eine G<sub>0</sub>-Phase, in der die Zellen ruhen und sich nicht mehr vermehren (55,60). Die SubG<sub>1</sub>-Fraktion ist gekennzeichnet durch fragmentierte apoptotische Zellen mit degradierter DNS. Die Zellen der SubG<sub>1</sub>-Fraktion treten nicht mehr in den Zellzyklus ein (60). Differenzierte Zellen begeben sich in die G<sub>0</sub>-Phase. Ein Eintritt in die G<sub>0</sub>-Phase wird durch eine terminale Differenzierung, einen Mangel an Wachstumsfaktoren oder eine hohe Populationsdichte hervorgerufen. In dieser Ruhephase findet keine Zellteilung mehr statt. Wachstumsfaktoren können bei Bedarf einen Wiedereintritt in den Zellzyklus bewirken (55).



Abbildung 1 Übersicht der Zellzyklusphasen

In dieser Abbildung sind die Zellzyklusphasen dargestellt, bestehend aus insgesamt vier Phasen, der M-Phase und der anschließenden Interphase, die sich in die G1-, S-, und G2-Phase untergliedert. In Ergänzung sind die drei Kontrollpunkte des Zellzyklus und die G0-Phase sowie die SubG1-Fraktion dargestellt, modifiziert nach Löffler und Petrides (55,59)

# 1.7. Die Bedeutung der Zellzykluskontrolle

Der G<sub>1</sub>-*Checkpoint* überprüft die Zellgröße, das Vorkommen von eventuellen DNS-Schäden und die Menge an Substraten, die für die Replikation in der S-Phase benötigt werden (55). Der Intra-S-Phase-*Checkpoint* unterdrückt das Abfeuern neuer Replikationsursprünge, wenn Replikationsstress vorliegt und reguliert die Replikationsgabeln (57–59). Die Überprüfung, ob die DNS erfolgreich repliziert wurde, findet im G<sub>2</sub>-*Checkpoint* statt. Der M-*Checkpoint* überprüft am Ende der Metaphase der Mitose eine regelrechte Anheftung der Kinetochore an den mitotischen Spindelapparat. Die Kinetochore sind aus DNS und Proteinen bestehende Komplexe und befinden sich an den Centromeren der Chromosomen (55).

Wenn die Kontrollpunkte Fehler registrieren, so wird der Zellzyklus angehalten, um eventuelle DNS-Schäden zu reparieren oder im Falle irreparabler Schäden die Apoptose einzuleiten (55). Eine Reparatur geschädigter DNS erfolgt durch eine direkte Reparatur, Basen-Exzisionsreparatur (BER), Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), Mismatch-Reparatur (MMR), NHEJ oder durch die homologe Rekombination (55,61). Tumorzellen bevorzugen NHEJ, um eine geschädigte DNS zu reparieren (2). Bei der BER, NER und der MMR kann die geschädigte Base bzw. das geschädigte Nukleotid, z. T. zusammen mit benachbarten Nukleotiden, herausgeschnitten werden. Um den DNS-Schaden zu beheben, kann die entstandene Lücke durch eine Polymerase wieder aufgefüllt werden und durch eine Ligase verschlossen werden. Mithilfe der NHEJ oder der homologen Rekombination können DNS-Doppelstrangbrüche (DSB) behoben werden (55,61,62). Bei der NHEJ werden zwei DNS-Fragmente wieder zusammengefügt, ohne dass, im Gegensatz zur homologen Rekombination, eine homologe DNS-Sequenz als Vorlage dient. Der Vorteil ist eine zügige Reparatur von DNS-Schäden. Eventuelle auftretende Deletionen, Insertionen oder Mutationen im Genom sind die Nachteile der NHEJ (55,62). Das Auftreten von Aberrationen, aufgrund einer fehlerhaften Reparatur, kann zu einer genomischen Instabilität in Tumorzellen führen, die ein Malignitätskriterium darstellt (63).

Die Entscheidung einen Kontrollpunkt zu passieren, wird über intrazelluläre Wachstumsfaktoren, Cycline und CDKs gesteuert. Es ist eine exakte Regulation der Cyclin/CDK-Komplexe für einen geordneten Ablauf des Zellzyklus notwendig. Die Aktivität der CDKs wird sowohl über die Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Ubiquitinierung von Cyclinen als auch durch spezifische CDK-Inhibitoren (CKI) wie *inhibitor of kinase 4* (INK4) oder *cyclin inhibitor protein/kinase inhibitor protein* (CIP/KIP) gesteuert (55). Weitere Regulatoren sind die CDK-aktivierende Kinase (CAK), die subzelluläre Lokalisation und die transkriptionelle Regulation der CKIs durch den Transkriptionsfaktor p53. Eine Inaktivierung der CDKs findet sich häufig in *neoplastischen* Zellen (Tumorzellen). Diese haben auch die Eigenschaft, dass die Zellzykluskontrolle und Steuerung von Wachstumsfaktoren verloren gegangen ist. Der Zellzyklus wird nicht mehr physiologisch kontrolliert (55,62). Die Tumorzellen teilen sich autonom und die Dauer eines Zellzyklus ist in der Regel im Vergleich zu physiologischen (gesunden) Zellen verändert (64). Die Überwachungen an den Kontrollpunkten sind

daher von großer Notwendigkeit, damit fehlerhafte Zellen oder geschädigte DNS sich nicht replizieren können. Eine fehlerhafte Kontrolle an den *Checkpoints* kann daher zur Karzinogenese (Tumorentstehung) beitragen (65).

## 1.8. Signalweg von *MYCN* und seine Bedeutung für das Neuroblastom

Das Proto-Onkogen *MYCN* befindet sich auf Chromosom 2 und trägt zu einer Vergrößerung des Neuroblastoms bei (5,6). *MYCN* ist in mehreren neonatalen Geweben in geringen Konzentrationen vorhanden. Besonders häufig wird es im *Metencephalon* (Hinterhirn) exprimiert (50). Es ist an der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum, dem Energiestoffwechsel und der *Apoptose* (Zelltod) von Neuroblastom-Zellen beteiligt und dient als wichtigster genetischer Marker für eine schlechte Prognose (7,8). Zudem koordinieren *MYC*-Proteine die DNS-Replikation und den Zellzyklus (66). *MYC*-Proteine führen zu einem erhöhten Replikationsstress, der zu einer Aktivierung der DNS-Schadensantwort führen kann (29). Es ergaben sich Hinweise darauf, dass *MYCN* Neuroblastomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose sensibilisieren kann (2). Die Proto-Onkogene *MYCN* und *MYCC* können zudem auch die CHK1-Transkription erhöhen (67). Daher ist die Untersuchung einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und CHK1-Inhibitoren bei *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen, wie es in dieser Arbeit beschrieben ist, besonders interessant.

Eine Überexpression des Proto-Onkogens MYCN wird im Wesentlichen von seinen Interaktionspartnern bestimmt. Zu diesen Interaktionspartnern gehören glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3B), POU class 5 homeobox 1 (OCT4), aldehyde dehydrogenase 18 family member A1 (ALDH18A1), micro-ribonucleic acid (RNA) let-7, FBXW7 und CDK1/Cyclin B (68). Die Rezeptortyrosinkinase ALK aktiviert Akt kinase (AKT) über eine Aktivierung von PI3K. AKT kann über eine Hemmung des Tumorsuppressorproteins GSK3β das Proto-Onkogen MYCN exprimieren. Eine Hemmung von GSK3β kann auch über MYCN opposite strand (NCYM) erfolgen (68). MYCN induziert wiederum die Expression von NCYM (positive Rückkopplung) und high mobility group AT-hook 1 (HMGA1). OCT4 und ALDH18A1 bilden ebenfalls eine positive Rückkopplungsschleife für die Expression von MYCN. Durch MYCN induziertes HMGA1 inhibiert die Expression der Tumorsuppressorproteine p53 und NUMB endocytic adaptor protein (NUMB), was eine symmetrische Zellteilung in MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen zur Folge hat (68). Der Abbau von MYCN oder eine Überexpression des Tumorsuppressorproteins tripartite motif containing 32 (TRIM32) führt zu einer asymmetrischen Zellteilung in Neuroblastomzellen. Hierbei entstehen in einer einzigen Zellteilung zwei verschiedene Zellen. Es ist ein Merkmal für die Heterogenität von

Tumorzellen (68). Des Weiteren kann *lin-28 homolog B* (LIN28B) die Micro-RNA let-7 inhibieren und trägt somit ebenfalls zur Überexpression des Proto-Onkogens *MYCN* bei. Dadurch kann auch die Überexpression von AURKA begünstigt werden, was wiederum zur Überexpression von *MYCN* beiträgt und die FBXW7-abhängige MYCN-Ubiquitinierung inhibiert, die ebenfalls eine symmetrische Zellteilung des Neuroblastoms zur Folge hat (68). Ein Mangel an CDK1/Cyclin B trägt ebenfalls zu einer Überexpression von *MYCN* bei, da eine durch TRIM32 induzierte Ubiquitinierung von *MYCN* ausbleibt. TRIM32 wird durch CDK1/Cyclin B an die Spindelpole während der Metaphase rekrutiert und kann somit *MYCN* ubiquitinieren bzw. abbauen (68).

Eine kanzerogene Aktivität des Proto-Onkogens *MYCN* kann durch genetische Veränderungen entstehen, wie bspw. eine Genamplifikation oder eine Chromosomen-Aberration. Sie kann aber auch durch Aktivierung mitogener Signalwege, z. B. *sonic hedgehog signaling molecule* (SHH), entstehen. Der SHH-Signalweg konnte in Medulloblastomzellen PI3K aktivieren, was wiederum über AKT GSK3 $\beta$  inhibieren konnte und somit eine Überexpression des Proto-Onkogens *MYCN* induzierte. Die Signalwege PI3K/AKT/MTOR und die Proteine WNT und *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ), für die ein Zusammenhang mit *MYCN*, eine Inhibierung durch Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  und somit eine tumorauslösende Aktivität in Erwägung gezogen wird, werden derzeit genauer untersucht (48,50). Eine umfassende Untersuchung dieser Signalwege im Zusammenhang mit dem Neuroblastom ist daher besonders interessant.

Es konnte gezeigt werden, dass mehrere onkogene Proteine an einer Überexpression des Proto-Onkogens *MYCN* beteiligt sind (50,68). Als therapeutisches Ziel zur Behandlung des Neuroblastoms ist *MYCN* besonders interessant. Allerdings fehlen jedoch den MYC-Proteinen in ihrer Struktur funktionelle Domänen, wodurch sich ein direktes, therapeutisches Vorgehen gegen *MYCN* als besonders schwierig ereignet. Aufgrund des komplexen Signalweges des Proto-Onkogens *MYCN* ist es schwierig, onkogene Effektorwege für eine präzise medikamentöse Therapie zu definieren. Die gezielte Therapie des Proto-Onkogens *MYCN* stellt eine große Herausforderung dar (50,68).

## 1.9. Die Rolle von CHK1 in der DNS-Schadensantwort

Die Serin/Threonin-Kinasen CHK1 und CHK2 stellen eine Schlüsselkomponente der DNS-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) dar. Ein wichtiges Ziel der CHK1 als Bestandteil der DNS-Schadensantwort besteht darin, die Zelle vor übermäßigem Replikationsstress zu schützen (69–71). Replikationsstress ist ein Zellzustand, bei dem die DNS-Replikationsgabel während der S-Phase in einen Stillstand arretiert (72). Dieser

Schutz wird gewährleistet, indem ATR/CHK1-Signalweg blockierte der Replikationsgabeln stabilisiert, die Zellzyklusprogression sowie das Feuern des Replikationsursprungs kontrolliert und die homologe Rekombination zur Reparatur geschädigter DNS z. B. aufgrund von DSB vermittelt. CHK1 kann einen Zellzyklusarrest (Unterbrechung des Zellzyklus) in der S-Phase oder G2-Phase herbeiführen und zeigt somit einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression und die DNS-Reparatur (siehe Abb. 2). Des Weiteren reguliert CHK1 Nukleasen, die zur Regulation der Replikation beitragen (70,71). CHK1 kann mit diversen Proteinen, die an der Replikation beteiligt sind, Komplexe eingehen. Zu diesen Proteinen zählt bspw. das proliferating cell nuclear antigen (PCNA), ein wichtiger Cofaktor der DNS-Polymerase δ (56,73,74). ATR kann CHK1 am Chromatin phosphorylieren und somit aktivieren, wenn insbesondere Einzelstrangbrüche (SSB) oder blockierte Replikationsgabeln vorliegen (siehe Abb. 2). Besonders in der S-Phase und G2-Phase ist ATR aktiv (56,71). Replikationsstress kann ATR aktivieren (75). Im Falle eines Vorliegens von DSB, folgt in der Regel eine Aktivierung des ATM serine/threonine kinase (ATM)/CHK2-Signalweges (siehe Abb. 2), der einen Zellzyklusarrest am G<sub>1</sub>/S-Phasenübergang und G<sub>2</sub>/M-Phasenübergang oder eine Apoptose induzieren kann (56,69,71). Die DSB stellen die schwerste Form der DNS-Schädigung dar (76).

Aktiviertes CHK1 kann die Phosphatase cell divison cycle 25 A (CDC25A) über eine Phosphorylierung inhibieren (siehe Abb. 2), was wiederum Cyclin/CDK-Komplexe (bspw. Cyclin D/CDK 4/6) inaktiviert (55,71). Dadurch wird ein Zellzyklusarrest in der S-Phase oder G2-Phase induziert und die Zelle kann, in dieser Zeit der Arretierung (Unterbrechung), ihre DNS-Schäden reparieren. Des Weiteren kann CHK1 Effektoren phosphorylieren, die an der Regulierung der Transkription und der Veränderung des Energieverbrauchs beteiligt sind (56,71). Eine Aktivierung von CHK1 kann somit zum Überleben von Tumorzellen beitragen, da sie ihre DNS-Schäden über Reparatur-Mechanismen wie bspw. die homologe Rekombination oder NHEJ reparieren können (71). Zudem kann eine Aktivierung von CHK1 auch eine Therapieresistenz von DNSschädigenden, therapeutischen Maßnahmen bewirken (71). Eine solche Therapie-Resistenz wurde in vorherigen Untersuchungen in der Strahlentherapie und bei den histone deacetylase inhibitors (HDAC-Inhibitoren) zur Behandlung des Multiplen Myeloms nachgewiesen (56). Zudem konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, die eine erhöhte CHK1 Expression aufzeigen, aufgrund von Therapieresistenzen und des Schutzes vor Replikationsstress Überlebensvorteile haben (56). Durch diese Überlebensvorteile können CHK1 exprimierende Tumorzellen im Tumorgewebe dominieren, was die Entstehung von Therapieresistenzen sowie evtl. Rezidive

begünstigt und die Malignität des Tumors erhöht. Dies ist ein starkes Argument dafür, CHK1 in der onkologischen Therapie zu inhibieren und CHK1-Inhibitoren genauer zu untersuchen (56).

Eine Inhibition von CHK1 hat eine Aktivierung des CDC25A zur Folge, welches wiederum die Cyclin/CDK-Komplexe aktiviert, wodurch die Zelle in die nachfolgende Zellzyklusphase übertreten kann. Dies kann zu einer weiteren DNS-Synthese und somit zur Mitose geschädigter DNS führen (71). Eine CHK1-Inhibition resultiert in einer unangemessenen Zellzyklusprogression, einer erhöhten Konzentration an CDC25A, einer verstärkten Aktivierung von cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) und CDK2 und somit einer mitotischen Katastrophe, die durch eine anormale Segregation (Trennung) der Chromosomen gekennzeichnet ist. Dadurch entstehen mehrere Mikrokerne (71). Unvollständig duplizierte DNS kann aufgrund des Fehlens des CHK1-gesteuerten G2/M-Kontrollpunkts vorzeitig die Mitose durchlaufen. Beim Vorliegen irreparabler DNS-Schäden wird somit die Apoptose induziert. Dieser Vorgang beschreibt eine mitotische Katastrophe (56). Aufgrund irreparabler DNS-Schäden z. B. durch DSB, können hohe p53-Konzentrationen die Expression pro-apoptotischer Proteine wie bspw. BCL2 associated X (BAX) und p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) sowie eine Expression der Todesrezeptoren Fas cell surface death receptor (FAS) und TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-receptor-2 (TRAILR2) induzieren, die eine Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der Apoptose bewirken. Im Gegensatz dazu kann bei einem Verlust von p53, das bei Tumorzellen häufig vorkommt, der CHK1-Signalweg verstärkt genutzt werden, um das Überleben maligner Tumorzellen zu sichern (55,77). Nicht nur CHK1-Inhibitoren führen als Monotherapeutikum zu einer mitotischen Katastrophe, sondern auch ATR-Inhibitoren (70). Es wird vermutet, dass eine Kombination aus beiden Inhibitoren zu umfangreichen DNS-Schäden und somit zu einer Replikationskatastrophe führen könnte (70). Eine Apoptose wird ebenfalls über eine Dysregulation der Nukleasen bei einer CHK1-Hemmung herbeigeführt, da neue Schäden an der DNS hervorgerufen werden. Eine Verabreichung von CHK1-Inhibitoren sollte am besten zu einem Zeitpunkt erfolgen, in dem möglichst viele Zellen in der S-Phase arretieren (verweilen) (71).

LY2603618 (*Rabusertib*) war der erste selektive und potente CHK1-Inhibitor, dessen Piperidin-Anteil durch ein Morpholin ersetzt wurde, wodurch das Auftreten der durch CHK1-Inhibitoren hervorgerufenen Kardiotoxizität reduziert werden konnte (70). Zudem gilt LY2603618 (*Rabusertib*) als spezifischster CHK1-Inhibitor (78). Dies stellten Argumente dar, warum in dieser Arbeit LY2603618 als CHK1-Inhibitor verwendet wurde. Jedoch brachten jüngere klinische Studien, in Bezug auf das *non-small-cell* lung *cancer* 

(NSCLC), keine vielversprechenden Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit von LY2603618 (70). In vergangenen Studien konnte LY2603618 weder eine Aufhebung des G<sub>2</sub>-Checkpoints noch eine Verstärkung der durch Cisplatin, Doxorubicin oder Etoposid induzierten Apoptose in Neuroblastomzellen der Hochrisikogruppe bewirken (79). Die Behandlung führte zu einer erheblichen Verminderung der CDK1-Gesamtmenge. Der CHK1-Inhibitor CCT244747 zeigte jedoch eine antitumorale Wirkung in Bezug auf das *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom (70).

Klassische Chemotherapeutika führen zu einer toxischen Akkumulation (Anhäufung) von Replikationsstress und wirken insbesondere auf Zellen. die eine hohe Zellproliferationsrate aufzeigen, welche nicht nur auf maligne Zellen beschränkt ist. So kann dies zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, die insbesondere das stark proliferierende Gewebe des Gastrointestinaltraktes und der Medulla ossis (Knochenmark) betreffen. Eine gezielte Hemmung von Proteinen der DNS-Schadensantwort könnte theoretisch für Tumorzellen besonders tödlich und für gesunde, physiologische Zellen weniger toxisch sein. CHK1-Inhibitoren stellen im Vergleich zu den klassischen Chemotherapeutika einen neuartigen therapeutischen potenziell breiteren therapeutischen Fenster Ansatz mit einem dar (72). Nebenwirkungen einer CHK1-Inhibition sind Kardiotoxizität und eine Entwicklungsstörung des blutbildenden Systems (70), (71). CHK1-Inhibitoren werden präklinischen und klinischen Studien bei einer Vielzahl von aktuell in Tumorerkrankungen getestet. Erste Studien berichten allerdings über Toxizität (80). Es wird vermutet, dass thromboembolische Ereignisse des CHK1-Inhibitors LY2603618 (Rabusertib) in Kombination mit Cisplatin auftreten können. In der Verwendung als Monotherapeutikum konnte keine erhöhte Anzahl an thromboembolischen Ereignissen festgestellt werden. Der Mechanismus ist derzeit noch nicht vollständig erforscht (81).

Die CHK1-Inhibition stellt ein spannendes Forschungsgebiet dar. Es gibt Rückschläge und Nachteile, aber auch Fortschritte und Vorteile, CHK1-Inhibitoren einzusetzen, bspw. in einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin. Die Frage ist, ob CHK1-Inhibitoren zukünftig in der onkologischen Klinik als Standardtherapie des Neuroblastoms oder anderer Tumorerkrankungen verwendet werden können und in die Behandlungs-Richtlinien aufgenommen werden können. Daher ist eine genaue Untersuchung der CHK1-Inhibitoren von großem Interesse.



Abbildung 2 Übersicht der DNS-Schadensantwort

In dieser Abbildung werden die wichtigsten Schritte der Signalkaskade in der DNS-Schadensantwort (DDR) veranschaulicht. MRN ist ein Enzymkomplex, der aus *MRE11 homolog, double strand break repair nuclease* (MRE11), *RAD50 double strand break repair protein* (RAD50) und *Mre11 complex subunit Nbs1* (NBS1) besteht und als Sensor von DSB dient. Das *replication protein A* (RPA) bindet an SSB. Je nachdem welcher DNS-Schaden vorliegt wird entweder der ATM- oder ATR-Signalweg aktiviert. Die Signalkaskade wird durch Phosphorylierungsreaktionen betrieben, an deren Ende je nach Typ und Schwere des Schadens eine Apoptose, ein Zellzyklusarrest, eine Seneszenz (Einstellung der Zellteilung) oder eine DNS-Reparatur (BER bei SSB und homologe Rekombination bei DSB) eingeleitet wird. (Abkürzungen: DSB = DNS-Doppelstrangbrüche, SSB = DNS-Einzelstrangbrüche, BER = Basen-Exzisions-Reparatur, ATM = *ATM serine/threonine kinase*, ATR = *ATR serine/threonine kinase*, CHK1 = Checkpoint-Kinase 1, CHK2 = Checkpoint-Kinase 2, p53 = Tumorsuppressorprotein, CDC25A = *cell divison cycle 25 A*), modifiziert nach Sulli et al. 2012 und Roos et al. 2013 (82,83)

# 1.10. Die Bedeutung der PARP-Inhibition in Neuroblastomzellen

Mittlerweile sind *Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-*(PARP)-Inhibitoren, wie bspw. Olaparib (*Lynparza*), schon in den Behandlungsrichtlinien des Ovarialkarzinoms aufgenommen worden und werden standardmäßig in der Post-Konsolidierungstherapie nach einer Operation oder Chemotherapie eingesetzt (84). Olaparib wurde zudem von der *European Medicines Agency* (EMA) auch als Monotherapeutikum für die Post-Konsolidierungstherapie von platinsensitiven, rezidiviertem und *BRCA1/2*-mutierten Tubenkarzinom und Peritonealkarzinom zugelassen (85). PARPs sind multifunktionale Enzyme, die an der Reparatur von SSB und der Basen-Exzisionsreparatur (BER)
beteiligt sind, indem sie an X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) binden und es an die Stelle des DNS-Schadens rekrutieren (85-87). XRCC1 kann während der BER eine toxische Bindung von PARP1 an die SSB verhindern und zu einer zügigen Reparatur der SSB beitragen. Der genaue Mechanismus ist derzeit Bestandteil der Forschungen (88). Des Weiteren ist PARP1 auch an der NHEJ beteiligt (86,89). Es ergab sich der Hinweis darauf, dass eine hohe PARP1-Expression eine schlechte Prognose des Neuroblastoms aufzeigt. Das deutet darauf hin, dass PARP1 einen potenziellen, bisher unbekannten Prognosefaktor darstellt (90). PARP1 und PARP2 sind zudem an der Poly-Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung (Parylierung) beteiligt. Die Parylierung stellt eine posttranslationale Modifikation von Proteinen dar, in der mehrere ADP-Ribose-Einheiten mithilfe des Beta-Nicotinamidadenindinukleotids (β-NAD<sup>+</sup>) auf Zielproteine übertragen werden können und reguliert wichtige zelluläre Funktionen, Transkription, den WNT-Signalweg, darunter die die Zellteilung die und Aufrechterhaltung von Telomeren (86,89). PARP1 kann bspw. Reparaturproteine parylieren, die an SSB und BER beteiligt sind. Eine Autoparylierung von PARP1 ermöglicht eine Dissoziation (Trennung) des PARP1 von der DNS (86,89).

Olaparib (Lynparza), früher AZD2281 genannt, ist ein oral applizierter PARP-Inhibitor. Dieses Medikament wirkt als kompetitiver Inhibitor von β-NAD<sup>+</sup> an der C-terminalen katalytischen Domäne von PARP1 und PARP2 und inhibiert deren Parylierungen. PARP1 und PARP2, die über ihren N-Terminus (Zinkfingerdomäne) an der DNS gebunden sind, werden über die Hemmung der Autoparylierungen aufgrund einer PARP-Inhibition an der Dissoziation der DNS gehindert (sog. "PARP trapping"). Eine Hemmung des BER infolge einer PARP-Inhibition führt zu einer Anhäufung von nicht reparierten SSB. Zudem verursachen die toxischen PARP-DNS-Komplexe innerhalb der Replikation (S-Phase) des Zellzyklus DSB (85,87,91). DSB werden in der Regel über die homologe Rekombination oder NHEJ repariert (siehe 1.7). Gene wie BRCA1 oder BRCA2 sind wichtige Komponenten dieser homologen Rekombination. Tumorzellen mit deletären Mutationen an BRCA1 oder BRCA2 sind nicht in der Lage, diese DSB über eine homologe Rekombination zu reparieren (84,85,87,92). Aufgrund des Verlustes der homologen Rekombination greifen diese Tumorzellen bevorzugt zur NHEJ, single strand annealing (SSA), microhomology-mediated end joining (MMEJ) oder bleiben unrepariert, wodurch eine genomische Instabilität in diesen Tumorzellen resultiert. Die Folge ist eine gesteigerte Anzahl mitotischer Katastrophen und Apoptosen. Die Inhibition der PARP-Aktivität und der Verlust der homologen Rekombination aufgrund BRCA1/2-Mutationen führt zu einer synthetischen Letalität der Tumorzellen (84,85,87,92). Synthetische Letalität beschreibt das Phänomen, das durch das gleichzeitige Auftreten von zwei genetischen Ereignissen definiert ist, die ausschließlich in Kombination einen Zelltod auslösen (85). Eine Voraussetzung für den Behandlungs-Erfolg von PARP-Inhibitoren ist der Nachweis von Mutationen an *BRCA1/2* (29,92).

Tumorzellen, die eine geschädigte DNS-Schadensantwort besitzen, sind besonders empfindlich gegenüber einer PARP-Inhibition (93). Die dadurch resultierende Apoptose führt zu einer Regression (Rückbildung) des Tumors. Der Einsatz von Olaparib beim Mammakarzinom und Prostatakarzinom zeigte ebenfalls eine gute Wirksamkeit (29,92). Eine Aufnahme in die aktuelle Leitlinientherapie steht bei diesen Tumorerkrankungen noch aus. Ein eindeutiger Patientennutzen wird derzeit durch klinische Studien untersucht. Aufgrund der Verhinderung der PARP-vermittelten DNS-Reparatur durch PARP-Inhibitoren, wie bspw. Olaparib, sind sie nicht nur als Monotherapeutikum wirksam, sondern auch als Radiosensibilisator oder Chemosensibilisator, insbesondere in einer Kombinationsbehandlung mit Alkylatoren oder Platinanaloga (29,92). Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit eine Kombinationsbehandlung mit Cisplatin untersucht. Präklinische Studien über die Wirksamkeit von Olaparib auf Neuroblastomzellen konnten eine Zytotoxizität auf Neuroblastomzellen bestätigen (29,92). In anderen Versuchen hat die Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin/Carboplatin eine synergistische ("als Mitspieler wirkende") Toxizität bei BRCA1/2-defizienten Zelllinien des Ovarialkarzinoms und Mammakarzinoms gezeigt (85).

Die häufigsten Nebenwirkungen, die im Zusammenhang mit Olaparib auftreten, sind Müdigkeit, Nausea (Übelkeit) und Vomitus (Erbrechen) (85). Schwerwiegendere Nebenwirkungen sind seltener, aber häufig hämatologischer Natur. Die Anämie ("Blutarmut") und Nausea stellen die häufigsten Nebenwirkungen dar (93,94). Eine verstärkte Myelosuppression (Knochenmarksuppression) stellt eine häufige dosislimitierende Toxizität in der Kombinationsbehandlung dar, die erhebliche Dosisänderungen des PARP-Inhibitors und/oder des anderen zytotoxischen Wirkstoffs erfordert (85,95). Zu der dosislimitierenden Toxizität von Olaparib gehören auch Nebenwirkungen auf das zentrale Nervensystem, wie Kopfschmerzen, Schwindel oder Dysgeusie (Geschmacksstörungen). Die Inzidenz schwerer hämatologischer Toxizität war in den klinischen Studien sehr unterschiedlich. Schwere Neutropenien (Verminderung der neutrophilen Granulozyten im Blut) traten in Kombinations-Behandlungen häufiger auf, was darauf hindeutet, dass eine Kombinationsbehandlung die chemotherapiebedingte Toxizität verstärken könnte. Eine seltene schwerwiegende Komplikation stellt das Myelodysplastische Syndrom (MDS) dar, aus dem sich eine akute

25

myeloische Leukämie (AML) entwickeln kann, die für den Patienten letal (tödlich) verlaufen kann (85,95).

Außer den Nebenwirkungen stellt die Resistenz von Tumorzellen gegen die PARP-Inhibition ein weiteres Problem dar. Der häufigste erworbene Mechanismus der Resistenz *BRCA1/2*-mutierter Tumorzellen gegen PARP-Inhibitoren ist eine intragenische Mutation der *BRCA1/2*-Gene, wodurch die regelrechte Funktion von *BRCA1/2* wiederhergestellt wird. Diese Resistenz wurde bei *BRCA1/2*-mutierten Tumorzellen festgestellt, die *in-vitro* einem Selektionsdruck von PARP-Inhibition und Cisplatin ausgesetzt waren (96). Daher ist dieser Resistenzmechanismus für Patienten mit *BRCA1/2*-Mutation und einer Therapie mit Platinderivaten von großer klinischer Relevanz (96). Die Zahl der Resistenzen dürfte bei einem vermehrten therapeutischen Einsatz von PARP-Inhibitoren ansteigen. Die Unterdrückung des PI3K/AKT-Signalweges in Kombination mit PARP-Inhibitoren stellt einen derzeitigen, strategischen Schwerpunkt zur Überwindung der PARP-Resistenz beim Ovarialkarzinom dar (97).

Die Frage, ob Olaparib als Monotherapeutikum oder in einer Kombinationsbehandlung mit Platinderivaten beim Neuroblastom eine zytotoxische Wirkung zeigt, war ein Bestandteil dieser Arbeit. Präklinische Versuche zeigten gute Ergebnisse, bezogen auf die Wirksamkeit einer PARP-Inhibition in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen (29,92). Eine *MYCN*-Amplifikation führt zu einem erhöhten Replikationsstress in Neuroblastomzellen. Dieser Replikationsstress wird durch eine PARP-Inhibition gesteigert, die in erhöhten DNS-Schäden und somit einer gesteigerten Apoptose resultieren (29,92).

Zusammenfassend zeigt auch der therapeutische Einsatz von PARP-Inhibitoren insgesamt sowohl Rückschläge und Nachteile als auch Fortschritte und Vorteile. Eine PARP-Inhibition allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika stellt dennoch eine potenzielle therapeutische Strategie für das Neuroblastom dar (29,92).

#### 1.11. Wirkweise und Stellenwert von Cisplatin in der Therapie des Neuroblastoms

Cisplatin [(*SP-4-2*)-*Diamminedichloridoplatin* (*II*)] ist seit Ende der 1970er Jahre eines der potentesten und am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika in der Medizin und wird neben dem Neuroblastom in diversen Tumorerkrankungen in der Regel in Kombination mit anderen Chemotherapeutika standardmäßig intravenös appliziert (98,99). Die Wirkungsweise von Cisplatin beruht auf einer Vernetzung mit den Purinbasen (Adenin und Guanin) der DNS, wodurch Reparaturmechanismen gestört

werden. Diese Störungen der Reparaturmechanismen können zu DNS-Schäden führen und die Apoptose induzieren (98,100). Cisplatin kann DSB hervorrufen (101).

Aus chemischer Sicht besteht Cisplatin aus einem doppelt geladenen Platinkation, das von vier Liganden umgeben ist, davon zwei Amin-Liganden auf der linken Seite und zwei Chlorid-Liganden auf der rechten Seite. Die Chlorid-Liganden können kovalente Bindungen mit den Purinbasen eingehen (98). Cisplatin gelangt dabei in die Zellen über Membrantransporter, wie der Kupfermembrantransporter high-affinity Cu transporter CTR1 (CTR1) und organic cation/carnitine transporter 2 (OCT2), und wird erst intrazellulär aktiviert, in dem Cisplatin in unterschiedlich geladene reaktive Spezies unter Einlagerung von entweder einem oder zwei Wassermolekülen hydrolisiert wird (98). Zu diesen Spezies gehören je nach Einlagerung monoaquatische [cis-(NH)PtCI(HO)]<sup>+</sup> und diaquatische [cis-(NH)Pt(HO)]<sup>2+</sup>- Formen, die ca. 1000-mal reaktiver im Vergleich zu nicht-hydrolisiertem Cisplatin sind (98). Aufgrund der höheren Chloridkonzentrationen im Blut wird Cisplatin extrazellulär nicht hydrolysiert (102). Die Chloridatome werden aufgrund der Einlagerung von Wassermolekülen verdrängt. Das hydrolysierte Cisplatin ist ein starkes Elektrophil (reaktionsanfälliges Kation) und bindet an das reaktive N7-Zentrum von Purinen, was zur Bildung von Quervernetzungen auf einem der beiden DNS-Stränge führt [sog. "deoxyribonucleic acid (DNA)-intrastrand-crosslinks"]. Zu diesen Quer-Vernetzungen zählen die 1,2-intrastrand-d(GpG)-adducts (Addukte zwischen zwei Guaninbasen), 1,2-intrastrand-d(ApG)-adducts (Addukte zwischen Adenin und Guanin) und 1,3-intrastrand-d(GpXpG)-adducts (Addukte zwischen zwei Guaninbasen, zwischen denen sich eine andere Base befindet). Die 1,2-intrastrandd(GpG)-adducts machen mit ca. 90 % den größten Anteil der kovalent gebundenen Addukte aus (98). Diese Quervernetzungen auf einem DNS-Strang, sowie Quervernetzungen zwischen beiden DNS-Strängen, tragen zur Toxizität von Cisplatin bei (98). Die Tertiärstruktur der DNS wird erheblich verändert und kann vom Protein high mobility group box 1 (HMGB1) erkannt werden (102,103). Es entstehen ternäre (aus drei Grundeinheiten bestehend) DNS-Platin(Pt)-HMGB1-Komplexe, die zur Blockade der Replikation und Transkription führen und einen Zellzyklusarrest herbeiführen können (102).

In der Zeit des Zellzyklusarrestes kann die Tumorzelle ihre DNS-Schäden reparieren (102). *DNA-intrastrand crosslinks* werden über NER repariert (83). Wenn die Reparatur misslingt, wird eine Apoptose induziert. Eine erfolgreiche Reparatur führt zu einer Resistenz (102). Auch über andere molekulare Wirkmechanismen, wie bspw. die Induktion des p53-Signalweges, die Herabregulierung von Proto-Onkogenen und anti-apoptotischen Proteinen oder die Aktivierung des JNK-Signalweges, zeigt Cisplatin

27

seine Wirksamkeit (98). Ein weiterer Mechanismus, der zur Toxizität von Cisplatin beiträgt, ist der oxidative Stress, der durch Cisplatin verursacht wird. Cisplatin induziert in Abhängigkeit von Dosis und Expositionsdauer reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die ebenfalls DNS-Schäden verursachen und zur Apoptose (extrinsischer und intrinsischer Weg) führen (98). Der Zelltod durch ROS kann auch aufgrund einer *Autophagie* (Verdauung eigener Bestandteile) in Lysosomen ausgelöst werden. Des Weiteren wirkt Cisplatin auch über eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) zytotoxisch, wodurch die Energieversorgung beeinträchtigt wird (98).

Es gibt jedoch Probleme in der therapeutischen Verwendung von Cisplatin. Zu diesen Problemen zählen die Nebenwirkungen und Resistenzmechanismen (99). Verantwortlich für die Cisplatin-Resistenzen sind u.a. eine Verringerung der intrazellulären *Akkumulation* in den Tumorzellen aufgrund von Störungen des Transportweges, eine Inaktivierung durch Glutathion und Metallothioneinen, eine erhöhte Reparatur von DNS-Schäden, Veränderungen des Methylierungsstatus der DNS und Überexpression von Chaperonen (99).

#### 1.12. Cisplatin-bedingte unerwünschte Arzneimittelreaktionen

Die Nebenwirkungen von Cisplatin sind zahlreich. Es gibt etwa 40 spezifische Arten der Toxizität von Cisplatin, von denen die Nephrotoxizität generell die häufigste ist (102). Die Nephrotoxizität entsteht aufgrund einer *Akkumulation* von Cisplatin im S-3 Segment des *proximalen Tubulus* und kann zu tubulären Schäden und zum akuten Nierenversagen führen (104). Bei jungen Patienten tritt ein akutes Nierenversagen allerdings selten auf (104). Eine Nephrotoxizität bei jungen Patienten äußert sich häufig in einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR), einer *Hypokaliämie* (Verringerung der Kalium-Konzentration im Blut), einer *Hypokalzämie* (Verringerung der Kalziumkonzentration im Blut) und einer *Hypomagnesiämie* (Verringerung der Magnesiumkonzentration im Blut) (104). Bei einer extremen Verringerung dieser Elektrolytkonzentrationen im Blut können Herzrhythmusstörungen und gesteigerte neuromuskuläre Hyperexzitabilität, wie Muskelkrämpfe oder Tetanie ("Pfötchenstellung" der Hände) auftreten (105,106).

Des Weiteren wirkt Cisplatin häufig auch ototoxisch (gehörschädigend), neurotoxisch (nervenschädigend), hepatotoxisch (leberschädigend) und kardiotoxisch (herzschädigend) (102). Insbesondere Kinder, die im Rahmen eines Neuroblastoms erkranken, neigen unter einer Cisplatin-Therapie zu Hörverlust. Die Ototoxizität hängt vom Alter und dem Geschlecht ab. Junge Patienten, die Kohorte (Personengruppe) des Neuroblastoms, sind anfälliger für Cisplatin-bedingte Hörschäden (102). Bei männlichen Patienten ist die Wahrscheinlichkeit ototoxischer Schäden größer als bei weiblichen

Patienten (102). Meistens treten bei jungen Patienten unter einer Cisplatin-Therapie ototoxische und nephrotoxische Schäden auf (107). Des Weiteren können bei jungen Patienten auch zentrale und periphere neurotoxische Symptome, sowie gastrointestinale und hämatologische Beschwerden auftreten (107). Die Ototoxizität von Cisplatin ist auf eine *Akkumulation* in der *Cochlea* (Hörschnecke) und somit einer Schädigung der äußeren Sinneshaarzellen zurückzuführen (108). Zu den ototoxischen Symptomen zählen Ohrenschmerzen, Taubheit und *Tinnitus* ("Ohrensausen"), wobei der *Tinnitus* nicht von der Schallreizweiterleitung abhängt (108). Ca. 90 % der Patienten, die eine Cisplatin-Therapie erhalten, entwickeln *Nausea*, *Vomitus* oder *Diarrhoen* (Durchfall) (102). Seltener treten sekundäre Malignome im Rahmen einer Cisplatin-Therapie auf (98,102).

Die Nebenwirkungen sorgen für eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität, die einer Verringerung der Medikamentendosis von Cisplatin oder einen Abbruch der Cisplatin-Therapie bedingen und somit den Behandlungserfolg einschränken können (98). Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen von Cisplatin und der besonderen, erhöhten Gefahr eines Hörverlustes bei jungen Patienten, ist die Erforschung einer besseren Kombinationstherapie mit dem Ziel einer Verminderung unerwünschter Arzneimittelreaktionen, die im Rahmen der Cisplatin-Therapie häufig auftreten, erforderlich.

#### 1.13. Cisplatin-bedingte Neurotoxizität

Aufgrund der Verwendung von hippocampalen Neuronen in dieser Arbeit wird hiermit ein spezieller Bezug auf die Neurotoxizität gelegt. Neurotoxizität ist eine dosislimitierende Nebenwirkung von Cisplatin und bewirkt überwiegend eine periphere sensorische Neuropathie, unter der ca. 30 % der Behandelten leiden (102). Eine periphere sensorische Neuropathie ist gekennzeichnet durch *Parästhesien* (Kribbeln), Taubheit, Nadelstiche, Schmerzen oder Brennen und tritt bevorzugt in den Fingern, Händen und Füßen auf. Ellbogen und Knie können ebenfalls betroffen sein. Bei einer erhöhten Exposition kann auch ein Verlust der Propriozeption (Tiefensensibilität) hervorgerufen werden, der in einem ataktischen Gang (Gangbild mit "stampfendem" Charakter) resultieren kann. Ein Befall von motorischen Neuronen findet in der Regel nicht statt (108). Die Symptomatik kann auch mehrere Monate nach Beendigung der Behandlung auftreten (sog. *coasting*). In seltenen Fällen kann auch ein Lhermitt'sches Phänomen auftreten, das mit der *Ventralflexion* (Beugung) des Halses beginnt und durch das Empfinden elektrischer Schocks von der Halswirbelsäule zu den oberen Extremitäten hinreichen kann (108).

29

Seltener treten zentralnervöse Nebenwirkungen auf, wie z. B. der Status epilepticus (langandauernder epileptischer Anfall > 5 min.), Koma oder Hemiparese (Lähmung einer Körperhälfte), da in der Regel Cisplatin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann (102,108,109). Mehrere Faktoren können die Integrität der Blut-Hirn-Schranke allerdings beeinträchtigen. Dazu zählen Hirntumore bzw. Hirnmetastasen, eine Kombinationsbehandlung von Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkung, hohe Dosen eines Chemotherapeutikums oder eine Chemotherapie-bedingte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (108). Die höchste Konzentration von Cisplatin weisen die Spinalganglien auf. Insbesondere die Dorsalwurzelganglien sind betroffen (102). Da dort keine Blut-Hirn-Schranke vorhanden ist, sondern ein großes fenestriertes Kapillarnetz einschließlich einer reduzierten Menge an entgiftendem Glutathion, kann Cisplatin leicht über die Membrantransporter CTR1 und OCT2 in die sensorischen Neurone eindringen und nicht nur an der DNS der Neuronen, sondern auch an die mitochondriale DNS binden (102,108). Infolgedessen entstehen DNS-Schäden, die zu einer Beeinträchtigung der Replikation und Transkription der DNS führen und somit einen Zellzyklusarrest herbeiführen, der wiederrum eine Kaskade von Signaltransduktionen auslöst und eine Apoptose einleiten kann (102). Es folgen zudem eine Störung des Energieversagen, Elektronenflusses auch ein an der Mitochondrienmembran und somit eine Überproduktion von ROS. Die Folge der mitochondrialen Dysfunktion ist eine Degeneration des axonalen Transportes (102). Axonaler Transport ist definiert als der Prozess, durch den im Neurosom gebildete Proteine durch das Zytoskelett zu den Nervenenden transportiert werden (110).

In Bezug auf hippocampale Neurone konnte Cisplatin eine Beeinträchtigung der Neurogenese von Dendriten sowie kognitiver Funktionen wie Lernen und Gedächtnisleistungen bewirken (111). Die bisherigen Erkenntnisse reichen für einen effektiven Wirkstoff zur Neuroprotektion und Behandlung Cisplatin-bedingter Neurotoxizität nicht aus (108). Mehrere Untersuchungen legen nahe, dass eine Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und anderen Chemotherapeutika zu einer Reduktion von Nebenwirkungen und Resistenzen, die durch eine Cisplatin-Therapie hervorgerufen werden können, beitragen kann (99). Daher ist eine Kombinations-Behandlung bspw. mit CHK1-Inhibitor oder PARP-Inhibitor, wie in dieser Arbeit beschrieben, von großem Interesse.

#### 1.14. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit besteht darin, die Auswirkungen von Cisplatin, einer CHK1-Inhibition und einer PARP-Inhibition auf Neuroblastomzellen zu erfassen und die Cisplatin-Einzelbehandlungen mit den Kombinationsbehandlungen aus Cisplatin und dem jeweiligen Inhibitor zu vergleichen. Hierbei sollte untersucht werden, ob die jeweilige Kombinationsbehandlung die Sensibilität der Neuroblastomzellen in-vitro auf eine Cisplatin-Therapie erhöhen kann. In der Klinik ist bisher kein deutlich effektiver Wirkstoff als protektive Prävention oder therapeutische Maßnahme der Cisplatin-bedingten Nebenwirkungen verfügbar. In dieser Arbeit wurden sowohl Cisplatin als auch CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) zur Inhibition der Checkpoint-Kinase 1 (CHK1) und PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) zur Inhibition der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) verwendet. Dabei dienten die MYCN-amplifizierte Neuroblastomzelllinie IMR-32 und die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, die nicht durch eine MYCN-Amplifikation gekennzeichnet ist, als Modell für die Tumorzellen, während primäre Zellen (hippocampale Neurone) aus Rattenembryonen ein Modell für das physiologische Nervengewebe darstellten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Inhibition von CHK1 oder PARP die Sensibilität der Neuroblastomzellen auf eine Cisplatin-Therapie erhöhen kann, wodurch die antitumorgen wirksame Konzentration von Cisplatin in-vitro vermindert werden kann und somit ein Grundstein gelegt wird, der im Rahmen der Neuroblastomtherapie eventuell Nebenwirkungen einschränken und den Behandlungs-Erfolg optimieren könnte.

#### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Materialien

#### Zelllinien

 Tabelle 7
 Übersicht der verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
IMR-32	DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
SH-SY5Y	DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

#### Chemotherapeutika

 Tabelle 8
 Übersicht der verwendeten Chemotherapeutika

Bezeichnung	Hersteller
CHK1-Inhibitor LY2603618 Rabusertib	Selleck Chemicals
Cisplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
Olaparib ( <i>Lynparza,</i> AZD2281)	Apexbio Technology LLC

#### Medien- und Medienzusätze

 Tabelle 9
 Übersicht der verwendeten Medien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller
B-27® Supplement (50X)	Thermo Fisher Scientific Inc.
DMEM	Sigma-Aldrich
Fetal calf serum (FCS)	Merck Millipore
Fungizone®	Thermo Fisher Scientific Inc.
HBSS (10 x) (-Ca/-Mg)	Thermo Fisher Scientific Inc.
HEPES (1 M)	Thermo Fisher Scientific Inc.
MEM Non-essential Amino Acid sol. (100x)	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Life Technologies
Neurobasal® Medium	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich
Wasser, steril filtriert	Sigma-Aldrich

#### Chemikalien

 Tabelle 10
 Übersicht der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Borax (di-Natriumtetraborat-10-hydrat)	Merck Millipore
Borsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck Millipore
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ethanol	Merck Millipore
Formaldehyd (37%)	Carl Roth GmbH und Co. KG
HCI	Carl Roth GmbH und Co. KG
Isopropanol	VWR International GmbH
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH und Co. KG
Methanol	VWR International GmbH
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA
NaCl	VWR International GmbH
Na-Resazurin	Sigma-Aldrich
NaOH	Merck KGaA
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH und Co. KG
Tris-HCI	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich

#### Lösungen und Puffer

Tabelle 11 Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Borat-Puffer	0,95 g Borax
	0,62 g Borsäure
	200 ml H <sub>2</sub> O
	pH 8,4; steril filtrieren
1x HBSS + 10 mM HEPES	$225 \mathrm{ml}\mathrm{H_2O}$
	25 ml 10x HBSS (-Ca/-Mg)
	2,53 ml 1 M HEPÈS
	pH 7,3, steril filtrieren

IMR-32 Medium	500 ml RPMI 1640 (88 %) +
	57,47 ml FCS (10 %) +
	5,75 ml MEM Non-Essential Amino Acid
	Solution 100x (1%) +
	5,75 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
NaCl/Pi-Puffer	154 mM NaCl
	$3,77 \text{ mM Na}_2 \text{HPO}_4$
	1,06 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
NB/B27	5,26 ml B-27 (2 %)
	2,63 ml Fungizone (1 %)
	2,63 ml Na-Pyruvat (1 %)
	250 ml Neurobasal Medium (95 %)
	2,63 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
NB/FCS	13,7 ml FCS (5 %)
	2,79 ml Fungizone (1 %)
	2,79 ml Na-Pyruvat (1 %)
	250 ml Neurobasal Medium (92 %)
	2,79 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
PBS (pH 7,4)	2,7 mM KCl
	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	137 mM NaCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
DRS high calt	2,7 mM KCl
r bo high sait	400 mM NaCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PRST	PBS
	0,3 % (v/v) Triton X-100
PDI -I ösung (Poly-D-I ysin)	10 ml Borat-Puffer
	100 mg Poly-D-Lysin steril filtrieren
Resazurin-NaCI/P-I ösung	9999 ml NaCl/P <sub>i</sub> -Puffer (99,9 %)
	1 ml Resazurin-Stocklösung (0,1 %)
Resazurin-Stocklösung	440 mM Na-Resazurin in
	Dimethylformamid
	500 ml DMEM (89 %) +
SH-SY5Y Medium	57,47 ml FCS (10 %) +
	5,75 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)

#### Verbrauchsmaterialien

 Tabelle 12
 Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
12-well-Platten	Greiner Bio-One International GmbH
60-mm-Platten	Greiner Bio-One International GmbH
96-well-Platten	Greiner Bio-One International GmbH
Deckgläser 18 x 18 mm	VWR International GmbH
EASYstrainer™-Zellsiebe	Greiner Bio-One International GmbH
Einfrierröhren Cryo.s™	Greiner Bio-One International GmbH

Falcon 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH
Filterspitzen 10 μl, 20 μl	Biozym Scientific GmbH
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab International GmbH
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Spritzen Braun Injekt 5 ml, 20 ml	B. Braun SE
Sterilfilter 0,2 µM, 0,45 µM	VWR International GmbH
Stepper Tips 20 µl, 100 µl	Eppendorf SE
Zellkulturflaschen 25 cm², 75 cm²	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturschalen Ø: 3,5 cm, 6 cm	Greiner Bio-One International GmbH

#### Primärantikörper

Tabelle 13Auflistung der Primärantikörper

Name	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-GFAP	Maus	Sigma-Aldrich	1 : 500
Anti-MAP2	Maus	Sigma-Aldrich	1 : 500

#### Sekundärantikörper

 Tabelle 14
 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Maus	Thermo Fisher Scientific, Inc.	1 : 500
Alexa Fluor® 555	Ziege anti-Maus	Thermo Fisher Scientific, Inc.	1 : 500

#### Enzyme

Tabelle 15Übersicht der verwendeten Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
DNase-freie RNase	Serva Electrophoresis GmbH
Trypsin-EDTA-Lösung 0,05 %	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	Sigma-Aldrich

#### Geräte

 Tabelle 16
 Übersicht der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG
Binokulares Mikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG
Binokulares Mikroskop Leica S8AP	Leica Microsystems
CO2-Inkubator Serie CB	Binder GmbH
Durchflusszytometer BD AccuriTM C6	Becton, Dickinson and Company
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH
Flockeneisbereiter SPR-80	NordCap®
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus
Heizblock Drybath System	Starlab International GmbH
Heizplatte/Magnetrührer Combimag Ret	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG
Kühlzentrifuge Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Laborschüttler SWIP SM25-C	Edmund Bühler GmbH
Mikroliterpipetten Pipetman classic 10 µl,	Gilson
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite 200®	Tecan Group AG
Mini-Zentrifuge	Neolab Migge GmbH
Multipette® M4	Eppendorf SE
Netzgerät PowerPac™ Basic Power	Bio-Rad™
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Thermomixer® compact	Eppendorf SE
Waage 3716MP	Sartorius AG
Wärme-/Trockenschrank-Inkubator	Memmert GmbH + Co. KG
Wasserbad W22	GK Sondermaschinenbau GmbH
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH & Co.
Multifuge™ X1	Thermo Fisher Scientific, Inc.

#### Software

Tabelle 17 Übersicht der verwendeten Computersoftwa
-----------------------------------------------------

Bezeichnung	Hersteller
BD Accuri™ C6	Becton, Dickinson and Company
CellSens Dimension	Olympus
GraphPad Prism 5.01	GraphPad
Microsoft Excel	Microsoft
Software ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD

#### Sonstige Materialien

 Tabelle 18
 Übersicht weiterer verwendeter Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Augenschere	nopa instruments Medizintechnik GmbH
Glasflaschen	Schott AG
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand GmbH und Co.
KG lsofluran	AbbVie
Nagellack (Acryl, klar)	Trend it up (DM)
Öl Immersion Oil Type-F	Olympus
Vectashield®	Vector Laboratories
Wistar-Ratten	Janvier Labs
Zellzähler	Infactory

#### Herstellernachweise

Tabelle 19 Übersicht der Herstellerhauptsitze

Hersteller	Sitz
AbbVie	North Chicago, Illinois, USA
B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Binder GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland	
DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)	Braunschweig, Deutschland	
Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland	
Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland	
Gilson	Middleton, Wisconsin, USA	
GK Sondermaschinenbau GmbH	Arnsdorf, Deutschland	
GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA	
Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich	
IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland	
Janvier Labs	Le Genest-Saint-Isle, Pays de la Loire, Frankreich	
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland	
Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland	
Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, USA	
Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, Deutschland	
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland	
Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA	
Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA	
Neolab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland	
nopa instruments Medizintechnik GmbH	Tuttlingen, Deutschland	
NordCap®	Bremen, Deutschland	
Olympus	Shinjuku, Japan	
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Peqlab Biotechnologie GmbH	
Lauda-Königshofen, Deutschland	Erlangen, Deutschland	
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland	
Sartorius AG	Göttingen, Deutschland	
Schott AG	Mainz, Deutschland	
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland	
Selleck Chemicals LCC	Houston, Texas, USA	
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	
Starlab International GmbH	Hamburg, Deutschland	
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz	
Teva Pharmaceutical Industries Ltd.	Petach Tikwa, Israel	
	Heusten Taxas USA	

Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA
Vector Laboratories	Burlingame, Kalifornien, USA

#### 2.2. Kultivierung der Neuroblastomzelllinien

Eine Zellkultivierung fand sowohl mit zwei humanen Neuroblastomzelllinien (siehe Tabelle 7) als auch mit primären Zellen (hippocampale Neurone) statt, die aus Rattenembryonen präpariert wurden. Die Kultivierung der beiden Neuroblastomzelllinien IMR-32 (*DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) und SH-SY5Y (*DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) wurde bei einer gleichmäßigen Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % in einem Wärmeschrankinkubator durchgeführt. Die Kultivierung der *MYCN*-amplifizierten Zelllinie IMR-32 wurde im Zellkulturmedium, entwickelt am *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), durchgeführt. Die nicht *MYCN*-amplifizierte Zelllinie SH-SY5Y wurde dagegen in *Dulbeccos's modified Eagle's minimal essential medium* (DMEM) kultiviert (siehe Tabelle 9) (112). Beide Zellkulturmedien enthielten jeweils 20 % fetales Kälberserum *fetal calf serum* (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Neuroblastomzellinie IMR-32 wurde zusätzlich mit nicht essenziellen Aminosäuren in Kultur gehalten (*1 x MEM Non-Essential Amino Acid*).

Nach einer 48 h Inkubation im Wärmeschrankinkubator und der anschließenden Einschätzung der Zelldichte in einem binokularen Mikroskop erfolgte die Aussaat beider Neuroblastomzelllinien aus den Kulturflaschen. Hierbei wurden die Neuroblastomzellen nach Entwicklung eines ausreichenden Zellrasen von 70–80 % einmalig mit 2 ml *phosphate buffered saline* (PBS) gespült, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Neuroblastomzellen mittels 2 min. Inkubation mit 0,05 % Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) abgelöst und mit dem entsprechenden Medium mithilfe einer Glaspipette in ein Probenröhrchen überführt und gemischt. Nach einer Zählung der Zellzahl in der Zählkammer Neubauer-Improved wurden die entsprechend ausgerechneten Zellzahlen (5000 Zellen/*well* und 10 000 Zellen/*well*) in den jeweiligen Kavitäten der Mikrotiterplatte (96-*well*-Platte) ausgesät. Die Aussaat beider Neuroblastomzellinien für die Durchführung der Behandlungen mit Chemotherapeutika fand 24 h vor Versuchsbeginn der Behandlungen statt. Zudem wurde auch parallel zur Aussaat ein Teil dieser Neuroblastomzellen für eine erneute Kultivierung und eine weitere zukünftige Verwendung in unbenutzte Kulturflaschen überführt.

#### 2.3. Präparation primärer Zellen (hippocampale Neurone) aus Rattenembryonen

Die notwendige Hirnentnahme aus E18-Embryonen erfolgte unter Beachtung der zum Zeitpunkt der Versuche geltenden tierschutzrechtlichen Regelungen der Organ-Entnahme unter dem Aktenzeichen 015/13. Es wurde eine tragende Wistar-Ratte in einem großen Glasbehälter inklusive Deckel mit 2 ml des volatilen Anästhetikums Isofluran betäubt und danach mittels Genickbruch getötet (113). Anschließend wurde das Abdomen der Wistar-Ratte mit 70 %igem Ethanol ausreichend benetzt und zügig mit Schere und Skalpell eröffnet. Die E18-Embryonen wurden aus dem *Uterus* und dem *Amnion* (Fruchtblase) herauspräpariert, gezählt und dekapitiert. Anschließend wurden die Köpfe in eine Zellkulturschale mit HBSS-Puffer überführt.

Es folgte eine Präparation der *Hippocampi* aus den Köpfen der Rattenembryonen. Dabei wurde zunächst der Kopf fixiert, indem mit einer kleinen Pinzette in die Augen des Embryos gestochen wurde. Anschließend wurde mit einer kleinen Schere okzipital in einem 45° Winkel ins Cerebellum geschnitten und vorsichtig das *Enzephalon* (Gehirn) herausgeschoben und in eine frische Zellkulturschale mit HBSS-Puffer überführt. Es folgte eine Resektion der *Meningen* (Hirnhäute) und Trennung der *Cortices* (Großhirnrinde) vom *Truncus encephali* (Hirnstamm) mittels einer kleinen Pinzette unter einem binokularen Mikroskop. Mithilfe einer Augenschere wurden die beiden *Hippocampi* eines Kopfes, ein *Hippocampus* pro Hemisphäre, aus dem *Cortex* (*Hirnrinde*) herauspräpariert und in eine frische Zellkulturschale mit HBSS-Puffer überführt und auf Flockeneis gelegt. Nach der Präparation folgte die Kultivierung der hippocampalen Neurone (siehe 2.4). Die Präparation wurde zügig und präzise durchgeführt, um eine möglichst hohe Zellausbeute zu gewinnen.

#### 2.4. Kultivierung der primären Zellen (hippocampale Neurone)

Die hippocampalen Neurone aus der Präparation der Rattenembryonen wurden ebenfalls bei einer gleichmäßigen Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Nach Abschluss der Präparation aus E18-Embryonen (siehe 2.3), wurden die *Hippocampi* in einer 0,05 %igen Trypsin-Lösung überführt und für 5 min. bei einer Temperatur von 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die *Hippocampi* mit 5 ml des NB/FCS-Mediums aus der Trypsin-Lösung entnommen und in ein Probenröhrchen überführt. Nach der natürlichen Sedimentation der *Hippocampi* (keine Zentrifugation) wurde vorsichtig das Medium abgenommen und 5 ml frisches NB/FCS-Medium dazugegeben. Der Vorgang der Sedimentation, die Abnahme des überstehenden NB/FCS-Mediums, sowie die Zugabe des frischen NB/FCS-Mediums

40

wurden zweimal wiederholt. Beim letzten Mal wurden lediglich 2 ml NB/FCS-Medium zu den *Hippocampi* dazugegeben.

Zur Vereinzelung der hippocampalen Neurone erfolgte eine mehrmalige Titruation mit verödeten Pasteurpipetten. Anschließend wurde nur so viel NB/FCS-Medium dazugegeben, bis das Gesamtvolumen 5 ml betrug. Danach wurden die hippocampalen Neurone vorsichtig gemischt und durch ein EASYstrainer™-Zellsieb gesiebt, um gröbere Gewebereste oder Zellklumpen zu entfernen. Zudem wurde eine 1:5-Verdünnung hergestellt (20 µl Zellsuspension, 20 µl Trypanblau, 60 µl NB/FCS), bevor mithilfe der Zählkammer Neubauer-Improved die Zellen gezählt wurden. Anschließend wurden die entsprechenden Zellzahlen der Zellsuspension (172000 Zellen/well) ermittelt. Die Verwendung von Trypanblau zur Zellzählung dient der Bestimmung der Zellviabilität, da die Substanz ausschließlich von geschädigten Zellen und nicht von intakten Zellen aufgenommen wird (114). Nach der Zellzählung wurden die entsprechend ausgerechneten Zellzahlen der Zellsuspension auf die mit Poly-D-Lysin-(PDL)beschichteten Deckgläschen in den entsprechenden Kavitäten der 12-well-Platte ausgesät. Das PDL ist ein chemisch synthetisiertes Polymer, das aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen eine Zelladhäsion der Neuronen an den Deckgläschen begünstigt und das Wachstum der Neuriten fördert (115).

Nach einer Inkubation von 2–4 h bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % im Wärmeschrankinkubator erfolgte ein Mediumwechsel in 72 h vorgepuffertes NB/B27 Medium. Ein erneuter Wechsel des NB/B27 Mediums wurde nach einer Woche durchgeführt. Die hippocampalen Neurone wurden nach einer insgesamt 2-wöchigen Inkubationszeit im Wärmeschrankinkubator und nach mikroskopischer Einschätzung der Zelldichte mit Cisplatin, einem CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) und einem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) für je 72 h behandelt. Auch bei den hippocampalen Neuronen wurden sowohl Einzelbehandlungen als auch Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin durchgeführt.

#### 2.5. Alamar Blue Assay

Der Alamar Blue Assay dient zur Bestimmung der Zellviabilität beispielsweise nach Behandlung mit Chemotherapeutika oder anderen zytotoxischen Substanzen. Dieses Verfahren eignet sich auch für die Proliferationsanalysen. Metabolisch aktive Zellen resorbieren dabei blaues, nicht fluoreszierendes Resazurin und metabolisieren es in ihren Mitochondrien zu pinkfarbenem, fluoreszierendem Resorufin (siehe Abb. 3). Dabei korrelieren die Zellviabilität, die Zytotoxizität und die mitochondriale Aktivität beziehungsweise die metabolische Aktivität mit der Reduktionsrate des Resazurins. Die Stoffe Resazurin und Resorufin sind im Rahmen der Inkubationszeit von 90 min., die im Alamar Blue Assay verwendet wird, für Zellen nicht toxisch (116,117). Zellen, die durch zytotoxische Substanzen geschädigt wurden, haben eine verminderte metabolische Aktivität oder sind zum Messzeitpunkt bereits apoptotisch und können demnach weniger Resazurin in Resorufin reduzieren, was wiederum in einer verminderten emittierten Fluoreszenz gemessen werden kann (118). Eine erniedrigte Zellviabilität im Alamar Blue Assay kann durch eine Apoptose, Proliferationshemmung oder einem Zellzyklusarrest bedingt sein (119).



Resazurin



Reduktion des Resazurins unter Oxidation des Reduktionsmittels Nicotinamid-Adenindinukleotid(phosphat) (NAD(P))H<sup>+</sup> zu fluoreszierendem Resorufin und NAD(P)<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O. Die in der Abbildung dargestellte Redoxreaktion wurde selbständig unter Heranziehung von www.ChemSpider.com (Zugriffsdatum 29.11.22) erstellt, modifiziert nach Lavogina et al. 2022 (120)

Die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y wurden jeweils einer Behandlungszeit von 24 h und 72 h mit Cisplatin ausgesetzt. Des Weiteren wurden in anderen Experimenten beide Neuroblastomzelllinien mit einem CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) für 72 h und einem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) für 72 h behandelt, sowohl als Einzelbehandlung als auch als Kombinationsbehandlung mit Cisplatin. Für die Proliferationsanalysen der Neuroblastomzellen, in denen zum Vergleich eine Behandlung mit Chemotherapeutika ausblieb, wurde je ein Alamar Blue Assay nach 24 h, 48 h, und 72 h angefertigt.

Bei der Durchführung eines Alamar Blue Assays wurde eine Resazurin-NaCI/Pi-Lösung (440 µM) hergestellt, indem die Resazurin-Stocklösung im Verhältnis 1:1000 mit NaCl/Pi-Puffer verdünnt wurde. Diese Resazurin-NaCI/Pi-Lösung (440 µM) wurde zur Herstellung einer Resazurin-Arbeitslösung (44 µM) im Verhältnis 1:10 mit DMEM verdünnt. Nach Ablauf der Behandlungszeiten mit den verwendeten Chemotherapeutika (siehe Tabelle 8) wurde zur Bestimmung der Zellviabilität jede Kavität (well) der

Mikrotiterplatte (96-*well*-Platte) abgesaugt und 100 µl der Resazurin-Arbeitslösung (44 µM) hinzugegeben. Dabei musste beachtet werden, dass lediglich der flüssige Überstand und nicht die Zellen auf dem Grund der Kavitäten der Mikrotiterplatte (96-*well*-Platte) abgesaugt wurden. Die Inkubationszeit der Resazurin-Arbeitslösung (44 µM) betrug 90 min. und wurde im Wärmeschrankinkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % durchgeführt. Zudem wurde bei jedem Experiment eine unbehandelte Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle bei LY2603618 und Olaparib) mitgeführt. Es wurde lediglich ein Mediumwechsel bei der unbehandelten Kontrolle (Kon) zum Behandlungszeitpunkt durchgeführt. Bei jedem *Alamar Blue Assay* wurden zusätzlich Blanks (Leerwerte, Kontroll-*wells*) mitgeführt, indem sich lediglich die Resazurin-Arbeitslösung (44 µM) befand. In der unbehandelten Kontrolle wurde die relative Zellviabilität für die Auswertung auf 100 % gesetzt. Mithilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite 200® wurde die emittierte Fluoreszenz gemessen (*Exzitation*: 535 nm; Emission: 590 nm, 5 Blitze, Integrationszeit: 20 µs) und anschließend die Hintergrundfluoreszenz der Blanks subtrahiert.

#### 2.6. Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung

Die Durchflusszytometrie *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, FACS) ist in der Regel ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen und Oberflächenmolekülen (121–123). Das methodische Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Erfassung einer emittierenden Fluoreszenz, die durch eine Markierung ("Färbung") von Proteinen und Oberflächenmolekülen hervorgerufen wird, nachdem diese markierten Proteine oder Oberflächenmoleküle einzeln einen Laserstrahl passieren. Die Markierung erfolgt dabei unter der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern. Durch diese Methode können in relativ kurzer Zeit große Zellpopulationen erfasst werden (121–123). Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde der DNS-Gehalt der Neuroblastom-Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y in den jeweiligen Zellzyklusphasen gemessen.

Der Zellzyklus besteht aus der M-Phase und der anschließenden Interphase, die sich in die G1-, S-, und G2-Phase untergliedert (siehe Abb. 1) (55). Des Weiteren existieren noch eine SubG1-Fraktion und eine G0-Phase, in der die Zellen ruhen und sich nicht mehr vermehren (55,60). Die SubG1-Fraktion ist gekennzeichnet durch fragmentierte apoptotische Zellen mit degradierter DNS (60). In apoptotischen Zellen liegt ein inkompletter Chromosomensatz vor, da spezifische Endonukleasen eine Chromatin-Spaltung und somit eine Degradierung der DNS verursachen. Der DNS-Gehalt der SubG1-Population ist mithilfe der Durchflusszytometrie nachweisbar (60). Nach

43

Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika oder anderen zytotoxischen Substanzen kann der DNS-Gehalt der SubG1-Fraktion ansteigen (siehe Abb. 9 B) (60).

Nachdem eine entsprechende Umrechnung und Zellzählung für 650 000 Zellen pro 60mm-Platte erfolgt war, wurden beide Neuroblastomzelllinien für die durchflusszytometrische Bestimmung auf 60-mm-Platten ausgesät. Im Anschluss einer Inkubationszeit von 24 h im Wärmeschrankinkubator, bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %, wurde die Zelldichte in einem binokularen Mikroskop eingeschätzt. Bei einem ausreichend bedecktem Zellrasen von 70-80 % wurden beide Neuroblastomzelllinien mit 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 25  $\mu$ M Cisplatin-Verdünnungen für 24 h behandelt. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen und in ein Probenröhrchen überführt. In dem Medium befanden sich die apoptotischen Zellen (SubG1-Population). Zudem wurden aber auch die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y auf dem Grund der 60-mm-Platten mit Trypsin/EDTA abgelöst und ebenfalls in das Probenröhrchen überführt. Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wurden im Gegensatz zu den Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 vor der Behandlung mit Trypsin einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Probenröhrchen 5 min. mithilfe der Kühlzentrifuge Megafuge 16R zentrifugiert (reduzierte Bremse, 300 x g, 4 °C), der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min. zentrifugiert (reduzierte Bremse, 300 x g, 4 °C). Nach erneutem Absaugen des Überstands wurden die Zellen zum Schluss mit 100 µl PBS resuspendiert und die Proben auf Flockeneis gestellt. Hierbei wurde eine 1000 µl Pipettenspitze verwendet, um die Zellen nicht aufgrund der größeren Scherkräfte bei Verwendung kleinerer Pipettenspitzen zusätzlich zu belasten. Zuletzt wurden die Neuroblastomzellen in den Proben aufgrund der Zugabe von Ethanol permeabilisiert ("durchdringbar gemacht") und fixiert (124,125). Hierbei wurde mithilfe eines Vortex unter dauerhaft, langsamem Mischen tropfenweise 2 ml 80 % Ethanol (-20 °C) dazugegeben. Im Anschluss wurden die Proben für maximal 2 Wochen bei -20 °C gelagert.

Am Tag der durchflusszytometrischen Bestimmung wurden die Proben für 10 min. in der Zentrifuge Heraeus <sup>™</sup> Multifuge <sup>™</sup> X1 zentrifugiert (reduzierte Bremse, 500 x g, 4 °C), der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 133 µl PBS + 1 µl Ribonuklease A (RNase A) (1 mg/ml) (siehe Tabelle 15) zunächst resuspendiert und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die RNase A katalysiert als Endonuklease die Transphosphorylierung und Zersetzung der Ribonukleinsäuren (RNS), in dem es an mehreren Bindungsstellen der Polynukleotidkette bindet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zu jeder Probe 367 µl Propidiumiodid (PI) (50 µg/ml)

44

hinzugegeben und anschließend für 15-20 min. lichtgeschützt auf Flockeneis inkubiert. PI bindet sowohl an die RNS als auch an die DNS. Die RNase A bewirkt innerhalb der Inkubationszeit eine Entfernung der RNS und ist somit zur Quantifizierung des DNS-Gehaltes unerlässlich (126,127). Der Fluoreszenzfarbstoff PI diffundiert dabei ausschließlich in spätapoptopische und nekrotische Zellen, da die Fähigkeit von PI, in eine Zelle einzudringen, von der Permeabilität der Zellmembran abhängt (128). Dabei interkaliert PI zwischen den Basen der DNS spätapoptotischer Zellen (129). PI wird bei Wellenlängen zwischen 400 und 600 nm angeregt und emittiert Licht in einer Wellenlänge zwischen 600 und 700 nm (121–123). Die durchflusszytometrische Messung wurde am Durchflusszytometer BD AccuriTM C6 durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung, ähnlich einer Perlenkette, an einem gebündelten, monochromatischen Laserstrahl vorbeigeleitet. Durch die Energie des Laserstrahls wurden die Elektronen des PI zunächst auf ein höheres Energieniveau angehoben. Unmittelbar nach dem Laserimpuls konnten die Elektronen des PI unter Abgabe von Energie, in Form von Photonen (Licht), auf ihr Ursprungniveau zurückkehren. Die Emission der Photonen konnte mithilfe eines Photonendetektors, der im Durchflusszytometer integriert ist, gemessen werden. Dabei ist die emittierte Photonenkonzentration proportional zur Menge an PI gebundener DNS (121-123,126,130). Die nachfolgende Analyse der Zellzyklusverteilung fand mithilfe der BD Accuri™ C6 Software statt.

#### 2.7. Immunzytochemische Bestimmung der Zellausbeute der primären Zellen (hippocampale Neurone)

Zur immunzytochemischen Bestimmung zum Nachweis hippocampaler Neurone der Zellausbeute nach Präparation wurde zuerst eine Fixation der Neurone durchgeführt, die auf PDL-beschichteten Deckgläschen ausgesät wurden. Hierbei wurde das NB/B27 Medium vorsichtig abgesaugt und die Neurone auf den Deckgläschen einmalig mit 4 ml PBS gewaschen, um die Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Neurone auf den Deckgläschen mit 4 ml 4 %iger Formaldehyd/PBS-Lösung (15 min., RT) fixiert. Dabei wurde die Lösung vor jeder Durchführung frisch angesetzt und auf RT gebracht. Folglich wurde die 4 %ige Formaldehyd/PBS-Lösung 3 x für je 5 min. mit PBS entfernt und die Zellmembran der Neurone im Anschluss für eine Dauer von 20 min. mit -20 °C kaltem Methanol permeabilisiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach abgeschlossener Fixation wurden die Zellen wieder mit PBS gespült, um das Methanol zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Blockade unspezifischer Antigenbindungsstellen mithilfe von 5 %igem bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS mit 0,3 %igem Triton X-100 (PBST) (60 min, RT). Nach vollständiger Entfernung des

5 % igen BSA in PBST wurde 50 µl einer Antikörperlösung des Primärantikörpers Antimicrotubule associated protein 2 (MAP2) Maus (siehe Tabelle 13) in PBST (1:500) auf die Deckgläschen hinzugegeben und bis zum nächsten Tag bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Mikrotubuli assoziierte Protein MAP2 kommt in differenzierten Neuronen vor und dient als Zytoskelettregulator an neuronalen Dendriten. Daher eignete es sich hervorragend als spezifischer somatodendritischer Marker differenzierter Neuronen (131,132). Im Anschluss an die Markierung mit dem Primärantikörper Anti-MAP2 Maus (siehe Tabelle 13) folgten mehrere Waschschritte mit PBS (2 x 5 min, RT), PBS high salt (2 min, RT) und PBST (5 min, RT), bevor eine Inkubation im Dunkeln (1 h, RT) mit 50 µl des Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpers Alexa Fluor® 555 (siehe Tabelle 14) in PBST (1:500) auf die Deckgläschen hinzugegeben wurde. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten im Dunkeln. Nach erneutem 3-maligem Waschen mit PBS für je 5 min. und dem anschließenden 2-maligem kurzzeitigen Spülen mit PBST wurden die Deckgläschen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Vectashield® eingedeckt, mit Nagellack (Acryl, klar) luftdicht verschlossen und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Das DAPI diente dabei als Gegenfärbemittel der doppelsträngigen DNS, um die Nuclei (Zellkerne) der primären Zellen (hippocampale Neurone) in blauer Farbe darzustellen. DAPI wird im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von ca. 300-400 nm angeregt und emittiert im Bereich von ca. 450 nm. Dadurch entstand eine blaufarbige Fluoreszenz (127). In einem anderen Versuch wurde als Primärantikörper Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) Maus (siehe Tabelle 13) und als Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 (siehe Tabelle 14) verwendet. Die Arbeitsschritte unterschieden sich hierbei nicht im Vergleich mit dem Versuch zur Verwendung des Primärantikörpers Anti-MAP2 Maus und des Sekundärantikörpers Alexa Fluor® 555. Das saure Gliafaserprotein GFAP ist ein bedeutendes Intermediärfilamentprotein in reifen Astrozyten und diente daher als spezifischer Marker der Neuroglia (133,134). Mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software cellSens Dimension wurde die mikroskopische Auswertung durchgeführt.

#### 2.8. Statistische Auswertung

Mithilfe der Software Microsoft Excel und der Software GraphPad Prism 5.01 erfolgten die statistischen Auswertungen, indem das jeweilige arithmetische Mittel, die Standardabweichungen und die Standardfehler der Versuche berechnet wurden. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde unter der Verwendung der Software GraphPad Prism 5.01 eine unparametrisch einfache Varianzanalyse *one-way analysis of variance* (*ANOVA*) mit *Tukey's post hoc multiple comparison test* durchgeführt. Hierbei wurden p-Werte ≤ 0,05 als statistisch signifikant angesehen. Es erfolgten statistische Analysen zwischen der jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppe und der entsprechend behandelten Gruppe. Zudem wurden auch statistische Analysen bei Kombinationsbehandlungen zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen durchgeführt. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001. Eine Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede von behandelten Proben zwischen beiden Neuroblastomzelllinien erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: # = p ≤ 0,05; ## = p ≤ 0,01;

#### 3. Ergebnisse

## 3.1. Wachstumsverhalten der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y

Es wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche humane Neuroblastomzelllinien für die Versuche herangezogen, um die Aussagekraft zu erhöhen und um die Auswirkungen der Chemotherapeutika auf Neuroblastomzellen, mit und ohne Amplifikation des Proto-Onkogens MYCN, zu charakterisieren. Die verwendete Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigt eine Amplifikation des Proto-Onkogens MYCN, während die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen keine Amplifikation des Proto-Onkogens MYCN aufzeigten (112). Aufgrund der MYCN-Amplifikation stellt die Neuroblastomzelllinie IMR-32 ein Modell für die Hochrisikogruppe dar. Die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen können in Abhängigkeit mehrerer Faktoren jeder der drei risikoangepassten Behandlungsgruppen zugeordnet werden (siehe Tabelle 5). Es wurde bei beiden Neuroblastomzelllinien die Zellviabilität bestimmt, sowie mittels Durchflusszytometrie nach der Behandlung mit Cisplatin der Zellzyklus analysiert. Zudem wurde auch die Zellviabilität nach Behandlung sowohl mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) als auch mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) untersucht. Zusätzlich wurde auch geprüft, ob die Zellviabilität beider Neuroblastomzelllinien sich sowohl durch eine Kombinationsbehandlung mit Cisplatin einem CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) als auch durch eine und Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und einem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin verändert.

Zu Beginn wurden die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien ausgesät, ihre Zellzahl bestimmt und ihr Wachstumsverhalten charakterisiert, indem jeweils nach 24 h, 48 h, und 72 h die Zelldichte unter einem binokularen Mikroskop eingeschätzt wurde. Es wurden Proliferationsanalysen durchgeführt, in denen eine Behandlung mit Chemotherapeutika ausblieb, um das Wachstum und die Vermehrung der Neuroblastomzellen zu charakterisieren. Hierbei erfolgten zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens Zellviabilitätsmessungen jeweils am Tag der Aussaat, nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Ergebnisse dieser Zellviabilitätsmessungen nach einer Wachstumszeit von 48 h und 72 h wurden auf die Ergebnisse der Proliferationsanalysen nach einer Zellviabilität gemessen werden kann, aber die in den Untersuchungen dieser Arbeit zu messende Proliferation der Zellen am Tag der Aussaat beginnt.

Die beiden Neuroblastomzelllinien zeigten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten (siehe Abb. 4 A). Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigten nach einer

Aussaat von 5000 Zellen eine Verdopplungszeit von 62 h und nach einer Aussaat von 10 000 Zellen keine Verdopplung in einem Zeitfenster von 72 h. Nach einer Aussaat von 5000 Zellen zeigten die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y eine Verdopplungszeit von 48 h und bei einer Zellzahl von 10000 Zellen nach Aussaat eine Verdopplungszeit von 53 h (siehe Abb. 4 A). Die IMR-32-Neuroblastomzellen zeigten im Vergleich zu den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen, entgegen den Herstellerangaben, im Mittel ein langsameres Wachstum. Die Ergebnisse der Proliferationsanalysen für die Neuroblastomzelllinie IMR-32 sind nach einer Aussaat von 5000 Zellen bei einer Wachstumszeit (Proliferationszeit) von 48 h nicht signifikant unterschiedlich zur Proliferationszeit von 24 h, nach einer Wachstumszeit von 72 h jedoch signifikant (siehe Abb. 4 A). Bei einer Zellzahl von 10 000 Zellen nach Aussaat sind die Ergebnisse nach beiden Proliferationszeiten im Vergleich zur Proliferationszeit von 24 h signifikant. Die Ergebnisse der Proliferationsanalysen für die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y sind nach einer Aussaat von 5000 Zellen für beide Wachstumszeiten im Vergleich zur Proliferationszeit von 24 h signifikant. Bei einer Zellzahl von 10 000 Zellen nach Aussaat sind die Ergebnisse nach beiden Proliferationszeiten ebenfalls signifikant. Aufgrund des langsamen Zellwachstums beider Neuroblastomzelllinien, sowie einer verminderten Zelldichte in der mikroskopischen Beurteilung und der größeren Standardabweichung der Neuroblastomzelllinie IMR-32 nach einer Aussaat von 5000 Zellen im Vergleich zu einer Aussaat von 10000 Zellen, wurde die Entscheidung getroffen, für die Behandlungen mit den verwendeten Chemotherapeutika eine Zellzahl von 10 000 Zellen pro well auf der Mikrotiterplatte (96-well-Platte) auszusäen.

Α





В

IMR-32

SH-SY5Y





72 h



24 h

72 h

Abbildung 4 Wachstumsverhalten der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y

Es erfolgte eine Aussaat der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y in unterschiedlicher Zellzahl. Die mikroskopische Einschätzung des Zellrasens, sowie die Proliferationsanalysen erfolgten jeweils am Tag der Aussaat und nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Ergebnisse der Proliferationsanalysen nach einer Wachstumszeit von 48 h und 72 h wurden auf die Ergebnisse der Proliferationsanalysen nach einer Wachstumszeit von 24 h bezogen. Die Graphen der Proliferationsanalysen beginnen daher bei einer Wachstumszeit innerhalb von 24 h mit einer rel. Fluoreszenz ab dem Wert "Null".

A) Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung der Proliferationsanalysen (n = 2–4, N = 1). Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede im Vergleich zur Proliferationszeit von 24 h erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \* =  $p \le 0.05$ ; \*\* =  $p \le 0.01$ ; \*\*\* =  $p \le 0.001$ . (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

B) Exemplarische Darstellung repräsentativer Bilder beider Neuroblastomzelllinien nach 24 h und 72 h Wachstum (100-fache Vergrößerung) und einer Aussaat von 10 000 Zellen

## 3.2. Isolation und Identifizierung von primären Zellen (hippocampale Neurone) aus Rattenembryonen

Zur Untersuchung des Einflusses der Chemotherapeutika Cisplatin, CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) und PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) auf das physiologische Gewebe wurden primäre Zellen aus 18-Tage alten Rattenembryonen (Alter E18) präpariert. Es wurden als primäre Zellen, hippocampale Neurone präpariert, um eine eventuell neurotoxische (nervenschädigende) Wirkung der verwendeten Chemotherapeutika nach den Behandlungen zu erfassen. Die hippocampalen Neurone wurden insgesamt 2 Wochen lang nach der Präparation kultiviert, bevor diese, nach mikroskopischer Einschätzung der Zelldichte, mit den jeweiligen Chemotherapeutika behandelt wurden. Es wurden sowohl Einzelbehandlungen der jeweiligen Chemotherapeutika in verschiedenen Konzentrationen für einen Zeitraum von 72 h durchgeführt als auch Kombinationsbehandlungen der beiden Inhibitoren jeweils mit Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen für einen Zeitraum von 72 h.

#### **Hippocampale Neurone**



Am Tag der Präparation

1 Woche nach Präparation



#### 2 Wochen nach Präparation

### Abbildung 5 Kultivierung primärer Zellen (hippocampale Neurone) aus 18 Tage alten Rattenembryonen

Als Modell für das physiologische Nervengewebe wurden primäre Zellen (hippocampale Neurone) aus 18-Tage alten Rattenembryonen (Alter E18) präpariert und auf PDL (*Poly-D-Lysin*)beschichteten Deckgläschen (172 000 Zellen/*well*) in den entsprechenden Kavitäten der 12-*well*-Platte ausgesät. Nach einer 2-wöchigen Kultivierung erfolgten die Behandlungen mit den jeweiligen Chemotherapeutika. Diese Abbildung zeigt exemplarisch drei lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung), die das Wachstumsverhalten hippocampaler Neurone unmittelbar nach Präparation, nach 1 Woche und nach 2 Wochen aufzeigen. Erst nach einer 2wöchigen Kultivierung zeigten die hippocampalen Neurone eine morphologische Differenzierung.

Bei der Kultivierung der hippocampalen Neurone war die Anzucht einer Zellkultur, die ausschließlich aus hippocampalen Neuronen besteht, nicht möglich gewesen. Es befanden sich in der Kultur der hippocampalen Neurone nach der Präparation auch Zellen der Neuroglia, die für die nervale Funktion hippocampaler Neurone wichtige Supportivfunktionen übernehmen. Zu den Zellen der Neuroglia, die im Hippocampus vorkommen, gehören überwiegend Astrozyten und Oligodendrozyten (135). Zur Identifizierung der hippocampalen Neurone und zum Nachweis der Zellausbeute der hippocampalen Neurone nach Präparation, wurden immunzytochemische Bestimmungen (siehe Abb. 6) durchgeführt, mit Hilfe derer der Anteil der hippocampalen Neurone an den Gesamtzellen bestimmt wurde. Hierbei wurden drei unabhängige immunzytochemische Bestimmungen mit dem Primärantikörper Anti-MAP2 Maus und als Vergleich eine immunzytochemische Bestimmung mit dem Primärantikörper Anti-GFAP Maus durchgeführt (siehe Abb. 6). Mit dem Primärantikörper Anti-MAP2 Maus wird spezifisch das Mikrotubuli assoziierte Protein (MAP2) markiert, das in differenzierten Neuronen vorkommt und als Zytoskelettregulator an neuronalen Dendriten fungiert (131,132). Der Primärantikörper Anti-GFAP Maus markiert das saure Gliafaserprotein GFAP. Es ist ein bedeutendes Intermediärfilamentprotein in reifen Astrozyten und dient daher als spezifischer Marker der Neuroglia (133,134). Es wurde

Alexa Fluor® 555 als Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper nach Verwendung des Primärantikörpers Anti-MAP2 Maus herangezogen. Nach Verwendung des Primär-Antikörpers Anti-GFAP Maus wurde der Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 verwendet. Um die Zellkerne der primären Zellen (hippocampale Neurone) darzustellen, wurde die DNS mit DAPI gefärbt. Mithilfe des Fluoreszenz-Mikroskops BX43 und der Software cellSens Dimension erfolgte die mikroskopische Auswertung.

Bei der Kultivierung der hippocampalen Neurone waren insgesamt 82 % MAP2-positiv. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil MAP2-positiver Zellen in den Kulturen der hippocampalen Neurone 82 % beträgt. Des Weiteren war eine Kultur der hippocampalen Neurone zu 27 % GFAP-positiv. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil an *Neuroglia* in dieser Kultur aus hippocampalen Neuronen mind. 27 % beträgt. Bei der Gesamtauswertung der insgesamt vier immunzytochemischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil der hippocampalen Neurone nach der Präparation und einer 2-wöchigen Kultivierung insgesamt 80 % betrug. Mithilfe der immunzytochemischen Bestimmungen konnte somit nachgewiesen werden, dass die für die Versuchsdurchführungen verwendete Zellpopulation zum überwiegenden Teil aus hippocampalen Neuronen bestand.

Grünfarbige Darstellung der Neuroglia mittels Anti-GFAP und Alexa Fluor® 488



Orangefarbige Darstellung differenzierter Neurone mittels Anti-MAP2 und Alexa Fluor® 555



# Abbildung 6 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung primärer Zellen (hippocampale Neurone) und Gliazellen nach Verwendung der entsprechenden Primärantikörper

Exemplarische Darstellung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (400-fache Vergrößerung). Die Zellkerne sind entsprechend der Färbung mit DAPI blaufarbig dargestellt. Der Zellkörper

differenzierter Neurone ist entsprechend der Fluoreszenz des Sekundärantikörpers Alexa Fluor® 555 orangefarbig dargestellt. Entsprechend der Fluoreszenz des Sekundärantikörpers Alexa Fluor® 488 ist die Neuroglia grünfarbig dargestellt. Es wurden hippocampale Neurone aus 18-Tage alten Rattenembryonen präpariert und 2 Wochen nach dem Aussäen in drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) mit dem Neuronen-spezifischen monoklonalen Primärantikörper Anti-MAP2 inkubiert. Zudem wurde auch ein Versuch (n = 1, N = 1) mit dem monoklonalen Primärantikörper Anti-GFAP durchgeführt. Der Antikörper Anti-MAP2 dient als spezifischer Marker differenzierter Neurone. Als spezifischer Marker für die Neuroglia wurde der Antikörper Anti-GFAP verwendet. Es wurde Alexa Fluor® 555 als Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper nach Verwendung des Primärantikörpers Anti-MAP2 herangezogen. Nach Verwendung des Primärantikörpers Anti-GFAP wurde der Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 verwendet. Im Anschluss wurden die Objektträger im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Pro Objektträger wurden 200 Zellkerne ausgewertet (insgesamt 800 Zellkerne). (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

#### 3.3. Cisplatin induziert eine dosis- und teilweise behandlungsdauerabhängige Reduktion der Zellviabilität in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y

Es wurden zur Evaluation des zytotoxischen Effektes des Chemotherapeutikums Cisplatin auf die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt (siehe Abb. 7 A/B) und im Anschluss die Zellviabilität mittels Tumorzellen Alamar Blue Assay bestimmt. Hierbei wurden die beider Neuroblastomzelllinien 24 h nach dem Aussäen über eine Behandlungsdauer von 24 h (siehe Abb. 7 A) und 72 h (siehe Abb. 7 B) mit Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Zellviabilitätsmessungen erfolgten jeweils im Vergleich zu unbehandelten Neuroblastomzellen, die als Kontrollgruppen dienten. Mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt (siehe Abb. 8), die in Abhängigkeit der Behandlungsdosis die Zellviabilität der Neuroblastomzellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle aufzeigt.

Die Zelldichte beider Neuroblastomzelllinien ist anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen nach einer Behandlungsdauer von 24 h mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin leicht eingeschränkt. Morphologisch sind jedoch mit zunehmender Konzentration zum Teil kleine Tumorzellverbände aus zerstörten Tumorzellen mit vermindertem Zytoplasmagehalt erkennbar (siehe Abb. 7 A). Nach einer Behandlungs-Dauer von 72 h ist die Zelldichte beider Neuroblastomzelllinien anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin deutlich eingeschränkt (siehe Abb. 7 B). Anhand der Aufnahmen ist die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin bei beiden Neuroblastomzelllinien gestiegen. IMR-32 24 h Behandlung



Kon

Α





10 µM CisPt

25 µM CisPt





Kon

2 µM CisPt



IMR-32 72 h Behandlung



Kon

В

0,1 µM CisPt



0,2 µM CisPt

0,4 µM CisPt



1μM CisPt

2 µM CisPt



Die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/*well*) wurden 24 h nach der Aussaat für 24 h und 72 h mit Cisplatin (*CisPt*) behandelt. Im Anschluss der Behandlungen wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der Neuroblastomzellen angefertigt.

A) Exemplarische Darstellung lichtmikroskopischer Aufnahmen, die sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede beider Neuroblastomzelllinien nach einer 24 h Behandlung mit Cisplatin (*CisPt*) in den Konzentrationen von 2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 25  $\mu$ M aufzeigen. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Neuroblastomzellen (Kon) aufgeführt. Die Zelldichte beider Neuroblastomzelllinien ist anhand der Aufnahmen mit zunehmender Konzentration leicht eingeschränkt. Anhand der Aufnahmen ist zudem die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentration zum Teil kleine Tumorzellverbände aus zerstörten Tumorzellen mit vermindertem Zytoplasmagehalt erkennbar. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle)

B) Exemplarische Darstellung lichtmikroskopischer Aufnahmen, die sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede beider Neuroblastomzelllinien nach einer 72 h Behandlung mit Cisplatin (CisPt) in den Konzentrationen von 0,1 µM, 0.2 µM und 0,4 µM für die IMR-32-Neuroblastomzellen und 0,5 µM, 1 µM und 2 µM für die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen aufzeigen. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzellen aufgeführt. unbehandelten (Kon) Die Zelldichte beider Neuroblastomzelllinien ist anhand der Aufnahmen mit zunehmenden Konzentrationen deutlich eingeschränkt. Anhand der Aufnahmen ist zudem die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin bei beiden Neuroblastomzelllinien gestiegen. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle)

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Cisplatin als Teil der Induktions-Chemotherapie der Hochrisikogruppe des Neuroblastoms, die Zellviabilität beider Neuroblastomzelllinien in Abhängigkeit zur Konzentration und Behandlungszeit für bestimmte Konzentrationen zunehmend einschränkte (siehe Abb. 8) (9). Nach einer 24 h Behandlung mit Cisplatin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Neuroblastomzelllinien bzgl. der Zellviabilität festgestellt werden (siehe Tabelle 21). Beide Neuroblastomzelllinien zeigen hierbei einen ähnlichen Graphenverlauf, in denen eine Verringerung der Zellviabilität mit zunehmender Konzentration von Cisplatin erkennbar ist (siehe Abb. 8). Die Ergebnisse nach einer 24 h Behandlung mit Cisplatin waren für beide Neuroblastomzelllinien erst ab einer Konzentration von 2 µM signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 8). Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Neuroblastomzelllinien nach einer 72 h Behandlung in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 1 und 2 µM Cisplatin festgestellt werden. Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigen nach einer Behandlungszeit von 72 h eine höhere Sensibilität in diesen Konzentrationen als jene der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Bei den Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 waren in der 72 h Behandlung niedrigere Konzentrationen ausreichend, um die Zellviabilität zu vermindern. Cisplatin zeigt in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 1 und 2 µM eine höhere therapeutische Potenz bei Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32, die durch eine MYCN-Amplifikation gekennzeichnet ist (112).



Abbildung 8 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin.

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/*well*) 24 h nach der Aussaat für 24 h und 72 h mit Cisplatin (*CisPt*) behandelt. Im Anschluss wurde zur Zellviabilitätsmessung je ein *Alamar Blue Assay* durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus insgesamt sechs unabhängigen Versuchen (n = 6, N = 1) für die 24 h Behandlung und fünf unabhängigen Versuchen (n = 5, N = 1) für die 72 h Behandlung der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien. Der rotfarbige Graph stellt die Zellviabilität der IMR-32-Neuroblastomzellen dar. Die Zellviabilität der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wird durch den blaufarbigen Graphen dargestellt. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \*= p ≤ 0,00; \*\*/\*\* = p ≤ 0,01; \*\*\*/\*\*\* = p ≤ 0,001. Identische Signifikanzen beider Neuroblastomzelllinien werden zur Übersichtlichkeit durch schwarzfarbige Signifikanzsymbole ("Signifikanzsternchen") gekennzeichnet. Bei nicht identischen Signifikanzen beider Neuroblastomzelllinien kennzeichnen rotfarbige Signifikanzsymbole die Signifikanz der Neuroblastomzelllinie IMR-32 und blaufarbige Signifikanzsymbole die Signifikanz der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

Eine erhöhte therapeutische Potenz ist auch in den Inhibitory-Concentration-50 %(IC<sub>50</sub>)-Werten und inhibitory-concentration-80 %(IC<sub>80</sub>)-Werten erkennbar (siehe Abb. 8 und Tabelle 20). Diese IC-Werte beider Behandlungszeiten sind bei den Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 niedriger als bei den Tumorzellen der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y. Die Ergebnisse nach einer 72 h Behandlung mit Cisplatin waren für beide Neuroblastomzelllinien signifikant. Auch der Vergleich beider Behandlungszeiten je Neuroblastomzelllinie zeigte einen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität (siehe Tabelle 21). Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass die Zellviabilität nach einer 72 h Behandlung mit Cisplatin im Gegensatz zu einer 24 h Behandlung teilweise deutlich niedriger ausfiel. Die statistische Auswertung ergab für die Neuroblastomzelllinie IMR-32 einen signifikanten Unterschied beider Behandlungszeiten in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 1, 2, 5 und 10 µM Cisplatin (siehe Tabelle 21). In diesem Konzentrationsbereich von 0,1-10 µM Cisplatin zeigte sich für die Neuroblastomzelllinie IMR-32 eine behandlungsdauerabhängige Reduktion der Zellviabilität. In den Konzentrationen 25, 50 und 100 µM Cisplatin war dieser Unterschied für die Neuroblastomzelllinie IMR-32 nicht signifikant. Für die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ergab sich ein signifikanter Unterschied beider Behandlungszeiten in den Konzentrationen 1, 2, 5, 10 und 25 µM Cisplatin (siehe Tabelle 21).

Tabelle 20	Zytotoxischer Effekt von Cisplatin auf Neuroblastomzellen und primären
	Zellen (hippocampale Neurone)

CisPt	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	Zelltyp
24 h	6 µM	22 µM	IMR-32
	10 µM	26 µM	SH-SY5Y
72 h	0,2 μM	0,4 μM	IMR-32
	1 µM	2 µM	SH-SY5Y
	3 µM	16 µM	Primäre Zellen

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y 24 h nach der Aussaat für 24 h und 72 h mit Cisplatin (*CisPt*) behandelt und im Anschluss ihre Zellviabilität mithilfe des *Alamar Blue Assays* gemessen (siehe Abb. 8). Zudem wurden auch die primären Zellen (hippocampale Neurone) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit Cisplatin (*CisPt*) behandelt und im Anschluss ihre Zellviabilität mittels *Alamar Blue Assay* gemessen. In dieser Tabelle sind die IC<sub>50</sub>-Werte (*Inhibitory-Concentration-50*%) und die IC<sub>80</sub>-Werte (*Inhibitory-Concentration-80*%) der insgesamt sechs unabhängigen Versuche (n = 6, N = 1) für die Behandlungszeit von 24 h und der insgesamt fünf unabhängigen Versuche (n = 5, N = 1) für die Behandlungszeit von 72 h aufgelistet. Ebenfalls sind in dieser Tabelle zum Vergleich mit den hippocampalen Neuronen ihre
IC<sub>50</sub>-Werte und IC<sub>80</sub>-Werte der insgesamt drei unabhängigen Versuche (n = 3, N = 1) für die Behandlungszeit von 72 h aufgeführt. (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

Zusammenfassend führte das Chemotherapeutikum Cisplatin zu einem dosisabhängigen und teilweise (bei bestimmten Konzentrationen) behandlungsdauerabhängigen Zellviabilitätsverlust in Neuroblastomzellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation. Cisplatin zeigte nach einer 72 h Behandlung bei Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32, die durch eine *MYCN*-Amplifikation charakterisiert ist, im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y eine stärkere therapeutische Potenz in bestimmten Konzentrationen (112).

# Tabelle 21Übersicht der statistischen Auswertungen der Neuroblastomzellen nach<br/>Behandlung mit Cisplatin

IMR-32 + SH-SY5Y 24 h CisPt

Konzentration (µM)	0,1	0,5	1	2	5	10	25	50
Signifikanz	_	-	-	-	-	-	-	-

IMR-32 + SH-SY5Y 72 h CisPt

Konzentration (µM)	0,1	0,5	1	2	5	10	25	50
Signifikanz	***	***	***	***	_	-	_	-

#### IMR-32 24 h + 72 h CisPt

Konzentration (µM)	0,1	0,5	1	2	5	10	25	50
Signifikanz	*	***	***	***	***	***	_	_

SH-SY5Y 24 h + 72 h CisPt

Konzentration (µM)	0,1	0,5	1	2	5	10	25	50
Signifikanz	_	_	***	***	***	***	*	_

Es wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 je eine unparametrisch einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit *Tukey's post hoc multiple comparison test* durchgeführt. Dabei wurden für die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y jeweils die 24 h Behandlung und die 72 h Behandlung miteinander verglichen. Zudem wurden auch beide Neuroblastomzelllinien innerhalb der jeweiligen Behandlungszeit miteinander verglichen. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den jeweiligen Bedingungen (siehe Anzeige über den einzelnen tabellarischen Darstellungen) erfolgte für beide Neuroblastomzelllinien durch die Verwendung folgender Symbole: \* = p ≤ 0,05; \*\*\* = p ≤ 0,001; – = nicht signifikant).

# 3.4. Cisplatin induziert einen Arrest in der G1-Phase und S-Phase bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 sowie eine dosisabhängige Apoptose in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y

Eine erniedrigte Zellviabilität im *Alamar Blue Assay* kann durch eine Apoptose, eine Proliferationshemmung bzw. einen Zellzyklusarrest bedingt sein (119). Um dies genauer zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen (siehe Abb. 9 A/B) durchgeführt. Hierbei wurden relativ hohe äquimolare Konzentrationen (5 µM, 10 µM und 25 µm) von Cisplatin für beide Neuroblastomzelllinien verwendet, um den Anteil apoptotischer Neuroblastomzellen zu erfassen. Mit diesen Konzentrationen wurden die Tumorzellen bei beiden Neuroblastomzelllinien 24 h nach der Aussaat für einen Zeitraum von 24 h behandelt. Nach der Behandlungszeit wurde zur Analyse der Zellzyklusverteilung für jede Probe eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Proliferation wird in humanen Zellen, insbesondere in der G1-Phase des Zellzyklus, gesteuert. Eine Proliferationshemmung führt zu einer Verlängerung der Dauer der G1-Phase (136). Aufgrund eines Zellzyklusarrestes kann der Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase ansteigen, da die Zellen an dem Übergang in die nächste Zellzyklusphase gehindert werden (137). Die SubG1-Fraktion repräsentiert den Anteil an apoptotischen Zellen (60).

Die durchflusszytometrischen Analysen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Anstieg des DNS-Gehaltes in der in der SubG<sub>1</sub>-Fraktion (siehe Abb. 9 B). In der G<sub>1</sub>-Phase konnte jedoch ein signifikanter Anstieg des DNS-Gehaltes bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M Cisplatin festgestellt werden (siehe Abb. 9 B). Des Weiteren war auch ein signifikanter Anstieg des DNS-Gehaltes zur unbehandelten Kontrolle bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M Cisplatin in der S-Phase zu erkennen, der im Vergleich zum DNS-Gehalt bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M Cisplatin in der S-Phase zu erkennen, der im Vergleich zum DNS-Gehalt bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M Cisplatin signifikant abnahm. Sowohl im Vergleich zum DNS-Gehalt bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M Cisplatin nahm der DNS-Gehalt bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M Cisplatin ebenfalls signifikant ab (siehe Abb. 9 B). Zudem zeigten die durchflusszytometrischen Analysen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen signifikanten dosisunabhängigen Abfall des DNS-Gehaltes in der G<sub>2</sub>/M-Phase (siehe Abb. 9 B).

Die durchflusszytometrischen Analysen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg des DNS-Gehaltes in der SubG1-Fraktion (siehe Abb. 9 B). In der G1-Phase konnte im

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Abnahme des DNS-Gehaltes bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M Cisplatin nachgewiesen werden (siehe Abb. 9 B). Diese Abnahme des DNS-Gehaltes war im Vergleich zu einer Konzentration von 5  $\mu$ M Cisplatin ebenfalls signifikant. Die SubG<sub>1</sub>-Fraktion zeigt eine signifikante Zunahme nach einer 24 h Behandlung mit 25  $\mu$ M Cisplatin im Vergleich zur Behandlung mit 5  $\mu$ M Cisplatin (siehe Abb. 9 B). Der DNS-Gehalt in der S-Phase war nahezu konstant. Es konnte weder ein signifikanter Anstieg noch ein signifikanter Abfall erfasst werden. In der G<sub>2</sub>/M-Phase konnte ein signifikanter Abfall des DNS-Gehaltes im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen werden, der von der niedrigsten Konzentration (5  $\mu$ M) bis zur höchsten Konzentration (25  $\mu$ M) Cisplatin ebenfalls signifikant zur unbehandelten Kontrolle war (siehe Abb. 9 B).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Cisplatin einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase und S-Phase bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 sowie eine dosisabhängige Apoptose in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y induziert.



# Α







Abbildung 9 Analyse der Zellzyklusverteilung der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y mittels Durchflusszytometrie nach einer 24 h Behandlung mit Cisplatin

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (650 000 Zellen/60-mm-Platte) 24 h nach der Aussaat für 24 h mit den Konzentrationen (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 25  $\mu$ m) Cisplatin (*CisPt*) behandelt. Im Anschluss wurde zur Analyse der Zellzyklusverteilung jeweils eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die SubG1-Fraktion stellt den Anteil der apoptotischen Zellen dar.

В

A) Darstellung exemplarischer Bilder der Zellzyklusverteilung der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien nach einer 24 h Behandlung mit Cisplatin (*CisPt*). (Abkürzungen: Kon = unbehandelte Kontrolle, PI = Propidiumiodid)

B) Darstellungen der Auswertungen der SubG1-, G1-, S- und G2/M-Fraktionen der Zellzyklen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien jeweils nach einer 24 h Behandlung mit Cisplatin (*CisPt*). Es wurde jeweils der auf die unbehandelte Kontrolle (Kon) normalisierte Mittelwert ± Standardabweichung der zwei unabhängigen Versuche für die IMR-32-Neuroblastomzellen (n = 2, N = 2–3) und der drei unabhängigen Versuche für die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen (n = 3, N = 1–2) für die Auswertungen herangezogen. Die schwarzfarbigen Balken repräsentieren jeweils die unbehandelten Kontrollen (Kon). Die jeweiligen Behandlungen mit Cisplatin (*CisPt*) werden durch die graufarbigen Balken dargestellt. Eine Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole für beide Neuroblastomzelllinien: \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.5. Cisplatin induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in den primären Zellen (hippocampale Neurone)

Zur Evaluation des zytotoxischen Effektes des Chemotherapeutikums Cisplatin auf die primären Zellen (hippocampale Neurone), die ein Modell für das physiologische Nervengewebe darstellten, wurden ebenfalls lichtmikroskopische Aufnahmen der hippocampalen Neurone nach einer Behandlung mit Cisplatin angefertigt (siehe Abb. 10) und die Zellviabilität mittels Alamar Blue Assay bestimmt (siehe Abb. 11). Hierbei wurden die hippocampalen Neurone 2 Wochen nach dem Aussäen einer Behandlungszeit von 72 h mit Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Die Zellviabilitätsmessungen erfolgten jeweils im Vergleich zu unbehandelten hippocampalen Neuronen, die als Kontrollgruppen dienten. Die Dosis-Wirkungs-Kurve, die mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 erstellt wurde (siehe Abb. 11), zeigt in Abhängigkeit der Behandlungsdosis die Zellviabilität der hippocampalen Neurone in Prozent der unbehandelten Kontrolle auf.

Nach einer Behandlungsdauer von 72 h ist die Zelldichte der hippocampalen Neurone anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin eingeschränkt. Die Aufnahmen zeigen eine dosisabhängige Zunahme zerstörter Zellen, die apoptotisch scheinen. Morphologisch sind bei einer Konzentration von 20 µM Cisplatin eine Verringerung und Verkürzung der Zellausläufer, ein verminderter Zytoplasmagehalt in den *Perikaryen* (neuronale *Zytosomata*) sowie eine Zunahme kleiner, abgerundeter Zellhaufen (*cell membrane blebbing*) erkennbar (siehe Abb. 10).

## Hippocampale Neurone 72 h Behandlung



5 µM CisPt

20 µM CisPt

Abbildung 10 Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Cisplatin.

Die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/*well*) wurden 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit Cisplatin (*CisPt*) behandelt. Anschließend wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der hippocampalen Neurone angefertigt. Die exemplarisch dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der hippocampalen Neurone nach einer Behandlung mit Cisplatin in den Konzentrationen von 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 20  $\mu$ M. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Neuroblastomzellen (Kon) aufgeführt. Die Zelldichte der hippocampalen Neurone ist mit zunehmenden Konzentrationen eingeschränkt. Anhand der Aufnahmen ist zudem die Menge an hippocampalen Neuronen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin gestiegen. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle)

In den Zellviabilitätsmessungen konnte gezeigt werden, dass die Zellviabilität der hippocampalen Neurone, als Modell für das physiologische Nervengewebe, mit zunehmender Konzentration von Cisplatin abnahm. Diese Dosisabhängigkeit von Cisplatin ist auch in den IC<sub>50</sub>-Werten und IC<sub>80</sub>-Werten erkennbar (siehe Tabelle 20). Bei den Konzentrationen 1 und 2  $\mu$ M Cisplatin war dieser Verlust der Zellviabilität nicht signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 11). Die Konzentrationen 5, 10, 20 und 50  $\mu$ M Cisplatin zeigten dagegen einen signifikanten Zellviabilitätsverlust.

Zusammenfassend betrachtet, induzierte Cisplatin eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in hippocampalen Neuronen.



Abbildung 11 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Cisplatin.

Es wurden die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/well) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit Cisplatin (CisPt) behandelt. Anschließend wurde zur Zellviabilitätsmessung je ein Alamar Blue Assay durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, die auf 100 % Abbildung dargestellte normalisiert wurde. Der in dieser Graph zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus insgesamt drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) für die 72 h Behandlung. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \* =  $p \le 0.05$ ; \*\* =  $p \le 0.01$ . (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

## 3.6. CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y

Als Nächstes sollte der zytotoxische Effekt des Chemotherapeutikums CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) auf die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y evaluiert werden, um im Hinblick auf die darauffolgenden Kombinationsbehandlungen die Wirksamkeit einer CHK1-Inhibition zu erfassen. Hierbei wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit LY2603618 angefertigt (siehe Abb. 12) und anschließend die Zellviabilität ebenfalls mittels *Alamar Blue Assay* bestimmt, nachdem die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien 24 h nach dem Aussäen einer Behandlungsdauer von 72 h mit LY2603618 in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt worden waren (siehe Abb. 13). Da LY2603618 das Lösungsmittel DMSO enthielt, erfolgten die Zellviabilitätsmessungen jeweils im Vergleich zur unbehandelten Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kontrolle, um einen zyto-

toxischen Effekt des DMSO auszuschließen. Es wurden ebenfalls Dosis-Wirkungs-Kurven mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 erstellt, die in Abhängigkeit der Behandlungsdosis die Zellviabilität der Neuroblastomzellen in Prozent der DMSO-Kontrolle aufzeigen (siehe Abb. 13).

Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen ist die Zelldichte der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien nach einer Behandlungsdauer von 72 h mit zunehmenden Konzentrationen von LY2603618 eingeschränkt (siehe Abb. 12). Die Aufnahmen zeigen eine dosisabhängige Zunahme zerstörter Zellen und Zellfragmente sowie eine dosisabhänge Abnahme der Zelldichte und der Zellzahl. Morphologisch sind bei einer Konzentration von 0,5 µM LY2603618 bei den IMR-32-Neuroblastomzellen und bei einer Konzentration von 2 µM LY2603618 bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen ein deutlich erhöhter Anteil zerstörter Zellen und Zellfragmente im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erkennbar (siehe Abb. 12). Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigen bei dieser Konzentration von 0,5 µM LY2603618 eine höhere Anzahl an kleinen Tumorzellverbänden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Anhand der Aufnahmen lässt sich bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien eine Abnahme des Zytoplasmagehalts mit einer zunehmenden Konzentration von LY2603618 erkennen (siehe Abb. 12).



### IMR-32 72 h Behandlung

Kon



0,25 µM LY



# SH-SY5Y 72 h Behandlung





0,5 µM LY

2μM LY

Abbildung 12 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y nach Behandlung mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*)

Die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/*well*) wurden 24 h nach der Aussaat für 72 h mit CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) (*LY*) behandelt. Im Anschluss wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der Neuroblastomzellen angefertigt. Die exemplarisch dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der Neuroblastomzelllinie IMR-32 nach einer Behandlung mit LY2603618 in den Konzentrationen von 0,25  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M und der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y nach einer Behandlung mit LY2603618 in den Konzentrationen von 0,5  $\mu$ M und 2  $\mu$ M. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Neuroblastomzellen (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) aufgeführt. Die Zelldichte der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien ist anhand der Aufnahmen mit zunehmenden Konzentrationen eingeschränkt. Anhand der Aufnahmen ist zudem die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von LY2603618 bei beiden Neuroblastomzelllinien gestiegen. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Mit den Zellviabilitätsmessungen konnte gezeigt werden, dass CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) (*LY*) die Zellviabilität beider Neuroblastomzelllinien in Abhängigkeit zur Konzentration zunehmend einschränkte (siehe Abb. 13). Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigen in den Konzentrationen 0,25, 0,5, 0,75 und 1 µM eine höhere Sensibilität gegenüber dem CHK1-Inhibitor als die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (siehe Abb. 13). Ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität zwischen beiden Neuroblastomzelllinien konnte nach einer 72 h Behandlung mit LY2603618 in diesen Konzentrationen festgestellt werden. Bei den Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 sind niedrigere Konzentrationen ausreichend, um die Zellviabilität zu vermindern. LY2603618 zeigte im Vergleich zu der

Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y in den Konzentrationen 0,25, 0,5, 0,75 und 1 µM eine erhöhte therapeutische Potenz bei den Tumorzellen der *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie IMR-32 (112).



Abbildung 13 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*)

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/*well*) 24 h nach der Aussaat für 72 h mit CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) (*LY*) behandelt. Im Anschluss wurde zur Zellviabilitätsmessung je ein *Alamar Blue Assay* durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus insgesamt drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) für die 72 h Behandlung. Der rotfarbige Graph stellt die Zellviabilität der IMR-32-Neuroblastomzellen dar. Die Zellviabilität der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wird durch den blaufarbigen Graphen dargestellt. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001. Eine Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben zwischen beiden Neuroblastomzelllinien erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \* = p ≤ 0,05; ### = p ≤ 0,05; ###

Die erhöhte therapeutische Potenz ist auch in den  $IC_{50}$ -Werten und  $IC_{80}$ -Werten erkennbar (siehe Abb. 13 und Tabelle 22). Bei den Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 sind die IC-Werte niedriger als bei jenen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (siehe Abb. 13 und Tabelle 22). Der Verlust der Zellviabilität der Neuroblastomzelllinie IMR-32 war nach einer 72 h Behandlung mit LY2603618 in den Konzentrationen 0,25, 0,5, 0,75 und 1  $\mu$ M signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 13). Bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen war der

Zellviabilitätsverlust im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach einer 72 h Behandlung mit LY2603618 in den Konzentrationen 1, 2 und 5  $\mu$ M signifikant.

Zusammenfassend zeigen die Resultate der Zellviabilitätsmessungen, dass der CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) zu einem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in Neuroblastomzellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation führt. Der CHK1-Inhibitor zeigte im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y in bestimmten Konzentrationen eine erhöhte therapeutische Potenz bei Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32, die durch eine *MYCN*-Amplifikation charakterisiert ist (112).

Tabelle 22Zytotoxischer Effekt des Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY 2603618<br/>(*Rabusertib*) auf Neuroblastomzellen und primäre Zellen (hippocampale<br/>Neurone)

LY	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	Zelltyp
72 h	0,4 µM	0,6 µM	IMR-32
	1 µM	4 µM	SH-SY5Y
	2 µM	4 µM	Primäre Zellen

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y 24 h und die primären Zellen (hippocampale Neurone) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit CHK1-Inhibitor LY 2603618 (*Rabusertib*) (*LY*) behandelt. Anschließend wurde ihre Zellviabilität mittels *Alamar Blue Assay* gemessen. In dieser Tabelle sind die IC<sub>50</sub>-Werte (*Inhibitory-Concentration-50*%) und die IC<sub>80</sub>-Werte (*Inhibitory-Concentration-80*%) der insgesamt drei unabhängigen Versuche (n = 3, N = 1) je Zelltyp für die Behandlungszeit von 72 h aufgelistet. (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.7. CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in den primären Zellen (hippocampale Neurone)

Zur Evaluation des zytotoxischen Effektes des Chemotherapeutikums CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) auf die primären Zellen (hippocampale Neurone) wurden ebenfalls lichtmikroskopische Aufnahmen (siehe Abb. 14) nach einer Behandlung mit LY2603618 angefertigt und die Zellviabilität mittels *Alamar Blue Assay* bestimmt (siehe Abb. 15). Hierbei wurden die hippocampalen Neurone 2 Wochen nach dem Aussäen einer Behandlungszeit von 72 h mit LY2603618 in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Die Messungen der Zellviabilität mittels *Alamar Blue Assay* erfolgten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 erstellt, die in Abhängigkeit zur Behandlungsdosis die Zellviabilität der hippocampalen Neurone in Prozent zur DMSO-Kontrolle darstellt (siehe Abb. 15).

Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen scheint nach einer Behandlungsdauer von 72 h mit 1 µM LY2603618 eine Differenzierung hippocampaler Neurone akzeleriert zu sein, da im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und DMSO-Kontrolle ein vermehrtes

neuronales Netzwerk sichtbar ist. Zugleich sind auch vermehrt Zellen zu finden, deren Zellkörper klein und abgerundet sind und auf den Prozess der Apoptose hinweisen. Die apoptotischen Hinweise sind nach einer Behandlung mit 5  $\mu$ M LY2603618 stärker ausgeprägt als nach einer Behandlung mit 1  $\mu$ M LY2603618. Die vermehrten neuronalen Netze sind nach der Behandlung mit 5  $\mu$ M LY2603618 im Vergleich zu einer Behandlung mit 1  $\mu$ M LY2603618 vermindert (siehe Abb. 14).



# Hippocampale Neurone 72 h Behandlung



5 µM LY

Abbildung 14 Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*).

Die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/*well*) wurden 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) (*LY*) behandelt. Anschließend wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der hippocampalen Neurone angefertigt. Die exemplarisch dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der hippocampalen Neurone nach einer Behandlung mit LY2603618 in den Konzentrationen von 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten hippocampalen Neurone (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) dargestellt. Es sind mit zunehmenden Konzentrationen von LY2603618 vermehrt Zellen zu finden, deren Zellkörper klein und abgerundet sind und auf den Prozess der Apoptose hinweisen. Nach der Behandlung mit 5  $\mu$ M LY2603618 sind kaum neuronale Netzwerke sichtbar. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Es konnte gezeigt werden, dass CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) ebenfalls die Zellviabilität der hippocampalen Neurone, als Modell für das physiologische Nervengewebe, in Abhängigkeit zur Konzentration zunehmend einschränkte. Die hippocampalen Neurone zeigten eine Sensibilität gegenüber dem CHK1-Inhibitor. Dies ist sowohl anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abb. 14) als auch in den

IC<sub>50</sub>-Werten und IC<sub>80</sub>-Werten erkennbar (siehe Tabelle 22). Der Zellviabilitätsverlust nach einer 72 h Behandlung mit dem Chemotherapeutikum LY2603618 war im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in den Konzentrationen 2, 5 und 10  $\mu$ M signifikant (siehe Abb. 15).

Zusammenfassend betrachtet, führte das Chemotherapeutikum CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) zu einem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in hippocampalen Neuronen.



Abbildung 15 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY 2603618 (*Rabusertib*).

Es wurden die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/*well*) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) (LY) behandelt. Anschließend wurde zur Zellviabilitätsmessung je ein *Alamar Blue Assay* durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur DMSO-Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Der in dieser Abbildung dargestellte Graph zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus insgesamt drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) für die 72 h Behandlung. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001. (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.8. CHK1-Inhibition kann die Neuroblastomzelllinie IMR-32 und die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für Cisplatin nicht sensibilisieren

Die IMR-32 und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wurden sowohl als Einzelbehandlung als auch als Kombinationsbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des CHK1-Inhibitors LY2603618 (*Rabusertib*) und von Cisplatin behandelt, um festzustellen, ob der CHK1-Inhibitor die Neuroblastomzellen für Cisplatin sensibilisieren kann. Es wurden für diesen Versuch äquimolare Konzentrationen von LY2603618 und äquitoxische Konzentrationen von Cisplatin der beiden Neuroblastomzelllinien verwendet, die sich aus den vorherigen Versuchen (Einzelbehandlungen) ergaben. Hierbei wurden die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien jeweils mit der gleichen Konzentration (äquimolar) von LY2603618 behandelt. Diese Konzentration wurde bewusst niedrig gewählt, um die Neuroblastomzellen nicht zu stark zu schädigen und einen zytotoxischen Effekt der Kombinationsbehandlungen beider Chemotherapeutika zu erfassen. Es wurden in diesem Versuch zudem Einzelbehandlungen mit Cisplatin durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss an die Einzel- und Kombinationsbehandlungen, zeitlich vor den Zellviabilitätsmessungen, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien angefertigt (siehe Abb. 16). Der Zellviabilitätsverlust infolge der entsprechenden Kombinationsbehandlung aus beiden Chemotherapeutika wurde mit dem Zellviabilitätsverlust nach der jeweiligen Konzentration dieser Cisplatin-Einzelbehandlungen verglichen, die auch in den entsprechenden Kombinationsbehandlungen eingesetzt wurden. Diese Konzentrationen von Cisplatin, die sich zwischen den beiden Neuroblastomzelllinien unterschieden, hatten in den vorherigen Einzelbehandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 8) bei beiden Neuroblastomzelllinien einen identischen zytotoxischen Effekt (äquitoxisch). In diesem Versuch wurde die Zellviabilität ebenfalls mittels Alamar Blue Assay bestimmt, nachdem die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien 24 h nach dem Aussäen für eine Zeitspanne von 72 h mit dem CHK1-Inhibitor und Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt worden waren (siehe Abb. 17). Auch in diesen Versuchen erfolgten die Messungen der Zellviabilität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Cisplatin-Einzelbehandlungen dieses Versuches bezogen sich hierbei auf die unbehandelte Kontrolle (Kon), in der ausschließlich das entsprechende Zellmedium der Neuroblastomzellen hinzugegeben wurde. Jedoch bezogen sich die Einzel-Behandlungen mit LY2603618 und die Kombinationsbehandlungen auf die DMSO-Kontrolle. Mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 wurde ein Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen erstellt (siehe Abb. 17), das in Abhängigkeit zur Behandlungsdosis die Zellviabilität der Neuroblastomzellen in Prozent zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) aufzeigt.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin nach einer Behandlungsdauer von 72 h bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien eine Abnahme der Zelldichte (siehe Abb. 16). Bei einer Konzentration von 0,4 µM Cisplatin bei den IMR-32-Neuroblastomzellen und einer

73

Konzentration von 2 µM Cisplatin bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen ist jeweils ein erhöhter Anteil zerstörter Zellen und Zellfragmente im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle morphologisch erkennbar (siehe Abb. 16). In diesen Aufnahmen kann eine dosisabhängige Zunahme zerstörter Zellen sowie eine dosisabhängige Abnahme der Zelldichte und der Zellzahl nach einer Behandlung mit Cisplatin erkannt werden. Mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin zeigen die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 eine höhere Anzahl an Tumorzellverbänden. Auch die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zeigen bei einer Konzentration von 2 µM Cisplatin eine höhere Anzahl an Tumorzellverbänden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Größe dieser Tumorzellverbände ist jedoch im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie IMR-32 deutlich kleiner. Zudem zeigen die Aufnahmen bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien mit einer zunehmenden Konzentration von Cisplatin eine Abnahme des Zytoplasmagehalts (siehe Abb. 16). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Einzelbehandlungen mit LY2603618 zeigen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keinen morphologischen Unterschied (siehe Abb. 16). Die Zelldichte der IMR-32-Neuroblastomzellen bei den Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemo-Therapeutika ist anhand der Aufnahmen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen mit Cisplatin nicht effizienter eingeschränkt (siehe Abb. 16). Es sind keine morphologischen Unterschiede zwischen den Kombinationsbehandlungen und den jeweiligen Einzelbehandlungen mit Cisplatin erkennbar. Bei der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y ist die Zelldichte im Vergleich zu den Einzelbehandlungen ebenfalls nicht oder geringfügig stärker eingeschränkt. Eine geringfügige Abnahme der Zelldichte Vergleich zur Einzelbehandlung mit 2 µM Cisplatin kann der im in Kombinationsbehandlung aus 0,6 µM LY2603618 und 2 µM Cisplatin bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen festgestellt werden. In den Aufnahmen dieser Kombinations-Behandlung ist eine verminderte Zellzahl im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 2 µM Cisplatin erkennbar (siehe Abb. 16).





Kon

DMSO

0,2 µM LY





0,2 μM CisPt



0,2 μM LY + 0,1 μM CisPt



0,2 μM LY + 0,2 μM CisPt



0,2 µM LY + 0,4 µM CisPt

SH-SY5Y 72 h Behandlung



Kon

DMSO

0,6 µM LY





0,5 µM CisPt

1 µM CisPt



0,6 µM LY + 0,5 µM CisPt

0,6 μM LY + 1 μM CisPt

2 µM CisPt



0,6 µM LY + 2 µM CisPt

#### Abbildung 16 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des Checkpoint-Kinase-Inhibitors LY2603618 (*Rabusertib*) und Cisplatin

Die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/well) wurden 24 h nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des CHK1-Inhibitors LY2603618 (Rabusertib) (LY) und des Chemotherapeutikums Cisplatin (CisPt) behandelt. Im Anschluss wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der Neuroblastomzellen angefertigt. Die dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der Neuroblastomzelllinie IMR-32 nach einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit LY2603618 (LY) in den Konzentrationen von 0,2 µM und mit Cisplatin (CisPt) in den Konzentrationen von 0,1 µM, 0,2 µM und 0,4 µM und der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y nach einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit LY2603618 in den Konzentrationen von 0,6 µM und mit Cisplatin in den Konzentrationen von 0,5 µM, 1 µM und 2 µM . Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter Neuroblastomzellen (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) aufgeführt. Anhand der Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Zelldichte beider Neuroblastomzelllinien mit zunehmenden Dosen von Cisplatin eingeschränkt ist. Zudem ist die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin bei beiden Neuroblastomzelllinien gestiegen. Bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 konnte anhand der Aufnahmen die Zelldichte durch die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika nicht effizienter eingeschränkt werden. Die Zelldichte der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y anhand der Aufnahmen durch konnte die Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen ebenfalls nicht oder geringfügig stärker (siehe SH-SY5Y 0,6 µM LY + 2 µM CisPt) eingeschränkt werden. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Anhand der Zellviabilitätsmessungen konnte gezeigt werden, dass die Zellviabilität beider Neuroblastomzelllinien mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin sowohl in der Einzelbehandlung als auch in der Kombinationsbehandlung aus beiden Chemotherapeutika erniedrigt wurde (siehe Abb. 17). Die Zellviabilitätsverluste waren in den IMR-32-Neuroblastomzellen höher als bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nach den Einzelbehandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 17). Der Verlust der Zellviabilität der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigte in der Einzelbehandlung mit 0,4 µM Cisplatin und in der Kombinationsbehandlung aus 0,2 µM LY2603618 und 0,4 µM Cisplatin ein signifikantes Ergebnis zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) (siehe Abb. 17). Für die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zeigte der Zellviabilitätsverlust, bis auf die Einzelbehandlung mit 0,5 µM Cisplatin, signifikante Ergebnisse im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle). Die Zellviabilitätsverluste der Kombinationsbehandlungen aus LY2603618 und Cisplatin waren bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 im Vergleich zu den Zellviabilitätsverlusten der Einzelbehandlungen mit Cisplatin etwa gleich groß (siehe Abb. 17). Die Kombinationsbehandlungen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zeigten, im Gegensatz zu der Neuroblastomzelllinie IMR-32, einen leicht erhöhten Verlust der Zellviabilität im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen mit Cisplatin. Die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen ergaben, dass der durch Cisplatin induzierte

Verlust der Zellviabilität der Neuroblastomzelllinie IMR-32 bei den Kombinations-Behandlungen aus beiden Chemotherapeutika im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin nicht gesteigert werden konnte (siehe Abb. 17). Bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen konnte der durch Cisplatin induzierte Verlust der Zellviabilität bei den Kombinationsbehandlungen aus 0,6 µM LY2603618 und 0,5 µM Cisplatin sowie 0,6 µM LY2603618 und 1 µM Cisplatin im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin leicht erhöht werden. Die statistische Auswertung ergab, dass diese Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen für die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin nicht signifikant sind. Die Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigte in diesem Versuch etwa gleich hohe Zellviabilitätsverluste nach einer Behandlung mit Cisplatin im Vergleich zu den vorherigen Einzelbehandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 8 und Abb. 17). Bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y sind die Verluste der Zellviabilität nach einer Behandlung mit Cisplatin in diesem Versuch im Mittel um ca. 10-30 % geringer ausgefallen als in den vorherigen Einzelbehandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 8 und Abb. 17).

Zusammenfassend betrachtet, führten sowohl die Einzelbehandlungen als auch die Kombinationsbehandlungen zu einem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in Neuroblastomzellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation. Die CHK1-Hemmung mit CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) konnte die Sensibilität der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien gegenüber einer Einzelbehandlung mit Cisplatin nicht erhöhen. Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen für die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien sind im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin nicht signifikant.





Abbildung 17 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) und Cisplatin.

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/well) 24 h nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des CHK1-Inhibitors LY2603618 (Rabusertib) (LY) und Cisplatin (CisPt) behandelt. Das Balkendiagramm zeigt zur Vereinfachung der Visualisierung gelbfarbige Balken für die Einzelbehandlung mit CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) (LY) und blaufarbige Balken für die Einzelbehandlung mit Cisplatin (CisPt). Die Balken für die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sind grün markiert. Zur Zellviabilitätsmessung wurde je ein Alamar Blue Assay durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Die Einzelbehandlungen mit Cisplatin bezogen sich hierbei auf die unbehandelte Kontrolle (Kon), wohingegen die Einzelbehandlungen mit LY2603618 und die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sich auf die DMSO-Kontrolle (DMSO) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus insgesamt zwei unabhängigen Versuchen (n = 2, N = 1) für die 72 h Behandlungen. Die Signifikanzen der behandelten Proben stehen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Kon, DMSO). Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Kon, DMSO) erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \* =  $p \le 0.05$ ; \*\* =  $p \le 0.01$ ; \*\*\* =  $p \le 0.001$ . (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.9. CHK1-Inhibition sensibilisiert primäre Zellen (hippocampale Neurone) für Cisplatin nicht

Die primären Zellen (hippocampale Neurone) wurden sowohl als Einzelbehandlung als auch als Kombinationsbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des CHK1-Inhibitors LY2603618 (*Rabusertib*) und Cisplatin behandelt, um einen zytotoxischen Effekt der Kombinationsbehandlung auf die hippocampalen Neurone zu evaluieren. Zudem wurden in diesem Versuch auch Einzelbehandlungen mit Cisplatin durchgeführt. Hierbei sollte der zytotoxische Effekt der Kombinationsbehandlung in Bezug zur jeweiligen Cisplatin-Einzelbehandlung dieses Versuches verglichen werden. Zum Zweck der Erfassung der zytotoxischen Wirkung der Kombinationsbehandlungen wurden nach diesen Einzel- und Kombinationsbehandlungen lichtmikroskopische Aufnahmen der hippocampalen Neurone angefertigt (siehe Abb. 18) und die Zellviabilität ebenfalls mittels Alamar Blue Assay bestimmt, nachdem die hippocampalen Neurone 2 Wochen nach dem Aussäen einem Zeitraum von 72 h mit LY2603618 und Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt worden waren (siehe Abb. 19). Es wurden hierbei Konzentrationen verwendet, die sich aus den vorherigen Versuchen (Einzelbehandlungen) mit LY2603618 und Cisplatin ergaben. Die Messungen der Zellviabilität erfolgten ebenfalls im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle). Die Cisplatin-Einzelbehandlungen dieses Versuches bezogen sich hierbei auf die unbehandelte Kontrolle (Kon). Die Einzelbehandlung mit LY2603618 sowie die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika bezogen sich ebenfalls auf die DMSO-Kontrolle. Es wurde ein Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 erstellt (siehe Abb. 19). Dieses Balkendiagramm stellt in Abhängigkeit der Behandlungsdosis die Zellviabilität der hippocampalen Neurone in Prozent zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) dar.

Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen lässt sich nach einer Behandlung von 1 µM Cisplatin eine Zunahme von abgerundeten kleinen Zellen erkennen, die auf eine Apoptose hinweisen, während nach einer Behandlung von 2 µM Cisplatin die Anzahl der Zellen vermindert ist und kaum noch Zellen mit den morphologischen Merkmalen der unbehandelten Kontrolle und DMSO-Kontrolle sichtbar sind (siehe Abb. 18). Der CHK1-Inhibitor LY2603618 führt, wie bereits in Abb.14 beobachtet, zu einem deutlich sichtbaren neuronalen Netzwerk. Die Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin und LY2603618 zeigen keine morphologischen Unterschiede zu den Cisplatin-Einzelbehandlungen (siehe Abb. 18).



#### Hippocampale Neurone 72 h Behandlung



0,5 µM LY

1 µM CisPt

2 µM CisPt



0,5 μM LY + 1 μM CisPt

0,5 µM LY + 2 µM CisPt

Abbildung 18 Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des Checkpoint-Kinase-Inhibitors LY2603618 (*Rabusertib*) und Cisplatin

Die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/*well*) wurden 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des CHK1-Inhibitors LY2603618 (*Rabusertib*) (*LY*) und des Chemotherapeutikums Cisplatin (*CisPt*) behandelt. Im Anschluss wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der hippocampalen Neurone angefertigt. Die dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der hippocampalen Neurone nach einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit LY2603618 (*LY*) in den Konzentrationen von 0,5 µM und mit Cisplatin (*CisPt*) in den Konzentrationen von 1 µM und 2 µM. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter hippocampaler Neurone (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) aufgeführt. Anhand der Aufnahmen sind mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin vermehrt Zellen zu finden, deren Zellkörper klein und abgerundet sind und auf den Prozess der Apoptose hinweisen. Die Kombinationsbehandlungen aus LY2603618 und Cisplatin zeigen keine morphologischen Unterschiede zu den Cisplatin-Einzelbehandlungen. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Die Zellviabilität der hippocampalen Neurone verringerte sich mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin in der Einzelbehandlung (siehe Abb. 19). Die Kombinationsbehandlungen aus CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) und Cisplatin zeigten im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit Cisplatin unter Berücksichtigung der größeren Standardabweichungen der Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu den Cisplatin-Einzelbehandlungen keinen erhöhten Verlust der Zellviabilität (siehe Abb. 19). Die Ergebnisse waren sowohl für die Einzelbehandlungen als auch für die Kombinationsbehandlungen nicht signifikant im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) (siehe Abb. 19). Der durch Cisplatin induzierte Verlust der Zellviabilität bei den hippocampalen Neuronen konnte in den

Kombinationsbehandlungen aus LY2603618 und Cisplatin im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen mit Cisplatin nicht signifikant gesteigert werden (siehe Abb. 19).

Zusammenfassend betrachtet, zeigen die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen, dass die Einzelbehandlungen mit Cisplatin zu einem dosisabhängigen, nicht signifikanten Verlust der Zellviabilität in hippocampalen Neuronen führten. Die Sensibilität der hippocampalen Neurone für Cisplatin konnte durch eine CHK1-Hemmung mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) nicht erhöht werden.



Abbildung 19 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Checkpoint-Kinase-Inhibitor LY2603618 (*Rabusertib*) und Cisplatin.

Es wurden primäre Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/well) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des CHK1-Inhibitors LY2603618 (Rabusertib) (LY) und Cisplatin (CisPt) behandelt. Das Balkendiagramm zeigt zur Vereinfachung der Visualisierung gelbfarbige Balken für die Einzelbehandlung mit CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) (LY) und blaufarbige Balken für die Einzelbehandlung mit Cisplatin (CisPt). Die Balken für die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sind grün markiert. Zur Zellviabilitätsmessung wurde je ein Alamar Blue Assay durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Die Einzelbehandlungen mit Cisplatin bezogen sich hierbei auf die unbehandelte Kontrolle (Kon), wohingegen die Einzelbehandlungen mit Olaparib und die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sich auf die DMSO-Kontrolle (DMSO) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus insgesamt zwei unabhängigen Versuchen (n = 2, N = 1) für die 72 h Behandlungen. Eine Signifikanz der behandelten Proben im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) sowie eine Signifikanz der Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu der jeweiligen Cisplatin-Einzelbehandlung ist nicht gegeben. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.10. PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) induziert eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y

Ein weiteres Experiment diente der Evaluation eines zytotoxischen Effektes des Chemotherapeutikums Olaparib (*Lynparza*) auf die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y. Diese Ergebnisse dienten der Erfassung der Wirksamkeit einer PARP-Inhibition im Hinblick auf die darauffolgenden Kombinationsbehandlungen. Nachdem die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien 24 h nach dem Aussäen einer Behandlungs-Zeit von 72 h mit Olaparib in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt worden waren, folgten im Anschluss ebenfalls eine Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen (siehe Abb. 20) und eine Bestimmung der Zellviabilität mittels *Alamar Blue Assay* (siehe Abb. 21 A/B). Auch in diesen Versuchen erfolgten Zellviabilitätsmessungen jeweils im Vergleich zur unbehandelten Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kontrolle, da Olaparib das Lösungsmittel DMSO enthielt. Des Weiteren wurden ebenfalls mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Diese zeigen eine dosisabhängige Zellviabilität der Neuroblastomzellen in Prozent zur DMSO-Kontrolle auf (siehe Abb. 21 A/B).

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen mit einer zunehmenden Konzentration von Olaparib bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien eine Abnahme der Zelldichte nach einer Behandlungsdauer von 72 h (siehe Abb. 20). Es sind bei einer Konzentration von 2,5 µM Olaparib bei den IMR-32-Neuroblastomzellen und bei einer Konzentration von 10 µM Olaparib bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen erhöhte Anteile zerstörter Zellen und Zellfragmente im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle morphologisch erkennbar (siehe Abb. 20). Anhand der Aufnahmen kann eine dosisabhängige Zunahme zerstörter Zellen sowie eine dosisabhängige Abnahme der Zelldichte und der Zellzahl erkannt werden. Mit einer zunehmenden Konzentration von Olaparib zeigen die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 eine höhere Anzahl an Tumorzellverbänden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Auch die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zeigen bei einer Konzentration von 10 µM Olaparib eine höhere Anzahl an Tumorzellverbänden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, die im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie IMR-32 deutlich kleiner sind. Zudem zeigen die Aufnahmen bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien eine Abnahme des Zytoplasmagehalts mit einer zunehmenden Konzentration von Olaparib (siehe Abb. 20).

# IMR-32 72 h Behandlung



Kon

DMSO



0,25 µM Ola

1 µM Ola

2,5 µM Ola



2,5 µM Ola

10 µM Ola



Die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/*well*) wurden 24 h nach der Aussaat für 72 h mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) (*Ola*) behandelt. Im Anschluss wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der Neuroblastomzellen angefertigt. Die exemplarisch dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der Neuroblastomzelllinie IMR-32 nach einer Behandlung mit Olaparib in den Konzentrationen von 0,25 µM, 1 µM und 2,5 µM und der

Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y nach einer Behandlung mit Olaparib in den Konzentrationen von 2,5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Neuroblastomzellen (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) aufgeführt. Die Zelldichte der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien ist anhand der Aufnahmen mit zunehmenden Konzentrationen eingeschränkt. Anhand der Aufnahmen ist zudem die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin bei beiden Neuroblastomzelllinien gestiegen. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Die Messungen der Zellviabilität beider Neuroblastomzelllinien zeigten eine Dosis-Abhängigkeit zum PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza). Die Graphen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien zeigen hierbei eine Verringerung der Zellviabilität mit zunehmender Konzentration des PARP-Inhibitors Olaparib an (siehe Abb. 21 A). Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität zwischen beiden Neuroblastom-Zelllinien nach einer 72 h Behandlung des PARP-Inhibitors Olaparib in den Konzentrationen 1 und 2,5 µM festgestellt werden (siehe Abb. 21 A). Der Graph der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigt in Abhängigkeit der Skalierung der x-Achse (Abzisse) einen sigmoiden Verlauf, bei dem die Zellviabilität im Konzentrationsbereich von 0,5 µM und 1 µM Olaparib nahezu konstant ist und erst in höheren Konzentrationen wieder dosisabhängig abnimmt (siehe Abb. 21 B). Die IMR-32-Neuroblastomzellen zeigen bei den Konzentrationen 1 und 2,5 µM eine höhere Sensibilität gegenüber dem Olaparib als die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen (siehe Abb. 21 A). Um die Zellviabilität zu vermindern, sind bei den IMR-32-Neuroblastomzellen im Vergleich zu der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y niedrigere Konzentrationen von Olaparib ausreichend. Olaparib zeigte in den Konzentrationen 1 und 2.5 µM eine erhöhte therapeutische Potenz bei den Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32, die im Gegensatz zu den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen durch eine MYCN-Amplifikation gekennzeichnet ist (112).



Abbildung 21 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*)

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/*well*) 24 h nach der Aussaat für 72 h mit PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) (*Ola*) behandelt. Im Anschluss wurde zur Zellviabilitätsmessung je ein *Alamar Blue Assay* durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur DMSO-Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus

insgesamt drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) für die 72 h Behandlung der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien. (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

- A) Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven nach einer 72 h Behandlung der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien mit Olaparib (*Ola*). Der rotfarbige Graph stellt die Zellviabilität der IMR-32-Neuroblastomzellen dar. Die Zellviabilität der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wird durch den blaufarbigen Graphen dargestellt. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \*\* =  $p \le 0,01$ ; \*\*\* =  $p \le 0,001$ . Eine Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben zwischen beiden Neuroblastomzelllinien erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: # =  $p \le 0,05$ ; ## =  $p \le 0,01$ .
- B) Separate Darstellung, insbesondere des niedrigen Konzentrationsbereichs, der IMR-32-Neuroblastomzellen nach einer 72 h Behandlung mit Olaparib (*Ola*). Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \*\*\* = p ≤ 0,001.

Auch an den IC<sub>50</sub>-Werten und IC<sub>80</sub>-Werten ist diese erhöhte therapeutische Potenz erkennbar (siehe Tabelle 23). Die IC-Werte sind bei den IMR-32-Neuroblastomzellen deutlich niedriger als die IC-Werte der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen (siehe Abb. 21 A und Tabelle 23). Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war der Verlust der Zellviabilität der Neuroblastomzelllinie IMR-32 in den Konzentrationen 1, 2,5 und 5  $\mu$ M signifikant (siehe Abb. 21 A/B). Bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y war der Zellviabilitätsverlust im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in den Konzentrationen 5,10, 25 und 50  $\mu$ M signifikant (siehe Abb. 21 A).

Zusammenfassend betrachtet, konnte bei dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) ein dosisabhängiger Verlust der Zellviabilität in Neuroblastomzellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation nachgewiesen werden, wobei die *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Neuroblastomzellen in bestimmten Konzentrationen eine höhere therapeutische Potenz im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y aufwiesen (112).

Tabelle 23Zytotoxischer Effekt des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) auf<br/>Neuroblastomzellen und primären Zellen (hippocampale Neurone)

Ola	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	Zelltyp
72 h	0,5 μM	2 µM	IMR-32
	5 µM	22 µM	SH-SY5Y
	> 100 µM	> 100 µM	Primäre Zellen

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y 24 h und die primären Zellen (hippocampale Neurone) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) (*Ola*) behandelt und im Anschluss ihre Zellviabilität mittels *Alamar Blue Assay* gemessen. In dieser Tabelle sind die IC<sub>50</sub>-Werte (*Inhibitory-Concentration-50*%) und die IC<sub>80</sub>-Werte (*Inhibitory-Concentration-80*%) der insgesamt drei unabhängigen Versuche (n = 3, N = 1) je Zelltyp für die Behandlungszeit von 72 h aufgelistet. (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.11. PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) führte zu keinem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in den primären Zellen (hippocampale Neurone)

Um den zytotoxischen Effekt des Chemotherapeutikums Olaparib (*Lynparza*) auf die primären Zellen (hippocampale Neurone) zu erfassen, wurden ebenfalls Zellviabilitäts-Messungen mittels *Alamar Blue Assay* durchgeführt. Die hippocampalen Neurone wurden hierbei mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) in verschiedenen Konzentrationen 2 Wochen nach der Aussaat einer Zeitspanne von 72 h ausgesetzt. Danach wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (siehe Abb. 22) angefertigt und die Zellviabilität gemessen (siehe Abb. 23). Die Zellviabilitätsmessungen erfolgten jeweils im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Im Anschluss wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 erstellt, die in Abhängigkeit der Behandlungsdosis die Zellviabilität der hippocampalen Neurone in Prozent zur DMSO-Kontrolle darstellt (siehe Abb. 23).

Nach einer Behandlungsdauer von 72 h ist anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen die Zelldichte der hippocampalen Neurone dosisunabhängig von Olaparib konstant. Die Aufnahmen zeigen in den Konzentrationen 10 und 50 µM Olaparib keine morphologischen Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle sowie zur DMSO-Kontrolle auf (siehe Abb. 22).



# Abbildung 22 Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza)

50 µM Ola

10 µM Ola

# 87

Die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/*well*) wurden 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) (*Ola*) behandelt. Anschließend wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der hippocampalen Neurone angefertigt. Die exemplarisch dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Merkmale der hippocampalen Neurone nach einer Behandlung mit Olaparib in den Konzentrationen von 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten hippocampalen Neurone (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) aufgeführt. Die Zelldichte der hippocampalen Neurone ist anhand der Aufnahmen mit zunehmender Konzentration uneingeschränkt konstant. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Es konnte gezeigt werden, dass der PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) die Zellviabilität der hippocampalen Neurone, als Modell für das physiologische Nervengewebe, in Abhängigkeit zur Konzentration nicht beeinflusst. Die Zellviabilität der hippocampalen Neurone ist trotz zunehmender Konzentration des PARP-Inhibitors Olaparib konstant. Daher sind in diesem Versuch der IC<sub>50</sub>-Wert und der IC<sub>80</sub>-Wert > 100  $\mu$ M Olaparib (siehe Tabelle 23). Die Ergebnisse der Messungen der Zellviabilität sind für die hippocampalen Neurone im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach einer 72 h Behandlung nicht signifikant (siehe Abb. 23).

Zusammenfassend betrachtet, führte das Chemotherapeutikum PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) zu keinem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in hippocampalen Neuronen.



Abbildung 23 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Behandlung mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*)

Es wurden die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/*well*) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) (*Ola*) behandelt. Anschließend wurde zur Zellviabilitätsmessung je ein *Alamar Blue Assay* durchgeführt und der Anteil lebender

Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur DMSO-Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Der in dieser Abbildung dargestellte Graph zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus insgesamt drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) für die 72 h Behandlung. Eine Signifikanz der behandelten Proben im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ist nicht gegeben. (Abk.: n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.12. PARP-Inhibition kann die Neuroblastomzelllinie IMR-32 im Gegensatz zur Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für Cisplatin sensibilisieren

Um festzustellen, ob Olaparib die Neuroblastomzellen für Cisplatin sensibilisieren kann, wurden die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y sowohl als Einzelbehandlung als auch als Kombinationsbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) und Cisplatin behandelt. Für diesen Versuch wurden ebenfalls äquimolare Konzentrationen von Olaparib und äquitoxische Konzentrationen von Cisplatin der beiden Neuroblastomzelllinien verwendet, die sich aus den vorherigen Versuchen (Einzelbehandlungen) ergaben. Auch in diesem Versuch wurde die äquimolare Konzentration bewusst niedrig gewählt, um die Neuroblastomzellen nicht zu stark zu schädigen und die zytotoxische Wirkung der Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin zu erfassen. Es wurden ebenfalls in diesem Versuch Einzelbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin durchgeführt, die auch in den entsprechenden Kombinationsbehandlungen verwendet wurden und sich zwischen beiden Neuroblastomzelllinien unterschieden. Bevor die Messungen der Zellviabilität durchgeführt wurden, folgte im Anschluss an die Einzelund Kombinationsbehandlungen mit diesen Chemotherapeutika eine Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen der Neuroblastomzellen (siehe Abb. 24). Die Zellviabilität infolge der Kombinationsbehandlungen wurde mit der Zellviabilität nach einer Behandlung mit den jeweiligen Konzentrationen der Cisplatin-Einzelbehandlungen verglichen. Auch in diesem Versuch wurde die Zellviabilität mittels Alamar Blue Assay bestimmt, nachdem die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien 24 h nach der Aussaat für eine Behandlungsdauer von 72 h mit Olaparib und Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (siehe Abb. 25). Die Zellviabilitätsmessungen erfolgten im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle). Die Cisplatin-Einzelbehandlungen dieses Versuches bezogen sich hierbei auf die unbehandelte Kontrolle (Kon), wohingegen sich die Einzelbehandlungen mit Olaparib und die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika auf die DMSO-Kontrolle bezogen. Es wurde ein Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 erstellt (siehe Abb. 25). Dieses Balkendiagramm zeigt in Abhängigkeit der

89

Behandlungsdosis die Zellviabilität der Neuroblastomzellen in Prozent zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) auf.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen auch in diesem Versuch bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin nach einer Behandlungsdauer von 72 h eine Abnahme der Zelldichte (siehe Abb. 24). In den jeweils höchsten Konzentrationen (0,4 µM Cisplatin für IMR-32-Neuroblastomzellen und 2 µM Cisplatin für SH-SY5Y-Neuroblastomzellen) der Cisplatin-Einzelbehandlungen dieses Versuches ist für beide Neuroblastomzelllinien ein erhöhter Anteil zerstörter Zellen und Zellfragmente im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle morphologisch erkennbar (siehe Abb. 24). Es kann in diesen Aufnahmen eine dosisabhängige Zunahme zerstörter Zellen sowie eine dosisabhängige Abnahme der Zelldichte und Zellzahl nach einer Behandlung mit Cisplatin erkannt werden. Die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien zeigen mit einer zunehmenden Konzentration von Cisplatin eine höhere Anzahl an Tumorzellverbänden sowie eine Abnahme des Zytoplasmagehalts im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wobei die Größe dieser Tumorzellverbände in den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie IMR-32 deutlich kleiner ist (siehe Abb. 24). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Einzelbehandlungen mit Olaparib zeigen für die IMR-32-Neuroblastomzellen eine leicht eingeschränkte Zelldichte und eine leichte Zunahme im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, wohingegen für die der Tumorzellverbände Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kein morphologischer Unterschied zu erkennen ist (siehe Abb. 24). Die Zelldichte der IMR-32-Neuroblastomzellen ist bei den Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemoder Aufnahmen Therapeutika anhand im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen mit Cisplatin effizienter eingeschränkt (siehe Abb. 24). Morphologisch zeigen diese Aufnahmen der Kombinationsbehandlungen einen höheren Anteil zerstörter Zellen und Zellfragmente, eine größere Abnahme der Zelldichte, eine verminderte Zellzahl, eine größere Abnahme des Zytoplasmagehalts und eine höhere Anzahl an Tumorzellverbänden im Vergleich zu den entsprechenden Einzel-Behandlungen mit Cisplatin. Außer in der Kombinationsbehandlung aus 1 µM Olaparib und 2 µM Cisplatin ist bei den Kombinationsbehandlungen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y die Zelldichte im Vergleich zu den Einzelbehandlungen ebenfalls stärker eingeschränkt. Es zeigen sich in diesen Kombinationsbehandlungen ebenfalls, wenn auch schwächer im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie IMR-32, ein höherer Anteil zerstörter Zellen und Zellfragmente, eine größere Abnahme der Zelldichte, eine verminderte Zellzahl, eine höhere Abnahme des Zytoplasmagehalts und eine höhere

90

Anzahl an Tumorzellverbänden im Vergleich zu den entsprechenden Einzel-Behandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 24).



Kon

DMSO

0,2 µM Ola



0,1 µM CisPt

0,2 μM CisPt

0,4 µM CisPt



0,2 μM Ola + 0,1 μM CisPt



0,2 μM Ola + 0,2 μM CisPt



0,2 µM Ola + 0,4 µM CisPt



Kon

DMSO

1 µM Ola





1 µM Ola + 0,5 µM CisPt

1 µM Ola + 1 µM CisPt

1 µM Ola + 2 µM CisPt

Abbildung 24 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) und Cisplatin.

Die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/well) wurden 24 h nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) (Ola) und des Chemotherapeutikums Cisplatin (CisPt) behandelt. Im Anschluss wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der Neuroblastomzellen angefertigt. Die dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der Neuroblastomzelllinie IMR-32 nach einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib (Ola) in den Konzentrationen von 0,2 µM und mit Cisplatin (CisPt) in den Konzentrationen von 0,1 µM, 0,2 µM und 0,4 µM und der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y nach einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib in den Konzentrationen von 1 µM und mit Cisplatin in den Konzentrationen von 0,5 µM, 1 µM und 2 µM. Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter Neuroblastomzellen (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) aufgeführt. Die Zelldichte beider Neuroblastomzelllinien ist anhand der Aufnahmen mit zunehmender Konzentration von Cisplatin eingeschränkt. Bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 konnte anhand der Aufnahmen die Zelldichte aufgrund der Kombinationsbehandlungen Chemotherapeutika Vergleich aus beiden im zu den Einzelbehandlungen deutlich stärker eingeschränkt werden. Die Zelldichte der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y konnte anhand der Aufnahmen. bis auf die Kombinationsbehandlung aus 1 µM Olaparib und 2 µM Cisplatin, ebenfalls durch die Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen eine stärkere Abnahme zeigen. Zudem ist anhand der Aufnahmen bei den Kombinationsbehandlungen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, im Vergleich zu den Einzelbehandlungen weitgehend gestiegen. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Die Zellviabilität beider Neuroblastomzelllinien war mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin sowohl in der Einzelbehandlung als auch in der Kombinationsbehandlung mit PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) erniedrigt (siehe Abb. 25). Bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien sind die Verluste der Zellviabilität nach einer Behandlung mit Cisplatin in diesem Versuch ebenfalls geringer ausgefallen als in den vorherigen

Einzelbehandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 8 und Abb. 25). Die IMR-32-Neuroblastomzellen zeigten höhere Verluste der Zellviabilität bei den Einzel-Behandlungen mit Cisplatin sowie bei den Kombinationsbehandlungen aus Olaparib und Cisplatin im Vergleich zu den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen (siehe Abb. 25). Der Zellviabilitätsverlust der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien zeigte sowohl in der mittleren und höchsten Konzentration der Einzelbehandlung mit Cisplatin als auch in allen Kombinationsbehandlungen aus Olaparib und Cisplatin signifikante Ergebnisse im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) (siehe Abb. 25). Die Kombinationsbehandlungen beider Neuroblastom-Zelllinien zeigten, bis auf die Kombinationsbehandlung der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y aus 1 µM Olaparib und 2 µM Cisplatin, im Mittel einen höheren Verlust der Zellviabilität im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen mit Cisplatin. Die statistischen Auswertungen ergaben, dass der durch Cisplatin induzierte Verlust der Zellviabilität in der Kombinations-Behandlung der IMR-32-Neuroblastomzellen aus 0,2 µM Olaparib und 0,1 µM Cisplatin im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit 0,1 µM Cisplatin signifikant gesteigert werden konnte (siehe Abb. 25). Die Zellviabilitätsverluste der anderen Kombinations-Behandlungen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien sind bis auf diese Kombinationsbehandlung der IMR-32-Neuroblastomzellen aus 0,2 µM Olaparib und 0,1 µM Cisplatin im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen nicht signifikant.

Zusammenfassend betrachtet, zeigen die Resultate der Zellviabilitätsmessungen, dass sowohl die Einzelbehandlungen als auch die Kombinationsbehandlungen zu einem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in Neuroblastomzellen mit und ohne MYCN-Amplifikation führten. Die PARP-Inhibition zeigte in den Kombinationsbehandlungen, sowohl in der Neuroblastomzelllinie IMR-32, die durch eine MYCN-Amplifikation charakterisiert ist, als auch in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, bis auf die Kombinationsbehandlung aus 1 µM Olaparib und 2 µM Cisplatin, im Mittel einen stärkeren Zellviabilitätsverlust im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen mit Cisplatin. Die Kombinationsbehandlung aus 0,2 µM Olaparib und 0,1 µM Cisplatin konnte im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 0,1 µM Cisplatin die Sensibilität der IMR-32-Neuroblastomzellen signifikant erhöhen. Alle anderen Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien zeigen keine Signifikanz im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin.



Abbildung 25 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Neuroblastomzellen nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) und Cisplatin.

Es wurden die Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (10 000 Zellen/*well*) 24 h nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (*Lynparza*) (*Ola*) und Cisplatin (*CisPt*) behandelt. Das Balkendiagramm zeigt zur Vereinfachung der Visualisierung orangefarbige Balken für die Einzelbehandlung mit Olaparib (*Lynparza*) (*Ola*) und blaufarbige Balken für die Einzelbehandlung mit Cisplatin (*CisPt*). Die Balken für die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sind mintgrün markiert. Zur Zellviabilitätsmessung wurde je ein *Alamar Blue Assay* durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Die Einzelbehandlungen mit Cisplatin bezogen sich hierbei auf die unbehandelte Kontrolle (Kon), wohingegen die Einzelbehandlungen mit Olaparib und die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sich auf die DMSO-Kontrolle (DMSO) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus insgesamt

drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) für die 72 h Behandlungen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 und insgesamt vier unabhängigen Versuchen (n = 4, N = 1) für die 72 h Behandlungen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Die Signifikanzen der behandelten Proben stehen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Kon, DMSO). Eine Signifikanz der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung mit Cisplatin wird durch einen Querbalken dargestellt. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Kon, DMSO) oder der Einzelbehandlung mit Cisplatin erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole: \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001. (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 3.13. Eine durch PARP-Inhibition induzierte Sensibilisierung hippocampaler Neurone gegenüber einer Cisplatin-Behandlung kann nicht sicher ausgeschlossen werden

Zur Evaluation eines zytotoxischen Effektes der Kombinationsbehandlungen auf die primären Zellen (hippocampale Neurone) wurden in diesem Versuch eine Einzelbehandlung mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza), Einzelbehandlungen mit Cisplatin und Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen in den Cisplatin-Einzelbehandlungen und Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika verwendet, die aus den vorherigen Versuchen (Einzelbehandlungen) ermittelt wurden. Unmittelbar vor den Zellviabilitätsmessungen wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von den hippocampalen Neuronen im Anschluss an die Einzel- und Kombinationsbehandlungen dieses Versuches durchgeführt (siehe Abb. 26). Die Zellviabilität wurde ebenfalls mittels Alamar Blue Assay bestimmt, nachdem die hippocampalen Neurone 2 Wochen nach dem Aussäen in einem Zeitraum von 72 h mit Olaparib und Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (siehe Abb. 27). Identisch zu den anderen, beschriebenen Versuchen dieser Arbeit, in denen zwei Chemotherapeutika eingesetzt wurden, erfolgten diese Zellviabilitätsmessungen ebenfalls im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle). Zudem wurde die Zellviabilität der Kombinationsbehandlungen mit den entsprechenden Cisplatin-Einzelbehandlungen verglichen. Mithilfe der Software GraphPad Prism 5.01 wurde ein Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen erstellt (siehe Abb. 27), das in Abhängigkeit der Behandlungsdosis die Zellviabilität der hippocampalen Neurone in Prozent zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) darstellt.

Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen ist eine leichte Abnahme der Zelldichte bei einer Konzentration von  $2 \mu M$  Cisplatin im Vergleich zu den unbehandelten hippocampalen Neuronen (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) zu erkennen (siehe Abb. 26). Die Zelldichte ist bei einer Konzentration von  $1 \mu M$  Cisplatin im Vergleich zu beiden Kontrollen unverändert. Die Aufnahmen zeigen bei der Einzelbehandlung mit Olaparib in der Konzentration von  $1 \mu M$  im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keinen

95
morphologischen Unterschied (siehe Abb. 26). Des Weiteren zeigen die Aufnahmen der Kombinationsbehandlung aus 1  $\mu$ M Olaparib und 2  $\mu$ M Cisplatin einen geringen morphologischen Unterschied im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit 2  $\mu$ M Cisplatin. Es ist eine leicht verminderte Zellzahl und Zelldichte in dieser Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Cisplatin-Einzelbehandlung zu erkennen. Die Aufnahmen der Kombinationsbehandlung aus 1  $\mu$ M Olaparib und 1  $\mu$ M Cisplatin zeigen keinen morphologischen Unterschied im Vergleich zu der Einzelbehandlung zu erkennen. Die Aufnahmen der Kombinationsbehandlung aus 1  $\mu$ M Olaparib und 1  $\mu$ M Cisplatin zeigen keinen morphologischen Unterschied im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit 1  $\mu$ M Cisplatin (siehe Abb. 26).

#### Hippocampale Neurone 72 h Behandlung



Kon

DMSO



1 µM Ola

1 µM CisPt

2 µM CisPt



1 µM Ola + 1 µM CisPt

1 μM Ola + 2 μM CisPt

Abbildung 26 Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) und Cisplatin.

Die primären Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/well) wurden 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) (Ola) und des Chemotherapeutikums Cisplatin (CisPt) behandelt. Im Anschluss wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der hippocampalen Neurone angefertigt. Die dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die Zelldichte als auch die morphologischen Unterschiede der hippocampalen Neurone nach einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit  $1 \mu M$  Olaparib (*Ola*) und mit Cisplatin (*CisPt*) in den Konzentrationen von  $1 \mu M$  und  $2 \mu M$ . Zum Vergleich sind in dieser Abbildung auch lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter hippocampaler Neurone (Kon) und der DMSO-Kontrolle (DMSO) aufgeführt. Die Zelldichte der hippocampalen Neurone konnte anhand der Aufnahmen bei einer Konzentration von 2 µM Cisplatin im Vergleich zu beiden Kontrollen leicht eingeschränkt werden. Die Aufnahmen der Kombinationsbehandlung aus 1 µM Olaparib und 2 µM Cisplatin zeigt eine leicht verminderte Zellzahl und Zelldichte im Vergleich zu der Kon = unbehandelte Einzelbehandlung mit 2 µM Cisplatin. (Abk.: Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid)

Mit einer zunehmenden Konzentration von Cisplatin in den Cisplatin-Einzelbehandlungen dieses Versuches verringerte sich die Zellviabilität der hippocampalen Neurone (siehe Abb. 27). Die Kombinationsbehandlungen aus dem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) und Cisplatin zeigten im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit Cisplatin im Mittel einen erhöhten Verlust der Zellviabilität (siehe Abb. 27). Die Ergebnisse waren für die Einzelbehandlung mit 2 µM Cisplatin und für die jeweilige Kombinationsbehandlung aus 1 µM Olaparib und 2 µM Cisplatin ebenfalls signifikant im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) (siehe Abb. 27). Die Kombinationsbehandlungen aus Olaparib und Cisplatin konnten im Vergleich zu den Cisplatin-Einzelbehandlungen die Sensibilität der hippocampalen Neuronen für Cisplatin nicht signifikant steigern (siehe Abb. 27).

Zusammenfassend betrachtet, führten sowohl die Einzelbehandlungen als auch die Kombinationsbehandlungen zu einem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität in hippocampalen Neuronen. Eine PARP-Inhibition mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) konnte, trotz des erhöhten Verlustes der Zellviabilität, die Sensibilität der hippocampalen Neurone gegenüber einer Einzelbehandlung mit Cisplatin nicht signifikant erhöhen.



Abbildung 27: Dosis-Wirkungs-Beziehungen der primären Zellen (hippocampale Neurone) nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) und Cisplatin.

Es wurden primäre Zellen (hippocampale Neurone) (172 000 Zellen/well) 2 Wochen nach der Aussaat für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen des PARP-Inhibitors Olaparib (Lynparza) (Ola) und Cisplatin (CisPt) behandelt. Das Balkendiagramm zeigt zur Vereinfachung der Visualisierung orangefarbige Balken für die Einzelbehandlung mit Olaparib (Ola) und blaufarbige Einzelbehandlung mit Cisplatin (CisPt). für die Die Balken Balken für die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sind mintgrün markiert. Zur Zellviabilitätsmessung wurde je ein Alamar Blue Assay durchgeführt und der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation angegeben (Zellviabilität). Die dargestellten Ergebnisse wurden als Anteil lebender Zellen in Prozent zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, die auf 100 % normalisiert wurde. Die Einzelbehandlungen mit Cisplatin bezogen sich hierbei auf die unbehandelte Kontrolle (Kon), wohingegen die Einzelbehandlungen mit Olaparib und die Kombinationsbehandlungen aus beiden Chemotherapeutika sich auf die DMSO-Kontrolle (DMSO) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus insgesamt drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N = 1) für die 72 h Behandlungen. Die Signifikanzen der behandelten Proben stehen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Kon, DMSO). Eine Signifikanz der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung mit Cisplatin ist nicht gegeben. Die Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede behandelter Proben im Veraleich zur ieweiligen Kontrolle (Kon. DMSO) erfolgte durch die Verwendung folgender Symbole:  $* = p \le 0.05$ ;  $*** = p \le 0.001$ . (Abk.: Kon = unbehandelte Kontrolle. DMSO = Dimethylsulfoxid, n = Anzahl der unabhängigen Versuche, N = Anzahl der technischen Replikate pro Versuch)

# 4. Diskussion

## 4.1. Wachstumsverhalten der Neuroblastomzellen

Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigte bei einer Zellzahl von 5000 Zellen nach der Aussaat eine Verdopplungszeit von 62 h und bei einer Zellzahl von 10 000 Zellen nach der Aussaat keine Verdopplung in einem Zeitfenster von 72 h. Bei einer Zellzahl von 5000 Zellen nach der Aussaat zeigten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen eine Verdopplungszeit von 48 h und bei einer Zellzahl von 10 000 Zellen nach der Aussaat eine Verdopplungszeit von 53 h. Laut Herstellerangaben der DSMZ beträgt die Verdopplungszeit der Neuroblastomzelllinie IMR-32 ca. 40–50 h und der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y > 55 h (112).

Das Wachstumsverhalten der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ist trotz einer etwas zeitlich gesteigerten Proliferation im Vergleich zu den Herstellerangaben plausibel. Die Signifikanz ist zudem auch nach einer Wachstumszeit von 48 h und 72 h im Vergleich zur Proliferationszeit von 24 h gegeben. Das Wachstumsverhalten der Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 scheint in den Proliferationsanalysen trotz signifikanter Ergebnisse im Vergleich zur Proliferationszeit von 24 h bei einer Zellzahl von 10 000 Zellen nach Aussaat suspekt, da keine Verdopplung nach einer Proliferationszeit von 72 h auftrat. In der Regel proliferieren die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 schneller als die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. Das war hier jedoch nicht der Fall. Das Wachstum der Neuroblastomzelllinie IMR-32 war, entgegen den Herstellerangaben, deutlich langsamer.

Einen Grund für dieses Ergebnis könnte ein zufälliger Laborfehler sein, der innerhalb des beschränkten Zeitraumes, in der die Proliferationsanalysen stattgefunden haben, aufgetreten sein könnte. Die Proliferationsanalysen der IMR-32-Neuroblastomzellen fanden innerhalb eines Zeitraumes von 3 Wochen statt. Vielleicht wäre bei einer höheren Anzahl von Proliferationsanalysen in verschiedenen Zeiträumen ein anderes Ergebnis bei den IMR-32-Neuroblastomzellen zustande gekommen. Weitere Ursachen könnten auch ein Proliferationsstopp, ein Zellzyklusarrest oder eine Apoptose aufgrund schlechter Wachstumsbedingungen oder unbeabsichtigter, zufälliger Kontaminationen sein. Es konnte in jedem Versuch der Behandlungen mit den verwendeten Chemotherapeutika eine Abnahme der Zelldichte oder Zellschäden der unbehandelten Kontrollgruppen durch eine morphologische Beurteilung in einem binokularen Mikroskop ausgeschlossen werden (siehe Abb. 4 B und lichtmikroskopische Fotoaufnahmen im Ergebnisteil). Die Neuroblastomzellen zeigten unabhängig von der Zelllinie stets eine ausreichende Zelldichte (Zellrasen zu ca. 70–80 % bedeckt nach Aussaat von 10 000

Zellen) an, bevor und nachdem sie mit den entsprechenden Chemotherapeutika behandelt wurden. Zudem haben die Ergebnisse trotz gegebener Signifikanz im Vergleich zur Proliferationszeit von 24 h eine niedrigere Aussagekraft, da lediglich zwei Versuche in beiden Neuroblastomzelllinien durchgeführt wurden. Die Aussagekraft der Ergebnisse der Proliferationsanalysen ist aus diesen Gründen fragwürdig zu interpretieren. Es hätten mehr Proliferationsanalysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb des Forschungszeitraumes stattfinden müssen, um eine gute Aussagekraft zu erhalten. Das wissenschaftliche Design bezgl. der Proliferationsanalysen wird daher als verbesserungswürdig bewertet.

Die Aussagekraft der Einzel- und Kombinationsbehandlungen ist trotz des suspekten Wachstumsverhaltens der Neuroblastomzelllinie IMR-32 in den Proliferationsanalysen dennoch gegeben, da stets unbehandelte Kontrollgruppen mitgeführt wurden, deren Wachstumsverhalten unmittelbar vor und nach den jeweiligen Behandlungen mit den verwendeten Chemotherapeutika kontrolliert wurde. Auch wenn der Grund für das langsamere Wachstum der IMR-32-Neuroblastomzellen im Vergleich zu der Wachstumszeit der Herstellerangaben ein Proliferationsstopp, eine eingeschränkte Zelldichte oder ein Zellzyklusarrest wäre, so wäre die Aussagekraft der Einzelbehandlungen und Kombinationsbehandlung dennoch gegeben, da jedes Experiment unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde und Zellviabilitäts-Verluste durch den Einfluss der Chemotherapeutika unter den gleichen Bedingungen gemessen wurde.

#### 4.2. Interpretation der Auswirkungen von Cisplatin auf Neuroblastomzellen

In den Zellviabilitätsmessungen induziert Cisplatin, als Teil der Induktionschemotherapie der Hochrisikogruppe des Neuroblastoms, eine dosis- und teilweise Behandlungsdauerabhängige Reduktion in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y (siehe Abb. 8 und Tabelle 20) (9). Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen ist die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen bei beiden Neuroblastomzelllinien gestiegen, von Cisplatin wodurch diese Zellviabilitätsverluste bestätigt werden (siehe Abb. 7 A/B). Es konnte in anderen Untersuchungen ein ähnlicher morphologischer Befund (siehe 3.3) nach einer Behandlung mit Cisplatin in IMR-32 und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen beschrieben werden (138,139). Die Signifikanz **Dosis-Wirkungs-Kurven** der beider Neuroblastomzelllinien und beider Behandlungszeiten ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weitgehend überall gegeben, außer im niedrigen Konzentrationsbereich nach einer 24 h Behandlung (siehe Abb. 8). Die Ergebnisse der Messungen der Zellviabilität haben eine hohe Aussagekraft, da die Signifikanzen größtenteils gegeben sind und fünf bis sechs unabhängige Versuche durchgeführt wurden. Um die Ergebnisse im niedrigen Konzentrationsbereich der 24 h Behandlung zu bestätigen, in der keine Signifikanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegeben sind (siehe Abb. 8), könnte eine Versuchswiederholung, ggf. auch mit einer anderen Methode zur Messung der Zellviabilität wie z. B. dem Neutralrot-Assay oder MTT-Assay durchgeführt werden (140,141). Es konnte gezeigt werden, dass Cisplatin in der 24 h Behandlung einen signifikant toxischen Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erst ab einer Konzentration von 2 µM aufzeigt, während nach einer 72 h Behandlung bei nahezu jeder der verwendeten Konzentrationen ein signifikant toxischer Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 8). In dem Konzentrationsbereich von 1–10 µM zeigte sich für beide Neuroblastomzelllinien ein signifikanter Unterschied beider Behandlungszeiten (siehe Abb. 8 und Tabelle 21). Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Konzentration, sondern auch die Behandlungsdauer von Cisplatin einen Einfluss auf die Zytotoxizität ausübt. Dies entspricht der Haber'schen Regel, in der ein Summationsgift wie Cisplatin bei einer Verlängerung der Behandlungsdauer trotz identischer Dosisgabe oder niedrigerer Dosisgabe dieses Summationsgiftes im Vergleich zur vorherigen kürzeren Behandlungsdauer einen gleichen oder sogar größeren zytotoxischen Effekt erzielen kann (142,143). Aufgrund einer unzureichenden Ausscheidung oder schlechten Abbaubarkeit kann ein Summationsgift im Organismus akkumulieren und zu einer chronischen Intoxikation führen (143). Cisplatin kann auch mehrere Monate nach Abschluss der Behandlung im Gewebe nachgewiesen werden. Es wird in der Niere angereichert, da es von den Zellen des proximalen Tubulus über den Transporter OCT2 (siehe 1.11) basolateral aufgenommen wird, jedoch apikal über den Transporter solute carrier family 47 member 2 (SLC47A2, MATE-2K) diese Zellen nur schlecht verlassen kann (143). Zum einen zeigt jede der Konzentrationen, die in den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien verwendet wurden, einen signifikant toxischen Effekt in der 72 h Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zum anderen sind nach einer Behandlungszeit von 72 h deutlich niedrigere Konzentrationen von Cisplatin zum Verlust der Zellviabilität ausreichend im Vergleich zur Behandlungszeit von 24 h (siehe Abb. 8 und Tabelle 20). Um für die Klinik einen Hinweis hervorzubringen, dass niedrigere Dosen von Cisplatin als Monotherapeutikum sogar einen besseren Behandlungserfolg bewirken könnten, sofern die Behandlungsdauer zunehme, müssten klinische Versuche unter Berücksichtigung der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik erfolgen. Niedrige Dosen von Cisplatin zeigen in der Regel weniger unerwünschte Arzneimittelreaktionen als hohe Dosen (98,102). Die unerwünschten Arzneimittelreaktionen sind dosislimitierend und

somit von der Dosis abhängig. Höhere Dosen ergeben demnach ein vermehrtes oder stärkeres Auftreten unerwünschter Arzneimittelreaktionen bei gleicher Expositionsdauer (98,102).

Des Weiteren zeigen die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 nach einer Behandlungszeit von 72 h im niedrigen Konzentrationsbereich eine deutlich höhere Sensibilität im Vergleich zur Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (siehe Abb. 8). Eine erhöhte therapeutische Potenz Cisplatins bei den Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 ist auch in den Inhibitory-Concentration-50 % (IC50)-Werten und den Inhibitory-Concentration-80 % (IC<sub>80</sub>)-Werten erkennbar (siehe Tabelle 20). Der IC<sub>50</sub>-Wert gibt die ungefähre Konzentration an, bei der die Zellviabilität der Zellpopulation um 50 % reduziert ist. Der Anteil an lebenden, aktiven Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation beträgt hier also 50 %. Beim  $IC_{80}$ -Wert wird die ungefähre Konzentration angezeigt, bei der die Zellviabilität der Zellpopulation um 80 % reduziert ist. Der Anteil an lebenden, aktiven Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellpopulation beträgt beim IC80-Wert 20 %. Je geringer die IC-Werte ausfallen, desto höher ist die therapeutische Potenz des Chemotherapeutikums (142). Mithilfe der IC-Werte kann die richtige Dosis und Behandlungsdauer für die Anwendung von Cisplatin und anderen Chemotherapeutika besser eingeschätzt werden als ohne Berücksichtigung der IC-Werte (142). Die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen nach einer 72 h Behandlung mit Cisplatin deuten darauf hin, dass ein Neuroblastom mit MYCN-Amplifikation scheinbar sensibler auf Cisplatin reagiert als ein Neuroblastom ohne MYCN-Amplifikation. Für die Klinik könnte dies bedeuten, dass Cisplatin als Monotherapeutikum im Rahmen der Neuroblastomtherapie einen besseren Behandlungserfolg bei einer MYCN-Amplifikation erzielen könnte als bei einem Neuroblastom ohne MYCN-Amplifikation, sofern klinische Studien diese Ergebnisse bestätigen können. Das Proto-Onkogen MYCN ist an wichtigen Prozessen des Neuroblastoms beteiligt, wie bspw. der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum, dem Energiestoffwechsel und der Apoptose und dient als wichtigster genetischer Marker für eine schlechte Prognose (7,8). Daher werden Patienten, bei denen sowohl eine Neuroblastomerkrankung als auch eine MYCN-Amplifikation festgestellt wurde, nach aktueller Leitlinie in die Hochrisikogruppe eingeschlossen (9). Eine bessere Kombinationstherapie zu finden, ist insbesondere für die Hochrisikogruppe von großer Wichtigkeit und Bestandteil dieser Arbeit. Die Annahme, dass ein Neuroblastom mit MYCN-Amplifikation sensibler auf Cisplatin oder ein anderes Chemotherapeutikum reagiert, erscheint nachvollziehbar, da MYC-Proteine zu einem erhöhten Replikationsstress führen, der eine Aktivierung der DNS-Schadensantwort auslösen kann (29). Das Proto-Onkogen MYCN induziert eine erhöhte Transkription von

p53 (144). Irreparable DSB können zu einer Aktivierung von ATM führen (siehe Abb. 2), wodurch ebenfalls die p53-Konzentration ansteigen kann (55). Aktiviertes p53 kann einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase einleiten (55). Extrem hohe Konzentrationen von p53 können eine Apoptose induzieren (55). Bei etwa 50 % aller Tumorerkrankungen sind p53-Mutationen nachweisbar (145). Dies ist insofern von Bedeutung, dass diese genetisch mutierten Tumorzellen nicht in der Lage sind, die Apoptose einzuleiten und daher schlechter auf eine Chemotherapie ansprechen (146). Das Neuroblastom ist eine Tumorerkrankung, in der selten eine p53-Mutation nachweisbar ist (28). Aufgrund des seltenen Nachweises einer p53-Mutation in Neuroblastomzellen und einer erhöhten Transkription von p53 infolge der MYCN-Amplifikation sowie infolge von Cisplatin induzierten DSB, ist die Induktion eines Zellzyklusarrestes in der G1-Phase oder eine Apoptose bei den IMR-32-Neuroblastomzellen naheliegend. Dies könnte eine Ursache sein, warum Neuroblastomzellen mit MYCN-Amplifikation sensibler auf Cisplatin reagieren als Neuroblastomzellen ohne MYCN-Amplifikation. Einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase sowie eine Apoptose der IMR-32-Neuroblastomzellen kann durch die Induktion des p53-Signalweges hervorgerufen werden, die durch eine Aktivierung der ATM infolge des Auftretens von DSB ausgelöst werden kann (siehe Abb. 2) (55,101). Vorherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass MYCN Neuroblastomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose sensibilisierte (2). Neuroblastomzellen mit induzierter MYCN-Expression zeigten in vorherigen Untersuchungen nicht nur bei Cisplatin, sondern auch bei anderen Chemotherapeutika, die in die entsprechenden Behandlungsrichtlinien aufgenommen wurden und in der Klinik eingesetzt werden (siehe Tabelle 6), stärkere Apoptosewerte als Neuroblastomzellen ohne MYCN-Expression. Des Weiteren konnte eine Anhäufung von Zellpopulationen in der G<sub>2</sub>/M-Phase sowie eine Beschleunigung des Übergangs von der G1-Phase zur S-Phase in Neuroblastom-Zellen mit MYCN-Expression in Folge einer Cisplatin-Behandlung festgestellt werden (147). In diesem Versuch wurden Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie SH-EP Tet-21N (SH-EP<sup>MYCN</sup>) verwendet (147). Eine Aktivierung der DNS-Schadensantwort bei bspw. MYCN-amplifizierenden Zelllinien kann einen Zellzyklusarrest herbeiführen, in der die Tumorzelle versucht, auftretende DNS-Schäden (SSB, DSB) zu reparieren. Entweder ist die Reparatur erfolgreich und die Tumorzelle sichert ihr Überleben oder es misslingt die Reparatur, wodurch die Apoptose induziert werden kann. Ein dauerhafter Zellzyklusarrest, in der die Zelle es nicht schafft DNS-Schäden zu reparieren, kann ebenfalls zur Apoptose führen (56,70-72). Dem Replikationsstress einer alleinigen MYCN-Amplifikation kann die Tumorzelle in der Regel aufgrund einer Aktivierung der DNS-Schadensantwort entgegenwirken (147). Bei einer Kombination mit Cisplatin

steigen aufgrund der Mehrfachbelastung die Apoptosewerte (147). Cisplatin sorgt ebenfalls für einen Replikationsstress, der zu einer Aktivierung der DNS-Schadens-Antwort führt (148). Zudem konnte bei Tumorzellen des Ovarialkarzinoms gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von *MYCN* eine Cisplatin-Resistenz förderte, wodurch das Ergebnis unterstützt wird, dass Neuroblastomzellen mit *MYCN*-Amplifikation deutlich sensibler auf Cisplatin reagieren als Neuroblastomzellen ohne *MYCN*-Amplifikation (149).

Da das Proto-Onkogen MYCN und das Chemotherapeutikum Cisplatin jeweils zu einer Aktivierung der DNS-Schadensantwort führen kann, sollten die Proteine der DNS-Schadensantwort mit einer sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) aufgetrennt werden und anschließend mit Western-Blot-Analysen detektiert werden (29). Ein Nachweis von bspw. phosphoryliertem CHK1, CHK2 oder p53 (siehe Abb. 2), hätte eine Aktivierung der DNS-Schadensantwort bestätigen können. Interessant wäre auch der Nachweis von inaktivem, phosphoryliertem CDC25A, welches Cyclin/CDK-Komplexe inaktivieren kann und auf einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase hinweisen kann (71,150). Der Nachweis von dephoshoryliertem CDC25A könnte dementsprechend ein Anzeichen für einen Übergang von der G1-Phase zur S-Phase sein (71,151). Cycline, die den Zellzyklus regulieren, können ebenfalls durch Immunoblotting nachgewiesen werden. Durch die Messung der Cycline kann bestimmt werden, in welcher Zellzyklusphase sich die Neuroblastomzellen befinden (152). Cyclin D sowie die cyclinabhängigen Kinasen cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) und cyclindependent kinase 6 (CDK6) bilden einen wichtigen Komplex für den Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase (55,153). Dieser Komplex kann beim Vorliegen von DSB durch den CDK-Inhibitor cyclin dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A, p21<sup>cip</sup>) gehemmt wodurch eine Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins werden. RB transcriptional corepressor 1 (RB1, Retinoblastomprotein) und eine Freisetzung von E2F transcription factor 1 (E2F1) verhindert wird (55). Die Folge ist ein Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase (154). Der Nachweis einer Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins RB1 könnte aus diesem Grund auf einen Übergang von der G1-Phase zur S-Phase hinweisen (55). Der Hinweis eines G1-Arrestes könnte daher durch dephosphoryliertes RB1 erbracht werden. Die Transkription des Gens CDKN1A wird über aktiviertes p53 stimuliert (55). Auch aus diesem Grund ist ebenfalls ein Nachweis von phosphoryliertem p53 und eine Ermittlung der p53-Konzentration von Interesse.

Darüber hinaus interessant wäre auch der Nachweis einer Phosphorylierung des Proteins GSK3β, das beim Auftreten von DSB von ATM der DNS-Schadensantwort aktiviert werden kann. GSK3β wurde schon als Tumorsuppressor beschrieben, der

Proteine aktivieren kann, die wiederrum die DNS-Schadensreparatur und den Zellzyklus beeinflussen (155). In einer Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass GSK3β die Phosphatase CDC25A phosphorylierte und dass eine Inaktivierung von GSK3ß mit einer Überproduktion von CDC25A korrelierte (156). Durch die Phosphorylierung von CDC25A kann ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase induziert werden (150). Eine Inhibition von GSK3β korrelierte mit einem beschleunigten Übergang von der G1-Phase zur S-Phase (156). Wenn eine Aktivierung der GSK3β, aufgrund einer Cisplatin-Therapie, in den Neuroblastomzellen nachgewiesen werden kann, könnten auch GSK3β-Inhibitoren als Kombinationsbehandlung mit Cisplatin vorgeschlagen werden, um insbesondere MYCN-amplifizierte Neuroblastomzelllinien besser zu "bekämpfen". Diese Kombinationsbehandlung aus einem GSK3β-Inhibitor und Cisplatin könnte einen beschleunigten Eintritt in die S-Phase und eine Akkumulation geschädigter DNS (DSB) in der S-Phase der Neuroblastomzellen bewirken, der vermutlich zu einem Zellzyklusarrest frühestens in der S-Phase oder zu einer Apoptose führen kann. Eine Aktivierung der GSK3β, aufgrund einer Cisplatin-Therapie, konnte in vorherigen Untersuchungen in cochleären Hörsinneszellen nachgewiesen werden (157). Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass die Cisplatin-induzierte Ototoxizität mit der Aktivierung der GSK3ß verbunden sein könnte (157). Nicht nur GSK3β-Inhibitoren, sondern auch Inhibitoren von ALK, PI3K, AKT, CDK, HDAC8 oder von anderen Proteinen, wie bspw. AURKA oder LIN28B, die an der Stabilität des Proto-Onkogens MYCN beteiligt sind, können einen Therapieansatz darstellen, der eventuell die Sensibilität von Neuroblastomzellen auf Cisplatin erhöht, insbesondere bei MYCNamplifizierte Neuroblastomzelllinien (28,48,50,52,68).

Zur Sicherstellung, ob Cisplatin tatsächlich DSB in den Neuroblastomzelllinien IMR-32 und SH-SY5Y verursacht, sollten immunzytochemische Färbungen durchgeführt werden, wie bspw. die Foci  $\gamma$ -*H2A.X variant histone* (H2AX) und *tumor protein p53 binding protein 1* (TP53BP1). H2AX ist ein Histon, das beim Vorliegen von DSB durch Proteinkinasen wie ATM oder ATR aktiviert wird. Das dadurch entstehende  $\gamma$ H2AX kann durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen werden (158). TP53BP1 interagiert mit p53 und haftet in Schadensnähe am Chromatin (159). Ein weiterer Test zum Nachweis von DSB ist *BrdU in situ nick end labeling* (ISEL), bei dem Bromdesoxyuridin (BrdU) die freien OH-Gruppen der Strangbrüche bindet und immunzytochemisch durch einen Antikörper nachgewiesen werden kann (160).

Eine erniedrigte Zellviabilität im *Alamar Blue Assay* kann durch eine Apoptose, Proliferationshemmung bzw. einem Zellzyklusarrest bedingt sein (119). Um dies genauer zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Es

konnte nachgewiesen werden, dass Cisplatin sowohl in der Neuroblastomzelllinie IMR-32 einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase und S-Phase als auch eine dosisabhängige Apoptose in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y induziert. Die Signifikanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sind bis auf den G1-Arrest, der eine Signifikanz bei einer Konzentration von 25 µM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und im Vergleich zur Konzentration von 5 µM aufzeigt, größtenteils gegeben (siehe Abb. 9 B). Die Ergebnisse zeigen, dass mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin die IMR-32-Neuroblastomzellen in einen G1-Arrest übergegangen waren, während die Fraktion der S-Phase signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin abnahm (siehe Abb. 9 B). Ein Grund dafür wäre, dass nach einer Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von Cisplatin die Anzahl von DNS-Schäden, bspw. aufgrund von DSB, zum Messzeitpunkt niedriger sein könnte als nach einer Behandlung mit hohen Konzentrationen von Cisplatin. Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 könnten sich somit bei hohen Konzentrationen von Cisplatin schützen, um die Replikation (S-Phase) geschädigter DNS, bspw. aufgrund von DSB, zu vermindern und um diese Schäden innerhalb eines G1-Arrestes bspw. mithilfe der homologen Rekombination zu reparieren. Bei einer niedrigen Konzentration von Cisplatin könnte eine niedrige Anzahl der DSB innerhalb der G1-Phase der IMR-32-Neuroblastomzellen der Grund dafür sein, den G1-Checkpoint zu überwinden und daher in der S-Phase zu arretieren. Ähnlich dieser Überlegung konnte in einer Untersuchung der Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib bei hepatozellulären Tumorzellen mit zunehmenden Konzentrationen einen dosisabhängigen G<sub>1</sub>-Arrest sowie mit zunehmenden Konzentrationen eine Abnahme der Fraktion der S-Phase induzieren (161). Eine weitere Ursache für den dosisabhängigen G1-Arrest der IMR-32-Neuroblastomzellen könnten verschiedene p53-Konzentrationen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien sein. Der G<sub>1</sub>-Checkpoint ist von p53 abhängig (56). Aktiviertes p53 kann die Transkription des Gens CDKN1A stimulieren, sodass der Zellzyklus in der G1-Phase so lange angehalten werden kann, bis die Schäden an der DNS behoben sind (55). Eine Reparatur in der G1-Phase könnte mithilfe der homologen Rekombination durchgeführt worden sein, die für eine DSB-Reparatur in der S-Phase und G1-Phase verantwortlich ist (162). Eine DSB-Reparatur außerhalb der S-Phase und G1-Phase wird mithilfe der NHEJ durchgeführt (162). Die Ursache für den G1-Arrest der IMR-32-Neuroblastomzellen in hohen Konzentrationen von Cisplatin könnte im Vergleich zu niedrigen Konzentrationen von Cisplatin eine erhöhte Konzentration von p53 sein. Einem vorherigen Versuch zur Folge konnte das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil in einer Zelllinie des Hypopharynx-Karzinoms einen CDKN1A-abhängigen Zellzyklusarrest in der G1-Phase induzieren, der

ebenfalls mit einer erhöhten Expression von p53 einherging (163). Cisplatin konnte allerdings in diesem Versuch keinen G1-Arrest, sondern eine p53-abhängige Apoptose sowie einen CDKN1A-unabhängigen Zellzyklusarrest in der S-Phase induzieren (163). In einer anderen Untersuchung konnte Cisplatin ebenfalls keinen p53-abhängigen G1-Arrest induzieren (164). Einer weiteren Untersuchung zur Folge kann Cisplatin einen G1-Arrest ausschließlich in Zellen induzieren, die p53 in der Wildform exprimieren (165). Aufgrund der Seltenheit einer p53-Mutation in Neuroblastomzellen, ist die Induktion eines G1-Arrestes der IMR-32-Neuroblastomzellen nachvollziehbar (28). In vorherigen Versuchen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Zellen verschiedener Tumorerkrankungen aufgrund einer Cisplatin-Behandlung einen G1-Arrest induzieren können (166). Eine Untersuchung des p53-Status in Bezug auf diesen G1-Arrest fand jedoch nicht statt (166). Immunzytochemische Färbungen zur Ermittlung der mitotischen Aktivität und ein 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)-Zellproliferations-Assay könnten die Ergebnisse dieser Arbeit vertiefen. Ein EdU-Zellproliferations-Assay könnte den Einfluss Cisplatins auf die S-Phaseaktivität bestimmen. EdU ist ein Thymidinanalogon, das während der S-Phase in die DNS eingebaut wird und mithilfe eines Fluoreszenzmarkers detektiert werden kann (167). Der Zellzyklusarrest in der G1-Phase oder in der S-Phase könnte aber auch ohne die Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin bedingt sein, da die IMR-32-Neuroblastomzellen in den Proliferationsanalysen im Vergleich zu den Herstellerangaben ein langsameres Wachstum aufzeigten.

Die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zeigt eine dosisabhängige Apoptose, da mit zunehmender Konzentration von Cisplatin eine signifikante Zunahme der SubG1-Fraktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 9 B). Daraus lässt sich schließen, dass die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y bei einer zunehmenden Konzentration von Cisplatin vermehrt in die Apoptose übergehen. Diese Erkenntnis könnte durch eine SDS-PAGE bestätigt werden. Mithilfe von fluoreszierenden, aktivitätsbasierten Sonden könnte die Aktivität der Caspasen invitro nachgewiesen werden (168). Eine Apoptose der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y aufgrund einer Cisplatin-Behandlung, konnte zeitlich vor Beginn der Arbeit nachgewiesen werden und wird zudem ebenfalls mit dieser Arbeit bestätigt (169–174). Die G1-Fraktion und die G2/M-Fraktion der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zeigen eine signifikante Abnahme nach einer 24 h Behandlung mit 25 µM Cisplatin im Vergleich zur Behandlung mit 5 µM Cisplatin (siehe Abb. 9 B). Des Weiteren zeigt die SubG1-Fraktion eine signifikante Zunahme nach einer 24 h Behandlung mit 25 µM Cisplatin im Vergleich zur Behandlung mit 5 µM Cisplatin (siehe Abb. 9 B). Daraus lässt sich schließen, dass bei einer Konzentration von 25 µM Cisplatin die Zellpopulation der SH-SY5Y-

Neuroblastomzellen in der G<sub>1</sub>-Phase und G<sub>2</sub>/M-Phase zugunsten der Zellpopulation der SubG<sub>1</sub>-Phase abnahm. In diesen hohen Konzentrationen von Cisplatin ist der apoptotische Anteil der Zellpopulation dieser Neuroblastomzelllinie größer als in der G<sub>1</sub>-Phase und G<sub>2</sub>/M-Phase. Nach einer Kontrolle am G<sub>1</sub>-Checkpoint, G<sub>2</sub>-Checkpoint und M-Checkpoint könnten die Anzahl und Ausprägungen der DNS-Schäden (SSB, DSB) so groß gewesen sein, dass nach dieser Kontrolle die Apoptose eingeleitet wurde. Dies könnte die Abnahme der G<sub>1</sub>-Fraktion, die Abnahme der G<sub>2</sub>/M-Fraktion und die Zunahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktion der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen erklären.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cisplatin eine dosis- und behandlungsdauerabhängige Reduktion der Zellviabilität in beiden Neuroblastom-Zelllinien bewirkt und dass die MYCN-amplifizierte Neuroblastomzelllinie IMR-32 eine deutlich höhere Sensibilität auf Cisplatin zeigt als die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. Reduktion der Vorherige Studien konnten sowohl eine Zellviabilität von Neuroblastomzellen nach einer Cisplatin-Behandlung als auch eine höhere Sensibilität MYCN-amplifizierter Neuroblastomzellen für Cisplatin erfassen. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit darauf hingewiesen werden, dass Cisplatin in der Neuroblastomzelllinie IMR-32 einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase und S-Phase bewirkt. Die Ergebnisse weisen zudem auf eine dosisabhängige Apoptose in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y hin. Präklinische Studien können die Ergebnisse eines Zellzyklusarrestes in der G1-Phase und S-Phase der IMR-32-Neuroblastomzellen sowie einer dosisabhängigen Apoptose der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nach einer Behandlung mit Cisplatin unterstützen.

### 4.3. Interpretation der Auswirkungen der CHK1-Inhibition und der Auswirkungen auf Neuroblastomzellen in Bezug zur Kombination mit Cisplatin

Die CHK1-Inhibition mit LY2603618 (*Rabusertib*) bewirkte bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 ab einer Konzentration von 0,25 µM und bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen ab einer Konzentration von 1 µM einen signifikanten Verlust der Zellviabilität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 13). Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen konnte dieser zytotoxische Effekt mit zunehmender Konzentration von LY2603618 ebenfalls erkannt werden (siehe Abb. 12). Die morphologische Beurteilung der Neuroblastomzellen nach einer Behandlung mit LY2603618 (siehe 3.6) ähnelt jener einer vorherigen Untersuchung nach einer Behandlung mit Cisplatin (138,139). Für die Klinik bedeutet dies, dass eine CHK1-Inhibition als Therapeutikum des Neuroblastoms möglicherweise einen Behandlungserfolg erzielen kann, sofern klinische Studien den

Nutzen einer CHK1-Inhibition bestätigen können. In einer vorherigen Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass der CHK1-Inhibitor Prexasertib als Mono-Therapeutikum in Neuroblastomzellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation einen Verlust der Zellviabilität und DSB hervorruft sowie eine Apoptose induziert (175). In dieser vorherigen Untersuchung wurde die *MYCN*-amplifizierte *Kelly*-Neuroblastom-Zelllinie und die nicht *MYCN*-amplifizierte NBL-S-Neuroblastomzelllinie verwendet (175). Ein anderer Versuch konnte einen Verlust der Zellviabilität in verschiedenen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen infolge der Behandlung mit den CHK1-Inhibitoren CHIR-124 und PF477736 aufzeigen (67). Der CHK1-Inhibitor AZD7762 konnte einen Zellviabilitätsverlust in Melanomzellen bewirken (176). Ein Verlust der Zellviabilität konnte einen Implifizierten Leukämie (CLL) nach einer Behandlung mit dem CHK1-Inhibitor MU380 nachgewiesen werden (177).

Aufgrund der CHK1-Inhibition mit LY2603618 konnte die DNS-Schadensantwort höchstwahrscheinlich gehemmt werden. Um dies zu belegen, sollten die Proteine der DNS-Schadensantwort bspw. mit einer SDS-PAGE aufgetrennt werden und anschließend mit Western-Blot-Analysen detektiert werden (29). Von besonderem Interesse bei dieser Hemmung der DNS-Schadensantwort wäre der Nachweis einer Aktivierung oder Deaktivierung von CDC25A (siehe Abb. 2), die auf einen Übergang in die nächste Zellzyklusphase bzw. einen Zellzyklusarrest hinweisen könnte. Cyclin/CDK-Komplexe könnten ebenfalls nachgewiesen werden (152). Eine Inhibition von CHK1 führt zu einer Aktivierung des CDC25A, welches wiederum die Cyclin/CDK-Komplexe aktiviert, wodurch die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus übergehen kann. Dies kann zu einer weiteren DNS-Synthese, zur Replikation und somit zur Mitose geschädigter DNS führen (mitotische Katastrophe) (71). Immunzytochemische Färbungen wie bspw. die Foci y-H2A.X (siehe 4.2) oder ein Comet-Assay könnten DSB nachweisen, die zu einer mitotischen Katastrophe führen können (158,178). In einem vorherigen Versuch konnten DSB infolge einer CHK1-Inhibition nachgewiesen werden (178). Dieser Nachweis erfolgte in Osteosarkomzellen und Pankreaskarzinomzellen nach einer Behandlung mit dem CHK1-Inhibitor MK-8776 (178). Zudem konnte in diesem Versuch herausgefunden werden, dass diese CHK1-Inhibition zu einem vorzeitigen Abfeuern von Replikationsursprüngen führen kann, wodurch eine Störung der Transkription, eine Bildung von R-Schleifen und ein Kollaps der Replikationsgabel resultieren kann. Ob diese Auswirkungen tatsächlich an der Zytotoxizität dieser CHK1-Inhibition beteiligt sind, konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden (178). Anhand dieser Untersuchungen erscheint es plausibel, dass eine mitotische Katastrophe aufgrund von DSB für den Zellviabilitätsverlust der Tumorzellen beider Neuroblastom-

Zelllinien in dieser Arbeit nach einer Behandlung mit LY2603618 verantwortlich sein könnte.

Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigen in den Konzentrationen 0,25 µM-1 µM eine signifikant höhere Sensibilität gegenüber LY2603618 als die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (siehe Abb. 13). Die erhöhte therapeutische Potenz ist auch in den IC<sub>50</sub>-Werten und IC<sub>80</sub>-Werten erkennbar (siehe Tabelle 22). Auch bei der CHK1-Inhibition lässt sich anhand dieser Ergebnisse schließen, dass ein Neuroblastom mit MYCN-Amplifikation vermutlich sensibler auf eine CHK1-Inhibition reagiert im Vergleich zu einem Neuroblastom ohne MYCN-Amplifikation. Wenn klinische Untersuchungen diese Annahme bestätigen können, würde dies für die Klinik bedeuten, dass eine CHK1-Inhibition in der Neuroblastomtherapie eventuell einen besseren Behandlungserfolg bei einer MYCN-Amplifikation bewirken könnte als bei einem Neuroblastom ohne MYCN-Amplifikation. Diese Annahme scheint naheliegend zu sein, da MYCN eine Aktivierung der DNS-Schadensantwort auslöst (29). Das Proto-Onkogen MYCN konnte in einem Versuch eine Erhöhung der p53-Konzentrationen bewirken (144). Erhöhte p53-Konzentrationen können einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase oder eine Apoptose herbeiführen (55). Ein gemessener Verlust der Zellviabilität kann durch einen Zellzyklusarrest sowie einer Apoptose bedingt sein (119). Ein Zellzyklusarrest oder eine Apoptose könnten somit die Ursache der höheren Sensibilität der MYCNamplifizierten IMR-32-Neuroblastomzellen im Vergleich zu den nicht MYCNamplifizierten Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y sein. Eine CHK1-Inhibition mit Prexasertib zeigte in einem Versuch einen Verlust der Zellviabilität in MYCN-amplifizierten und nicht MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien, wobei die MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien deutlich höhere Sensibilitäten aufzeigten (152). In MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen, die eine 11q-Deletion und eine CHK1-Inhibition zeigten, kam es in vorherigen Untersuchungen zu einer synthetischen Letalität (152). Diese Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die MYCN-amplifizierten IMR-32-Neuroblastomzellen sensibler auf LY2603618 reagieren als die nicht MYCN-amplifizierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. Die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen nach einer Behandlung mit LY2603618 haben eine hohe Aussagekraft, da die Signifikanzen für beide Neuroblastomzelllinien im Vergleich zur DMSO-Kontrolle größtenteils gegeben sind und drei unabhängige Versuche durchgeführt wurden. In einem anderen Versuch konnte nachgewiesen werden, dass MYCN-amplifizierte Neuroblastomzellen weniger sensibel auf eine CHK1-Inhibition reagieren, da aufgrund einer CHK1-Inhibition DSB auftreten können, die wiederum über eine Aktivierung der DNS-Schadensantwort und über eine Reparatur

mithilfe der homologen Rekombination und NHEJ ihr Überleben sichern konnten (179). Diese Ergebnisse von Ando et al. 2019 widersprechen der Annahme, dass Neuroblastomzellen mit MYCN-Amplifikation sensibler auf eine CHK1-Inhibition reagieren als Neuroblastomzellen ohne MYCN-Amplifikation (179). Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 wurden in diesen Untersuchungen allerdings nicht verwendet (179). Die Zellviabilitätsmessungen dieser Arbeit bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien weisen darauf hin, dass eventuell das Proto-Onkogen MYCN Neuroblastomzellen für eine CHK1-Inhibition sensibilisiert. Um die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die IMR-32-Neuroblastomzellen eine höhere Sensibilität auf LY2603618 aufzeigen als die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen, zu bestätigen oder zu widerlegen, sollten weitere Versuche mit der Neuroblastomzelllinie IMR-32, ggf. mit mehreren MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien, durchgeführt werden. Möglicherweise stellt die Neuroblastomzelllinie IMR-32 eine Ausnahme dar. Spontane Mutationen könnten ebenfalls eine Rolle spielen. In nicht MYCN-amplifizierten Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH wurden bereits spontane Mutationen während der Invitro-Passage dieser Zellen entdeckt (180). Spontane Mutationen treten jedoch äußerst selten auf (180). Um diese Mutationen auszuschließen, könnte eine DNS-Sequenzierung bspw. mit Pyrosequenzierung oder anderen Verfahren der nextgeneration sequencing (NGS) weiterhelfen (181). Die Neuroblastomzelllinie IMR-32 ist nicht nur durch eine MYCN-Amplifikation gekennzeichnet, sondern auch durch die Translokation t (1;17), die ebenfalls eine Rolle für eine höhere Sensibilität MYCNamplifizierter Neuroblastomzellen spielen könnte (112,182). Des Weiteren könnte auch ein unbekannter Effekt des CHK1-Inhibitors LY2603618 (Rabusertib) dazu beigetragen haben. Nicht nur ein CHK1-Inhibitor könnte ein wirksames Therapeutikum darstellen, sondern auch eine CHK1-Überaktivierung in Abwesenheit von DNS-Schäden wie bspw. DSB (56). Eine Überaktivierung könnte vielleicht einen dauerhaften Zellzyklusarrest induzieren, indem das Wachstum des Tumors eingeschränkt wird, wodurch der therapeutische Einsatz klassischer Chemotherapeutika verhindert werden könnte. Dieses Medikament müsste CHK1 spezifisch erkennen und phosphorylieren können. Eine spezifische Kinase, die in der Lage ist, Phosphatgruppen dauerhaft auf CHK1 zu übertragen, könnte eventuell diese Überaktivierung bewirken. Ein vorheriger Versuch konnte nachweisen, dass mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1) neben ATR an einer Phosphorylierung von CHK1 beteiligt ist (183). Ob phosphorylierende Kinasen eine Überaktivierung von CHK1 bewirken können, müsste noch herausgefunden werden.

Die Kombinationsbehandlungen hatten das Ziel einen präklinischen Therapieansatz zu finden, der *in-vitro* die Sensibilität der Neuroblastomzellen auf eine Cisplatin-Therapie

erhöht. Die Kombinationsbehandlungen aus LY2603618 und Cisplatin bei den Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien zeigten im Vergleich den zu Einzelbehandlungen mit Cisplatin keinen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität (siehe Abb. 17). Für die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y sind die Signifikanzen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) größtenteils gegeben (siehe Abb. 17). Die Signifikanzen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 sind in der höchsten Konzentration der Einzelbehandlung mit Cisplatin und in der höchsten Konzentration der Kombinationsbehandlung aus LY2603618 und Cisplatin im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) gegeben (siehe Abb. 17). Die Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigte in den vorherigen Einzelbehandlungen mit Cisplatin allerdings auch im niedrigen Konzentrationsbereich signifikante Ergebnisse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kon) (siehe Abb. 8). Die Aussagekraft dieser vorherigen Einzelbehandlungen mit Cisplatin ist jedoch deutlich größer, da die Anzahl der unabhängigen Versuche dieser Einzelbehandlungen mit Cisplatin größer ist als die Anzahl unabhängiger Versuche der Kombinations-Behandlungen. Bei den Kombinationsbehandlungen wurden für beide Neuroblastom-Zelllinien zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Die höhere Aussagekraft der vorherigen Einzelbehandlungen mit Cisplatin lässt darauf schließen, dass eher die Einzelbehandlungen dieses Versuches mit Cisplatin (siehe Abb. 17) als die vorherigen Einzelbehandlungen (siehe Abb. 8) zu überdenken sind. Eine höhere Anzahl unabhängiger Versuche könnte die Aussagekraft steigern. Die niedrige Anzahl der unabhängigen Versuche ist höchstwahrscheinlich die Ursache für eine fehlende Signifikanz im niedrigen Konzentrationsbereich von Cisplatin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kon). Auch andere Varianten der statistischen Auswertung (nicht in dieser Arbeit dargestellt), wie bspw. eine parametrisch einfache Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Bonferronis Posthoc-Test führten dbzgl. zu identischen Ergebnissen im Vergleich zu den dargestellten Ergebnissen in dieser Arbeit. Der CHK1-Inhibitor LY2603618 konnte die Sensibilität der Tumorzellen beider Neuroblastom-Zelllinien gegenüber einer Einzelbehandlung mit Cisplatin nicht signifikant erhöhen (siehe Abb. 17). Bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen könnte die Kombinations-Behandlung aus LY2603618 und Cisplatin eine Tendenz zur Erhöhung der Sensibilität gegenüber einer Einzelbehandlung mit Cisplatin zeigen, was auf eine kumulative Toxizität dieser Kombinationsbehandlung hinweisen kann. Die Ergebnisse der Einzelbehandlungen mit LY2603618 (siehe Abb. 13) sowie der Kombinations-Behandlungen aus LY2603618 und Cisplatin (siehe Abb. 17) weisen darauf hin, dass eine CHK1-Inhibition MYCN-amplifizierte Neuroblastomzellen für Cisplatin nicht sensibilisieren kann, wohingegen in der Einzelbehandlung dieser CHK1-Inhibition das

Proto-Onkogen MYCN Neuroblastomzellen für eine CHK1-Inhibition sensibilisiert. Dies könnte bedeuten, dass bei MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen eine Kombinations-Behandlung aus einer CHK1-Inhibition und Cisplatin weniger effektiv ist als eine Einzelbehandlung mit dieser CHK1-Inhibition. Normalerweise ist infolge einer Kombinationsbehandlung ein größerer zytotoxischer Effekt auf Tumorzellen zu erwarten als infolge einer Einzelbehandlung mit einer Substanz, die in dieser Kombinations-Behandlung verwendet wird. Ob dieses Ergebnis ein Zufallsbefund darstellt oder auf einen unentdeckten molekularen Mechanismus hinweist, der in der Kombinations-Behandlung die MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen schützt, während in der Einzelbehandlung ein deutlicher zytotoxischer Effekt vorhanden ist, bleibt offen und sollte genauer untersucht werden. In vorherigen Untersuchungen zeigten MYCNamplifizierte Neuroblastomzellen eine höhere Sensibilität als nicht MYCN-amplifizierte Neuroblastomzellen in einer Kombinationsbehandlung mit CHK1-Inhibitoren (70,152). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen unterstützen die Ergebnisse der Zellviabilitäts-Messungen weitgehend (siehe Abb. 16). Die Beurteilung lichtmikroskopischer Aufnahmen liefert zwar einen Hinweis darauf, dass möglicherweise ein toxischer Effekt vorhanden sein könnte, aber die Aussagekraft dieser qualitativen Analysen der morphologischen Beurteilung ist im Vergleich zu den quantitativen Analysen der Zellviabilitätsmessungen niedriger (184,185).

Die präklinischen Untersuchungen bezgl. der Neuroblastomforschung über einen effektiven Nutzen einer Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und einer CHK1-Inhibition zeigten in den letzten Jahren unterschiedliche Ergebnisse. In vorherigen Untersuchungen konnten Kombinationsbehandlungen nachgewiesen werden, die sowohl eine Sensibilisierung der Neuroblastomzellen für Cisplatin als auch keine Sensibilisierung für Cisplatin aufzeigten (71). Diese Studien können die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass LY2603618 die Tumorzellen beider Neuroblastom-Zelllinien für Cisplatin nicht sensibilisiert. In diesem Versuch wurden im Vergleich zu dieser Arbeit andere Neuroblastomzelllinien und CHK1-Inhibitoren verwendet (71). In anderen Untersuchungen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine CHK1-Inhibition die Zellen verschiedener Tumorerkrankungen für zahlreiche DNS-schädigende therapeutische Maßnahmen empfindlicher macht. Zu diesen therapeutischen Maßnahmen zählen neben Cisplatin auch eine Bestrahlung und Wirkstoffe wie Antimetaboliten (Cytarabin, Hydroxyharnstoff, Gemcitabin, 5-Fluorouracil), Topoisomerase I- und II-Gifte (Etoposid, Doxorubicin, Topotecan, SN-38) und Alkylierungsmittel (Methylmethansulfonat) (70). Eine CHK1-Inhibition sensibilisierte zudem auch mehrere Tumorzellen für eine Behandlung mit dem PARP-Inhibitor Olaparib

und mit dem HDAC-Inhibitor Vorinostat (80,186). Auch Inhibitoren der Wee 1 kinase (WEE1), die CHK1 nachgeschaltet sind, zeigten in Kombination mit einer CHK1-Inhibition bei Neuroblastomzellen eine höhere Sensibilität im Vergleich zu einer Einzelbehandlung (70). Eine Kombination aus dem CHK1-Inhibitor MK-8776 und dem PARP-Inhibitor Olaparib konnte, insbesondere bei MYCN-amplifizierte Neuroblastom-Zelllinien, synergistisch wirken (80). Die Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigte hierbei die höchste Sensibilität für diese Kombination (80). LY2603618 konnte den Replikationsstress des Proto-Onkogens MYCN verstärken und die mitotischen Katastrophen fördern. Eine Kombination aus CHK1-Inhibition und PARP-Inhibition ist daher ein neuer potenzieller Behandlungsansatz, der unter dem Verzicht klassischer Chemotherapeutika weniger unerwünschte Arzneimittelreaktionen hervorrufen könnte (80). Aufgrund des Einsatzes niedriger Dosen der CHK1-Inhibitoren bei einer Kombination mit PARP-Inhibitoren könnten möglicherweise hämatotoxische oder kardiotoxische Nebenwirkungen der CHK1-Inhibitoren vermindert werden (179). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass eine Kombinationsbehandlung aus CHK1-Inhibition und ATM-Inhibition zur Blockierung der homologen Rekombination und NHEJ führt und die Sensibilität der Neuroblastomzellen für eine CHK1-Inhibition erhöht (179). Die Kombinationsbehandlungen aus einer CHK1-Inhibition und einer PARP-Inhibition bzw. ATM-Inhibition führt zu der Annahme, dass der Einsatz von klassischen Chemotherapeutika, wie bspw. Platinderivaten, eventuell in Zukunft verdrängt werden könnte, wodurch Cisplatin-bedingte Nebenwirkungen vermieden werden könnten (179). Diese erfolgsversprechenden Kombinationsbehandlungen mehrerer Studien bestätigen die Annahme, dass eine CHK1-Inhibition Neuroblastomzellen für eine Therapie mit Chemotherapeutika sensibilisieren kann. Die Hypothese, dass eine CHK1-Inhibition Neuroblastomzellen für eine Therapie mit Cisplatin sensibilisieren kann, konnte mit dieser Arbeit für die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien nicht bestätigt werden. Die CHK1-Inhibition ist jedoch in der Lage, Neuroblastomzellen für eine Therapie mit Cisplatin zu sensibilisieren (70,71). Ob diese Ergebnisse in der CHK1-Forschung tatsächlich in Hinblick auf eine Vermeidung unerwünschter Arzneimittelreaktionen und Resistenzmechanismen einen Behandlungserfolg erzielen können, müsste vorerst in weiteren präklinischen Studien und anschließenden klinischen Studien geprüft werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass eine CHK1-Inhibition mit LY2603618 (*Rabusertib*) ein Verlust der Zellviabilität in Neuroblastomzellen mit und ohne *MYCN*-Amplifikation bewirken konnte. Die *MYCN*-amplifizierte Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 zeigte eine deutlich höhere Sensibilität auf diese CHK1-Inhibition als die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Es sind Studien vorhanden, die eine höhere Sensibilität

*MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen im Vergleich zu Neuroblastomzellen ohne *MYCN*-Amplifikation bestätigen können sowie auch Studien, die diese Annahme nicht bestätigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine CHK1-Inhibition die Sensibilität der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien für Cisplatin nicht steigern kann. Daher kann anhand der Ergebnisse die Annahme, dass eine CHK1-Inhibition die Sensibilität von Neuroblastomzellen für eine Cisplatin-Therapie erhöhen kann, für die IMR-32 und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nicht bestätigt werden. Eine Sensibilisierung von Neuroblastomzellen für eine Cisplatin-Therapie infolge einer CHK1-Inhibition kann durch andere präklinische Studien sowohl widerlegt als auch bestätigt werden.

### 4.4. Interpretation der Auswirkungen der PARP-Inhibition sowie der Auswirkungen auf Neuroblastomzellen in Bezug zur Kombination mit Cisplatin

Die Zellviabilitätsmessungen konnten zeigen, dass der PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität in beiden Neuroblastomzelllinien führte (siehe Abb. 21 A). Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen ist die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von Olaparib bei beiden Neuroblastomzelllinien gestiegen, wodurch die Zellviabilitätsverluste bestätigt werden (siehe Abb. 20). Auch die morphologische Beschreibung nach einer Behandlung der Neuroblastomzellen mit Olaparib (siehe 3.10) zeigt Ähnlichkeiten zur morphologischen Beschreibung der Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 und SH-SY5Y nach einer Behandlung mit Cisplatin (siehe 3.3), die durch vorherige Untersuchungen bestätigt werden können (138, 139).Die Signifikanzen der Zellviabilitätsmessungen sind bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 ab einer Konzentration von 1 µM Olaparib und bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ab einer Konzentration von 5 µM Olaparib im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gegeben (siehe Abb. 21 A). Bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 kam es im niedrigen Konzentrationsbereich (< 1 µM Olaparib) zu einem Verlust der Zellviabilität, der im Bereich von  $0.5 \,\mu$ M $-1 \,\mu$ M Olaparib stagnierte (siehe Abb. 21 B). Die Zellviabilitätsverluste der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien weisen darauf hin. eine PARP-Inhibition als Therapeutikum dass des Neuroblastoms einen Behandlungserfolg erzielen könnte, sofern klinische Studien den therapeutischen Nutzen einer PARP-Inhibition bestätigen. Die Stagnation der Zellviabilität der Neuroblastomzelllinie IMR-32 im niedrigen Konzentrationsbereich (siehe Abb. 21 B) könnte aufgrund eines Zellzyklusarrestes und der nachfolgenden DNS-Schadensreparaturmechanismen (siehe 1.7) der IMR-32-Neuroblastomzellen hervorgerufen worden sein, um SSB und DSB infolge einer Behandlung mit Olaparib zu

reparieren und ihr Überleben zu sichern. Dies könnte auf einen Resistenzmechanismus infolge einer Behandlung mit einer niedrigen Konzentration von Olaparib hinweisen, der bspw. durch Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden könnte. Ab einer Konzentration von 1 µM Olaparib ist die Zellviabilität der Neuroblastomzelllinie IMR-32 mit zunehmender Konzentration reduziert. Ab dieser Konzentration könnte der Resistenzmechanismus überwunden worden sein, infolgedessen die IMR-32-Neuroblastomzellen die Apoptose induziert haben könnten. Durchflusszytometrische Analysen könnten diese Annahme bestätigen (60). Die Überlegung, dass eine Reparatur der Zellen für den fehlenden Verlust der Zellviabilität nach einer Behandlung mit einer geringen Konzentration eines Chemotherapeutikums verantwortlich sein könnte, wurde nach einer Behandlung mit Doxorubicin in Keratinozyten gebildet (187).

Die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigen eine deutlich höhere Sensibilität gegenüber Olaparib als die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (siehe Abb. 21 A). Die erhöhte therapeutische Potenz des PARP-Inhibitors Olaparib ist auch in den  $IC_{50-}$ Werten und IC<sub>80</sub>-Werten erkennbar (siehe Tabelle 23). Anhand der Ergebnisse lässt sich schließen, dass Neuroblastomzellen mit MYCN-Amplifikation eine höhere Sensibilität auf eine PARP-Inhibition aufzeigen im Vergleich zu jenen ohne MYCN-Amplifikation. Für die Klinik könnte dies nach Bestätigung durch klinische Untersuchungen bedeuten, dass eine PARP-Inhibition im Rahmen der Neuroblastomtherapie einen besseren Behandlungserfolg bei einem Neuroblastom mit MYCN-Amplifikation bewirken könnte als jenem ohne MYCN-Amplifikation. Präklinische Studien über die Wirksamkeit von Olaparib auf Neuroblastomzellen konnten einen dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität MYCN-amplifizierter und nicht MYCN-amplifizierter Tumorzellen verschiedener Neuroblastomzelllinien bestätigen, wobei die Tumorzellen MYCNamplifizierter Neuroblastomzelllinien eine deutlich höhere Sensibilität aufzeigten als die Tumorzellen der Neuroblastomzelllinien ohne MYCN-Amplifikation (29,92). Die Annahme, dass Neuroblastomzellen mit MYCN-Amplifikation eine höhere Sensibilität auf eine PARP-Inhibition aufzeigen als Neuroblastomzellen ohne MYCN-Amplifikation. ist nachvollziehbar. Eine PARP-Inhibition führt zu einer Hemmung der Reparatur von SSB, blockierten Replikationsgabeln und vermehrten DNS-Schäden (29). Das Proto-Onkogen MYCN sorgt zusätzlich für Replikationsstress (29). In einer vorherigen Untersuchung wurden bei einer PARP-Inhibition MYCN-amplifizierter Neuroblastom-Zellen vermehrt replikationsassoziierte Micronucleoli (Kernkörperchen) und nukleäre yH2AX-Foci gefunden, wodurch diese Annahme unterstützt wird (29). Neueste Erkenntnisse legen nahe, dass ein Neuroblastom mit einer 11q-Deletion ebenfalls sensibel auf eine PARP-Inhibition reagiert (29). Die Auswirkungen einer PARP-Inhibition

auf die DNS-Schadensantwort sollte noch untersucht werden und ist noch nicht vollends geklärt (90). Die Zellviabilitätsmessungen in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eventuell das Proto-Onkogen *MYCN* Neuroblastomzellen für eine PARP-Inhibition sensibilisiert.

Die Kombinationsbehandlungen hatten das Ziel einen präklinischen Therapieansatz zu finden, der In-vitro die Sensibilität der Neuroblastomzellen auf eine Cisplatin-Therapie erhöht. Anhand der Ergebnisse war die Zellviabilität beider Neuroblastomzelllinien mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin sowohl in den Kombinationsbehandlungen mit Olaparib als auch in den Einzelbehandlungen mit Cisplatin zunehmend reduziert (siehe Abb. 25). Bis auf die höchste Konzentration der Kombinationsbehandlung der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zeigte sich bei jeder Kombinationsbehandlung beider Neuroblastomzelllinien im Mittel einen stärkeren Verlust der Zellviabilität im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 25). Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass eine Kombination aus einer PARP-Inhibition und Cisplatin möglicherweise einen besseren Behandlungserfolg beim Neuroblastom erzielen kann, sofern klinische Studien einen therapeutischen Nutzen dieser Kombinationsbehandlung bestätigen können. Die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen der Kombinationsbehandlungen konnten ebenfalls durch lichtmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden (siehe Abb. 24). Die Zelldichte der Neuroblastomzellen beider Neuroblastomzelllinien ist bei den Kombinations-Behandlungen anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen mit zunehmender Konzentration von Cisplatin (CisPt) eingeschränkt (siehe Abb. 24). Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen ist bei den Kombinationsbehandlungen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien die Menge an Neuroblastomzellen, die apoptotisch scheinen, im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin größtenteils gestiegen (siehe Abb. 24). Präklinische Untersuchungen zeigten, dass eine Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin zu einer synergistischen Toxizität bei Tumorzellen des Oviarialkarzinoms und Mammakarzinoms führte (85). Des Weiteren konnte ein synergistischer Effekt beider Chemotherapeutika auch in Tumorzellen des NSCLC und Ösophaguskarzinoms nachgewiesen werden (188,189). Diese Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Jede der Kombinationsbehandlungen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien zeigt eine Signifikanz im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 25). Die Kombinationsbehandlungen aus 0,2 µM Olaparib und 0,1 µM Cisplatin zeigten bei der Neuroblastomzelllinie IMR-32 im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit 0,1 µM Cisplatin einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 25). Die Verluste der Zellviabilität

sind in den Kombinationsbehandlungen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich größer als im hohen Konzentrationsbereich (siehe Abb. 25). Daraus lässt sich schließen, dass die DNS-Schäden (SSB, DSB) nach einer Einzelbehandlung mit hohen Konzentrationen von Cisplatin vermutlich so groß gewesen sind, dass die Zellviabilität der Neuroblastomzellen eventuell infolge eines Zellzyklusarrestes oder einer Apoptose stark reduziert wurde. Dieser starke Viabilitätsverlust konnte höchstwahrscheinlich durch den Verlust der homologen Rekombination bzw. durch eine erhöhte Anzahl mitotischer Katastrophen aufgrund einer PARP-Inhibition nicht mehr stärker durch eine hohe Konzentration der Kombinationsbehandlung reduziert werden. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass der zytotoxische Effekt der Kombinationsbehandlungen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen mit Cisplatin im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich größer ist als im hohen Konzentrationsbereich. größerer Zellviabilitätsverlust einer Kombinations-Ein Behandlung im niedrigen Konzentrationsbereich im Vergleich zum hohen Konzentrationsbereich konnte ebenfalls bei Neuroblastomzellen nachgewiesen werden, die mit Erdafitinib und Cisplatin behandelt wurden (190). In dieser Studie war der Anteil an apoptotischen Neuroblastomzellen in der Einzelbehandlung mit Cisplatin so groß gewesen, dass eine Kombinationsbehandlung aus Erdafitinib und Cisplatin in hohen Konzentrationen keinen stärkeren zytotoxischen Effekt verursachen konnte im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung aus Erdafitinib und Cisplatin in niedrigen Konzentrationen (190). Eine niedrige Dosierung von Olaparib und Cisplatin in Kombination könnte nach einer Bestätigung durch klinische Studien eventuell einen besseren Behandlungserfolg erzielen, wodurch das Auftreten von toxischen Nebenwirkungen aufgrund der Verwendung einer niedrigen Dosis von Cisplatin verringert werden könnte. Es konnte bspw. nachgewiesen werden, dass Paclitaxel in der Kombinationsbehandlung die therapeutische Wirkung von Cisplatin in Tumorzellen des Mammakarzinoms verstärken kann, wodurch eine ähnliche antineoplastische Wirkung und eine Reduzierung des Auftretens Cisplatin-bedingter Nebenwirkungen mit einer geringeren Dosis von Cisplatin in der Kombinationsbehandlung aus Paclitaxel und Cisplatin im Vergleich zur Cisplatin-Einzelbehandlung erzielt werden konnte (191). Die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen haben eine hohe Aussagekraft, da die Signifikanzen für beide Neuroblastomzelllinien im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kontrolle, DMSO-Kontrolle) größtenteils gegeben sind und drei unabhängige Versuche durchgeführt wurden. Der Nachweis eines signifikant zytotoxischen Effektes der Kombinationsbehandlung aus 0,2 µM Olaparib und 0,1 µM

Cisplatin im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 0,1 µM Cisplatin bei gleichzeitigem Fehlen der Signifikanz dieser Einzelbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, führt demgegenüber zu einer Minderung der Aussagekraft. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen, dass eine PARP-Inhibition Neuroblastomzellen für Cisplatin sensibilisiert (siehe Abb. 25). Bei den IMR-32-Neuroblastomzellen weisen die Messergebnisse der Zellviabilität dieser Kombinations-Behandlung auf einen additiven oder synergistischen zytotoxischen Effekt hin. Die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen dieser Kombinationsbehandlung könnte bei den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen auf eine Tendenz für eine kumulative Toxizität beider Chemotherapeutika im niedrigen Konzentrationsbereich hinweisen. Bei einer additiven Toxizität kann davon ausgegangen werden, dass die kumulative Toxizität der Kombinationsbehandlung aus der Summe der einzelnen toxischen Potenzen jeder einzelnen Substanz eingeschätzt werden kann (192). Ein synergistischer toxischer Effekt liegt vor, wenn der toxische Effekt der einzelnen Substanzen in Kombination einen höheren toxischen Effekt bewirkt als die Summe der einzelnen toxischen Effekte dieser Substanzen (192). Ein synergistisch toxischer Effekt übersteigt demnach den Effekt einer toxischen Additivität (192). Aufgrund der relativ großen Standardabweichungen im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich der Kombinationsbehandlungen aus Olaparib und Cisplatin bei den IMR-32-Neuroblastomzellen (siehe Abb. 25), ist eine klare Zuordnung einer toxischen Additivität oder eines synergistischen Effektes der Kombinationsbehandlungen nicht möglich. Die Verluste der Zellviabilität der Einzelbehandlungen mit Cisplatin in diesem Versuch (siehe Abb. 25) sind im Mittel um ca. 10-20 % geringer ausgefallen als in den vorherigen Einzelbehandlungen mit Cisplatin (siehe Abb. 8). Diese Variation in der Zellviabilität bei verschiedenen Versuchen ist jedoch vertretbar und könnte von vielen Faktoren in der Versuchsdurchführung abhängig oder zufällig entstanden sein. Jeder Versuch in dieser Arbeit wurde möglichst unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

Sollte sich ein effektiver Nutzen dieser Kombinationsbehandlungen aus Olaparib und Cisplatin in Neuroblastomzellen auch in klinischen Studien bestätigen, ist es von besonderem Interesse, Resistenzmechanismen genau zu charakterisieren. Ein Problem in der Klinik stellt die zunehmende Resistenz von Tumorzellen gegen die PARP-Inhibition dar (96). Eine Untersuchung legt nahe, dass in resistenten Tumorzellen eine vermehrte Expression der *DNA polymerase theta* (POLQ) vorhanden ist. Wenn die homologe Rekombination aufgrund der PARP-Inhibition ausfällt, findet die Tumorzelle andere Reparaturwege, wie die MMEJ, die wiederum von POLQ abhängt (96). Eine präklinische Studie, in der eine Kombination aus einer POLQ-Inhibition, einer PARP-

Inhibition Cisplatin verwendet wird, und könnte daher eine interessante Kombinationsbehandlung in Hinblick auf die zunehmende Resistenzentwicklung darstellen. Auch Tumore mit einer BRCA1-C61G-Mutation entwickeln schnell eine Resistenz gegenüber einer PARP-Inhibition (96). Das heat-shock protein (HSP-90) kann die mutierten BRCA1-Proteine unter einer PARP-Inhibition stabilisieren und den Tumorzellen sowohl gegenüber einer PARP-Inhibition als auch gegenüber Cisplatin eine Resistenz verleihen (96). Eine Kombination aus einer HSP-90-Inhibition und einer PARP-Inhibition, kombiniert mit Cisplatin im Vergleich, wäre daher ebenfalls ein interessanter Vorschlag einer präklinischen Studie im Hinblick auf die zunehmende Resistenzentwicklung in der Klinik. Aufgrund der Verwendung einer erhöhten Anzahl von Medikamenten steigt jedoch das toxische Potenzial. Stoffe, die CDK1, CDK12, PI3K, AKT und HDAC inhibieren können, könnten aufgrund ihrer Bedeutung für das Proto-Onkogen MYCN (siehe 1.5, 1.8 und 4.2) eventuell ebenfalls kombiniert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Tumore mit defekter homologer Rekombination eine hohe Sensibilität gegenüber einer PARP-Inhibition aufzeigten. Diese Inhibitoren können die homologe Rekombination hemmen und Tumorzellen für die Kombinationsbehandlung aus einem PARP-Inhibitor und Cisplatin sensibilisieren (92,96). Auch das Medikament JQ1, das als Inhibitor der bromodomain family member proteins (BET) die MYCN-Expression herunterreguliert, könnte mit einer PARP-Inhibition kombiniert werden, da in Neuroblastomzellen unabhängig vom MYCN-Status synergistische Effekte bei einer Kombinationsbehandlung aus JQ1 und Olaparib nachgewiesen werden konnten (92). BET-Proteine sind wichtige Transkriptionsregulatoren, die an der Zellzyklusprogression und der Reparatur von DSB beteiligt sind (92). Bei MYCN-amplifizierten Neuroblastomzelllinien war diese Kombinationsbehandlung aus JQ1 und Olaparib mit einer Herunterregulierung der MYCN-Transkription, vermehrten DNS-Schäden, Defekten in der DNS-Reparatur und einer Apoptose verbunden (92). In Neuroblastom-Zelllinien ohne MYCN-Amplifikation führte diese Kombinationsbehandlung zu einem Zellzyklusstillstand (92). Auch eine Kombination aus einer PARP-Inhibition und einer ATR-Inhibition zeigte eine erhöhte Zytotoxizität (193). Diese Kombination könnte ebenfalls mit Cisplatin in weiteren Versuchen kombiniert werden. Ob all diese Ergebnisse in der Forschung von PARP-Inhibitoren tatsächlich in Hinblick auf eine Vermeidung unerwünschter Arzneimittelreaktionen und Resistenzmechanismen einen Behandlungserfolg erzielen können, müsste vorerst in weiteren präklinischen und anschließenden klinischen Studien geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte herausgefunden werden, dass eine PARP-Inhibition als Therapeutikum des Neuroblastoms möglicherweise einen Behandlungserfolg erzielen kann, da eine PARP-Inhibition mit Olaparib (*Lynparza*) in beiden Neuroblastomzelllinien zu einem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität führte. Die *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzelllinie IMR-32 zeigte eine deutlich höhere Sensibilität auf diese PARP-Inhibition. Die PARP-Inhibition konnte die Sensibilität der IMR-32-Neuroblastomzellen im Gegensatz zu den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen gegenüber einer Einzelbehandlung mit Cisplatin im niedrigen Konzentrationsbereich signifikant erhöhen. Die Ergebnisse dieser Versuche können durch andere Studien bestätigt werden.

## 4.5. Interpretation der Auswirkungen der verwendeten Chemotherapeutika auf primäre Zellen (hippocampale Neurone)

Die hippocampalen Neurone zeigten erst nach einer 2-wöchigen Kultivierung im Anschluss ihrer Präparation aus den 18-tägigen Rattenembryonen (Alter E18) eine morphologische Differenzierung und ein konfluentes Wachstum (siehe Abb. 5). Bei der Gesamtauswertung der insgesamt vier immunzytochemischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil der hippocampalen Neurone an den Gesamtzellen nach der Präparation und einer 2-wöchigen Kultivierung insgesamt 80 % betrug. Die immunzytochemischen Bestimmungen (siehe Abb. 6) weisen darauf hin, dass die Durchführungen der Versuche in dieser Doktorarbeit überwiegend mit hippocampalen Neuronen geschah, die sich für die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit besonders eigneten. Primäre Zellen werden aus vitalen Organismen entnommen. Sie sind im Gegensatz zu Stammzellen terminal differenziert und daher repräsentativ für das jeweilige Gewebe, aus denen sie entnommen wurden. Daher sind hippocampale Neurone repräsentativ für das Nervengewebe (194). Aufgrund der einfachen anatomischen Struktur, der anatomischen Ähnlichkeit zum *Isocortex*, der etwa 90% aller Cortexareale des Gehirns (Enzephalon) ausmacht, werden insbesondere hippocampale Neurone in der experimentellen Hirnforschung eingesetzt (195,196). In einer vorherigen Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass Cisplatin die Neurogenese und Morphogenese von Dendriten der hippocampalen Neurone beeinträchtigt, wodurch kognitive Defizite, wie Lernstörungen und Gedächtnisstörungen hervorgerufen werden können (111). Zudem konnten aufgrund der Verwendung von hippocampalen Neuronen in dieser Arbeit, nicht proliferierende Nervenzellen mit proliferierenden Neuroblastomzellen im Hinblick auf die Wirksamkeit der Chemo-Therapeutika verglichen werden. Des Weiteren wurden hippocampale Neurone für die Verwendung in dieser Arbeit ausgewählt, da diese ein Modell für das physiologische Nervengewebe darstellen, mit deren Hilfe die Neurotoxizität eingeschätzt werden kann

Hierbei sollte eine Reduktion von Cisplatin-bedingten unerwünschten (111). Arzneimittel-Reaktionen erfolgen, die erheblichen Einschränkungen zu der Lebensqualität führen. Zu diesen unerwünschten Arzneimittelreaktionen gehören häufig nicht nur neurotoxische Erkrankungen, sondern auch Nierenschäden und Hörschäden bei überwiegend jungen Patienten, die an einem Neuroblastom erkranken (102,107). Cisplatin-bedingte neurotoxische Nebenwirkungen (siehe 1.13) können z. T. mehrere Monate nach Beendigung der Behandlung auftreten, da Neurone eine begrenzte Regenerations-Fähigkeit besitzen (108). Bislang reichen die Erkenntnisse nicht aus, um einen effektiven Wirkstoff als protektive Prävention oder therapeutische Maßnahme dieser Nebenwirkungen in der Klinik einzusetzen (108). Daher ist eine bessere Kombinations-Therapie mit einer größeren therapeutischen Breite im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin erstrebenswert. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die hippocampalen Neurone mit Cisplatin, einem CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) und einem PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) für je 72 h behandelt.

Auch bei den hippocampalen Neuronen wurden sowohl Einzelbehandlungen als auch Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin durchgeführt. In den Einzelbehandlungen mit Cisplatin konnte ein dosisabhängiger Verlust der Zellviabilität gezeigt werden (siehe Abb. 11). Diese Dosisabhängigkeit ist auch in den IC<sub>50</sub>-Werten und IC<sub>80</sub>-Werten erkennbar (siehe Tabelle 20). Die Signifikanz ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Konzentration von 5 µM Cisplatin gegeben (siehe Abb. 11). Bei einer Konzentration von 2 µM zeigt Cisplatin einen sicheren Verlust der Zellviabilität. Die Aussagekraft ist hoch, da drei unabhängige Versuche durchgeführt wurden. Insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich, in der keine Signifikanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegeben sind, könnte eine höhere Anzahl an Versuchen, die Aussagekraft erhöhen und die Konzentration bestätigen, in der ein signifikanter neurotoxischer Effekt gegeben ist. Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen ist die Menge an hippocampalen Neuronen, die apoptotisch scheinen, mit zunehmenden Konzentrationen von Cisplatin gestiegen (siehe Abb. 10). Eine ähnliche Beurteilung der Morphologie sowie ein cell membrane blebbing (siehe 3.5) konnte bereits in vorherigen Untersuchungen in hippocampalen Neuronen nach einer Behandlung mit Cisplatin beschrieben werden (197). Das cell membrane blebbing ist mit der Apoptose verbunden und kann daher einen Indikator für die Zellviabilität darstellen (198). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schließen, dass Cisplatin mindestens ab einer Dosis von 1 µM, eher ab einer Dosis von 2 µM und am wahrscheinlichsten ab einer Dosis von 5 µM, neurotoxisch wirken könnte. Das Auftreten toxischer Nebenwirkungen hängt im Allgemeinen nicht nur von der Dosis, sondern von vielen Faktoren ab, vor allem

von der individuellen Toxikodynamik und Toxikokinetik (143). Eine übertragende Interpretation der Ergebnisse aus Rattenembryonen auf den humanen Organismus, ist nur bedingt möglich.

In den Einzelbehandlungen mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) konnte ebenfalls ein dosisabhängiger Verlust der Zellviabilität gezeigt werden (siehe Abb. 15). Diese Dosisabhängigkeit ist auch in den IC<sub>50</sub>-Werten und IC<sub>80</sub>-Werten erkennbar (siehe Tabelle 22). Die Zelldichte der hippocampalen Neurone ist zudem anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen mit zunehmender Konzentration eingeschränkt, womit die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen bestätigt werden können (siehe Abb. 14). Die Menge an hippocampalen Neuronen, die apoptotisch scheinen, ist anhand der Aufnahmen mit zunehmenden Konzentrationen von LY2603618 gestiegen. Bis auf eine Akzeleration der Differenzierung der hippocampalen Neurone mit zunehmenden Konzentrationen von LY2603618 ähnelt die Morphologie der hippocampalen Neurone nach einer Behandlung mit LY2603618 (siehe 3.7) in Bezug auf die Apoptosehinweise der Morphologie nach einer Behandlung mit Cisplatin (siehe 3.5). Eine morphologische Beurteilung hippocampaler Neurone eines vorherigen Versuches nach einer Behandlung mit Cisplatin kann diese Ähnlichkeit bestätigen (197). Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen scheint es, als könnte LY2603618 die Differenzierung von hippocampalen Neuronen beschleunigen bei einer gleichzeitig erhöhten Menge des Auftretens von morphologischen Apoptosehinweisen. Die Signifikanz ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ab einer Konzentration von 2 µM gegeben (siehe Abb. 15). Die Zellviabilität der hippocampalen Neurone nach einer CHK1-Inhibition mit LY2603618 ist ab einer Konzentration von 1 µM vermindert. Die Aussagekraft ist ebenfalls hoch, da auch in diesem Versuch drei unabhängige Versuche durchgeführt wurden.

Die Kombinationsbehandlung aus LY2603618 und Cisplatin konnte die Sensibilität der hippocampalen Neurone für Cisplatin nicht erhöhen (siehe Abb. 19). Die Verluste der Zellviabilität dieses Versuches (siehe Abb. 19) stimmen mit den Verlusten der Zellviabilität der vorherigen Einzelbehandlungen mit LY2603618 (siehe Abb. 15) und Cisplatin (siehe Abb. 11) überein. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigen die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen (siehe Abb. 18). Es lässt sich schließen, dass LY2603618 mindestens ab einer Dosis von 0,5  $\mu$ M (wahrscheinlicher ab einer Dosis von 2  $\mu$ M) neurotoxische Nebenwirkungen hervorrufen könnte, da die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen ab einer Konzentration von 2  $\mu$ M eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant neurotoxische Wirkung in hippocampalen Neuronen zeigen. Die Literaturrecherche ergab keinen Hinweis auf eine Studie, die bisher eine deutlich ausgeprägte, starke Neurotoxizität einer CHK1-Inhibition durch LY2603618 nachweisen

konnte. Eine vorherige Untersuchung mit dem CHK1-Inhibitor AZD-7762 konnte in-vitro lediglich auf ein geringes Risiko einer niedrigen Neurotoxizität in primären hippocampalen Neuronen und Gliazellen hinweisen (199). In den Kombinations-Behandlungen konnte Cisplatin einen dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität herbeiführen (siehe Abb. 19). Der Zellviabilitätsverlust nach einer Kombinations-Behandlung aus LY2603618 und Cisplatin zeigt im Vergleich zum Verlust der Zellviabilität nach einer Einzelbehandlung mit Cisplatin keinen wesentlichen Unterschied. Der neurotoxische Effekt der Kombinationsbehandlung aus LY2603618 und Cisplatin scheint daher nicht größer zu sein als der neurotoxische Effekt der Einzelbehandlung mit Cisplatin. Die Standardabweichung ist im höchsten Konzentrationsbereich der Kombinationsbehandlung sehr groß. Da eine Präparation hippocampaler Neurone aus verschiedenen Rattenembryonen verschiedener Individuen durchgeführt wurde, ist eine größere Standardabweichung bei den Ergebnissen der hippocampalen Neuronen nachvollziehbar. Des Weiteren hängen die Ergebnisse stark von dem Anteil der Ausbeute hippocampaler Neurone und somit von der Präparationsleistung des Versuchsdurchführers ab. Die Ergebnisse geben dennoch einen Hinweis darauf, dass die Neurotoxizität der Konzentrationen, die verwendet wurden, in einer Kombination aus LY2603618 und Cisplatin im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin nicht wesentlich gesteigert wird. In Hinblick auf den therapeutischen Nutzen der Ergebnisse in Bezug zu den Neuroblastomzellen unter der Vermeidung von Nebenwirkungen wäre mindestens eine Konzentration von 0,25 µM LY2603618 für die Neuroblastomzelllinie IMR-32 und mindestens eine Konzentration von 0,75 µM LY2603618 für die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y erforderlich, um eine zytotoxische Wirkung bei den Tumorzellen zu erzielen und Nebenwirkungen theoretisch zu vermeiden. Für beide Neuroblastomzelllinien sollte die Konzentration von LY2603618 mindestens 0,5 µM (höchstens 2 µM) sein, um eine nebenwirkungsfreie Anwendung oder tolerierbare Nebenwirkungen zu ermöglichen. Bei einer Dosis von 2 µM des CHK1-Inhibitors LY2603618 könnte der therapeutische Nutzen der Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien in Hinblick auf tolerierbare Nebenwirkungen besonders groß sein.

Die Einzelbehandlungen mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (*Lynparza*) führten zu keinem dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität (siehe Abb. 23). Daher sind die  $IC_{50}$  und  $IC_{80}$ -Werte für Olaparib > 100 µM (siehe Tabelle 23). Eine Signifikanz der Ergebnisse im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ist daher nicht gegeben. Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Zellviabilitätsmessungen ist hoch, da drei unabhängige Versuche durchgeführt wurden. Die Zelldichte der hippocampalen Neurone ist zudem anhand der

lichtmikroskopischen Aufnahmen mit zunehmender Konzentration konstant und unverändert (siehe Abb. 22). Die Aufnahmen bestätigen die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Olaparib nicht neurotoxisch auf hippocampale Neurone wirkt. Daraus lässt sich schließen, dass Olaparib möglicherweise allgemein nicht neurotoxisch wirkt. Für die Klinik würde dies bedeuten, dass ein Chemotherapeutikum gefunden wurde, dass eventuell keine oder kaum neurotoxische Nebenwirkungen hervorruft. Um jedoch eine neurotoxische Wirkung des PARP-Inhibitors Olaparib vollständig auszuschließen, müssten präklinische Untersuchungen mit allen neuronalen Zelltypen sowie klinische Untersuchungen durchgeführt werden, deren Ergebnisse auf eine fehlende Neurotoxizität hinweisen. Der bisherige Forschungsstand zeigt jedoch, dass Olaparib ebenfalls häufig neurotoxische Nebenwirkungen hervorrufen kann (85,95). Zu diesen gehören Nebenwirkungen des zentralen Nervensystems wie Kopfschmerzen, Schwindel, Müdigkeit oder Dysgeusie. Des Weiteren können häufig auch Nausea, Vomitus und Anämien auftreten (85,95). Diese Nebenwirkungen treten allerdings unter In-vivo-Bedingungen auf. Ergebnisse, die auf In-vivo-Bedingungen basieren, sind einer In-vitro-Untersuchung überlegen.

Die Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin sowie die Einzelbehandlung mit Cisplatin konnten einen dosisabhängigen Verlust der Zellviabilität im höchsten Konzentrationsbereich herbeiführen (siehe Abb. 27). Die Ergebnisse der Zellviabilitätsmessungen werden durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigt (siehe Abb. 26). Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Daher ist die Aussagekraft der Kombinationsbehandlungen aus Olaparib und Cisplatin hoch. Die Verluste der Zellviabilität dieses Versuches (siehe Abb. 27) stimmen mit den Verlusten der Zellviabilität der vorherigen Einzelbehandlungen mit Olaparib (siehe Abb. 23) und Cisplatin (siehe Abb. 11) überein. In der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin fällt im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin auf, dass der Verlust der Zellviabilität der hippocampalen Neurone nach der Kombinationsbehandlung aus 1 µM Olaparib und 2 µM Cisplatin deutlich höher ist als der Verlust der Zellviabilität nach einer Einzelbehandlung mit 2 µM Cisplatin (siehe Abb. 27). Olaparib konnte jedoch die Sensibilität der hippocampalen Neurone gegenüber einer Einzelbehandlung mit Cisplatin nicht signifikant erhöhen. Eine durch PARP-Inhibition induzierte Sensibilisierung hippocampaler Neurone gegenüber einer Cisplatin-Behandlung kann daher nicht bestätigt werden. Ob der größere Zellviabilitätsverlust im höchsten Konzentrationsbereich der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin tatsächlich auf eine neurotoxische Wirkung auf hippocampale Neurone zuzuführen ist oder mit den allgemein eher höheren

Standardabweichungen und der unterschiedlichen Zellausbeute im Rahmen der Präparation hippocampaler Neurone zusammenhängt oder zufällig entstanden ist, bleibt offen. Hier wären weitere Untersuchungen sinnvoll, um ein eindeutiges Ergebnis zu liefern. Der deutlich hohe Zellviabilitätsverlust der hippocampalen Neurone nach dieser Kombinationsbehandlung weist darauf hin, dass die Neurotoxizität der Konzentrationen, die verwendet wurden, aufgrund einer Kombination aus Olaparib und Cisplatin im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin eventuell gesteigert werden kann. Die Zellviabilität hippocampaler Neurone scheint bei einer Einzelbehandlung mit Olaparib kaum beeinflusst zu werden. Eine durch PARP-Inhibition induzierte Sensibilisierung hippocampaler Neurone gegenüber einer Cisplatin-Behandlung kann daher nicht sicher ausgeschlossen werden. Somit kann eine Neurotoxizität nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend betrachtet, deuten die Resultate der Zellviabilitätsmessungen der hippocampalen Neurone darauf hin, dass Cisplatin mindestens ab einer Dosis von 1 µM, wahrscheinlicher ab einer Dosis von 2 µM, am wahrscheinlichsten ab einer Dosis von 5 µM, neurotoxische Nebenwirkungen hervorrufen könnte. Eine Cisplatin-bedingte Neurotoxizität konnte durch eine Vielzahl von Studien belegt werden. Es ergab sich der Hinweis darauf, dass der CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) ab einer Konzentration von  $0.5 \,\mu$ M (wahrscheinlicher ab einer Dosis von 2  $\mu$ M) neurotoxisch wirkt. Ein eindeutig großer neurotoxischer Effekt einer CHK1-Inhibition durch LY2603618 wurde in vorherigen Studien nicht nachgewiesen. Bei einer Dosis von 2 µM LY2603618 könnte der therapeutische Nutzen von LY2603618 auf die Tumorzellen beider Neuroblastomzelllinien in Hinblick auf tolerierbare Nebenwirkungen besonders groß sein. Zudem ergab sich ein Hinweis darauf, dass die Neurotoxizität der Konzentrationen, die verwendet wurden, aufgrund einer Kombination aus der CHK1-Inhibition und Cisplatin im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin nicht wesentlich gesteigert wird. Diese Arbeit kann zwar auf eine Tendenz zur Sensibilisierung hippocampaler Neurone in der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu einer Cisplatin-Behandlung hinweisen, aber eine neurotoxische Wirkung von Olaparib in der Einzelbehandlung hippocampaler Neurone konnte nicht bestätigt werden, weswegen eine Neurotoxizität Olaparibs in dieser Arbeit nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Vorherige Studien berichten jedoch über das Auftreten von Neurotoxizität, die durch Olaparib hervorgerufen werden können.

# Literaturverzeichnis

- 1. Ackermann S, Cartolano M, Hero B, Welte A, Kahlert Y, Roderwieser A, et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science (New York, N.Y.).* 2018;362(6419): 1165–1170. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT6768.
- 2. Wang PL, Teng L, Feng YC, Yue YM, Han MM, Yan Q, et al. The N-Mycresponsive IncRNA MILIP promotes DNA double-strand break repair through non-homologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2022;119(49). https://doi.org/10.1073/PNAS.2208904119.
- 3. DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, Brodeur GM, Seeger RC, Atkinson JB, et al. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 1999;21(3): 181–189. https://doi.org/10.1097/00043426-199905000-00005.
- 4. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Pediatric Clinics of North America*. 2008;55(1): 97–120. https://doi.org/10.1016/j.pcl.2007.10.014.
- 5. Davidoff AM. Neonatal Neuroblastoma. *Clinics in Perinatology*. 2021;48(1): 101– 115. https://doi.org/10.1016/J.CLP.2020.11.006.
- Yiallouros Maria, Prof. Dr. med. Berthold Frank, and Prof. Dr. med. Simon Thorsten, "Kinderkrebsinfo wird von der Deutschen Kinderkrebsstiftung gefördert," Mar. 2022. [Online]. Available: https://www.gpoh.de/sites/gpoh/kinderkrebsinfo/content/e9031/e10591/e77083/e 104562/Neuroblastom-Langinfo25032022\_ger.pdf
- Kaczówka P, Wieczorek A, Czogała M, Książek T, Szewczyk K, Balwierz W. The role of N-Myc gene amplification in neuroblastoma childhood tumour - Singlecentre experience. *Wspolczesna Onkologia*. 2018;22(4): 223–228. https://doi.org/10.5114/wo.2018.81402.
- Feriancikova B, Feglarova T, Krskova L, Eckschlager T, Vicha A, Hrabeta J. MIAT Is an Upstream Regulator of NMYC and the Disruption of the MIAT/NMYC Axis Induces Cell Death in NMYC Amplified Neuroblastoma Cell Lines. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(7). https://doi.org/10.3390/IJMS22073393.
- 9. Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (2019): S1-Leitlinie "Neuroblastom", AWMF-Register Nr. 025-008; online abgerufen im März 2019 unter www.awmf.org.
- 10. Gortner L, Meyer S. *Duale Reihe Pädiatrie*.. 5.Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018. https://www.lehmanns.de/shop/medizin-pharmazie/39863062-9783132411531duale-reihe-paediatrie [Accessed 20th January 2023].
- 11. von Harnack GA, Koletzko B. *Kinder und Jugendmedizin*. 13.Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Verlag); 2007. https://doi.org/10.1007/978-3-540-48736-4. [Accessed 11th January 2023].
- 12. Martin TJ. Horner Syndrome: A Clinical Review. *ACS chemical neuroscience*. 2018;9(2): 177–186. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.7B00405.
- Hughes M, Marsden HB, Palmer MK. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer*. 1974; https://doi.org/10.1002/1097-0142(197411)34:5<1706::AID-CNCR2820340519>3.0.CO;2-J.
- 14. Nakazawa A. Biological categories of neuroblastoma based on the international neuroblastoma pathology classification for treatment stratification. *Pathology International*. 2021;71(4): 232–244. https://doi.org/10.1111/PIN.13085.
- 15. Qiu B, Matthay KK. Advancing therapy for neuroblastoma. *Nature reviews. Clinical oncology*. 2022;19(8): 515–533. https://doi.org/10.1038/S41571-022-

00643-Z.

- 16. Irwin MS, Naranjo A, Zhang FF, Cohn SL, London WB, Gastier-Foster JM, et al. Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2021;39(29): 3229–3241. https://doi.org/10.1200/JCO.21.00278.
- Fischer M, Spitz R, Oberthür A, Westermann F, Berthold F. Risk estimation of neuroblastoma patients using molecular markers. *Klinische Padiatrie*. 2008;220(3): 137–146. https://doi.org/10.1055/S-2008-1065345.
- 18. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Michael Bishop J. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science (New York, N.Y.)*. 1984;224(4653): 1121– 1124. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6719137.
- 19. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Lopez G, Maris JM, Ansari M, Gumy-Pause F. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. *Molecular cancer*. 2017;16(1). https://doi.org/10.1186/S12943-017-0686-8.
- 20. Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;353(21): 2243–2253. https://doi.org/10.1056/NEJMOA052399.
- 21. Hallberg B, Palmer RH. The role of the ALK receptor in cancer biology. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2016;27 Suppl 3: iii4–iii15. https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW301.
- 22. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry. Biokhimiia*. 2010;75(13): 1563–1583. https://doi.org/10.1134/S0006297910130055.
- Fischer-Mertens J, Otte F, Roderwieser A, Rosswog C, Kahlert Y, Werr L, et al. Telomerase-targeting compounds Imetelstat and 6-thio-dG act synergistically with chemotherapy in high-risk neuroblastoma models. *Cellular oncology* (*Dordrecht*). 2022;45(5): 991–1003. https://doi.org/10.1007/S13402-022-00702-8.
- 24. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nature genetics*. 2013;45(3): 279–284. https://doi.org/10.1038/NG.2529.
- 25. Mohi MG, Neel BG. The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(1): 23–30. https://doi.org/10.1016/J.GDE.2006.12.011.
- 26. Dyer MA, Qadeer ZA, Valle-Garcia D, Bernstein E. ATRX and DAXX: Mechanisms and Mutations. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(3). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A026567.
- 27. Li S, Zhuo Z, Chang X, Ma Y, Zhou H, Zhang J, et al. NRAS rs2273267 A>T polymorphism reduces neuroblastoma risk in Chinese children. *Gene*. 2020;727. https://doi.org/10.1016/J.GENE.2019.144262.
- 28. Wang H, Wang X, Xu L, Zhang J. TP53 and TP53-associated genes are correlated with the prognosis of paediatric neuroblastoma. *BMC genomic data*. 2022;23(1). https://doi.org/10.1186/S12863-022-01059-5.
- King D, Li XD, Almeida GS, Kwok C, Gravells P, Harrison D, et al. MYCN expression induces replication stress and sensitivity to PARP inhibition in neuroblastoma. *Oncotarget*. 2020;11(23): 2141–2159. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27329.
- 30. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(5). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A026062.
- 31. Parodi S, Perfumo C, Garaventa A, Inga A, Mazzocco K, Defferrari R, et al. MDM2 SNP309 genotype is associated with ferritin and LDH serum levels in

children with stage 4 neuroblastoma. *Pediatric blood & cancer*. 2010;55(2): 267–272. https://doi.org/10.1002/PBC.22477.

- 32. Niemeyer Charlotte, Eggert Angelika. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. 2018; https://doi.org/10.1007/978-3-662-43686-8.
- Simon T, Hero B, Schulte J, Deubzer H, Hundsdoerfer P, von Schweinitz D, et al. 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klinische Padiatrie*. 2017;229(3): 147–167. https://doi.org/10.1055/S-0043-103086.
- 34. Vöö S, Bucerius J, Mottaghy FM. I-131-MIBG therapies. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2011;55(3): 238–245. https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2011.10.006.
- 35. de Bernardi B, Gerrard M, Boni L, Rubié H, Cañete A, Cataldo AD, et al. Excellent outcome with reduced treatment for infants with disseminated neuroblastoma without MYCN gene amplification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(7): 1034– 1040. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.5877.
- Hero B, Simon T, Spitz R, Ernestus K, Gnekow AK, Scheel-Walter HG, et al. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: Results of the prospective trials NB95-S and NB97. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(9): 1504–1510. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.3349.
- 37. Montemurro F, Nuzzolese I, Ponzone R. Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer? *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2020;21(9): 1071–1082. https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1746273.
- 38. Aigner KR, Stephens FO. *Onkologie Basiswissen*.. 1.Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Verlag); 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48585-9. [Accessed 19th January 2023].
- Ladenstein R, Pötschger U, Pearson ADJ, Brock P, Luksch R, Castel V, et al. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as highdose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. 2017;18(4): 500–514. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30070-0.
- Granger MM, Naranjo A, Bagatell R, DuBois SG, McCune JS, Tenney SC, et al. Myeloablative Busulfan/Melphalan Consolidation following Induction Chemotherapy for Patients with Newly Diagnosed High-Risk Neuroblastoma: Children's Oncology Group Trial ANBL12P1. *Transplantation and cellular therapy*. 2021;27(6): 490.e1-490.e8. https://doi.org/10.1016/J.JTCT.2021.03.006.
- 41. Park JR, Kreissman SG, London WB, Naranjo A, Cohn SL, Hogarty MD, et al. Effect of Tandem Autologous Stem Cell Transplant vs Single Transplant on Event-Free Survival in Patients With High-Risk Neuroblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019;322(8): 746–755. https://doi.org/10.1001/JAMA.2019.11642.
- 42. Blanes M, Lahuerta JJ, González JD, Ribas P, Solano C, Alegre A, et al. Intravenous busulfan and melphalan as a conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a matched comparison to a melphalan-only approach. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(1): 69–74. https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2012.08.009.
- Haverkamp W, Herth F, Messmann H. Internistische Intensivmedizin Methoden-Diagnosen-Therapie. Stuttgart: Thieme; 2008. https://www.google.de/books/edition/Internistische\_Intensivmedizin/TaF3-2wVwnsC?hl=de&gbpv=0 [Accessed 22nd January 2023].
- 44. Illhardt T, Toporski J, Feuchtinger T, Turkiewicz D, Teltschik HM, Ebinger M, et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation for Refractory/Relapsed

Neuroblastoma. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24(5): 1005–1012. https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2017.12.805.

- 45. Mueller I, Ehlert K, Endres S, Pill L, Siebert N, Kietz S, et al. Tolerability, response and outcome of high-risk neuroblastoma patients treated with long-term infusion of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO. *mAbs*. 2018;10(1): 55–61. https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1402997.
- 46. Balaguer J, García Hidalgo L, Hladun R, Márquez Vega C, Pérez Alonso V. Recent Evidence-Based Clinical Guide for the Use of Dinutuximab Beta in Pediatric Patients with Neuroblastoma. *Targeted oncology*. 2022; https://doi.org/10.1007/S11523-022-00930-W.
- 47. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer cell*. 2014;26(5): 682–694. https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2014.09.019.
- 48. Zafar A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F, et al. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Medicinal research reviews*. 2021;41(2): 961–1021. https://doi.org/10.1002/MED.21750.
- 49. Zafar A, Wang W, Liu G, Xian W, McKeon F, Zhou J, et al. Targeting the p53-MDM2 pathway for neuroblastoma therapy: Rays of hope. *Cancer letters*. 2021;496: 16–29. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.09.023.
- 50. Shrestha S, Morcavallo A, Gorrini C, Chesler L. Biological Role of MYCN in Medulloblastoma: Novel Therapeutic Opportunities and Challenges Ahead. *Frontiers in oncology*. 2021;11. https://doi.org/10.3389/FONC.2021.694320.
- 51. Li X, Yang F, He N, Zhang M, Lv Y, Yu Y, et al. YM155 inhibits neuroblastoma growth through degradation of MYCN: A new role as a USP7 inhibitor. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2022;181. https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2022.106343.
- 52. Rishfi M, Krols S, Martens F, Bekaert SL, Sanders E, Eggermont A, et al. Targeted AURKA degradation: Towards new therapeutic agents for neuroblastoma. *European journal of medicinal chemistry*. 2023;247: 115033. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2022.115033.
- 53. Kuhn C, Boeschen M, Philip M, Schöneberg T, Thor D, Horn S. Candidate drugs associated with sensitivity of cancer cell lines with DLST amplification or high mRNA levels. *Oncotarget*. 2023;14(1). https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.28342.
- 54. Liu KX, Joshi S. 'Re-educating' Tumor Associated Macrophages as a Novel Immunotherapy Strategy for Neuroblastoma. *Frontiers in immunology*. 2020;11. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01947.
- 55. Heinrich Peter C., Müller Matthias, Graeve Lutz, Koch Hans-Georg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.. 10.Auflage. Berlin: Springer (Verlag); 2022.
- 56. Zhang Y, Hunter T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International journal of cancer*. 2014;134(5): 1013–1023. https://doi.org/10.1002/IJC.28226.
- 57. Kelly RL, Huehls AM, Venkatachalam A, Huntoon CJ, Machida YJ, Karnitz LM. Intra-S phase checkpoint kinase Chk1 dissociates replication proteins Treslin and TopBP1 through multiple mechanisms during replication stress. *The Journal of biological chemistry*. 2022;298(4). https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.101777.
- 58. Feijoo C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, et al. Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *The Journal of cell biology*. 2001;154(5): 913–923. https://doi.org/10.1083/JCB.200104099.
- 59. Karnani N, Dutta A. The effect of the intra-S-phase checkpoint on origins of

replication in human cells. *Genes & development*. 2011;25(6): 621–633. https://doi.org/10.1101/GAD.2029711.

- 60. Afshar S, Pashaki AS, Najafi R, Nikzad S, Amini R, Shabab N, et al. Cross-Resistance of Acquired Radioresistant Colorectal Cancer Cell Line to gefitinib and regorafenib. *Iranian journal of medical sciences*. 2020;45(1): 50–58. https://doi.org/10.30476/IJMS.2019.44972.
- 61. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology*. 2003;193(1–2): 3–34. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00287-7.
- 62. Rihs HP, Hoffmeyer F, Brüning T. [DNÁ repair: from the mechanisms to the impact on occupational research]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2009;63(6): 319–324. https://doi.org/10.1055/S-0029-1214671.
- 63. Caracciolo D, Riillo C, Di Martino MT, Tagliaferri P, Tassone P. Alternative Non-Homologous End-Joining: Error-Prone DNA Repair as Cancer's Achilles' Heel. *Cancers*. 2021;13(6): 1–14. https://doi.org/10.3390/CANCERS13061392.
- 64. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835): 342–348. https://doi.org/10.1038/35077213.
- 65. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2022;23(1): 74–88. https://doi.org/10.1038/S41580-021-00404-3.
- 66. Baluapuri A, Wolf E, Eilers M. Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2020;21(5): 255–267. https://doi.org/10.1038/S41580-020-0215-2.
- 67. Song X, Wang L, Wang T, Hu J, Wang J, Tu R, et al. Synergistic targeting of CHK1 and mTOR in MYC-driven tumors. *Carcinogenesis*. 2021;42(3): 448–460. https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGAA119.
- Izumi H, Kaneko Y, Nakagawara A. The Role of MYCN in Symmetric vs. Asymmetric Cell Division of Human Neuroblastoma Cells. *Frontiers in oncology*. 2020;10. https://doi.org/10.3389/FONC.2020.570815.
- 69. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of molecular cell biology*. 2014;6(6): 442–457. https://doi.org/10.1093/JMCB/MJU045.
- 70. Qiu Z, Oleinick NL, Zhang J. ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2018;126(3): 450–464. https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2017.09.043.
- 71. Thompson R, Eastman A. The cancer therapeutic potential of Chk1 inhibitors: how mechanistic studies impact on clinical trial design. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;76(3): 358–369. https://doi.org/10.1111/BCP.12139.
- 72. Keller KM, Krausert S, Gopisetty A, Luedtke D, Koster J, Schubert NA, et al. Target Actionability Review: a systematic evaluation of replication stress as a therapeutic target for paediatric solid malignancies. *European journal of cancer* (*Oxford, England : 1990*). 2022;162: 107–117. https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2021.11.030.
- 73. Breyer WA, Matthews BW. A structural basis for processivity. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2001;10(9): 1699. https://doi.org/10.1110/PS.10301.
- 74. Nir Heyman S, Golan M, Liefshitz B, Kupiec M. A Role for the Interactions between Polδ and PCNA Revealed by Analysis of pol3-01 Yeast Mutants. *Genes*. 2023;14(2). https://doi.org/10.3390/GENES14020391.
- 75. Nunes C, Depestel L, Mus L, Keller KM, Delhaye L, Louwagie A, et al. RRM2 enhances MYCN-driven neuroblastoma formation and acts as a synergistic target with CHK1 inhibition. *Science advances*. 2022;8(28). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABN1382.
- 76. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, et al. DNA
double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nature communications*. 2017;8(1). https://doi.org/10.1038/S41467-017-01883-9.

- 77. Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, Yasuda T, Zhang WW, Roth JA, et al. *p53* expression overcomes *p21* WAF1/CIP1-mediated G 1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. 1997.
- 78. van Harten AM, Buijze M, van der Mast R, Rooimans MA, Martens-de Kemp SR, Bachas C, et al. Targeting the cell cycle in head and neck cancer by Chk1 inhibition: a novel concept of bimodal cell death. *Oncogenesis*. 2019;8(7). https://doi.org/10.1038/S41389-019-0147-X.
- 79. Wang G, Edwards H, Caldwell JT, Buck SA, Qing WY, Taub JW, et al. Panobinostat synergistically enhances the cytotoxic effects of cisplatin, doxorubicin or etoposide on high-risk neuroblastoma cells. *PloS one*. 2013;8(9). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076662.
- Di Giulio S, Colicchia V, Pastorino F, Pedretti F, Fabretti F, Nicolis di Robilant V, et al. A combination of PARP and CHK1 inhibitors efficiently antagonizes MYCNdriven tumors. *Oncogene*. 2021;40(43): 6143–6152. https://doi.org/10.1038/S41388-021-02003-0.
- 81. Wehler T, Thomas M, Schumann C, Bosch-Barrera J, Viñolas Segarra N, Dickgreber NJ, et al. A randomized, phase 2 evaluation of the CHK1 inhibitor, LY2603618, administered in combination with pemetrexed and cisplatin in patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. *Lung cancer* (*Amsterdam, Netherlands*). 2017;108: 212–216. https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2017.03.001.
- 82. Sulli G, di Micco R, di Fagagna FDA. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2012;12(10): 709–720. https://doi.org/10.1038/NRC3344.
- 83. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters*. 2013;332(2): 237–248. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2012.01.007.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 3.0, 2019, AWMF-Registernummer: 032/0350L. 2019 Jan [Accessed 1st February 2023]. https://www.leitlinienprogrammonkologie.de/fileadmin/user\_upload/Downloads/Leitlinien/Ovarialkarzinom/Versi on\_3\_\_2018\_/LL\_Ovarialkarzinom\_Langversion\_3.0.pdf [Accessed 1st February 2023].
- 85. Bochum S, Berger S, Martens UM. Olaparib. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer.* 2018;211: 217–233. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8\_15.
- 86. Li N, Chen J. ADP-ribosylation: activation, recognition, and removal. *Molecules and cells*. 2014;37(1): 9–16. https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2014.2245.
- 87. Yang Y, Yang X, Li H, Tong X, Zhu X. Efficacy and safety of olaparib in advanced ovarian cancer: a meta-analysis. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2023;43(1). https://doi.org/10.1080/01443615.2022.2151883.
- Demin AA, Hirota K, Tsuda M, Adamowicz M, Hailstone R, Brazina J, et al. XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair. *Molecular cell*. 2021;81(14): 3018-3030.e5. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2021.05.009.
- 89. Dréan A, Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitor combination therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016;108: 73–85. https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2016.10.010.
- 90. Colicchia V, Petroni M, Guarguaglini G, Sardina F, Sahún-Roncero M, Carbonari M, et al. PARP inhibitors enhance replication stress and cause mitotic

catastrophe in MYCN-dependent neuroblastoma. *Oncogene*. 2017;36(33): 4682–4691. https://doi.org/10.1038/ONC.2017.40.

- 91. Murai J, Huang SYN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer research*. 2012;72(21): 5588–5599. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.
- 92. Jacobson JC, Qiao J, Clark RA, Chung DH. Combination bromo- and extraterminal domain and poly (ADP-ribose) polymerase inhibition synergistically enhances DNA damage and inhibits neuroblastoma tumorigenesis. *Discover. Oncology*. 2022;13(1). https://doi.org/10.1007/S12672-022-00563-5.
- 93. Nindra U, Hong JH, Balakrishnar B, Pal A, Chua W. Review of Toxicities of PARP Inhibitors in Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer. *Clinical genitourinary cancer*. 2023;21(1). https://doi.org/10.1016/J.CLGC.2022.07.005.
- 94. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2020;382(22): 2091–2102. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1911440.
- 95. European Medicines Agency Science Medicines Health. *Lynparza, INN-olaparib*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lynparza-eparproduct-information\_de.pdf According to the EMA copyright policy ([Legal notice | European Medicines Agency (europa.eu)|https://www.ema.europa.eu/en/aboutus/about-website/legal-notice#european-medicines-agency-copyright-andlimited-reproduction-notices-section] [Accessed 14th February 2023].
- 96. D'Andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA repair*. 2018;71: 172–176. https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2018.08.021.
- 97. Biegała Ł, Gajek A, Marczak A, Rogalska A. PARP inhibitor resistance in ovarian cancer: Underlying mechanisms and therapeutic approaches targeting the ATR/CHK1 pathway. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*. 2021;1876(2). https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2021.188633.
- 98. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*. 2014;740: 364–378. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.07.025.
- 99. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*. 2019;88. https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2019.102925.
- 100. Kaneko K, Aoyagi Y, Fukuuchi T, Inazawa K, Yamaoka N. Total purine and purine base content of common foodstuffs for facilitating nutritional therapy for gout and hyperuricemia. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2014;37(5): 709–721. https://doi.org/10.1248/BPB.B13-00967.
- Oei AL, Vriend LEM, van Leeuwen CM, Rodermond HM, ten Cate R, Westermann AM, et al. Sensitizing thermochemotherapy with a PARP1-inhibitor. *Oncotarget*. 2017;8(10): 16303–16312. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11422.
- 102. Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chemical research in toxicology*. 2019;32(8): 1469–1486. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00204.
- 103. Harteis S, Schneider S. Making the bend: DNA tertiary structure and protein-DNA interactions. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(7): 12335–12363. https://doi.org/10.3390/IJMS150712335.
- 104. Ruggiero A, Ariano A, Triarico S, Capozza MA, Romano A, Maurizi P, et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity in children: what is the best protective strategy? *Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*. 2021;27(1): 180–186. https://doi.org/10.1177/1078155220961550.
- 105. Blum HE, Müller-Wieland D. *Klinische Pathophysiologie*.. 10.Auflage. Stuttgart: Thieme (Verlag); 2018. https://www.lehmanns.de/shop/medizinpharmazie/38446348-9783134496109-klinischepathophysiologie?PHPSESSID=jgr5bu1hir6mtpmrdldfmq2lq4 [Accessed 6th

February 2023].

- 106. Tepper SJ. An overview of migraine pathophysiology. *Postgraduate medicine*. 2003;114(5 Suppl Understanding): 5–10. https://doi.org/10.3810/PGM.2003.11.SUPPL30.165.
- 107. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M, et al. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anti-cancer drugs*. 2013;24(10): 1007–1019. https://doi.org/10.1097/CAD.0B013E3283650BDA.
- 108. Santos NAG dos, Ferreira RS, Santos AC dos. Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2020;136. https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.111079.
- 109. Sánchez Fernández I, Vendrame M, Kapur K, Klehm J, Uysal S, Gedik M, et al. Comparison of pediatric patients with status epilepticus lasting 5-29 min versus ≥30 min. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2014;37: 1–6. https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2014.05.018.
- 110. de Vos KJ, Hafezparast M. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? *Neurobiology of Disease*. 2017;105: 283–299. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.02.004.
- 111. Gyau BB, Deaglio S. A2A receptor signaling drives cisplatin-mediated hippocampal neurotoxicity and cognitive defects in mice. *Purinergic signalling*. 2023; https://doi.org/10.1007/S11302-023-09919-0.
- 112. Müller SD (head of press and communication). The Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures is a Gesellschaft mit beschränkter Haftung (GmbH). Registration Number: HRB 2570 Commercial Register Braunschweig, Germany. https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture [Accessed 8th February 2023].
- 113. Larsen R. Inhalationsanästhesie. In: Larsen R (ed.) *Anästhesie und Intensivmedizin: für Schwestern und Pfleger*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999. p. 121–153. https://doi.org/10.1007/978-3-662-00514-9\_9.
- 114. Zlatskiy IA, Zlatska A v, Antipova N v, Dolenko SA, Gordiienko IM, Gubar OS, et al. Comparative Analysis of the Different Dyes' Potential to Assess Human Normal and Cancer Cell Viability In Vitro under Different D/H Ratios in a Culture Medium. 2020; https://doi.org/10.1155/2020/2373021.
- 115. Kim YH, Baek NS, Han YH, Chung MA, Jung SD. Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly-d-lysine. *Journal of Neuroscience Methods*. 2011;202(1): 38–44. https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2011.08.036.
- 116. Fields RD, Lancaster M. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *undefined*. 1993;
- 117. Thomas R, Karen P•, Burg JL. Toxic effects of resazurin on cell cultures. https://doi.org/10.1007/s10616-013-9664-1.
- 118. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the alamarblue assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018;2018(6): 462–464. https://doi.org/10.1101/pdb.prot095489.
- 119. Sazonova E v., Chesnokov MS, Zhivotovsky B, Kopeina GS. Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. *Cell death discovery*. 2022;8(1). https://doi.org/10.1038/S41420-022-01207-X.
- 120. Lavogina D, Lust H, Tahk MJ, Laasfeld T, Vellama H, Nasirova N, et al. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. *Biosensors*. 2022;12(4). https://doi.org/10.3390/BIOS12040196.
- 121. Lenz D, Mittag A, Bocsi J. Probenvorbereitung für die Bildzytometrie. *Zelluläre Diagnostik*. 2007; 139–156. https://doi.org/10.1159/000097379.
- 122. Brockhoff G. DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie.

Zelluläre Diagnostik. 2007; 604–646. https://doi.org/10.1159/000097715.

- 123. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor protocols*. 2016;2016(7): 647–651. https://doi.org/10.1101/PDB.PROT087163.
- 124. Ciancio G, Pollack A, Taupier MA, Block NL, Irvin GL. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1988;36(9): 1147–1152. https://doi.org/10.1177/36.9.2457047.
- 125. Kalejta RF, Brideau AD, Banfield BW, Beavis AJ. An integral membrane green fluorescent protein marker, Us9-GFP, is quantitatively retained in cells during propidium iodide-based cell cycle analysis by flow cytometry. *Experimental cell research*. 1999;248(1): 322–328. https://doi.org/10.1006/EXCR.1999.4427.
- 126. Wlodkowic D, Czerw A, Karakiewicz B, Deptała A. Recent progress in cytometric technologies and their applications in ecotoxicology and environmental risk assessment. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2022;101(3): 203–219. https://doi.org/10.1002/CYTO.A.24508.
- 127. Hamada S, Fujita S. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry*. 1983;79(2): 219–226. https://doi.org/10.1007/BF00489783/METRICS.
- 128. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(50). https://doi.org/10.3791/2597.
- 129. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi Č. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Journal of Immunologwal Methods. 1991.
- 130. Altmeier J. Was ist Durchflusszytometrie?. Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz-Institut für Toxikologie. https://www.unimedizinmainz.de/toxikologie/facs/was-ist-zytometrie.html [Accessed 8th February 2023].
- 131. Izant JG, Mcintosh JR. *Microtubule-associated proteins: A monoclonal antibody* to MAP2 binds to differentiated neurons (microtubule assembly/tubulin/high molecular weight component/lymphocyte hybridoma/neuronal development). Cell Biology. 1980. https://www.pnas.org
- 132. DeGiosio RA, Grubisha MJ, MacDonald ML, McKinney BC, Camacho CJ, Sweet RA. More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022;15. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.974890.
- 133. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*. 2011;93(3): 421–443. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2011.01.005.
- 134. van Asperen J v., Robe PAJT, Hol EM. *GFAP Alternative Splicing and the Relevance for Disease A Focus on Diffuse Gliomas*. ASN Neuro. 2022. https://doi.org/10.1177/17590914221102065.
- 135. Verkhratskiĭ AN (Alekseĭ N, Butt Arthur. Glial physiology and pathophysiology. 2013; 527.
- 136. DiSalvo C v., Zhang D, Jacobberger JW. Regulation of NIH-3T3 cell G1 phase transit by serum during exponential growth. *Cell proliferation*. 1995;28(9): 511–524. https://doi.org/10.1111/J.1365-2184.1995.TB00089.X.
- 137. Murakami T, Aida Y. Visualizing Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PloS one*. 2014;9(1). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0086840.
- 138. Marmiroli P, Nicolini G, Miloso M, Scuteri A, Cavaletti G. The fundamental role of morphology in experimental neurotoxicology: the example of chemotherapyinduced peripheral neurotoxicity. *Italian journal of anatomy and embryology* = *Archivio italiano di anatomia ed embriologia*. 2012;117(2): 75–97. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420996/

- 139. Swaminathan S, Haribabu J, Kalagatur NK, Konakanchi R, Balakrishnan N, Bhuvanesh N, et al. Synthesis and Anticancer Activity of [RuCl2(η6arene)(aroylthiourea)] Complexes-High Activity against the Human Neuroblastoma (IMR-32) Cancer Cell Line. ACS omega. 2019;4(4): 6245–6256. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B00349.
- 140. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*. 2018;2018(6): 469–471. https://doi.org/10.1101/PDB.PROT095505.
- 141. Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.*). 2017;1601: 19–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\_2.
- Graefe KH, Lutz W, Bönisch H. Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie..
  2.Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. https://www.lehmanns.de/shop/medizinpharmazie/36091059-9783132016729-duale-reihe-pharmakologie-undtoxikologie [Accessed 20th January 2023].
- 143. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie-Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*.. 3.Auflage. Berlin: Springer; 2020.
- 144. Chen L, Iraci N, Gherardi S, Gamble LD, Wood KM, Perini G, et al. p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer research*. 2010;70(4): 1377–1388. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2598.
- 145. Meulmeester E, Jochemsen A. p53: a guide to apoptosis. *Current cancer drug targets*. 2008;8(2): 87–97. https://doi.org/10.2174/156800908783769337.
- 146. Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro KI, Uchida D, Shinagawa Y, Tachibana M, et al. Oncogenic mutation of the p53 gene derived from head and neck cancer prevents cells from undergoing apoptosis after DNA damage. *International Journal of Oncology*. 2007;30(5): 1089–1097. https://doi.org/10.3892/IJO.30.5.1089/DOWNLOAD.
- 147. Paffhausen T, Schwab M, Westermann F. Targeted MYCN expression affects cytotoxic potential of chemotherapeutic drugs in neuroblastoma cells. *Cancer letters*. 2007;250(1): 17–24. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2006.09.010.
- 148. Zhu S, Pabla N, Tang C, He L, Dong Z. DNA damage response in cisplatininduced nephrotoxicity. *Archives of toxicology*. 2015;89(12): 2197–2205. https://doi.org/10.1007/S00204-015-1633-3.
- 149. Yu R, Zhang H, Wang R, Xiao L. Low expression of MYCN promotes cisplatin resistance by suppressing cisplatin-induced apoptosis in epithelial ovarian cancer. *Oncology letters*. 2022;24(6). https://doi.org/10.3892/OL.2022.13543.
- 150. Yuan Y, Wu J, Li B, Niu J, Tan H, Qiu S. Regulation of Signaling Pathways Involved in the Anti-proliferative and Apoptosis-inducing Effects of M22 against Non-small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Scientific reports*. 2018;8(1). https://doi.org/10.1038/S41598-018-19368-0.
- 151. Bai B, Shan L, Wang J, Hu J, Zheng W, Lv Y, et al. Small molecule 2,3-DCPE induces S phase arrest by activating the ATM/ATR-Chk1-Cdc25A signaling pathway in DLD-1 colon cancer cells. *Oncology letters*. 2020;20(6). https://doi.org/10.3892/OL.2020.12157.
- 152. Keller KM, Eleveld TF, Schild L, van den Handel K, van den Boogaard M, Amo-Addae V, et al. Chromosome 11q loss and MYCN amplification demonstrate synthetic lethality with checkpoint kinase 1 inhibition in neuroblastoma. *Frontiers in oncology*. 2022;12. https://doi.org/10.3389/FONC.2022.929123.
- 153. Lehmann GM, McCabe MJ. Arsenite Slows S Phase Progression via Inhibition of cdc25A Dual Specificity Phosphatase Gene Transcription. *Toxicological Sciences*. 2007;99(1): 70–78. https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFM142.
- 154. Han BS, Jung KH, Lee JE, Yoon YC, Ko S, Park MS, et al. Lidocaine enhances the efficacy of palbociclib in triple-negative breast cancer. *American journal of cancer research*. 2022;12(7): 3083–3098.

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35968350/

- 155. Lin J, Song T, Li C, Mao W. GSK-3β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*. 2020;1867(5). https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118659.
- 156. Kang T, Wei Y, Honaker Y, Yamaguchi H, Appella E, Hung MC, et al. GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer cell.* 2008;13(1): 36–47. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2007.12.002.
- 157. Park HJ, Kim HJ, Bae GS, Seo SW, Kim DY, Jung WS, et al. Selective GSK-3beta inhibitors attenuate the cisplatin-induced cytotoxicity of auditory cells. *Hearing research*. 2009;257(1–2): 53–62. https://doi.org/10.1016/J.HEARES.2009.08.001.
- 158. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*. 2008;22(3): 305–310. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18610740/
- 159. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2014;15(1): 7–18. https://doi.org/10.1038/NRM3719.
- 160. Aschoff A, Jantz M, Jirikowski GF. In-situ end labelling with bromodeoxyuridine--an advanced technique for the visualization of apoptotic cells in histological specimens. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme. 1996;28(7): 311–314. https://doi.org/10.1055/S-2007-979801.
- 161. Huether A, Höpfner M, Sutter AP, Schuppan D, Scherübl H. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics. *Journal of hepatology*. 2005;43(4): 661–669. https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2005.02.040.
- 162. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(27): 10512–10523. https://doi.org/10.1074/JBC.TM117.000374.
- 163. Lee BJ, Chon KM, Kim YS, An WG, Roh HJ, Goh EK, et al. Effects of cisplatin, 5-fluorouracil, and radiation on cell cycle regulation and apoptosis in the hypopharyngeal carcinoma cell line. *Chemotherapy*. 2005;51(2–3): 103–110. https://doi.org/10.1159/000085769.
- 164. Attardi LD, De Vries A, Jacks T. Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*. 2004;23(4): 973–980. https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1207026.
- 165. Lee SI, Brown MK, Eastman A. Comparison of the efficacy of 7hydroxystaurosporine (UCN-01) and other staurosporine analogs to abrogate cisplatin-induced cell cycle arrest in human breast cancer cell lines. *Biochemical pharmacology*. 1999;58(11): 1713–1721. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00258-0.
- 166. Un F. G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. *Anti-cancer drugs*. 2007;18(4): 411–417. https://doi.org/10.1097/CAD.0B013E32801429ED.
- 167. Yu Y, Arora A, Min W, Roifman CM, Grunebaum E. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [(3)H]thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *Journal of immunological methods*. 2009;350(1–2): 29–35. https://doi.org/10.1016/J.JIM.2009.07.008.
- 168. Edgington-Mitchell LE, Bogyo M. Detection of Active Caspases During Apoptosis Using Fluorescent Activity-Based Probes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.*). 2016;1419: 27–39. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3581-9\_3.
- 169. Tredici G, Petruccioli MG, Tarelli LT, Cece R, Pizzini G. Ultrastructural and confocal laser scanning microscopical aspects of apoptosis in cultured human

neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Italian journal of anatomy and embryology* = *Archivio italiano di anatomia ed embriologia*. 1995;100 Suppl 1: 47–53. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11322325/

- 170. Shinbo J, Ozaki T, Nakagawa T, Watanabe K ichi, Nakamura Y, Yamazaki M, et al. p73-dependent expression of DAN during cisplatin-induced cell death and osteoblast differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;295(2): 501–507. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00707-6.
- 171. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe KI, et al. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene*. 2005;24(48): 7156–7169. https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1208872.
- 172. Cecen E, Altun Z, Ercetin P, Aktas S, Olgun N. Promoting effects of sanguinarine on apoptotic gene expression in human neuroblastoma cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(21): 9445–9451. https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.21.9445.
- 173. Liang H, Zhang L, Xu R, Ju XL. Silencing of survivin using YM155 induces apoptosis and chemosensitization in neuroblastomas cells. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2013;17(21): 2909–2915. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24254560/
- 174. Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;354(4): 892–898. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.01.057.
- 175. Lowery CD, VanWye AB, Dowless M, Blosser W, Falcon BL, Stewart J, et al. The Checkpoint Kinase 1 Inhibitor Prexasertib Induces Regression of Preclinical Models of Human Neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(15): 4354–4363. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2876.
- 176. Magnussen GI, Emilsen E, Giller Fleten K, Engesæter B, Nähse-Kumpf V, Fjær R, et al. Combined inhibition of the cell cycle related proteins Wee1 and Chk1/2 induces synergistic anti-cancer effect in melanoma. *BMC cancer*. 2015;15(1). https://doi.org/10.1186/S12885-015-1474-8.
- 177. Boudny M, Zemanova J, Khirsariya P, Borsky M, Verner J, Cerna J, et al. Novel CHK1 inhibitor MU380 exhibits significant single-agent activity in TP53-mutated chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2019;104(12): 2443–2455. https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.203430.
- 178. Sakurikar N, Thompson R, Montano R, Eastman A. A subset of cancer cell lines is acutely sensitive to the Chk1 inhibitor MK-8776 as monotherapy due to CDK2 activation in S phase. *Oncotarget*. 2016;7(2): 1380–1394. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6364.
- 179. Ando K, Nakamura Y, Nagase H, Nakagawara A, Koshinaga T, Wada S, et al. Co-Inhibition of the DNA Damage Response and CHK1 Enhances Apoptosis of Neuroblastoma Cells. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(15). https://doi.org/10.3390/IJMS20153700.
- 180. JF M, MB B, SA W, BA S, JL B, GM B. Low frequency of ras gene mutations in neuroblastomas, pheochromocytomas, and medullary thyroid cancers. *Cancer research*. 1991;51(6): 1596–1599. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1998949/
- 181. Mimosa ML, Al-ameri W, Simpson JT, Nakhla M, Boissinot K, Munoz DG, et al. A Novel Approach to Detect IDH Point Mutations in Gliomas Using Nanopore Sequencing: Test Validation for the Clinical Laboratory. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2023;25(3). https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2022.12.001.
- 182. van Roy N, Laureys G, Cheng NC, Willem P, Opedenakker G, Versteeg R, et al. 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes, chromosomes & cancer*.

1994;10(2): 103–114. https://doi.org/10.1002/GCC.2870100205.

- 183. Choi SH, Cho K, Kim ES, Yoo HY. Proline-serine-threonine-repeat region of MDC1 mediates Chk1 phosphorylation and the DNA double-strand break repair. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2022;143. https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2021.106152.
- 184. Brajtenbach D, Puls JS, Matos de Opitz CL, Sass P, Kubitscheck U, Grein F. Quantitative Analysis of Microscopy Data to Evaluate Bacterial Responses to Antibiotic Treatment. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2023;2601: 231–257. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2855-3 12.
- 185. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2007;22(5): 1304–1309. https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEM011.
- 186. Dai Y, Chen S, Kmieciak M, Zhou L, Lin H, Pei XY, et al. The novel Chk1 inhibitor MK-8776 sensitizes human leukemia cells to HDAC inhibitors by targeting the intra-S checkpoint and DNA replication and repair. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(6): 878–889. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0902.
- 187. Janssen FPEM, Bouten CVC, Van Leeuwen GMJ, Van Steenhoven AA. Effects of temperature and doxorubicin exposure on keratinocyte damage in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*. 2008;44(3–4): 81–86. https://doi.org/10.1007/S11626-007-9074-9/TABLES/1.
- 188. Minami D, Takigawa N, Takeda H, Takata M, Ochi N, Ichihara E, et al. Synergistic effect of olaparib with combination of cisplatin on PTEN-deficient lung cancer cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2013;11(2): 140–148. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0401.
- 189. Miyamoto K, Minegaki T, Tanahashi M, Yamamoto A, Moriyama Y, Wada A, et al. Synergistic Effects of Olaparib and DNA-damaging Agents in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Anticancer research*. 2019;39(4): 1813– 1820. https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.13288.
- 190. HOLZHAUSER S, LUKOSEVICIUTE M, PAPACHRISTOFI C, VASILOPOULOU C, HEROLD N, WICKSTRÖM M, et al. Effects of PI3K and FGFR inhibitors alone and in combination, and with/without cytostatics in childhood neuroblastoma cell lines. *International journal of oncology*. 2021;58(2): 211–225. https://doi.org/10.3892/IJO.2021.5167.
- 191. Wang H, Guo S, Kim SJ, Shao F, Kei Ho JW, Wong KU, et al. Cisplatin prevents breast cancer metastasis through blocking early EMT and retards cancer growth together with paclitaxel. *Theranostics*. 2021;11(5): 2442–2459. https://doi.org/10.7150/THNO.46460.
- 192. Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R, López-Guarnido O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology*. 2013;307: 136–145. https://doi.org/10.1016/J.TOX.2012.06.009.
- 193. Southgate HED, Chen L, Tweddle DA, Curtin NJ. ATR Inhibition Potentiates PARP Inhibitor Cytotoxicity in High Risk Neuroblastoma Cell Lines by Multiple Mechanisms. *Cancers*. 2020;12(5). https://doi.org/10.3390/CANCERS12051095.
- 194. Giordano G, Costa LG. Primary neurons in culture and neuronal cell lines for in vitro neurotoxicological studies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2011;758: 13–27. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3 2.
- 195. Waschke J, Böckers TM, Paulsen F. *Komplettes Wissen für* Studium und Prüfung Sobotta Anatomie Das Lehrbuch. 2.Auflage. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2019. https://www.lehmanns.de/shop/medizinpharmazie/47939969-9783437440816-sobotta-lehrbuch-anatomie [Accessed 19th January 2023].
- 196. Deller T, Kummer W, Welsch U. Histologie-Das Lehrbuch.. 6.Auflage. München:

Urban & Fischer in Elsevier; 2022.

https://www.google.de/books/edition/Histologie\_Das\_Lehrbuch/oUB\_EAAAQBA J?hl=de&gbpv=0 [Accessed 19th January 2023].

- 197. Andres AL, Gong X, Di K, Bota DA. Low-doses of cisplatin injure hippocampal synapses: a mechanism for 'chemo' brain? *Experimental neurology*. 2014;255: 137–144. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2014.02.020.
- 198. Bosworth LA, Schüler Š, Lennon R. Cell culture systems for kidney research. *Electrospinning for Tissue Regeneration*. 2011; 343–358. https://doi.org/10.1533/9780857092915.3.343.
- 199. Krüger K, Geist K, Stuhldreier F, Schumacher L, Blümel L, Remke M, et al. Multiple DNA damage-dependent and DNA damage-independent stress responses define the outcome of ATR/Chk1 targeting in medulloblastoma cells. *Cancer Letters*. 2018;430: 34–46. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.05.011.

## 5. Anhang

Für folgende Quellen wurde eine schriftliche Erlaubnis zur Verwendung und Zitation von folgenden verantwortlichen Personen eingeholt:

- (6,9) Prof. Dr. med. Ursula Creutzig und Maria Yiallouros (GPOH)
- (112) Prof. Dr. Laura Steenpass (DSMZ)
- (130) Julia Altmeier (Universität Mainz-Institut für Toxikologie)
- (84) Thomas Langer (Deutsche Krebsgesellschaft e.v., DKG)
- (95) Vladimíra Yalmanová (EMA)

## Danksagung

Hiermit möchte ich meinen großen Dank zum Ausdruck bringen für die Betreuung, die Zuteilung des Themas und die umfassende Korrektur. Großen Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz, meinem Doktorvater, aber auch Frau Dr. rer. nat. Stefanie Gaertner (ehem. Bormann), meiner Betreuerin, für die gute Einarbeitung und die Beantwortung meiner Fragen, sowie die Unterstützung des Anreizes selbstständig neue Gedankenimpulse zu kreieren. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie für die Annahme des Zweitgutachtens bedanken. Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Frau Lena Schumacher, Herrn Dr. rer. nat. Andreas Jahn, Prof. Dr. rer. nat. Nicole Schüpp und Herrn Dr. rer. nat. Christian Henninger bedanken, die mir bei der praktischen Umsetzung der Experimente, sowie der Bedienung der Laborgerätschaften zur Seite standen.

Als ein gläubiger Mensch trotz meiner naturwissenschaftlichen Tätigkeiten möchte ich hiermit auch unserem Schöpfer, der mir immer Kraft gespendet hatte und "gute Türen" in meinem Lebensweg für mich bereithielt, meinen außerordentlichen Dank zum Ausdruck geben. Für die uneingeschränkte Unterstützung, die Motivation und den großartigen Rückhalt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, Ruşen Can und Victor Roth vom Zentrum für Informations- und Medientechnologie (ZIM) an der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf.