

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

**Eignung pharmakologischer Modulatoren der DNA-Schadensantwort (DDR)
zur Erhöhung der antitumorigenen Wirksamkeit platinierender Zytostatika
bei Neuroblastomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Larissa Pereira Ferreira

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

„Was wir wissen, ist ein Tropfen – was wir nicht wissen, ein Ozean.“

– Isaac Newton

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle Tumor im Kindesalter und wird unter anderem mit Cis- und Carboplatin chemotherapeutisch behandelt. Als problematisch erweisen sich dabei dosislimitierende nephrotoxische Wirkungen sowie eine Resistenzentwicklung der Tumore. Ein Ansatz zur Umgehung dieser Resistenzentwicklung ist die Kombination klassischer Chemotherapeutika wie Cisplatin mit Modulatoren der DNA-Schadensantwort und des Zellzyklus. In dieser Arbeit wurden die Effekte einer Kombination von jeweils Cisplatin und Carboplatin mit dem PARP-Inhibitor Olaparib oder dem CHK1-Inhibitor LY2603618 untersucht. Für die Experimente verwendet wurden Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y sowie Zellen der Cisplatin-resistenten Subzelllinie SH-SY5Y^R. Es konnte eine Kreuzresistenz der SH-SY5Y^R-Zellen zu Carboplatin und LY2603618 nachgewiesen werden. Sowohl eine Kombination mit Olaparib als auch mit LY2603618 zeigte eine Verstärkung der Zytotoxizität, auch in den Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen. Die Kombination von Cis- und Carboplatin mit LY2603618 wurde weiter analysiert hinsichtlich der molekularen Effekte. Diese bewirkte vermehrte Pt-1,2-GpG-Intrastrangverknüpfungen, eine stärkere Aktivierung der DNA-Schadensantwort mit vermehrter Aktivierung des ATR/CHK1-Signalweges und eine Zunahme von γH2AX. Daraus folgten eine Aufhebung des Cis- bzw. Carboplatin-induzierten G2/M-Arrests, eine vermehrte subG1-Fraktion sowie vermehrte P53-abhängige Induktion des intrinsischen Weges der Apoptose und der Expression von P21. Trotz der Kreuzresistenz zu LY2603618 scheint die Kombination also auch in Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen die zytotoxische Wirkung der platinbasierten Zytostatika erfolgreich zu verstärken. Die SH-SY5Y^R-Zellen zeigten im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen vermehrt noradrenerg-mesenchymale Transition (NMT), eine verstärkte Expression des Efflux-Transporters *MRP2*, der detoxifizierenden Faktoren *GSTM1* und *DYRK1B* und des CDK-Inhibitors *P21*. Nach Cisplatin-Exposition zeigten sie zudem eine Hochregulation weiterer detoxifizierender Enzyme wie *GPX1* und *HMOX1*. Der Resistenz-Mechanismus scheint also nicht in einer Prävention vermehrter DNA-Schäden zu liegen, sondern möglicherweise in einer besseren Kompensation Cisplatin-induzierten oxidativen Stresses und verminderter Apoptose bei gleichem Ausmaß an DNA-Schäden. In proximalen Nierentubulusepithelzellen, die herangezogen wurden, um die dosislimitierende Nephrotoxizität von Cisplatin zu adressieren, wirkte die Kombination etwas weniger zytotoxisch als in beiden Neuroblastomzelllinien. Die Kombination mit LY2603618 könnte mit

Einschränkungen also durchaus eine Option zur Verstärkung der antitumorigenen Wirkung von platinbasierten Zytostatika auch bei resistenten Tumoren darstellen.

Summary

Neuroblastoma is the most frequent extracranial tumour in children and is among others treated by chemotherapy with Cis- and Carboplatin. Unfortunately platinum-based chemotherapy faces many challenges like dose-limiting nephrotoxicity and Cisplatin-resistance of tumours. Combining classic chemotherapeutic agents like Cisplatin with modulators of DNA-damage-response and cell-cycle is an approach to overcome the development of resistance. In this work, the effects of a combination of either Cisplatin or Carboplatin with the PARP-inhibitor Olaparib or the CHK1-inhibitor LY2603618 were analyzed. The experiments were conducted with the neuroblastoma cell line SH-SY5Y and the Cisplatin-resistant cell line SH-SY5Y^R. For SH-SY5Y^R-cells a cross-resistance to Carboplatin and LY2603618 could be proven. Combined treatment with Olaparib as well as LY2603618 showed a relevant increase in cytotoxicity, also in Cisplatin-resistant SH-SY5Y^R-cells. The combination of Cis- or Carboplatin with LY2603618 was further analyzed concerning its molecular effects. Combined treatment resulted in increased Pt-1,2-GpG-intrastrand-crosslinks, a stronger activation of the DNA-damage response with increased activation of the ATR/CHK1-pathway and elevated γH2AX-levels. This results in abrogation of checkpoint-induced G2/M-arrest, an increased subG1-fraction and increased P53-dependent induction of intrinsic apoptosis and P21-expression. In spite of the cross-resistance to LY2603618 combined treatment seems to successfully enhance the cytotoxicity of the platinum-based agents, also in SH-SY5Y^R-cells. Compared to SH-SY5Y-cells, SH-SY5Y^R-cells showed increased noradrenergic-to-mesenchymal-transition (NMT), increased expression of the efflux-transporter *MRP2*, detoxifying enzymes and factors like *GSTM1* and *DYRK1B* as well as increased levels of p21. Following exposition to Cisplatin they enhance expression of further detoxifying enzymes like *GPX1* and *HMOX1*. So the resistance mechanism does not seem to be a prevention of increased DNA-damage, but maybe a better compensation of cisplatin-induced oxidative stress and less apoptosis in spite of a similar extend of DNA-damage.

In renal proximal tubule epithelial cells, which were applied to analyze dose-limiting nephrotoxicity of Cisplatin, combined treatment seemed to be less cytotoxic than in neuroblastoma cells. Regarding a few limitations, combined treatment with LY2603618 could indeed be an option to improve anti-tumorigenic effects of platinum-based chemotherapy even in Cisplatin-resistant tumours.

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	P53-bindendes Protein 1
ABC	ATP binding cassettes
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Serin/Threonin-Kinase
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
ApG	Adenin-Guanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARID1A	<i>AT-rich interaction domain 1A</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	<i>ATPase copper transporting alpha</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and RAD3 related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BAD	<i>Bcl2-antagonist of cell death</i>
BAK	<i>Bcl2-homologous antagonist/killer 1</i>
BAX	Bcl2-assoziiertes X-Protein
BCL	<i>B-cell lymphoma</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl2 interacting mediator of cell death</i>
BIRC5	<i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5</i>
bp	<i>base pairs</i>
BRCA1	<i>breast cancer gene 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer gene 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAMs	<i>classically activated macrophages</i>
CarboPt	Carboplatin; Cb
CCL	Chemokin-Ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CDC	<i>cell division Control protein</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>

cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHK	Checkpoint-Kinase
CI	Kombinationsindex (<i>Combination Index</i>)
CisPt	Cisplatin; Cis
CK	Cytokeratin; Zytokeratin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cq-Wert	<i>quantification cycle value</i>
CSA	<i>cockayne syndrome type A protein</i>
CSB	<i>cockayne syndrome type B protein</i>
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
CtBP	<i>c-terminal-binding protein</i>
CTR1; Ctr1	<i>copper transporter 1</i>
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DDCV	<i>Drug Drug Combination Visualization</i>
DDR	<i>DNA damage response</i> ; DNA-Schadensantwort
DED	<i>death effector domain</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
D-Loop	<i>displacement-loop</i>
DMEM	<i>Dulbeccos's modified Eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
DYRK1B	<i>dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B</i>
E2F	E2F transcription factor 1, Transkriptionsfaktor
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchmal transition</i> ; Epithelial-Mesenchymale Transition
ER	<i>endoplasmatic reticulum</i> ; Endoplasmatisches Retikulum
ERBB2; Erbb2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ERCC1; Ercc1	<i>excision repair cross-complementing 1</i>
FADD	<i>FAS-associated death domain Protein</i>

FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
γ H2AX	<i>H2A histone family member X</i> an Serin139 phosphoryliert
G0-Phase	gap 0-Phase; reversible Ruhephase von Zellen
G1-Phase	gap 1-Phase; Phase des Zellzyklus
G2-Phase	gap 2-Phase; Phase des Zellzyklus
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
γ GCS	γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GG-NER	<i>global genome NER</i>
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GpG	Guanin-Guanin
GPX1	Glutathion-Peroxidase 1
GRP78	<i>Glucose-regulated protein 78</i>
GSH	Glutathion
GSTM1	Glutathion S-Transferase M1
H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMG	<i>high mobility group</i>
HMOX1	Häm-Oxygenase 1
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	homologe Rekombination
HR23B	<i>UV excision repair protein RAD23, homolog B</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HSPA-1B	<i>heat shock protein family A (Hsp70) member 1B</i>
HUS1	<i>HUS1 Checkpoint Clamp Component</i>
IC50	<i>inhibitory concentration 50 %</i> ; inhibitorische Konzentration 50 %
IC20	<i>inhibitory concentration 20 %</i> ; inhibitorische Konzentration 20 %
ICAD	<i>inhibitor of caspase activated DNase</i>
IDRF	<i>Image Defined Risk Factors</i>
Ig	Immunglobulin
INK4	<i>inhibitors of CDK4</i>
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
KAP	<i>KRAB-associated protein</i>
kDa	Kilodalton
KOF	Körperoberfläche (in m ²)
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>
LIG	Ligase
LY26	CHK1-Inhibitor LY2603618

M	Mol, mol/l
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
MLH1	<i>MutL protein homolog 1</i>
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MMR	Mismatch-Reparatur
M2R2	Komplex, bestehend aus Rad50 und Mre11
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN	ein Komplex, bestehend aus MRE11, RAD50 und NBS1
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
MSH2	MutS-homolog 2
MT1A	Metallothionein 1A
MYC	Myelocytomatose
MYT	<i>myelin transcription factor</i>
n	Anzahl der biologischen Replikate
N	Anzahl der technischen Replikate je biologischem Replikat
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NBS1	Nibrin; Nijmegen breakage syndrome 1
NER	nucleotide excision repair; Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NHEJ	non-homologous end joining; nicht-homologe Endverknüpfung
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
NMT	<i>noradrenergic-mesenchymal transition</i> ; Noradrenerg-Mesenchymale Transition
MYCN/N-MYC	<i>Neuroblastoma-Derived V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Related Oncogene</i>
NOXA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NSCLC	<i>non small-cell lung cancer</i> ; nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
N-Typ	neuroblastischer (Zell-)Typ
OCT2	<i>solute carrier family 22 member; organic cation transporter 2</i>
p-	phospho-
P21	CDK-Inhibitor
P38 MAPK	<i>P38-mitogen-activated kinase</i> ; P38-Mitogen-aktivierte Kinase
P53	Tumorsuppressorprotein P53
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>P21-activated kinase</i> ; P21-aktivierte Kinase
PALB2	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PAXX	<i>PAralog of XRCC4 and XLF</i>

PBS	phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit 0,1 % Tween20
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	<i>protein kinase</i> , Proteinkinase
PLK1	polo-like kinase 1
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RAC	<i>RAS-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAD1	<i>Cell cycle checkpoint protein RAD1</i>
RAD9	<i>Cell cycle checkpoint control protein RAD9</i>
RAD17	<i>Cell cycle checkpoint protein RAD17</i>
RAD50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
RAD54	<i>DNA repair and recombination protein RAD54</i>
RB	Retinoblastoma
RDH54	<i>RAD54 homologue</i>
RFC	<i>replication factor C</i> ; Replikationsfaktor C
RHO	RAS-homolog
RIPA	Lysepuffer
RNA	<i>ribonucleid acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNA PII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RNF8	<i>ring finger protein</i> ; Ubiquitin-Protein-Ligase
RNF168	Ubiquitin-Protein-Ligase
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPA	<i>replication protein A</i> ; Replikationsprotein A2
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am und benannt nach Roswell Park Memorial Institute
RPTEC	humane renale proximale Tubuluepithelzellen
RRM	Ribonukleotidreduktase
RT	Raumtemperatur
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
SCLC	small cell lung cancer; Kleinzelliges Bronchialkarzinom
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Ser	Serin
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen
SLUG	<i>snail family transcriptional Regressor 2</i>
SNAIL	<i>snail family transcriptional repressor 1</i>
SOD2	Superoxiddismutase 2
S-Phase	Synthese-Phase; Phase des Zellzyklus
ss	<i>single-stranded</i> ; einzelsträngig
SSB	<i>single strand break</i> ; Einzelstrangbruch
SSRP1	<i>structure specific recognition protein 1</i>
S-Typ	Substrat-adhärenter (Zell-)Typ
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable</i> (ein Chromatin-Remodelling Komplex)
SYBR Green	Cyanin-Farbstoff für DNA
TBS	<i>tris-buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit 0,1 % Tween20
TC-NER	<i>transcription-coupled NER</i>
TdT	terminale Desoxyribonukleotidtransferase
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TF	<i>transcription factor</i> ; Transkriptionsfaktor
TH	Tyrosin-Hydroxylase
Thr; T	Threonin
TIP60	Histon-Acetyltransferase
TLR	<i>Toll-like-receptors</i> ; Toll-Like-Rezeptoren
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> ; Tumornekrosefaktor
TRDD	<i>TNF receptor associated death domain</i>
TWIST	<i>twist family bHLH transcription factor</i>
U	<i>Unit</i>
UCN-01	CHK1-Inhibitor
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
VDAC; Vdac	<i>voltage-dependent anion-selective channel</i>
vs.	gegenüber
WEE1	<i>Wee1-like protein kinase</i> (Serin/Threonin-Kinase)
XAF1; Xaf1	<i>X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) associated factor 1</i>
XBP	<i>Xeroderma pigmentosum type B</i>
XIAP; Xiap	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XPA; Xpa	<i>Xeroderma pigmentosum protein A</i>
XPF	<i>DNA repair endonuclease XPF</i>

XRCC; Xrcc	<i>X-Ray Repair Cross Complementing</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
XPA-RPA	<i>Xeroderma pigmentosum protein A – replication protein A</i>
XPC-HR23B	<i>Xeroderma pigmentosum protein C homolog of RAD23B</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum Komplementation Group G protein</i>
ZEB	<i>zinc finger E-box binding homeobox</i>
5-HT3	5-hydroxytryptamine-3
λ	Wellenlänge

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis.....	X
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis.....	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Maligne Tumorerkrankungen.....	1
1.2 Neuroblastom	3
1.3 Platinverbindungen.....	4
1.3.1 Cisplatin	4
1.3.2 Carboplatin.....	10
1.3.3 Nephrotoxizität von Platinverbindungen.....	12
1.4 DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur	13
1.4.1 Molekulare Mechanismen der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur	13
1.4.2 Modulation der DNA-Schadensantwort.....	21
1.4.2.1 Der CHK1-Inhibitor LY2603618.....	21
1.4.2.2 Der PARP-Inhibitor Olaparib	22
1.5 Apoptose.....	24
1.6 Zellzyklus und Zellzyklusregulation.....	27
1.7 Noradrenerg-mesenchymale Transition (NMT)	30
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	31
2 Material und Methoden.....	34
2.1 Material	34
2.1.1 Herstellernachweise	34
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.3 Geräte.....	36
2.1.4 Chemikalien.....	37
2.1.5 Kits	38
2.1.6 Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	39
2.1.7 Wiederverwendbare Materialien	39
2.1.8 Antikörper.....	40

2.1.8.1	Primärantikörper.....	40
2.1.8.2	Sekundärantikörper.....	41
2.1.9	Primer (qRT-PCR).....	41
2.1.10	Sonstige Materialien.....	43
2.1.11	Puffer und Lösungen.....	44
2.1.12	Software.....	46
2.2	Methoden.....	46
2.2.1	Zellkultur	46
2.2.1.1	Behandlung der Zellen.....	47
2.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	48
2.2.2	Analyse der Zellviabilität.....	49
2.2.2.1	Alamar Blue Assay	49
2.2.2.2	Impedanzmessung zur Ermittlung des Zellindex	50
2.2.3	Analyse der Zellzyklusverteilung	51
2.2.4	Proteinbiochemie	52
2.2.4.1	Proteinextraktion und -quantifizierung.....	52
2.2.4.2	SDS-PAGE	53
2.2.4.3	Western Blot.....	54
2.2.5	Immunzytochemische Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	55
2.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	56
2.2.6.1	DNA-Isolierung	56
2.2.6.2	RNA-Isolierung.....	57
2.2.6.3	cDNA-Synthese.....	58
2.2.6.4	Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)	59
2.2.7	Analyse von DNA-Platinaddukten.....	60
2.2.8	Statistische Analysen.....	61
2.2.9	Kombinationsindex.....	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Die Zytotoxizität ausgewählter Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort in Neuroblastomzellen und deren zugrundeliegende molekulare Mechanismen	63
3.1.1	Analyse der zytotoxischen Effekte ausgewählter Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort in Neuroblastomzellen.....	63

3.1.1.1	Zytotoxische Effekte einer Monobehandlung mit Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort	63
3.1.1.2	Zytotoxische Effekte einer der Kombinationsbehandlung mit Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort	65
3.1.2	Analyse der Effekte der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Zellzyklusverteilung in Neuroblastomzellen	71
3.1.2.1	Effekte einer Monobehandlung mit Cis- oder Carboplatin bzw. dem CHK1-Inhibitor auf die Zellzyklusverteilung	72
3.1.2.2	Effekte einer Kombinationsbehandlung mit Cis- oder Carboplatin und dem CHK1-Inhibitor auf die Zellzyklusverteilung	73
3.1.3	Analyse der Effekte der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Induktion von apoptotischem Zelltod und die Expression von P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest	76
3.1.3.1	Einfluss der Platinverbindungen sowie des CHK1-Inhibitors auf die Induktion von apoptotischem Zelltod	76
3.1.3.2	Einfluss der Platinverbindungen sowie des CHK1-Inhibitors auf die Expression von P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest	79
3.1.4	Einfluss von Platinverbindungen sowie des CHK1-Inhibitors auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen	82
3.1.5	Auswirkungen der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die DNA-Schadensantwort (DDR)	85
3.1.6	Einfluss einer Behandlung mit Cisplatin und dem CHK1-Inhibitor auf die Entstehung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen	91
3.1.7	Einfluss von Cisplatin und LY2603618 auf die Expression von ausgewählten Cisplatin-Resistenzfaktoren	94
3.1.8	Einfluss der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Induktion einer Noradrenerg-Mesenchymalen-Transition (NMT)	102
3.2	Einfluss des CHK1-Inhibitors LY2603618 auf die Zytotoxizität der Platinverbindungen bei humanen renalen proximalen Tubuluszellen	108
4	Diskussion	114
4.1	Molekulare Wirkungen von Cis- und Carboplatin, LY2603618 und Olaparib auf Neuroblastomzellen mit und ohne Cisplatinresistenz	116
4.1.1	Einfluss von Cis- und Carboplatin, LY2603618 und Olaparib auf die Zellviabilität ...	116
4.1.2	Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf Zellzyklus und Apoptose .	121
4.1.3	Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Induktion von DNA-Schäden und die Aktivierung der DNA-Schadensantwort	125

4.1.3.1	Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Aktivierung der Signalwege der DNA-Schadensantwort	125
4.1.3.2	Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Bildung von γ H2AX/53BP1-Foci	128
4.1.3.3	Einfluss von Cisplatin sowie LY2603618 auf die Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen	131
4.1.3.4	Zusammenfassung des Einflusses von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Bildung von DNA-Schäden und die Aktivierung der DNA-Schadensantwort	133
4.1.4	Einfluss von Cisplatin sowie LY2603618 auf die Expression Cisplatinresistenz-assoziiierter Faktoren	134
4.1.4.1	Unterschiede der basalen Genexpression zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y ^R -Zellen	134
4.1.4.2	Einfluss einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 auf die Expression Cisplatin-Resistenz-assoziiierter Faktoren.....	137
4.1.4.3	Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Expression von P21 141	
4.1.5	Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Induktion Noradrenerg-Mesenchymaler Transition (NMT)	143
4.2	Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Zellviabilität in proximalen Nierentubulusepithelzellen als Modell zur Abschätzung der Zytotoxizität in Normalzellen	145
4.3	Schlussfolgerungen hinsichtlich einer klinischen Anwendbarkeit	149
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	153
6	Anhang.....	172
6.1	Ergänzende Abbildungen.....	172
6.2	Vergleichende Umrechnung klinisch applizierter Dosierungen von Cis- und Carboplatin in Stoffkonzentrationen (μ M).....	184

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Chemische Struktur von Cisplatin	5
Abbildung 1.2:	Zelluläre Aktivierung von Cisplatin zu positiv geladenen Aqua-Komplexen.....	6
Abbildung 1.3:	Aufnahme und Metabolismus von Cisplatin in der Zelle sowie entstehende Platin-DNA-Addukte.	8
Abbildung 1.4:	Chemische Struktur von Carboplatin.....	10
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Signalwege der DNA-Schadensantwort.	16
Abbildung 1.6:	DNA-Reparaturmechanismen.....	20
Abbildung 1.7:	Chemische Struktur von LY2603618.....	22
Abbildung 1.8:	Chemische Struktur von Olaparib	24
Abbildung 1.9:	Schematische Darstellung von Zellzyklus und Zellzyklus-Regulation.....	29
Abbildung 1.10:	Schematische Darstellung des dieser Arbeit zugrunde liegenden wissenschaftlichen Projektes	33
Abbildung 2.1:	Reduktion von Resazurin zu Resorufin als Funktionsprinzip des Alamar Blue Assays	50
Abbildung 3.1:	Einfluss der Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	64
Abbildung 3.2:	Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und LY2603618 bzw. Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen	67
Abbildung 3.3:	Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 bzw. Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen	68
Abbildung 3.4:	Kombinationsindizes (CI) der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 oder Olaparib bei SH-SY5Y- und SH-SY5Y ^R -Zellen..	71
Abbildung 3.5:	Einfluss der Mono- und Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 auf die Zellzyklusverteilung.....	75
Abbildung 3.6:	Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Cisplatin und dem CHK1-Inhibitor LY2603618 auf die Induktion von Apoptose	78
Abbildung 3.7:	Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 auf die Induktion von Apoptose und P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest	79
Abbildung 3.8:	Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 auf die Induktion von P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest	81
Abbildung 3.9:	Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	85
Abbildung 3.10:	Einfluss von LY2603618 auf die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort.....	88
Abbildung 3.11:	Einfluss von LY2603618 auf die Carboplatin-induzierte DNA-Schadensantwort.....	90
Abbildung 3.12:	Einfluss von Cisplatin und LY2603618 auf die Bildung Cisplatin-induzierter Pt-(GpG)-Intrastrang-Verknüpfungen.....	93

Abbildung 3.13: Einfluss einer Cisplatin- und LY2603618-Dauerbehandlung auf die Bildung Cisplatin-induzierter Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen	94
Abbildung 3.14: Die basale mRNA-Expression Cisplatin-Resistenz-assoziiierter Faktoren in SH-SY5Y- und SH-SY5Y ^R -Zellen.....	98
Abbildung 3.15: Einfluss von Cisplatin und LY260318 auf die Expression Cisplatin-Resistenz-assoziiierter Faktoren in SH-SY5Y- und SH-SY5Y ^R -Zellen.....	101
Abbildung 3.16: Einfluss des Cisplatin-Resistenzstatus und einer Cisplatin-Behandlung auf den Phänotyp von SH-SY5Y-Zellen	102
Abbildung 3.17: Einfluss von Cisplatin und LY2603618 auf die mRNA-Expression noradrenerger und mesenchymaler Marker als Indikator einer Noradrenerg-Mesenchymalen Transition (NMT).....	104
Abbildung 3.18: Einfluss der Platinverbindungen und LY2603618 auf die Proteinmenge noradrenerger und mesenchymaler Marker als Indikator einer Noradrenerg-Mesenchymalen Transition (NMT).....	107
Abbildung 3.19: Einfluss der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Viabilität von proximalen Nierentubuluszellen der Linie RPTEC.....	109
Abbildung 3.20: Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 auf die Viabilität von humanen renalen proximalen Tubuluszellen der Linie RPTEC	111
Abbildung 3.21: Kombinationsindizes (CI) der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 bei humanen renalen proximalen Tubuluszellen der Linie RPTEC	113
Abbildung 6.1: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	172
Abbildung 6.2: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	173
Abbildung 6.3: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	174
Abbildung 6.4: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	175
Abbildung 6.5: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	176
Abbildung 6.6: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	177
Abbildung 6.7: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	178
Abbildung 6.8: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	179
Abbildung 6.9: Kombinationsindizes (CI) der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 oder Olaparib auf SH-SY5Y- und SH-SY5Y ^R -Zellen.....	180
Abbildung 6.10: Einfluss einer Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und/oder dem CHK1-Inhibitor LY2603618 auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach 0 h und 2 h Postinkubation	182

Abbildung 6.11: Zeitlicher Verlauf der zytotoxischen Wirkung von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618.....	183
---	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Auflistung der Herstellerhauptsitze	34
Tabelle 2.2: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.....	35
Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Geräte.....	36
Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Chemikalien	37
Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Kits	38
Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	39
Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten wiederverwendbaren Materialien	39
Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.....	40
Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper	41
Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Real-time PCR-Primer.....	41
Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten sonstigen Materialien	43
Tabelle 2.12: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen.....	44
Tabelle 2.13: Auflistung der verwendeten Software.....	46
Tabelle 2.14: Dauer und Temperatur der Reaktionszyklen der cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	58
Tabelle 3.1: Zusammenfassung der IC ₂₀ und IC ₅₀ der getesteten Substanzen bei Neuroblastomzellen	65
Tabelle 3.2: Zusammenfassung der IC ₂₀ und IC ₅₀ der getesteten Substanzen bei proximalen Nierentubuluszellen der Linie RPTEC	109

1 Einleitung

1.1 Maligne Tumorerkrankungen

In Deutschland werden im Laufe ihres Lebens schätzungsweise 51 % aller Männer und 43 % aller Frauen mit dem einschneidenden Ereignis einer Krebsdiagnose konfrontiert (Quante *et al.*, 2016). Tabakkonsum, aber auch Ernährungsfaktoren, Bewegungsmangel, Alkoholkonsum und Luftverschmutzung sind nur einige wenige, aber durchaus ausschlaggebende Risikofaktoren für eine Krebserkrankung (Tran *et al.*, 2022). Etwa 15 – 20 % aller Tumorneuerkrankungen sind darüber hinaus auf virale Infektionen wie z. B. mit dem Humanen Papillomavirus (HPV), dem Hepatitis B- oder C-Virus, dem Epstein-Barr-Virus und weiteren zurückzuführen (De Paoli & Carbone, 2013). Das Risiko eine Krebserkrankung zu entwickeln steigt mit zunehmendem Alter stetig an. Zu den häufigsten Krebserkrankungen zählen Brust-, Prostata-, Dickdarm- sowie Lungenkrebs (RKI, 2021).

Während bei Erwachsenen Karzinome der oben genannten Entitäten am häufigsten auftreten, so sind bei Kindern Leukämien, ZNS-Tumore und Lymphome am meisten vertreten. Auch Neuroblastome und Ganglioneuroblastome gehören mit einer Inzidenz von 1,0 bzw. 1,3 von 100.000 bei Mädchen bzw. Jungen unter 18 Jahren zu den häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern (RKI, 2021). Die Entstehung eines malignen Tumors aus einer normalen Zelle erfordert ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die im folgenden Absatz erläutert werden und gemäß Bob Weinberg und Douglas Hanahan als *Hallmarks of Cancer* bezeichnet werden (Hanahan & Weinberg, 2011). Einen *Hallmark of Cancer* stellt gemäß Hanahan und Weinberg beispielsweise die Aufrechterhaltung proliferativer Signale dar, ebenso wie die Umgehung der Wirkung wachstumshemmender Signale, eine sich entwickelnde Resistenz gegenüber der Induktion von Zelltod bzw. Apoptose sowie letztlich auch das Erlangen replikativer Immortalität. Durch Erwerb dieser Eigenschaften wird ein dauerhaftes Tumorwachstum ermöglicht. Wächst der Tumor dauerhaft, steigt sein Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen, weshalb es kompensatorisch zur Induktion von Angiogenese kommt. Die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung – ebenfalls ein *Hallmark of Cancer* – ermöglicht dem Tumor schließlich eine ungehinderte Ausbreitung durch Zerstörung des umgebenden gesunden Gewebes. Auch die Ausbildung von Metastasen in anderen Organen wird dadurch möglich (Hanahan & Weinberg, 2011).

Weitere Charakteristika maligner Tumore stellen sowohl hereditär als auch sporadisch auftretende Formen der genetischen Instabilität und eine inflammatorische Mikroumgebung dar (Lu *et al.*, 2006; Negrini *et al.*, 2010).

Es existieren verschiedene Ansätze zur Behandlung maligner Tumoren. Durch medizinische Meilensteine wie die Entwicklung der Allgemeinanästhesie und die Entdeckung der Röntgenstrahlen im Verlaufe des 19. Jahrhunderts wurden zunächst operative Therapien und Bestrahlungstherapien angewendet, noch bevor Chemotherapeutika erfunden wurden (Liu *et al.*, 2024). Einen weiteren essenziellen Therapieansatz stellen konventionelle Chemotherapeutika dar, deren Wirkung darauf beruht, dass sie toxischer gegenüber sich sehr schnell teilenden Zellen sind. Dadurch sind Tumorzellen aufgrund der schnelleren Zellteilung anfälliger für die toxische Wirkung (Letai & de The, 2025).

Anhand ihrer spezifischen Wirkmechanismen werden Chemotherapeutika unterteilt in alkylierende Agenzien, Topoisomerase-Hemmer, Mitose-Inhibitoren, Antimetabolite, Corticosteroide und anti-tumorös wirksame Antibiotika (Mollaei *et al.*, 2021). Diese bewirken beispielsweise die Induktion von DNA-Vernetzungen (*cross-links*), die sekundär zu DNA-Strangbrüchen führen, inhibieren die DNA-Synthese selbst, inhibieren Enzyme der DNA- oder RNA-Synthese oder hemmen die Mitose (Tilsed *et al.*, 2022). Zu den alkylierenden Agenzien werden gemeinhin auch die im Rahmen dieser Arbeit thematisierten Platinverbindungen Cisplatin und Carboplatin gezählt (Mollaei *et al.*, 2021). Kurz vor Beginn des 21. Jahrhunderts wurden dann beginnend mit Rituximab für B-Zell-Lymphome und Trastuzumab für Brustkrebs zunehmend zielgerichtete Therapeutika zugelassen, die auf spezifische Signalwege in der Zelle einwirken (Grillo-López *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2024; Min & Lee, 2022; Swain *et al.*, 2023).

Neben Keimzelltumoren, Gehirntumoren, Lymphomrezidiven und Osteosarkomen stellen Neuroblastome eine der Haupttumoritäten im Kindesalter dar, die mit Platinverbindungen behandelt werden (Ruggiero *et al.*, 2013). Bei Kindern werden chemotherapeutisch vor allem alkylierende Agenzien, Antimetabolite, Topoisomerase Inhibitoren, Vinkaalkaloide, aber auch Platinverbindungen eingesetzt (Makin, 2018).

1.2 Neuroblastom

Das Neuroblastom als der häufigste extrakranielle Tumor im Kindesalter hat seinen Ursprung in Progenitorzellen, die vom Neuralrohr ausgehen und normalerweise das regelhafte sympathische Nervensystems ausbilden, aber auch zu Tumorzellen des Neuroblastoms entarten können (Van Arendonk & Chung, 2019). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei etwa 19 Monaten, sodass meist Kleinkinder betroffen sind, auch wenn Erkrankungen in sehr seltenen Fällen auch bereits *in utero* oder im jungen Erwachsenenalter auftreten können (Louis & Shohet, 2015). Aufgrund der Abstammung von den Progenitorzellen des sympathischen Nervensystems sind Neuroblastome am häufigsten paravertebral entlang des Grenzstranges oder im Bereich der Nebennierenloge lokalisiert (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019). Symptomatisch tritt die Erkrankung häufig in Form eher unspezifischer Beschwerden auf. So können Fieber, Anämie, Gewichtsverlust und Schmerzen, aber auch paraneoplastische Symptome wie z. B. intermittierender Bluthochdruck auftreten (Hallett & Traunecker, 2012). Da die Symptomatik leider oft erst spät auftritt, liegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits bei ca. 50 % der Patienten Fernmetastasen vor, die in absteigender Häufigkeit das Knochenmark, den Knochen, aber auch Lymphknoten oder Leber betreffen können (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019). Die Prognose ist sehr variabel und reicht von spontaner Remission ohne therapeutische Intervention bis hin zu einer Überlebensrate von maximal 50 % unter maximaler Ausschöpfung der Therapieoptionen bei Hochrisiko-Neuroblastomen (Pinto *et al.*, 2015; GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019). Prognose und Therapieregime orientieren sich hauptsächlich an den INSS (*International Neuroblastoma Staging System*)- und INRG (*International Neuroblastoma Risk Group*)-Stadieneinteilungen und richten sich nach der aktuell gültigen S1-Leitlinie Neuroblastom der federführenden Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) von 2019 (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019). Die Zuordnung zu einem Stadium ist abhängig von Operabilität des Tumors, Überschreitung der anatomischen Mittellinie, lokalem Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung sowie von radiologischen Faktoren, den *Image Defined Risk Factors* (IDRF). Prognose- und therapieentscheidend und daher wichtige diagnostische Faktoren sind daneben auch der *N-Myc*-Status sowie Aberrationen in Chromosom 1p (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019). Bei niedrigem INSS-Stadium und Abwesenheit von *N-Myc*-Amplifikation und Chromosom 1p-Aberration wird eine Chemotherapie gemäß der Leitlinie nur im Falle beeinträchtigender tumorassoziierter Symptome empfohlen. Diese wird mit Doxorubicin, Vincristin und Cyclophosphamid oder Carboplatin und Etoposid durchgeführt (Simon *et al.*, 2017). Andernfalls wird laut Leitlinie

lediglich eine Tumorresektion vorgenommen oder in symptomfreien Fällen bei Neugeborenen oder jungen Säuglingen das sogenannte „*Watch-and-Wait*“-Verfahren unter engmaschiger Kontrolle mittels bildgebender Verfahren (vor allem Sonografie) praktiziert. Bei höheren INSS-Stadien und/oder bei Chromosom 1p-Aberration erfolgen gemäß der Leitlinie chirurgische Resektion sowie Induktions- und Erhaltungskemotherapie. Sollte so keine vollständige Remission erzielbar sein, kann das Therapiekonzept bei metabolisch aktivem Resttumor um eine Strahlentherapie ergänzt werden (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019). Bei Vorliegen von Fernmetastasen bei > 18 Monate alten Patienten und/oder Nachweis einer *N-Myc*-Amplifikation unabhängig vom Stadium liegt ein Hochrisikoprofil vor (DuBois *et al.*, 2022; Irwin *et al.*, 2021). In diesen Fällen wird neben chirurgischer Resektion eine Therapieabfolge bestehend aus Induktionskemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Vindesin, Hochdosischemotherapie mit Busulfan und Melphalan, autologer Stammzelltransplantation und postkonsolidierungs-Chemotherapie mit dem Anti-GD2-Antikörper Dinutuximab beta) angewandt (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019).

1.3 Platinverbindungen

Nachdem 1960 als allererstes die Zytotoxizität von Cisplatin erkannt wurde, wurden im Laufe der Zeit weitere Cisplatin-Analoga entwickelt und als Chemotherapeutika verwendet (Pasetto *et al.*, 2006). So wurden das bei äquimolaren Dosierungen etwas weniger toxische Carboplatin sowie auch Oxaliplatin entwickelt, das sich teilweise als wirksam gegen Cisplatin-resistente Zellen zeigte (Schoch *et al.*, 2020). Noch heute wird daran geforscht, weitere Platinverbindungen als Zytostatika zu entwickeln, um Nebenwirkungen zu reduzieren, die Wirksamkeit zu steigern und Resistenzen zu umgehen (Sahoo *et al.*, 2024).

1.3.1 Cisplatin

Cisplatin wird als eines der ersten und besten Chemotherapeutika beschrieben, das auf einer Metallverbindung basiert (Ghosh, 2019). Im Jahr 1965 hatte Bernett Rosenberg entdeckt, dass die Elektrolyseprodukte einer Platinelektrode das Zellwachstum des Bakteriums *Escherichia coli* inhibieren (Rosenberg *et al.*, 1965). Schon 1970 wurde es in ersten klinischen Studien an Patienten verwendet und zeigte sich nach und nach wirksam gegen Keimzelltumoren des Hodens und andere

Tumore (Muggia *et al.*, 2015). Cisplatin weist ein breites antitumorigenes Wirkspektrum vor allem gegenüber epithelialen Tumoren auf und ist ein gängiges Zytostatikum in der Therapie von unter anderem Lungen-, Kopf-Hals-, Ösophagus-, Harnblasen-, Zervix- und Endometrium-Karzinomen (Go & Adjei, 1999). Auch beim Neuroblastom wird Cisplatin bei Hochrisiko-Patienten verwendet (De Bernardi *et al.*, 1992; Gunda *et al.*, 2020).

Cisplatin, auch als Cis-Diammindichloroplatin bezeichnet, ist ein planarer Platinkomplex mit jeweils zwei Chlor-Liganden und zwei Amin-Liganden, die sich jeweils auf einer Seite bzw. in *cis*-Position zueinander befinden (Abbildung 1.1) (Dunuweera & Rajapakse, 2017).

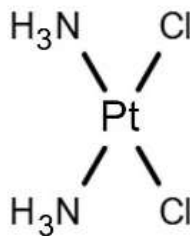


Abbildung 1.1: Chemische Struktur von Cisplatin

Abbildung generiert mithilfe von www.chemspider.com nach einer Abbildung von Go *et al.*, 1999.

In den Blutstrom appliziert, behält Cisplatin aufgrund der hohen Chloridionenkonzentration im Blut (100 mM) zunächst einen neutralen, ungeladenen Zustand bei. Es ist zu einem hohen Anteil an Plasmaproteine gebunden (Ghosh, 2019). Die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle wird unter anderem durch den membranständigen Kupfer-Transporter *copper transporter 1* (CTR1) vermittelt, neutrale und nicht geladene Cisplatin-Spezies können jedoch auch durch passive Diffusion aufgenommen werden (Ishida *et al.*, 2002; Makovec, 2019). Nach Aufnahme in die Zelle erfolgt im Zytoplasma aufgrund der geringeren Chloridkonzentration eine Substitution der Chlorid-Liganden durch Wassermoleküle. Ein Wassermolekül greift das Cisplatin nukleophil an und es erfolgt eine Reaktion zu einem Chloroqua-Komplex, bevor ein weiteres Wassermolekül angreift und anschließend ein Diaqua-Komplex entsteht (Abbildung 1.2 und 1.3) (Go & Adjei, 1999).

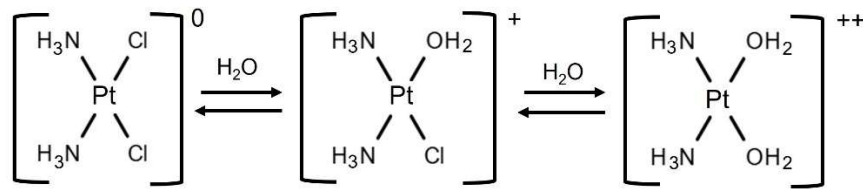


Abbildung 1.2: Zelluläre Aktivierung von Cisplatin zu positiv geladenen Aqua-Komplexen.

Cisplatin wird in wässriger Lösung durch einen zweifachen nukleophilen Angriff des H₂O-Moleküls zunächst in einen Chloroqua-Komplex und anschließend in einen Diaqua-Komplex umgewandelt. Die Reaktionen stehen in beide Richtungen in einem chemischen Gleichgewicht (selbst gezeichnet mithilfe von www.chemspider.com nach einer Abbildung von Go *et. al.*, 1999).

Die Reaktionen mit Wasser verleihen der Platinverbindung eine Elektrophilie, sodass es gut mit nukleophilen Molekülen bzw. Gruppen wie Sulfhydrylgruppen an Proteinen oder Aminogruppen an Nukleinsäuren reagieren kann (Dasari & Tchounwou, 2014). Reagiert Cisplatin mit DNA, so werden zunächst Monoaddukte gebildet, welche zu bivalenten Addukten weiterreagieren können (Eastman, 1987). Dabei entstehen zu ca. 90 % Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges, sogenannte Intrastrangverknüpfungen. Diese bilden sich zwischen benachbarten Purinbasen, sodass 1,2-GpG (Guanin-Platin-Guanin)- und 1,2-ApG (Adenin-Platin-Guanin)-Intrastrangverknüpfungen entstehen (Chválová *et al.*, 2007; Eastman, 1987). In deutlich geringerem Ausmaß werden auch 1,3-Intrastrangverknüpfungen zwischen nicht benachbarten Guanin-Basen oder Bindungen an einen einzigen Guanin-Rest, sogenannte Mono-Addukte, gebildet (Fichtinger-Schepman, 1985). Auch Interstrangverknüpfungen zwischen zwei Purinbasen aus zwei verschiedenen Strängen desselben DNA-Moleküls kommen vor, auch wenn diese je nach herangezogener wissenschaftlicher Quelle nur etwa 1 – 8 % der Platin-induzierten Läsionen ausmachen (Malinge *et al.*, 1999). Die präferenzielle Bildung von Addukten mit Purinbasen ist darin begründet, dass der Stickstoff an Position N7 des Imidazolrings von Guanin chemisch am reaktivsten gegenüber Cisplatin ist, gefolgt von Position N7 bei Adenin (Baik *et al.*, 2003; Ghosh, 2019).

Die gebildeten Addukte können die DNA-Replikation und die Transkription blockieren (Rocha *et al.*, 2018). Dabei interferieren die Addukte mit den Faktoren der DNA-Replikation und bewirken, dass die Replikation ins Stocken gerät – was wiederum konsekutiv zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen führen kann (Rocha *et al.*, 2018; Roos & Kaina, 2013). Cisplatin entfaltet seine Zytotoxizität auch durch die Induktion oxidativen Stresses, indem es die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B.

Hydroxylradikale, bewirkt. Dies führt unter anderem zu Schädigungen von Membranen über Lipidperoxidation und ebenfalls zur Induktion von DNA-Schäden (Ghosh, 2019).

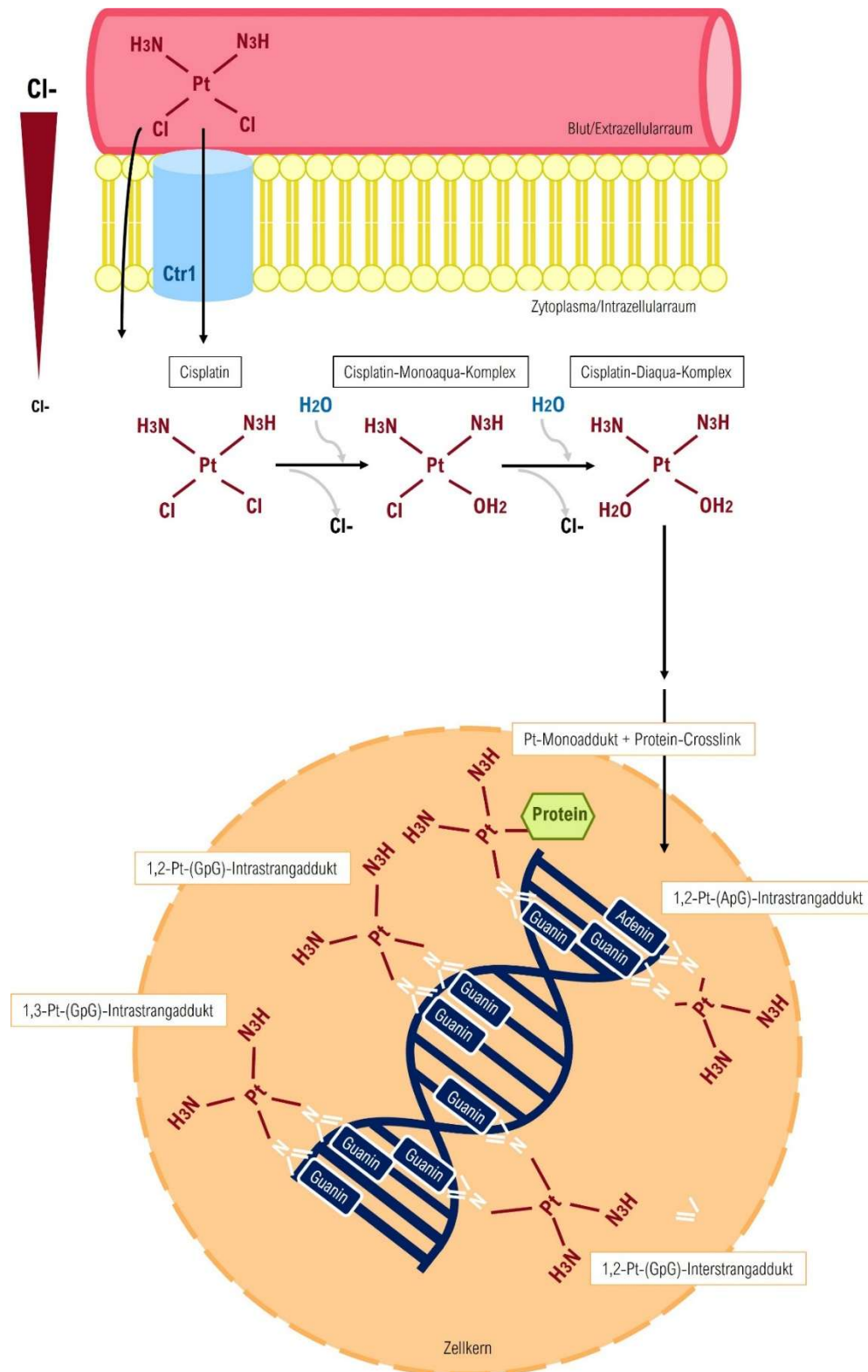


Abbildung 1.3: Aufnahme und Metabolismus von Cisplatin in der Zelle sowie entstehende Platin-DNA-Addukte.

Nach Transport über den Blutstrom tritt Cisplatin über den Transporter CTR1 sowie auch über passive Diffusion in die Zelle ein. Aufgrund der intrazellulär geringen Chloridionenkonzentration reagiert Cisplatin in mehreren Schritten unter Abspaltung von Chloridionen zu einem Cisplatin-Diaqua-Komplex. Dieser reagiert aufgrund seiner Elektrophilie mit nukleophilen Gruppen an Proteinen und den Basen der DNA. Es bildet dabei Addukte, vorzugsweise mit den Purinbasen Adenin und Guanin. Abhängig davon, ob sich die über Cisplatin verbundenen Basen in gleichen oder verschiedenen DNA-Strängen befinden, werden dabei Interstrang- und Intrastrangaddukte unterschieden. Modifiziert nach (Ratanaphan, 2011; Rocha *et al.*, 2018).

Die Cisplatin-induzierten DNA-Schäden bewirken eine Induktion der DNA-Schadensantwort. So wird über Checkpoint-Kinase 2 (CHK2) und P21 eine p53-abhängigen Induktion von Apoptose eingeleitet (Basu & Krishnamurthy, 2010; Pabla *et al.*, 2008). Auch eine Aktivierung des Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 (p38-MAPK)-Signalweges durch Cisplatin-Behandlung ist beschrieben und bewirkt ebenfalls eine Einleitung der Apoptose (Basu & Krishnamurthy, 2010). Es wird jedoch angenommen, dass auch Nekrose und Autophagie als Cisplatin-induzierte Zelltodmechanismen fungieren (Dasari & Tchounwou, 2014). Im Rahmen der DNA-Schadensantwort werden jedoch auch Signalwege aktiviert, die einen Zellzyklus-Arrest anstelle von Apoptose bewirken. So ist nach Cisplatin-Behandlung eine *ataxia telangiectasia and RAD3 related* (ATR)-vermittelte Aktivierung von Checkpoint-Kinase 1 (CHK1) zu verzeichnen, die einen Zellzyklus-Arrest und Schutz vor replikativem Stress vermittelt (Wagner & Karnitz, 2009).

In der klinischen Anwendung stellen vor allem stark nephrotoxische (Abschnitt 1.3.3) und neurotoxische Effekte therapielimitierende Nebenwirkungen von Cisplatin für den Patienten dar, aber auch Nausea und Erbrechen können die Lebensqualität der Patienten massiv einschränken (Kelland, 2007). Auch ototoxische Wirkungen stellen eine Nebenwirkung dar, was darauf zurückzuführen ist, dass Cisplatin in der Cochlea eine Induktion von ROS, inflammatorischen Reaktionen und Apoptose der äußeren Haarzellen bewirkt (Rybak *et al.*, 2019). Auch für Kinder stellt die Ototoxizität eine gravierendere therapielimitierende Nebenwirkung dar. Dies wird verdeutlicht durch eine zusammenfassende Analyse, gemäß der durchschnittlich 40 – 60 % der mit Cisplatin behandelten Kindern Schädigungen des Gehörs erleiden, die sich in Form von Tinnitus, Otalgie und Hörverlust niederschlagen können (Chattaraj *et al.*, 2023).

Neben den beschriebenen Nebenwirkungen ergeben sich auch aufgrund der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Cisplatin große therapeutische Probleme, da etwa 50 % der mit Cisplatin behandelten Patienten entwickeln irgendwann im Therapieverlauf eine klinisch relevante Resistenz gegenüber Cisplatin oder sogar gegenüber mehreren Chemotherapeutika aufweisen (Lugones *et al.*,

2022). Auch bei Neuroblastomen ist eine Resistenz der Hauptgrund für fehlenden Behandlungserfolg einer Cisplatin-Therapie (Li *et al.*, 2018).

Cisplatin-Resistenz kann über verschiedene Mechanismen entstehen und man unterscheidet abhängig vom Wirkort zwischen *pre-target*-, *on-target*-, *post-target*- und *off-target*-Resistenzen. Eine *pre-target*-Resistenz bezeichnet Mechanismen, die greifen, noch bevor Cisplatin an seine eigentlichen Zielstrukturen gebunden hat, z. B. in Form einer verminderten intrazellulären Akkumulation oder eines vermehrten Abbaus (Galluzzi *et al.*, 2012). Eine häufig auftretende *pre-target*-Resistenz besteht in einer Herunterregulation der Expression von Import-Transportproteinen wie CTR1 und OCT2. Aber auch ein gesteigerter Efflux durch eine vermehrte Expression von z. B. *ATPase copper transporting alpha* (ATP7A) und *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) zählt zu dieser Form der Resistenz (Chen & Chang, 2019). *On-target*-Resistenzmechanismen hingegen greifen erst, wenn Cisplatin bereits an Zielstrukturen gebunden hat, z. B. indem eine schnellere Reparatur entstandener Läsionen erfolgt oder aber eine gesteigerte Toleranz der Läsionen vermittelt wird (Galluzzi *et al.*, 2012). Im Unterschied dazu bewirken *post-target*-Resistenzen, dass die Zellen infolge der DNA-Läsionen nicht durch Apoptose absterben, während *off-target*-Resistenzen Änderungen in Signalwegen bewirken, die zwar nicht direkt mit der Cisplatin-Wirkung im Zusammenhang stehen, die jedoch normalerweise lethale Wirkungen von Cisplatin in der Zelle kompensieren oder verhindern (Galluzzi *et al.*, 2012). Zu den *off-target*-Resistenzfaktoren zählt beispielsweise die *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B* (DYRK1B) (Galluzzi *et al.*, 2012). Bei DYRKs handelt es sich um dual-spezifische Kinasen, die sowohl Serin/Threonin (S/T)-Reste phosphorylieren, als auch im Rahmen einer Autophosphorylierung Tyrosin-(Y)-Reste phosphorylieren (Ems *et al.*, 2025; Himpel *et al.*, 2001). Über Phosphorylierung von Zielproteinen bewirkt DYRK1B unter anderem einen Zellzyklus-Arrest am G0/G1-Übergang und eine Aktivierung des proliferativen mTOR/AKT-Signalweges (Ems *et al.*, 2025). Zudem phosphoryliert es P21 an Ser153, wodurch P21 sich im Zytoplasma ansammelt und dort inhibitorisch auf Apoptose-fördernde Faktoren wirkt, sodass eine anti-apoptotische Gesamtwirkung resultiert – zumindest in Myoblasten (Ems *et al.*, 2025; Mercer *et al.*, 2005). An Ovarialkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass DYRK1B über eine Heraufregulation von Ferroxidase und Superoxiddismutase 2 (SOD2) den Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vermindert, über eine Herunterregulation von Cyclin D1 den Zellzyklus arretiert und so Cisplatin-Zytotoxizität vermindert (Hu & Friedman, 2010).

Ein weiterer mit Cisplatin-Resistenz assoziierter Faktor ist *AT-rich interaction domain 1A* (ARID1A). ARID1A ist eine nicht-katalytische Untereinheit des Chromatin-remodellierenden Komplexes SWI/SNF, die essenziell ist für eine normale Induktion eines Zellzyklusarrests, indem sie P21 induziert und die Expression E2F-induzierter Gene unterdrückt (Nagl *et al.*, 2005). In fortgeschrittenen biliären Karzinomen ist eine ARID1A-Mutation ein Prädiktor für eine Resistenz gegenüber Cisplatin und Gemcitabine (Lee *et al.*, 2023). Für einen Verlust bzw. eine Inaktivierung von ARID1A konnte beim Blasenkarzinom eine Induktion von Cisplatin-Resistenz gezeigt werden (Jiang *et al.*, 2023).

1.3.2 Carboplatin

Carboplatin ist ein Cisplatin-Analogon, das ab 1981 im Rahmen klinischer Studien verwendet wurde und dort zunächst mit fehlender Oto- und Nephrotoxizität und verminderter Übelkeit und Erbrechen im Vergleich zu Cisplatin überzeugte (Calvert *et al.*, 1985). Strukturell weist Carboplatin genau wie Cisplatin zwei Ammoniumgruppen in *cis*-Stellung auf und nach Aufnahme in die Zelle bilden sie die gleichen Aquakomplexe, anstelle zweier Chlorid-Ionen liegt jedoch ein Cyclobutandicarboxylat-Ring als Abgangsgruppe vor (Go & Adjei, 1999).

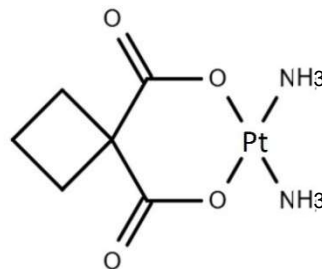


Abbildung 1.4: Chemische Struktur von Carboplatin

Abbildung generiert mithilfe von www.chemspider.com nach einer Abbildung von (Lee *et al.*, 1983).

Die Reaktion von Carboplatin mit DNA resultiert in der Bildung der gleichen Art von Platin-DNA-Addukten wie nach Cisplatin-Exposition, allerdings wird für die Induktion einer gleichen Menge DNA-Addukte eine etwa 10-fach größere Menge Carboplatin und eine etwa 7,5-fache Inkubationszeit benötigt (Hongo *et al.*, 1994). Die Kinetik von Carboplatin ist also wesentlich langsamer, was unter anderem darin begründet ist, dass die Bildung von Aquakomplexen bei gleichem pH und einer Temperatur von 37 °C etwa 100-fach langsamer ist als bei Cisplatin, da der Cyclobutandicarboxylat-

Ring eine deutlich weniger reaktive Abgangsgruppe ist (Hah *et al.*, 2006; Knox *et al.*, 1986). Verteilungs- und terminale Gesamthalbwertszeit (22 Minuten und 5,8 Tage) sind bei Carboplatin sehr ähnlich und nur geringfügig länger als bei Cisplatin, die Eliminationshalbwertszeit von Carboplatin beträgt mit fast 2 Stunden etwa das 2,7-fache im Vergleich zu Cisplatin (Vermorken *et al.*, 1984). Anders als Cisplatin wird Carboplatin zwar ebenfalls zu etwa 90 % renal eliminiert, wird allerdings ausschließlich frei filtriert und nicht zusätzlich tubulär exkretiert, sodass die renale Clearance von Carboplatin weitestgehend der GFR (Glomeruläre Filtrationsrate) entspricht (Egorin *et al.*, 1984). Aufgrund dieses Zusammenhanges wird die zu applizierende Dosis Carboplatin im klinischen Gebrauch mit der sog. Calvert-Formel ermittelt: $\text{Dosis (mg)} = \text{Ziel-AUC (mg/ml} \times \text{min)} \times (\text{GFR (ml/min)} + 25)$ (Calvert *et al.*, 1989). Es wird eine AUC (*Area Under the Curve*) von 5 - 7 mg/ml/min empfohlen (Go & Adjei, 1999). Auch ohne begleitende Behandlung mit 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten erwies sich Carboplatin als in klinisch bedeutsamem Maß weniger emetogen (Go & Adjei, 1999). Vermutlich ist Carboplatin aufgrund der fehlenden tubulären Sekretion weniger toxisch an Nierentubuli als Cisplatin (Go & Adjei, 1999). Carboplatin in nicht-myeloablativen Dosen weist auch eine geringere Ototoxizität auf und verursacht in weniger Fällen Hörverluste (Gersten *et al.*, 2020; Ruggiero *et al.*, 2013). Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass für das Risiko und Ausmaß eines Hörverlustes auch das Alter der Patienten eine Rolle spielt. So besteht z. B. bei Kindern unter 6 Monaten auch bei Verwendung von Carboplatin ein vielfach höheres (21-faches) Risiko für nachhaltigen Hörverlust als bei älteren Kindern (Ruggiero *et al.*, 2013).

Trotz der genannten klinischen Vorteile gegenüber Cisplatin weist auch Carboplatin Nachteile auf. So zeigen Cisplatin-resistente Tumorzellen *in vitro* in den allermeisten Fällen leider auch eine Kreuzresistenz gegenüber Carboplatin, vermutlich da Carboplatin die gleichen aktiven Intermediate bildet und zu gleichartigen DNA-Schäden führt (Go & Adjei, 1999). Zudem hat auch Carboplatin dosislimitierenden Effekte, die unter anderem in der myelosuppressiven Wirkung von Carboplatin begründet sind (Yarbro, 1989). Vor allem starke Thrombozytopenien und Neutropenien mit einhergehender Infektions- und Blutungsneigung sind klinisch problematisch, treten etwa 3 - 4-fach häufiger als nach Behandlung mit Cisplatin auf und betreffen im Falle der Thrombozytopenie bis zu einem Viertel der Patienten (Go & Adjei, 1999).

1.3.3 Nephrotoxizität von Platinverbindungen

Für Cisplatin ist hauptsächlich die Nephrotoxizität die Dosis-limitierende Nebenwirkung (Miller *et al.*, 2010). Bereits in einer kurz nach Entdeckung von Cisplatin im Jahr 1971 von Hill *et al.* durchgeführten Studie wurden nephrotoxische Nebenwirkungen registriert (Hill & Speer, 1982; Pabla & Dong, 2008). Wie Manohar und Leung in einer zusammenfassenden Arbeit darstellen, konnte durch Beachtung einer ausreichenden Hydratation und Diurese zumindest der Anteil an Patienten, die durch eine Cisplatin-Behandlung eine akute Nierenschädigung (AKI) erleiden, von 100 % auf 20 – 30 % gesenkt werden. Symptomatisch führend ist meist das Auftreten von Hypomagnesiämie, distal renal tubulärer Azidose und einer mangelnden Fähigkeit zur Harnkonzentrierung (Manohar & Leung, 2018). Langfristig bleibt nach akutem Nierenversagen durch Cisplatin oftmals eine verringerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Patienten zeigen abhängig vom Stadium des Nierenversagens ein verringertes Langzeitüberleben (Bhat *et al.*, 2015). Für Kinder konnte zusätzlich gezeigt werden, dass vor allem nach Cisplatin-Bolusgaben und damit einhergehenden höheren Spitzenkonzentrationen im Serum auch noch nach 12 Monaten subklinische Nierenschäden in Form von Proteinurie nachweisbar sind (Erdlenbruch *et al.*, 2001). Auch bei Kindern – der hauptsächlich vom Neuroblastom betroffenen Patientengruppe – ist von einer erheblichen Nephrotoxizität auszugehen (Yanagisawa *et al.*, 2018). Histologisch konnten nach Cisplatin-Applikation vor allem Schäden der proximalen Nierentubuli nachgewiesen werden (Dobyan *et al.*, 1980). In Experimenten an Ratten wurde eine dosisabhängige Nephrotoxizität festgestellt und die Nekrose proximaler Tubuluszellen histologisch nachgewiesen (Leonard *et al.*, 1971). Dies könnte darin begründet sein, dass die höchsten Cisplatin-Konzentrationen in der Niere im Bereich der proximalen Tubuli sowie des dicken aufsteigenden Abschnittes der Henle-Schleife erreicht werden (Kröning *et al.*, 1999). Aus diesen Gründen werden proximale Tubuluszellen häufig als Modell für die Untersuchung von Cisplatin-bedingter Nephrotoxizität herangezogen (Pabla & Dong, 2008). Verantwortlich für die Aufnahme sind vor allem verschiedene Transportproteine. Cisplatin wird sowohl über den Kupfertransporter CTR1 als auch über den *organic cation transporter* 2 (OCT2) in die Nierenzelle aufgenommen. Vor allem der basolaterale Transport über OCT2 scheint eine tragende Rolle einzunehmen (Pabla & Dong, 2008). Anders als Cisplatin wird Carboplatin nicht über OCT2 in Tubulusepithelzellen aufgenommen, was vermutlich zur geringeren Nephrotoxizität von Carboplatin beiträgt (Ciarimboli *et al.*, 2005).

Insgesamt setzt sich die Cisplatin-bedingte Nephrotoxizität aus mehreren schädigenden Mechanismen zusammen. Cisplatin führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS),

welche neben der Induktion von ER-Stress auch über vaskuläre Schäden zu renaler Ischämie führen (Ozkok & Edelstein, 2014). *In vivo* ist zudem auch ein inflammatorischer Effekt von Cisplatin auf die Niere von Bedeutung. Durch die Induktion von Zellschäden bewirkt Cisplatin eine Freisetzung von sogenannten *damage associated molecular patterns* (DAMPS), die wiederum über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) eine Immunantwort mit Ausschüttung von Zytokinen wie z. B. TNF α auslöst und so die Niere sekundär schädigt (Manohar & Leung, 2018). Der der Nephrotoxizität zugrunde liegende Zelltod kann sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose erfolgen, wobei sehr hohe Konzentrationen von Cisplatin zu Nekrose führen, geringere Konzentrationen hingegen unabhängig von der Expositionsdauer eher Apoptose induzieren (Lieberthal *et al.*, 1996). Apoptose kann dabei sowohl über den extrinsischen Weg als auch über den intrinsischen mitochondrialen Weg oder ER-Stress-vermittelt aktiviert werden (Pabla & Dong, 2008).

Hinsichtlich protektiver Mechanismen konnte unter anderem gezeigt werden, dass Nierentubuluszellen nach Cisplatin-Behandlung vermehrt den Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK)-Inhibitor P21 exprimieren, welcher durch Zellzyklus-abhängige und -unabhängige Effekte zytoprotektiv wirkt (Price *et al.*, 2004). Klinisch werden vor allem eine Steigerung der Diurese durch adäquate Hydrierung der Patienten, regelmäßige Kontrollen der GFR, Dosisreduktion bei Verschlechterung der Nierenfunktion sowie protektive Substanzen wie Amifostin zur Nephroprotektion eingesetzt (dos Santos *et al.*, 2012). Neuere Ansätze zur Nephroprotektion, welche die pharmakologische Modulation von z. B. P53, dem Enzym Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) oder des Kupfertransporters CTR1 in den Fokus setzen, sind aktuell Gegenstand der Forschung (Volarevic *et al.*, 2019).

1.4 DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur

1.4.1 Molekulare Mechanismen der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur

Um adäquat auf DNA-Schäden reagieren zu können, verfügen Zellen über ausgefeilte DNA-Schadensantwortmechanismen. Dazu zählen vorrangig verschiedene DNA-Reparaturmechanismen, aber auch Signalwege, die Zellzyklus-Checkpoints steuern sowie die Apoptose regulieren (Giglia-Mari *et al.*, 2011; Plesca *et al.*, 2008). DNA-Doppelstrangbrüche werden vom MRN-Komplex erkannt und gebunden, welcher als eine Art Sensor für diese fungiert (Lamarche *et al.*, 2010). Dieser Komplex setzt sich zusammen aus den drei Faktoren Mre11, Rad50 und NBS1. Der Faktor Rad50 ist eine ABC-

Typ ATPase, die über sogenannte *coiled-coil*-Strukturen homodimerisiert und mit einem aus zwei Mre11-Molekülen gebildeten Homodimer sogenannten M2R2-Komplex formt (Tatebe *et al.*, 2020). Innerhalb des MRN-Komplexes selbst besteht die Funktion von Rad50 in der Bindung und auch partiellen Aufwindung der doppelsträngigen DNA-Enden (Lamarche *et al.*, 2010). Eine DNA-bindende Aktivität weist auch Mre11 auf, verfügt zusätzlich aber auch über eine Endo- und Exonuklease-Aktivität, die wiederum durch RAD50 und Nbs1 stimuliert bzw. aktiviert wird (D'Amours & Jackson, 2002). Nbs1 als dritter Faktor des MRN-Komplexes bindet im Bereich von DSBs an γ H2AX, die phosphorylierte Form von Histon H2AX, und bewirkt die Rekrutierung von RAD50 und Mre11 vom Zytoplasma in den Zellkern (Zhang *et al.*, 2006). Dabei ist es über das Vorhandensein einer NLS (*Nuclear Localisation Sequence*) essentiell für die nukleäre Translokation des gesamten MRN-Komplexes und bedingt über eine weitere Domäne die Rekrutierung der Kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) (Lamarche *et al.*, 2010). ATM ist eine Proteinkinase mit Strukturhomologie zur Familie der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinasen (PI3K) und benötigt für ihre Aktivierung den MRN-Komplex (Lee & Paull, 2004; McKinnon, 2004). Eine Autophosphorylierung von ATM an Serin 1981 (Ser1981) vermittelt über eine Interaktion mit dem Faktor MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*) eine für die Reparatur notwendige Stabilisierung von ATM im Bereich der DSBs (So *et al.*, 2009). Es sind aber auch Phosphorylierungen an anderen Serin- und Threonin-Resten beschrieben sowie DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-unabhängige Aktivierungen durch Einzelstrangbrüche (*single strand breaks* (SSBs)) und oxidativen oder metabolischen Stress (Lee & Paull, 2021). ATM katalysiert die Phosphorylierung der Histon-Variante H2AX an Ser139. An Ser139 phosphoryliertes H2AX wird als γ H2AX bezeichnet (Burma *et al.*, 2001). MDC1 bindet an γ H2AX und führt über eine weitere Rekrutierung von MRN-Komplex und ATM zu einer weiteren Signalamplifikation (Goldstein & Kastan, 2015). Auch MDC1 wird durch ATM phosphoryliert und rekrutiert die Ubiquitin-Ligasen RNF8 und RNF168, die H2AX ubiquitinylieren. 53BP1 (*TP53-binding Protein 1*) erkennt und bindet dann ubiquitinyliertes H2AX, kann vermutlich aber auch γ H2AX direkt binden und kolokalisiert mit γ H2AX (Lanz *et al.*, 2019). ATM phosphoryliert CHK2 (Checkpoint-Kinase 2) an Thr68, wodurch CHK2 einen transienten Dimerisierungszustand durchläuft und in aktivierte Monomere dissoziiert (Lanz *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2002). Nach Aktivierung phosphoryliert CHK2 selbst zahlreiche von unter anderem Zannini *et al.* in einer Übersichtsarbeit gelistete Zielproteine wie z. B. *breast cancer gene 1* (BRCA1) und *breast cancer gene 2* (BRCA 2), *X-Ray Repair Cross Complementing 1* (XRCC1), P53 (an Ser20 oder Thr18) sowie Zellzyklus-Checkpoint-regulierende Faktoren wie CDC25A (G1/S-Checkpoint) und CDC25C (G2/M-Checkpoint). Auf diese Weise begünstigt CHK2-Aktivierung die DNA-Reparatur und induziert

nach DSBs einen temporären Zellzyklus-Arrest (Zannini *et al.*, 2014). Um eine bessere sterische Zugänglichkeit des DNA-Schadens gegenüber den DNA-Reparaturfaktoren zu schaffen, phosphorylieren sowohl ATM als auch CHK2 KAP-1 (*KRAB-associated protein 1*), was Interaktionen zwischen KAP-1 und anderen Proteinen stört und so eine für die DNA-Reparatur förderliche Restrukturierung des Chromatins bewirkt (Bolderson *et al.*, 2012; Zannini *et al.*, 2014).

Anders als ATM wird die PIK-Kinase ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) vorrangig durch allgemeinen Replikationsstress aktiviert (Saldivar *et al.*, 2017). Allgemein formuliert führt Replikationsstress über den Kollaps von Replikationsgabeln zu entwundener, einzelsträngig vorliegender DNA (ssDNA) (Saxena & Zou, 2022). Diese wird dann anschließend von RPA (*replication protein A*) gebunden, was dann über eine Interaktion mit ATRIP die Rekrutierung von ATR bewirkt (Zou & Elledge, 2003). Durch die Bindung von RPA an einzelsträngige DNA wird zudem die Rad17-abhängige Assoziation des sog. 9-1-1-Komplexes initiiert, welcher wiederum aus den Faktoren RAD9, HUS1 Checkpoint Clamp Component (HUS1) und RAD1 besteht (Majka *et al.*, 2006). Die rekrutierte und aktivierte ATR-Kinase phosphoryliert die Checkpoint-Kinase 1 (CHK1), die dann den G2/M-Checkpoint und den Spindel-Checkpoint in der M-Phase reguliert und somit die Zellzyklusprogression infolge eines DNA-Schadens reguliert (Patil *et al.*, 2013). Anschließend phosphoryliert CHK1 die untergeordnete Kinase WEE1, die dadurch aktiviert wird und wiederum selbst die cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) über eine Phosphorylierung an einem Tyrosinrest (Tyr15) inhibiert (Chow *et al.*, 2011; O'Connell *et al.*, 1997). Aufgrund der Tatsache, dass CDK1 im Komplex mit Cyclin B1 den Übergang von der G2-Phase in die Mitose-Phase vermittelt, bewirkt die Inhibition von CDK1 dementsprechend einen konsekutiven G2/M-Arrest (Massacci *et al.*, 2023; O'Connell *et al.*, 1997). Dazu passend und ergänzend phosphoryliert CHK1 auch Phosphatasen der CDC25-Familie - CDC25A und CDC25C - die dadurch dann inhibiert werden. Da diese Phosphatasen sonst im aktivierten, dephosphorylierten Zustand die inhibitorischen Phosphorylierungen an Thr14/Tyr15 von CDK1 abspalten, verbleibt die CDK1 so im phosphorylierten Zustand, weshalb als Konsequenz der Übergang in die M-Phase verhindert wird (Smits & Gillespie, 2015).

Im Rahmen der Regulation des Spindle-Checkpoints während der Mitose führt eine aktivierte CHK1 zu einer Aktivierung der Aurora B-Kinase, wodurch bei Defekten des Spindelapparates der Progress in die Anaphase verzögert wird, sodass eine fehlerhafte Chromosomensegregation vermieden wird (Zachos *et al.*, 2007). Das Tumorsuppressorprotein p53 wird im Rahmen der DNA-Schadensantwort sowohl durch ATM und ATR als auch durch CHK1 und CHK2 an verschiedenen Stellen phosphoryliert

(Ou *et al.*, 2005; Shieh *et al.*, 2000). Der Transkriptionsfaktor P53 wiederum bewirkt infolge von DNA-Schäden die Induktion von P21 (El-Deiry *et al.*, 1994). P21 hemmt dann über die Inhibition von CDKs den weiteren Zellzyklusprogress (Engeland, 2022).

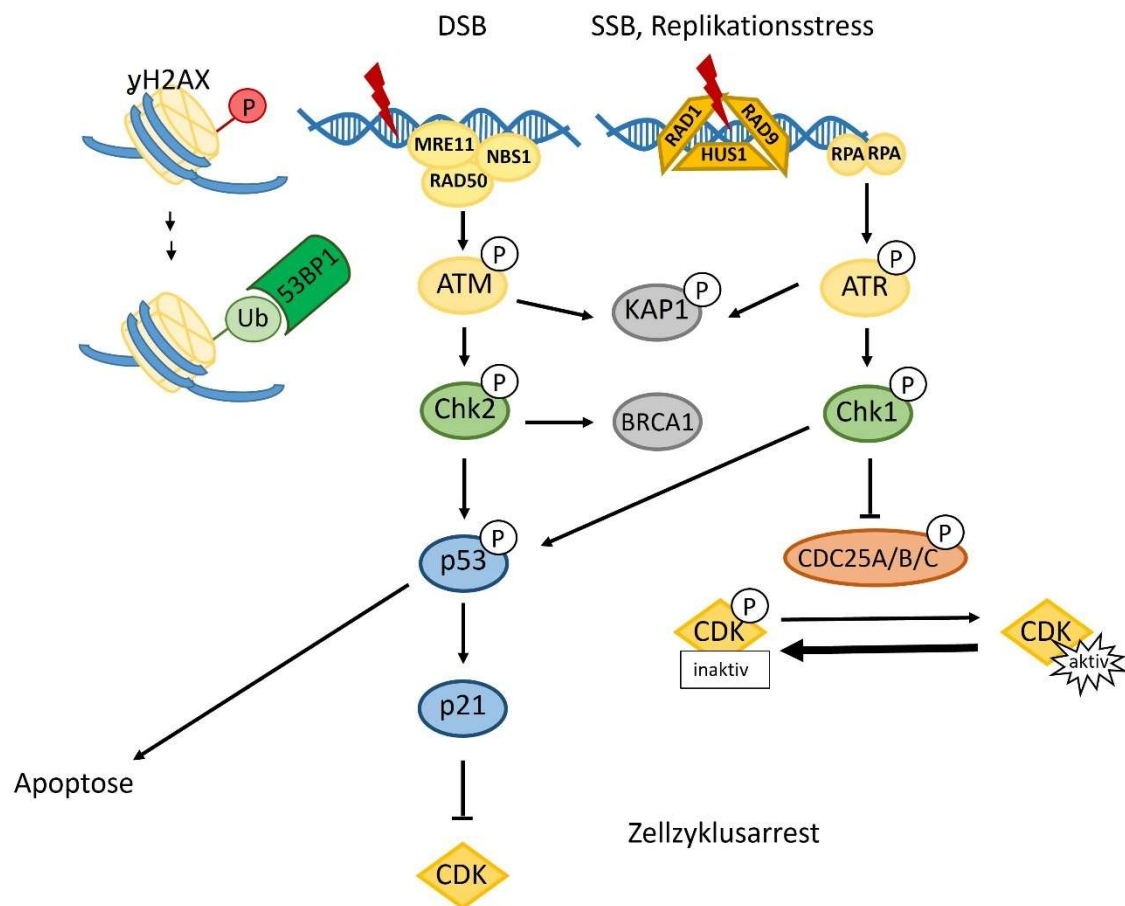


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Signalwege der DNA-Schadensantwort.

DNA-Schäden bewirken die Aktivierung spezifischer Signalkaskaden der sogenannten DNA-Schadensantwort, welche die Zelle zu einer adäquaten Reaktion befähigen soll. Dadurch werden ein temporärer Zellzyklus-Arrest und DNA-Reparatur initiiert oder aber Seneszenz oder Apoptose eingeleitet, wenn die DNA-Schäden nicht repariert werden können. Der Sensorkomplex MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) erkennt DSBs (Doppelstrangbrüche) und bewirkt die Aktivierung der Kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), die dann CHK2 (Checkpoint-Kinase 2) phosphoryliert. Das Histon H2AX wird an einem Serinrest zu yH2AX phosphoryliert und bewirkt eine Amplifikation des Schadenssignals über Interaktion mit diversen Faktoren, u. a. Ubiquitinligasen und eine Rekrutierung von 53BP1. Der Sensorkomplex 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) erkennt Einzelstrangbrüche und Replikationsstress und bewirkt eine konsekutive Aktivierung von ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) und anschließend CHK1 (Checkpoint-Kinase 1). Weitere Faktoren wie die Histonvariante H2AX und 53BP1 akkumulieren im Bereich von DSBs. Die Effektorinasen CHK1 und CHK2 phosphorylieren weitere Zielproteine. Dazu zählt BRCA1, ein Faktor, welcher sowohl für die NHEJ (nicht-homologe Endverknüpfung) als auch für die HR (homologe Rekombination) von Bedeutung ist. KAP1 ist von Bedeutung für die DSB-Reparatur in Heterochromatin. Die Phosphorylierung von P53 bewirkt eine Stabilisierung und Aktivierung des Proteins, welches sowohl Zellzyklus-Arrest als auch Apoptose einleiten kann. Die Phosphorylierung von CDC25-Proteinen bewirkt deren Inhibition und Degradierung, sodass sie CDKs (cyclin dependent kinases) nicht mehr dephosphorylieren und aktivieren können. Dies bewirkt einen konsekutiven Zellzyklusarrest. Abbildung und Beschreibung modifiziert nach (Freeman & Monteiro, 2010; Hu *et al.*, 2012; Kelliher *et al.*, 2024).

DNA-Schäden erfordern verschiedene Reparaturmechanismen, zu denen die direkte Basenreparatur durch Enzyme wie z. B. Photolyasen, die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die *Mismatch*-Reparatur (MMR) und im Falle von DNA-Doppelstrangbrüchen die Homologen Rekombination (HR) und die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) zählen (Huang & Zhou, 2021).

Treten DNA-Schäden in Form von Basenmodifikationen bzw. Einzelstrangläsionen auf, die die räumliche Struktur der DNA-Doppelhelix verändern bzw. destabilisieren – sogenannten *bulky adducts* – ist die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) von Bedeutung (Cohen & Adar, 2023). Beispiele für DNA-Schäden, die mittels NER repariert werden, sind UV-Licht-induzierte Thymidin-Dimere und Intrastrangverknüpfungen nach Behandlung mit Platinverbindungen wie Cisplatin und Carboplatin (Giglia-Mari *et al.*, 2011). Man unterscheidet die *Transcription coupled*-NER (TC-NER) und die transkriptions-unabhängige *global genome* NER (GG-NER) (Kumar *et al.*, 2020). Im Rahmen der TC-NER wird der Schaden von der RNA-Polymerase II erkannt. Weiterhin für Erkennung und Generierung einer Weiterleitung des Signals von Bedeutung sind die Faktoren CSA (*Cockayne Syndrome A*) und CSB (*Cockayne Syndrome B*), welche die am DNA-Schaden blockierte RNA-Polymerase II binden und helfen, den Faktor TFIIH zu rekrutieren, um die Reparatur zu initiieren (van der Weegen *et al.*, 2020; van Gool *et al.*, 1997). Abseits der Transkription werden Läsionen im Rahmen der GG-NER durch zwei verschiedene Komplexe erkannt. Zum einen durch einen Komplex XPC-HR23B (*Xeroderma pigmentosum protein C homolog of RAD23B*), zum anderen durch den Komplex XPA-RPA (*Xeroderma pigmentosum protein A-replication protein A*) (Sugasawa *et al.*, 1998; Thoma & Vasquez, 2003). Wie Thoma und Vasquez beschreiben, wird angenommen, dass zunächst XPC-HR23B DNA erkennt, die geschädigt ist bzw. von der typischen Watson-Crick-Struktur abweicht. Die Interaktion zwischen XPC-HR23B und der DNA führt zu Konformationsveränderungen und Rekrutierung der Helikase XPB. Diese entwindet die DNA an der Schadensstelle partiell und macht die Einzelstränge für das anschließend bindende XPA-RPA sterisch besser zugänglich. Ferner wird davon ausgegangen, dass XPA-RPA in diesem Zusammenhang eine Art Verifizierungsfunktion für das tatsächliche Vorliegen eines NER-reparablen Schadens einnimmt (Thoma & Vasquez, 2003). Zudem stabilisieren XPA und RPA die entwundene DNA (Kim *et al.*, 2022; Volker *et al.*, 2001). Anschließend wird der betroffene DNA-Strang durch die Endonuklease XPG und einen Komplex aus *excision repair cross-complementing 1* (ERCC1) und XPF in Richtung 3' und 5' der Läsion inzidiert. Es lagern sich RFC (*Replication factor C*) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) an die Lücke an und diese wird durch die DNA-Polymerase δ , ϵ oder κ aufgefüllt. An den Inzisionsstellen wird der Strang mithilfe der

DNA-Ligase I oder III durch die Wiederherstellung von Phosphodiesterbindungen verknüpft (Giglia-Mari *et al.*, 2011).

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), die Apoptose, Zellseneszenz und genetische Instabilität bis hin zur Karzinogenese bewirken können, werden unter anderem mittels einfacher, nicht homologer End-zu-End-Verknüpfung repariert (Davis & Chen, 2013). Die einfache End-zu-End-Verknüpfung wird auch als *non-homologous end joining* (NHEJ) bezeichnet und erfolgt meist bei allen DSBs, die außerhalb der späten S- oder G2-Phase auftreten, also dann, wenn kein doppelter Chromosomensatz vorliegt, der ein Zurückgreifen auf die Sequenz des Schwesterchromatids zulässt (Zhao *et al.*, 2020). Im Zuge des NHEJ bindet ein Ku70-Ku80-Heterodimer an die DNA (Doherty & Jackson, 2001; Walker *et al.*, 2001). Anschließend ereignet sich die sogenannte Synapsis. Diese kann lockerer oder fester sein und bezeichnet die Annäherung der beiden zu ligierenden DNA-Doppelstrang-Enden aneinander. In der flexiblen Synapsis sind die DNA-Enden parallel aneinander angelagert und sind lateral beweglich, was vermutlich die Suche von Mikrohomologien zwischen den Strängen ermöglicht. Die Faktoren XLF (*XRCC4-like factor*) und Paralog of XRCC4 and XLF (PAXX) induzieren dann die enge Synapsis. In dieser sind die DNA-Enden nicht mehr parallel und überlappend orientiert sondern werden in einen engen End-zu-End-Kontakt überführt (Zhao *et al.*, 2019). XLF interagiert direkt mit XRCC4-LIG4 und stimuliert die Ligase-Aktivität des Komplexes (Ahnesorg *et al.*, 2006; Riballo *et al.*, 2009). Sofern die DNA-Enden direkt kompatibel sind, werden sie ligiert. Meist sind sie bei einem DSB allerdings inkompatibel. Die Enden müssen dann zunächst prozessiert werden, indem Nukleasen defekte bzw. modifizierte Basen entfernen, bereits vorhandene Mikrohomologien zwischen beiden Strängen im Bereich der Strangenden freilegen oder Polymerasen solche Mikrohomologie generieren. Abhängig von der Struktur der Bruchenden müssen also unterschiedliche Proteine rekrutiert werden (Chang *et al.*, 2016; Waters *et al.*, 2014). Zu den im Rahmen des NHEJ aktiven Nukleasen zählt Artemis. Hierbei handelt es sich um ein Enzym mit 5'-Exonuklease- sowie 5'- und 3'-Endonukleaseaktivität (Li *et al.*, 2014). Nach der Prozessierung der Enden werden an inkompatiblen Enden mithilfe der zur DNA-Polymerase X-Familie gehörenden NHEJ-Polymerasen Pol μ , Pol λ oder TdT (*terminale Desoxyribonukleotidyltransferase*) Nukleotide angehängen (Pryor *et al.*, 2015). Eine Besonderheit dieser Polymerasen ist, dass sie nicht nur Desoxyribonukleotide sondern auch Ribonukleotide an den Strang synthetisieren (Pryor *et al.*, 2018). Anschließend werden die Enden durch die XRCC4-LIG4-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Dies erfolgt über eine ATP-abhängige Adenylierung des 5'-Phosphatrests des einen Stranges und anschließend folgendem nukleophilen Angriff dieser Intermediatstruktur durch das 3'-OH-Ende des anderen Stranges (Gu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Die Homologe Rekombination (HR) von Doppelstrangbrüchen erfordert ein Schwesterchromatid, was daran liegt, dass ein mindestens 100 Basenpaare (bp) langes homologes Template benötigt wird, um als Vorlage für die korrekte Synthese des zweiten DNA-Stranges im Bereich der Bruchstelle dienen zu können (Lisby & Rothstein, 2015). Die HR wird dann initiiert durch den MRN-Komplex, welcher sowohl die Kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), als auch die Histon-Acetyltransferase TIP60 rekrutiert, sodass dann eine weitere Signalkaskade aktiviert wird, indem die Kinase ATM das Histon H2AX phosphoryliert (Burma *et al.*, 2001; Stracker & Petrini, 2011; Sun *et al.*, 2005)

Phosphoryliertes H2AX wird auch als γ H2AX abgekürzt und bindet das Adapterprotein MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (Stucki *et al.*, 2005). Dieses wird ebenfalls durch ATM phosphoryliert und rekrutiert die E3-Ubiquitin-Ligasen RNF8 (*Ring Finger Protein 8*) und RNF168 (*Ring Finger Protein 168*) (Altmeyer & Lukas, 2013). Diese katalysieren die Ubiquitylierung von H2AX, wodurch anschließend 53BP1 (*tumor suppressor p53-binding protein 1*) und BRCA1 (*breast cancer 1*) an Ub-H2AX binden können. Die Interaktionen zwischen 53BP1 und BRCA1 determinieren Zellzyklusphasen-abhängig, ob der DSB eher über NHEJ oder HR repariert wird (Daley & Sung, 2014). Dabei 53BP1 wirkt protektiv gegen weiteres Prozessieren und Kürzen der DNA-Enden und wirkt weichenstellend in Richtung NHEJ. BRCA1 hingegen inhibiert diese Funktion von 53BP1 und initiiert die Ubiquitylierung von CtIP (*c-terminal-binding protein (CtBP)-interacting protein*) (Chapman *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2006). Damit die Bruchenden des DSB in den homologen DNA-Strang des Schwesterchromatids eindringen und dort die homologe Sequenz finden können, müssen DNA-Einzelstrangüberhänge (3'-Überhänge) generiert werden. Der MRN-Komplex und CtIP verfügen über Endonukleaseaktivität und spalten Phosphodiesterbindungen im Inneren des DNA-Stranges. Die dem DSB zugewandte Seite des inzidierten Stranges wird durch Exonukleasen in 5'→3'-Richtung abgebaut, sodass am komplementären Strang ein 3'-Überhang entsteht (Chen *et al.*, 2008). Der 3'-Überhang wird dann zunächst von RPA-Molekülen und anschließend von RAD51 gebunden und bildet somit ein Nukleoprotein-Filament. Wichtig für die Vermittlung der Bindung von RAD51 an die einzelsträngige DNA und somit für die folgende Stranginvasion sind BRCA2 und PALB2 (Holloman, 2011; Thorslund & West, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Anschließend beginnt die Stranginvasion des homologen DNA-Stranges. Akzessorische Proteine wie RAD54, RAD54B und Rdh54 binden dazu ebenfalls an die einzelsträngige DNA, verändern ihre Topologie und ermöglichen so die Stranginvasion unter Bildung einer sog. D-Loop (*Displacement-Loop*)-Struktur aus partiell entwundenem homologem DNA-Strang und darin eingedrungenem Einzelstrang (Sung & Klein,

2006). RAD54 bewirkt auch die Dissoziation von RAD51, sodass die DNA-Polymerasen Zugang zum 3'-Ende haben für die Neusynthese der DNA (Li & Heyer, 2008, 2009).

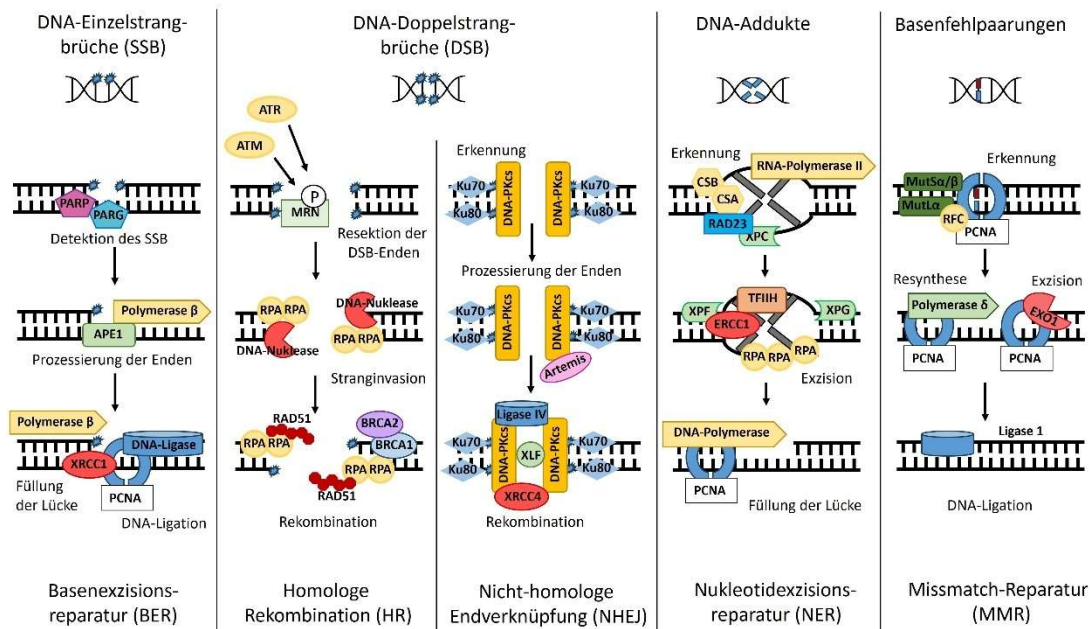


Abbildung 1.6: DNA-Reparaturmechanismen

Überblick über die verschiedenen Wege der DNA-Reparatur bei verschiedenen Arten der DNA-Schäden. Einfache Einzelstrangbrüche (SSBs) sowie abnormal veränderte Basen werden mithilfe der Basenexzisionsreparatur (BER) behoben (Hegde *et al.*, 2008). Nach Erkennung und Exzision der betroffenen Stelle mittels der Endonuclease APE1 erfolgen Füllung und Ligation der Lücke durch DNA-Polymerase β und -Ligase (Wang *et al.*, 2021). Im Rahmen der DNA-Replikation entstandene Basenfehlpaarungen werden mittels Mismatch-Reparatur (MMR) repariert. MutS- und MutL-Proteine erkennen die Fehlpaarung. Rekrutiert durch Replikationsfaktor C (RFC) bindet Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Exonuklease 1 (EXO1) schneidet die betroffene Stelle aus, dann erfolgen Füllung und Ligation der Lücke durch DNA-Polymerase δ und -Ligase (Kunkel & Erie, 2005). Mutationen mit bulky adducts - sterisch komplizierte Läsionen - erfordern die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Die Faktoren Cockayne Syndrom A und B (CSA und CSB) initiieren die NER. Replikationsprotein A (RPA) bindet den ungeschädigten DNA-Strang. Der Komplex XPC-RAD23 erkennt die Mutation und rekrutiert TFIIH. Der ERCC1-XPF-Komplex bewirkt eine Stranginzision, die das Ausschneiden der Läsion ermöglicht. Dann bindet PCNA und rekrutiert DNA-Polymerasen, die die Lücke füllen (Marteijn *et al.*, 2014; Schärer, 2013). DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) werden während der S- und G2-Phase durch Homologe Rekombination (HR) repariert. Nach Erkennung des DSB durch den MRN-Komplex werden die beiden Enden durch Nukleasen prozessiert, bevor die entstehenden Einzelstränge erst durch Replikationsprotein A (RPA), dann durch RAD51-Moleküle gebunden und so schließlich einer komplementären Ergänzung des Doppelstrangbruches anhand des homologen Schwesterchromatids als Matrize zugeführt werden (Cejka, 2015; Wang *et al.*, 2021; Wright *et al.*, 2018). In anderen Phasen des Zellzyklus ohne vorliegendes Schwesterchromatid werden DSBs durch die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) repariert. Das Heterodimer Ku70/Ku80 und die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PKc) erkennen DSBs und initiieren vermittelt durch XLF, XRCC4 und DNA-Ligase IV einen Verschluss der Bruchstelle. Die Endonuclease Artemis prozessiert zuvor inkompatible überhängende Einzelstrangenden (Chang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). Abbildung modifiziert nach (Marteijn *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2021).

1.4.2 Modulation der DNA-Schadensantwort

Die Entstehung und Progression von Tumoren ist mit genetischer Instabilität und DNA-Schäden verbunden (Bartek, 2011). Daher können durch Inhibition von Prozessen der DNA-Schadensantwort können Tumorzellen gegenüber eintretenden DNA-Schäden sensibilisiert werden und durch Akkumulation von DNA-Schäden der Zelltod während der Mitose – die mitotische Katastrophe – bewirkt werden (Kwok & Stankovic, 2019). Chemotherapeutika wie z. B. Platinverbindungen induzieren DNA-Schäden, die durch die Tumorzelle mithilfe der Aktivierung der DNA-Schadensantwort repariert werden müssen. Dies lässt sich pharmakologisch ausnutzen, indem man die Zytostatika mit Agenzien kombiniert, die die DNA-Schadensantwort inhibieren (Basourakos *et al.*, 2017). In Bezug auf eine Kombinationsbehandlung mit Zytostatika und Inhibitoren der DNA-Schadensantwort zur Verbesserung der antitumorigenen Wirksamkeit ist auch das Konzept der synthetischen Lethalität zu erwähnen. Zwei Gene bzw. ihre Produkte werden als synthetisch lethal bezeichnet, wenn die Mutation des einen Gens bzw. das Ausschalten des Genproduktes durch die Zelle kompensiert werden kann, aber ein gleichzeitiger Ausfall des zweiten Gens bzw. Genproduktes den Zelltod bewirkt (Kaelin, 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modulatoren der DNA-Schadensantwort sind im Folgenden ausführlicher beschrieben.

1.4.2.1 Der CHK1-Inhibitor LY2603618

LY2603618, auch als *Rabusertib* bekannt, ist ein selektiver und potenter Checkpoint-Kinase 1 (CHK1)-Inhibitor (Qiu *et al.*, 2018).

Im Gegensatz zu vielen zuvor untersuchten Checkpoint-Kinase-Inhibitoren weist LY2603618 eine ausgeprägte Selektivität für CHK1 auf und inhibiert andere Kinasen der DNA-Schadensantwort erst bei Applikation deutlich höherer Konzentrationen (King *et al.*, 2014). Für verschiedene Tumorentitäten konnten mit LY2603618 bereits Effekte gezeigt werden:

So sind bei Mammakarzinomzellen vom basalen Typ *in vitro* synergistische Effekte einer kombinierten Behandlung mit Cisplatin und LY2603618 bei gleichzeitig nicht verstärkter Zytotoxizität in gesunden Brustdrüsenzellen nachgewiesen worden (Nieto-Jimenez *et al.*, 2020). Darüber hinaus wurde für

Lungenkarzinomzellen von Wang *et al.* gezeigt, dass LY2603618 alleine einen Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase induzieren kann, eine vermehrte Expression von P21 bewirkt und zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort mit Phosphorylierung der Histonvariante H2AX führt. Auf molekularer Ebene wird durch LY2603618 die Autophosphorylierung von CHK1 an S296 inhibiert, während gleichzeitig eine vermehrte DNA-Schadens-assoziierte Phosphorylierung an S345 durch ATR induziert wird (Wang *et al.*, 2014). Auch in vereinzelt klinischen Studien wurden Wirksamkeit und Verträglichkeit von LY2603618 untersucht. In einer Phase I-Studie, welche die dosisabhängige Sicherheit und Verträglichkeit von LY2603618 in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Pemetrexed untersucht hat, zeigten sich vor allem Diarrhoe, allergische Reaktionen und Fatigue-Symptomatik als gelegentliche Nebenwirkungen bei insgesamt als akzeptabel bewertetem Sicherheitsprofil (Weiss *et al.*, 2013). In einer Phase II-Studie an Patienten mit fortgeschrittenem bzw. metastasiertem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) und ebenfalls in Kombination mit Pemetrexed wurde vor allem von Neutropenie bzw. Granulozytopenie, Nausea, Anämie und ebenfalls Fatigue berichtet (Scagliotti *et al.*, 2016). Auch pharmakokinetische Aspekte von LY2603618 wurden bereits in Studien untersucht und zeigten eine Plasmahalbwertszeit von 13,2 – 14,4 h, keine Akkumulation zwischen den Behandlungszyklen, aber auch eine zu beachtende pharmakokinetische Variabilität zwischen verschiedenen Patienten (Scagliotti *et al.*, 2016).

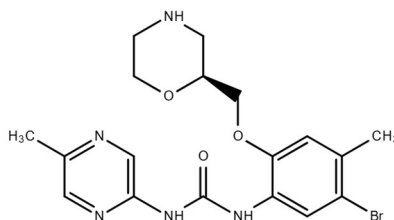


Abbildung 1.7: Chemische Struktur von LY2603618

Abbildung generiert mithilfe von www.chemspider.com und Microsoft Powerpoint nach einer Abbildung von (Ronco *et al.*, 2017)

1.4.2.2 Der PARP-Inhibitor Olaparib

Olaparib (AZD2281) ist ein Inhibitor des Enzyms Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase 1 und 2 (PARP1 und PARP2) (Meneer *et al.*, 2008). PARP1 ist ein Enzym, welches über verschiedene Zink-Finger-Motive DNA-Strangbrüche erkennt, für die Erkennung und konsekutive Reparatur von DNA-

Einzelstrangbrüchen (*single-strand-breaks*, SSBs) und DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) essenziell ist und sogar die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) unterstützt (Kanev *et al.*, 2024). Es katalysiert unter Spaltung von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) die Polyadenylierung von Zielproteinen wie z.B. Histonen und DNA-Reparatur-Proteinen – also die Verknüpfung von ADP-Ribose-Molekülen zu einem langen verzweigten Polymer, welches wiederum weitere DNA-Reparaturfaktoren rekrutiert (Javle & Curtin, 2011).

Inzwischen gibt es mehrere durch die FDA klinisch zugelassene PARP-Inhibitoren, zu denen neben Olaparib auch Niraparib, Rucaparib und Talazoparib zählen (Heiss *et al.*, 2024; Smith *et al.*, 2024). Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Olaparib weist auf chemischer Ebene eine Nikotinamid-Gruppe auf, welche mit NAD⁺ um die Bindungsstelle an den PARP-Enzymen konkurriert (Murai *et al.*, 2012). Wie Lord und Ashworth beschrieben, wurde als zytotoxischer Mechanismus der konsekutiven PARP-Inhibition lange vor allem die gestörte Reparatur und nachfolgende Persistenz von SSBs angesehen, die in die Bildung von DSBs mündet, sobald die SSBs auf eine Replikationsgabel treffen. Inzwischen überwiegt jedoch eher die Hypothese, dass PARP-Inhibitoren zu einer gestörten Auto-Polyadenylierung führen, die mit einer gestörten Loslösung des Enzyms von der geschädigten DNA einhergeht. Dies wird als „PARP-trapping“ bezeichnet und als zytotoxische Läsion angesehen (Lord & Ashworth, 2017).

Als allgemeine Nebenwirkung einer Behandlung mit Olaparib zeigten sich milde gastrointestinale Symptome, während Dosis-limitierende Nebenwirkungen vor allem in Stimmungsveränderungen, Fatigue und Thrombozytopenie bestanden (Fong *et al.*, 2009). In Phase-III-Studien ergaben sich Anämie, Neutropenie und Fatigue als die häufigsten schwerwiegenderen Nebenwirkungen (Montemorano *et al.*, 2019). Olaparib wurde von AstraZeneca Pharmaceuticals LP als orales Medikament entwickelt und ist unter dem Handelsnamen Lynparza® zugelassen für die Therapie fortgeschrittener BRCA-mutierter epithelialer Ovarialkarzinome (Montemorano *et al.*, 2019). Die Verwendung von PARP-Inhibitoren wie z.B. Olaparib ist vor allem bei BRCA1- oder BRCA2-defizienten Tumoren wirksam, weil diese aufgrund der fehlenden Faktoren eine Defizienz der HR aufweisen und somit aus SSB hervorgegangene DSBs weniger gut reparieren können (Bryant *et al.*, 2005; Rottenberg *et al.*, 2008; Turk & Wisinski, 2018). Auch bei Kindern kommt Olaparib im Rahmen von klinischen Studien zum Einsatz: Olaparib wurde bereits als Monotherapie im Rahmen einer Phase-I-Studie von Takagi *et al.* bei Kindern mit soliden Tumoren getestet, darunter Patienten mit Wilms Tumor, Ewing-Sarkom, aber auch dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Neuroblastom. In dieser Studie ergab

sich ein akzeptables Sicherheitsprofil mit ähnlichen Nebenwirkungen wie bei Erwachsenen bei einer überraschenden Verträglichkeit höherer Dosierungen bei Kindern. Aus der Studie wurde abgeleitet, dass PARP-Inhibitoren wie Olaparib vor allem bei 11q-deletierten Tumoren wirksam sein könnten, da bei diesen Tumoren wichtige Gene für die HR deletiert sind (Takagi et al., 2022). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y weist jedoch keine 11q-Deletion auf (Carén et al., 2010).

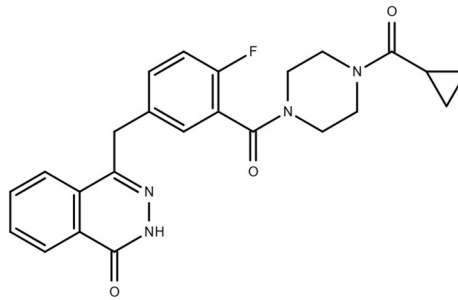


Abbildung 1.8: Chemische Struktur von Olaparib

Abbildung generiert mithilfe von www.chemspider.com und Microsoft Powerpoint nach einer Abbildung von (Tavares et al., 2020).

1.5 Apoptose

Zelltod ist von essenzieller Bedeutung für die Gewebemöostase von Organismen, da dadurch die Elimination geschädigter Zellen gewährleistet wird (Park et al., 2023). Neben der klassischen Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose als morphologisch voneinander abgrenzbare Zelltodarten sind inzwischen insbesondere mehrere Arten des programmierten Zelltodes bekannt. Hier sind vor allem Apoptose, Nekroptose und Pyroptose zu nennen, die als programmierte Zelltodarten alle durch genetisch festgelegte Signalwege bzw. Mechanismen ausgeführt werden (Yuan & Ofengeim, 2024). Apoptose dient unter anderem der Beseitigung von Zellen, welche durch Infektionen oder Noxen geschädigt wurden. So werden auch Zellen, die im Rahmen einer Chemotherapie oder Bestrahlung DNA-Schäden erworben haben, P53-abhängig mittels Apoptose eliminiert (Elmore, 2007). Bei der Apoptose handelt es sich um eine Art des kontrollierten Zelltodes, die von charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle begleitet wird (Saraste & Pulkki, 2000). Die Zelle schrumpft, der Zellkern verdichtet sich durch Chromatin-

Kondensierung (Pyknose), die DNA wird fragmentiert und die Zellmembran bildet Ausstülpungen (*membrane blebbing*) (Elmore, 2007). Schließlich wird auch die Zelle als solche fragmentiert und es bleiben apoptotische Körperchen zurück. Diese bestehen aus Zellinhalt umschlossen von intakter Zellmembran (Obeng, 2021; Savill & Fadok, 2000). In der Membran führt der Prozess der Apoptose zur Externalisierung von Phosphatidylserin, welches sich andernfalls nur im inneren *layer* der Lipiddoppelmembran befindet und im äußeren *layer* nun als Signal für Makrophagen fungiert, die apoptotische Zelle zu phagozytieren (McCarthy & Evan, 1998). Anders als bei der Nekrose handelt es sich bei der Apoptose also um einen stark regulierten und geordneten Prozess, wohingegen nekrotische Zellen anschwellen, sich abrunden, platzen und Zellinhalt in die extrazelluläre Matrix gelangt (Grooten *et al.*, 1993). Apoptose findet nur dann statt, wenn das ATP-Level der Zelle ausreichend hoch ist (Soldani & Scovassi, 2002). Apoptose wird ausgelöst durch Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren durch externe Signale, mitochondriale Schäden (z. B. durch Hypoxie, ionisierende Strahlung, Toxine, virale Infektion), Schädigung der Zellmembran und vor allem auch als Reaktion auf DNA-Schäden (Obeng, 2021). Es existieren zwei Wege, über die Apoptose eingeleitet wird, der extrinsische und der intrinsische Signalweg (Elmore, 2007). Der extrinsische Aktivierungsweg der Apoptose involviert Todesrezeptoren aus der TNF (*Tumor necrosis factor*)-Familie. Werden diese Rezeptoren von sogenannten Todesliganden (TNF Liganden, Fas-Liganden) aktiviert, binden Adapterproteine wie FADD (*Fas associated death domain*) und TRADD (*TNF receptor associated death domain*) an den intrazellulären Teil der Todesrezeptoren. Diese Adapterproteine leiten das Signal zur Einleitung der Apoptose weiter, indem sie über ihre DED (*death effector domain*) die Initiator-Caspasen 8 oder 10 binden und mit ihnen den sog. DISC (*Death inducing signaling complex*) formen (Liu *et al.*, 2017; Wajant, 2002). Caspasen sind Aspartat-spezifische Cysteinproteasen mit einem katalytisch aktiven Cystein-Rest im aktiven Zentrum, die Peptidbindungen hinter Aspartat spalten (Alnemri *et al.*, 1996; Seaman *et al.*, 2016). Sie liegen zunächst als inaktive Zymogene vor (Pro-Caspasen), die durch Prozessierung aktiviert werden (Hengartner, 2000). Abhängig von ihrer Position in der Signalkaskade werden sie in Initiator- und Effektorcaspasen eingeteilt (Parrish *et al.*, 2013). Die aktivierten Initiator-Caspasen aktivieren Effektor-Caspasen wie Caspase 3 und 7 (Boatright & Salvesen, 2003; Florentin & Arama, 2012). Im Intrinsischen Weg erfolgt die Caspase-Aktivierung durch eine gesteigerte Permeabilität der Mitochondrienmembran und einer resultierenden Freisetzung proapoptotischer Faktoren ins Zytoplasma. Cytochrom C und APAF-1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*) gelangen so ins Zytoplasma und bilden mit Pro-Caspase 9 das Apoptosom, in welchem Pro-Caspase 9 autokatalytisch zu Caspase 9 aktiviert wird (Hassan *et al.*, 2014). Für die gesteigerte

Permeabilität der Mitochondrien sind die Proteine BAX und BAK (*Bcl2-homologous antagonist/killer 1*) verantwortlich, die miteinander Poren-formende Oligomere in der äußeren Mitochondrienmembran formen (Westphal *et al.*, 2014). Die Porenbildung wird übergeordnet reguliert durch das Vorhandensein pro- und anti-apoptotischer Faktoren, die zur BCL2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie gehören. Zu den pro-apoptotischen Faktoren zählen nicht nur die Poren-formenden Proteine BAX und BAK (*Bcl2-homologous antagonist/killer 1*) selbst, sondern auch unter anderem BCL-10, BAD, BID (*BH3 interacting domain death agonist*) und BIM (*Bcl2 interacting mediator of cell death*), PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und NOXA (Obeng, 2021). Letztere sind vor allem wichtig für die P53-vermittelten Apoptose-Induktion (Lomonosova & Chinnadurai, 2008). Den pro-apoptotischen Faktoren aus der BCL2-Familie ist zudem das Vorhandensein einer sog. BH3-only-Domäne gemein, mit welcher sie anti-apoptotische Faktoren binden und somit deren Aktivität stören können (Giam *et al.*, 2008). Anti-apoptotische Faktoren sind unter anderem BCL2, BCL-XL, welche die Freisetzung von Cytochrom C verhindern und die Aktivierung von Caspasen verhindern (Tsujimoto, 1998). Intrinsischer und extrinsischer Weg konvergieren auf Ebene der Effektor-Caspasen 3 und 7. Caspase 3 ist vor allem für die Degradation des Zytoskeletts verantwortlich und spaltet unter anderem nukleäre Lamine, Proteine, die Zell-Zell-Adhäsionen ermöglichen, sowie Gelsolin, ein Aktin-bindendes Protein, dessen Fragmente wiederum Aktin spalten (Boland *et al.*, 2013; Kothakota *et al.*, 1997). Zudem spaltet Caspase 3 DNase-inhibierende Faktoren wie z. B. ICAD (*inhibitor of Caspase activated DNase*) und triggert somit die apoptotische DNA-Fragmentierung (Wolf *et al.*, 1999). Caspase 7 weist ein teils überlappendes Substratspektrum auf, wird im Unterschied zu Caspase 3 aber nicht nur durch Caspase 8 sowie Caspase 9 und 10 aktiviert, sondern kann auch Caspase 1-abhängig durch das Inflammasom aktiviert werden (Lamkanfi & Kanneganti, 2010). Die Funktionen beider Effektor-Caspasen sind vermutlich überlappend und zum Teil redundant, da Caspase-3-defiziente Zellen ebenfalls zu apoptotischem Zelltod fähig sind (Boland *et al.*, 2013). Ein weiteres Substrat von Caspase 3 und 7 ist PARP (*Poly-ADP-Ribose-Polymerase*) (Germain *et al.*, 1999). Wie bereits erläutert ist PARP ein Enzym, welches wichtig für die DNA-Reparatur von Einzelstrangbrüchen (SSB) ist (Javle & Curtin, 2011). Es ist 116 kDa groß und kann in zwei 89 kDa und 24 kDa große Fragmente gespalten werden (Germain *et al.*, 1999). Die Funktion dieser PARP-*cleavage* im Rahmen der Apoptose ist nicht abschließend geklärt. Es wird aber angenommen, dass damit verhindert wird, dass die Zelle weiteres NAD⁺ für unnötige DNA-Reparatur verbraucht. Nach der Spaltung sind katalytische Domäne und die DNA-Strangbruch erkennende DBD (*DNA-binding domain*) voneinander getrennt (Catri *et al.*, 2014; Soldani & Scovassi, 2002). Die Spaltung von PARP wird als Zeichen für Apoptose gewertet, jedoch

muss dazu erwähnt werden, dass nicht alle Zellen im Zuge der Apoptose PARP-Spaltung bzw. deren Spaltprodukte zeigen. So ist beispielsweise für apoptotische Leberzellen das Fehlen von PARP-Spaltprodukten beschrieben (Soldani & Scovassi, 2002).

1.6 Zellzyklus und Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus ist ein komplex regulierter Prozess, der notwendig für das Wachstum und die Proliferation von Zellen ist (Schafer, 1998). Wie Alma Howard and Stephen Pelc bereits 1953 auf der Basis von Untersuchungen mit radioaktiv markiertem, in die DNA eingebautem Phosphat postulierten, lassen sich vier verschiedene Zellzyklus-Phasen voneinander abgrenzen – G1-Phase, S-Phase, G2-Phase und eine Zellteilungs-Phase (Dubrovsky & Ivanov, 2003; Howard & Pelc, 1953). In der S-Phase wird die DNA innerhalb von ca. 10 – 12 Stunden dupliziert, in der Mitose-Phase (M-Phase) erfolgt die Zellkernteilung mit Aufteilung der duplizierten DNA auf zwei Tochterzellkerne, bevor dann während Zytokinese das Zytoplasma aufgeteilt wird (Alberts B, 2002). Vor und nach der S-Phase finden *gap phases* statt, bezeichnet als G1-Phase (vor der S-Phase) und G2-Phase (nach der S-Phase) (Umeda *et al.*, 2019). Ein Großteil der differenzierten somatischen Zellen (Neurone, Myozyten, Oberflächenepithelzellen) teilt sich jedoch überhaupt nicht mehr. Mit der G0-Phase wurde eine Bezeichnung für Zellen etabliert, die nicht mitotisch aktiv sind, sondern sich in einer Art Ruhezustand befinden – in diesem Zusammenhang auch Quieszenz genannt (Ding *et al.*, 2020; Williams & Stoeber, 2012). Das Durchlaufen der einzelnen Zellzyklusphasen wird reguliert durch die wechselnde Aktivierung und Deaktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin-dependent kinases*, CDKs), welche selbst aktiviert werden durch die Bindung von Cyclinen (Arellano & Moreno, 1997). CDKs sind Serin/Threonin-Kinasen, dessen Deregulation in malignen Tumorzellen zugunsten eines ungebremsen Zellzyklus zu den *Hallmarks of cancer* zählen (Abschnitt 1.1) (Hanahan & Weinberg, 2011). Sie bilden Heterodimere mit den regulatorischen Cyclinen (Canavese *et al.*, 2012). Signale von mitogenen Faktoren (z. B. Hormone) konvergieren auf die Aktivierung von CDK 4 und 6 durch D-Typ-Cycline (Cyclin D1, D2 und D3), die bewirken, dass Zellen aus der G0- oder G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus eintreten, sofern nicht hemmende Signale durch die CDK-Inhibitoren P15, P16, P18 und P19 aus der INK4-Familie überwiegen (Ding *et al.*, 2020; Malumbres & Barbacid, 2001). Wie Asghar *et al.* beschrieben haben, phosphoryliert und inhibiert der aktive Cyclin D-CDK4/6-Komplex

das Tumor-Suppressor-Protein RB (*Retinoblastoma*). Im unphosphorylierten aktiven Zustand bindet und inhibiert das RB-Protein den Faktor E2F. E2F ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von für die G1/S-Transition wichtigen Proteinen bewirkt. Die Inhibition von RB-Protein bewirkt eine Disinhibition von E2F, sodass die entsprechenden Proteine exprimiert werden. Zu diesen zählen unter anderem Cyclin E, Cyclin A sowie für die Desoxyribonukleotidbiosynthese notwendige Enzyme wie Dihydrofolatreduktase (DHFR) und Ribonukleotidreduktasen (RRM) (Asghar *et al.*, 2015). Im späteren Verlauf der G1-Phase bewirken die nun exprimierten E-Typ-Cycline (Cyclin E1 und E2) die Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradation der CDK-Inhibitoren P21 und P27 sowie die Dephosphorylierung von CDK2 durch die Phosphatase CDC25A und somit eine Aktivierung von CDK2 (Watanabe *et al.*, 1995). CDK2 führt in einem Feedback-Loop-Mechanismus zu einer Hyperphosphorylierung von RB und phosphoryliert und aktiviert weitere für DNA-Replikation, Histon-Synthese usw. erforderliche Proteine und Enzyme (Ma *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 2000). Gegen Ende der S-Phase führt Cyclin A zur Verdrängung von Cyclin E aus dem Komplex mit CDK2. Der Cyclin A/CDK2-Komplex terminiert die S-Phase durch die Phosphorylierung von CDC6 und E2F1, was den Übergang in die G2-Phase initiiert (Matthews *et al.*, 2021). Der Übergang von der G2-Phase in die Mitose sowie der geordnete Übergang der Mitosephasen ineinander wird durch CDK1 reguliert. CDK1 selbst bildet zunächst einen Komplex mit Cyclin A und ist selbst nur im dephosphorylierten Zustand aktiv. Wird sie durch die G2-Checkpoint-Kinasen WEE1 oder MYT1 phosphoryliert, wird sie inaktiviert und die Zelle in der G2-Phase arretiert (Matthews *et al.*, 2021). Die Phosphatase CDC25C hält den aktiven dephosphorylierten Zustand von CDK1 aufrecht. Der G2/M-Übergang wird also maßgeblich durch Menge und Aktivierungszustände von WEE1 und CDC25C determiniert (Matthews *et al.*, 2021). Die aktive CDK1 aktiviert die mitotischen Kinasen Aurora A und B sowie PLK1 (*Polo-like-Kinase 1*). Aurora A und B sind vermutlich für die Koordination der Verkürzung des Spindelapparates durch Depolymerisation der Mikrotubuli im Zuge der Chromosomensegregation in der Anaphase und somit die korrekte Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen sowie für den SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) von Bedeutung (Hégarat *et al.*, 2011).

Die sogenannten Zellzyklus-Checkpoints gewährleisten eine Kontrolle der Abläufe im Zellzyklus. So bewirken DNA-Schäden einen Zellzyklus-Arrest, um Zeit für die DNA-Reparatur zu schaffen (Barnum & O'Connell, 2014). Während der G1-Phase erworbene DNA-Schäden werden im Rahmen des G1/S-Checkpoints detektiert. Durch Aktivierung des ATM/CHK2- oder des ATR/CHK1-Signalweges wird P53 phosphoryliert, wodurch es stabilisiert wird und die Expression von P21 induziert, welches als CDK-Inhibitor fungiert und durch Hemmung von CDK2 einen G1-Arrest bewirkt (Kastan & Bartek,

2004). Eine Aktivierung des G2/M-Checkpoints verhindert, dass die Zelle mit DNA-Schäden die Mitose-Phase durchläuft. Die Aktivierung des ATM/CHK2- oder des ATR/CHK1-Signalweges verhindert durch eine inhibierende Phosphorylierung der CDC25-Phosphatasen, dass diese CDK1 durch Dephosphorylierung aktivieren (Donzelli & Draetta, 2003; Kastan & Bartek, 2004).

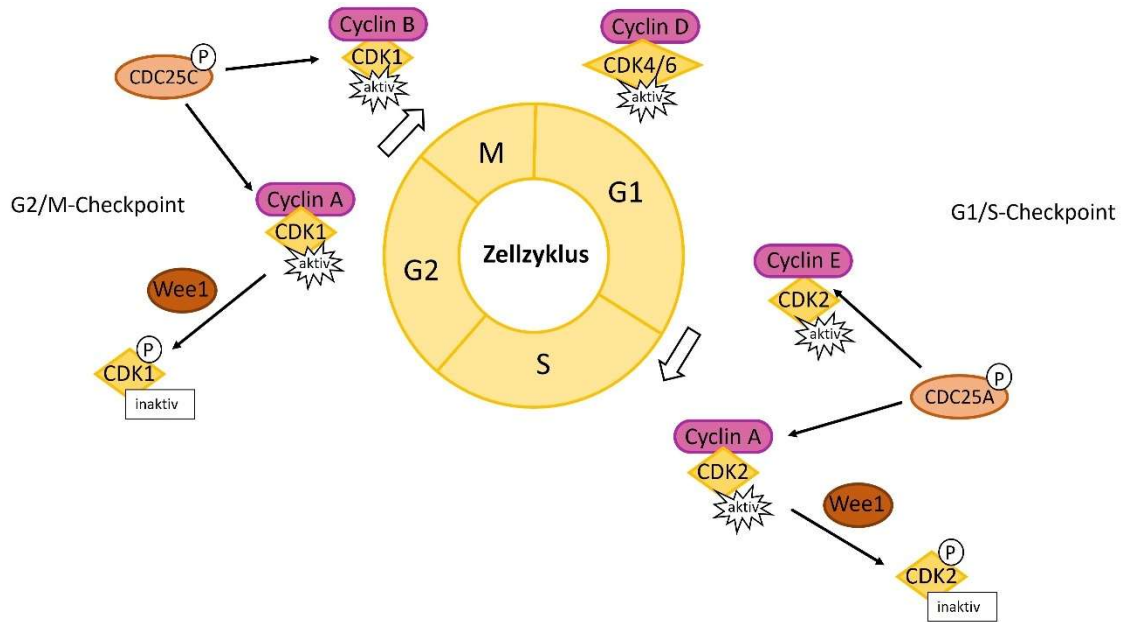


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung von Zellzyklus und Zellzyklus-Regulation

Der Zellzyklus setzt sich zusammen aus einer Abfolge von G1-Phase (*Gap1*), S-Phase, G2-Phase (*Gap2*) sowie der M-Phase (Mitose). In der S-Phase wird die DNA vermehrt, in der M-Phase findet die eigentliche Zellteilung statt. In den *Gap*-Phasen G1 und G2 finden jeweils notwendige Vorbereitungsprozesse wie z.B. Synthese von Enzymen für die S-Phase und M-Phase statt. Der Übergang der Zelle von einer Phase in die nächste wird durch Zellzyklus-Regulatoren kontrolliert, nämlich durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs). Die verschiedenen CDKs phosphorylieren phasen-spezifisch weitere Proteine für den Vollzug der jeweiligen Zellzyklus-Phase. CDKs selbst werden durch unterschiedliche Cycline gesteuert. Die CDKs selbst werden übergeordnet reguliert durch weitere Faktoren. Die Kinase Wee1 bewirkt über eine Phosphorylierung die Inhibition von CDK1 und CDK2. Dem entgegenwirkend können CDC25-Phosphatasen CDKs über eine hydrolytische Abspaltung der inhibierenden Phosphorylierung aktivieren. Abbildung und Beschreibung modifiziert nach (Kojima *et al.*, 2017; Leal-Esteban & Fajas, 2020; Schmidt *et al.*, 2017; Vermeulen *et al.*, 2003)

1.7 Noradrenerg-mesenchymale Transition (NMT)

Der Prozess der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beschreibt die Umwandlung stationärer Epithelzellen mit einer basal-apikalen Polarität in einen mesenchymalen Zelltyp unter Verlust der Zell-Zell-Adhäsionen und Erlangen der Fähigkeit zu verstärkter Zellmigration. Dieser Vorgang tritt physiologischerweise im Rahmen der embryonalen Entwicklung sowie bei Wundheilungsprozessen in Erscheinung (Lamouille *et al.*, 2014). Er geht einher mit der Herunterregulation epithelialer Faktoren und einer Hochregulation mesenchymaler Faktoren (Thiery *et al.*, 2009). Bei den epithelialen Faktoren handelt es sich vor allem um Faktoren, die eine Funktion im Rahmen der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten aufweisen, wie E-Cadherin, epitheliale Cytokeratine (CK 8, CK 18, CK 19), Desmoplakin und Occludin. Mesenchymale im Rahmen der EMT verstärkt exprimierte Faktoren sind z. B. N-Cadherin, Vimentin und Fibronektin (Serrano-Gomez *et al.*, 2016). Es gibt verschiedene Transkriptionsfaktoren, die unmittelbar EMT-induzierend wirken und zu denen z. B. SNAIL (*snail family transcriptional repressor 1*), SLUG (*snail family transcriptional repressor 2*), TWIST1 (*twist family bHLH transcription factor 1*), TWIST2 (*twist family bHLH transcription factor 2*) sowie ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) und ZEB2 (*zinc finger E-box binding homeobox 2*) zählen (Georgakopoulos-Soares *et al.*, 2020).

Für zahlreiche Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass EMT nicht nur mit gesteigerter Invasion und Metastasierung assoziiert ist, sondern auch mit verstärkter Resistenz gegenüber Chemotherapeutika einhergeht (Dudas *et al.*, 2020). Für Tumorentitäten wie z.B. das Mammakarzinom wurde bereits nachgewiesen, dass EMT mit einer Resistenz gegenüber Platin-basierter Chemotherapie assoziiert ist (Marchini *et al.*, 2013). Eine Behandlung mit Cisplatin scheint gleichzeitig auch Auslöser bzw. Trigger für den Prozess der EMT sein. *In vivo* führt Cisplatin auf mechanistischer Ebene zu einer Aktivierung von sogenannten CAMs (*classically activated macrophages*) und stimuliert diese zur Sekretion von CCL20 (Chemokin-Ligand 20). CCL20 wiederum bindet und aktiviert den Chemokin-Rezeptor 6 (CCR6), dessen Aktivierung zu einem gesteigerten Migrationspotenzial und in der Folge zu EMT führt (W. Liu *et al.*, 2020). Auch bei Neuroblastomen wurde gezeigt, dass die Induktion von EMT über die Hochregulation der Aurora-Kinase A und den PI3K-/AKT-Signalweg auftritt (Li *et al.*, 2021). Auch eine Korrelation der Induktion von EMT mit der Entwicklung von Cisplatin-Resistenz wurde bereits festgestellt (Piskareva *et al.*, 2015). Dabei muss jedoch die Besonderheit berücksichtigt werden, dass beim Neuroblastom keine epithelialen Zellen im eigentlichen Sinne vorliegen, sondern noradrenerge neuroblastische N-Typ-Zellen, die sich in mesenchymale S-Typ-Zellen umwandeln

können (Gautier *et al.*, 2021). Zudem sind noch andere Transkriptionsfaktoren als die oben genannten involviert, weshalb Gautier *et al.* für den EMT-ähnlichen Prozess beim Neuroblastom den Begriff der Noradrenerg-Mesenchymalen-Transition (NMT) vorgeschlagen haben (Gautier *et al.*, 2021). Auch die NMT-Marker unterscheiden sich teilweise von den EMT-Markern. So ist z. B. Dopamin- β -Hydroxylase ein Enzym der Noradrenalin-Synthese, welches als ein Marker für N-Typ-Zellen verwendet wird (Gautier *et al.*, 2021; Ross & Biedler, 1985).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Neuroblastome werden meist im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes behandelt, welches neben chirurgischer Resektion und Radiotherapie oftmals auch eine Chemotherapie umfasst (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019). Um in der Auswahl der Therapieoptionen dem unterschiedlichen individuellen Risiko der jeweiligen Neuroblastomkrankung gerecht zu werden, erfolgt eine Risikostratifizierung. Zu den zur Risikostratifizierung herangezogenen Faktoren zählen unter anderem vor allem der *N-Myc*-Amplifikationsstatus, die Histologie des Tumors, das Vorliegen definierter Chromosomenmutationen, das Alter der Patientin bzw. des Patienten sowie das Vorliegen von Fernmetastasen (Tolbert & Matthay, 2018). Zu den chemotherapeutisch eingesetzten Zytostatika zählen oftmals die platinhaltigen Zytostatika Cis- und Carboplatin, die in Kombination mit unter anderem Etoposid und Vindesine verabreicht werden (Simon *et al.*, 2017).

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob der PARP-Inhibitor Olaparib und der CHK1-Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) als Beispiele derartiger Modulatoren die zytotoxischen und antitumorigenen Eigenschaften von Cis- und Carboplatin in Neuroblastomzellen verbessern können. Dabei sollte zunächst überprüft werden, welcher Modulator – Olaparib oder LY2603618 – in Kombination mit den Platinzytostatika die größte Zytotoxizität bewirkt. Mit diesem Modulator sollten dann weitere Untersuchungen erfolgen, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzuklären. Um die klinisch relevante Problematik der Cisplatin-Resistenz abzubilden, wurde in dieser Arbeit sowohl eine wildtypische (SH-SY5Y) als auch eine durch Selektion gewonnene Cisplatin-resistente Neuroblastomzelllinie (SH-SY5Y^R) verwendet. Es sollte untersucht werden, wie sich die oben genannten Modulatoren und Platinverbindungen sowohl in Mono- als auch in Kombinationstherapien auf die Zellviabilität auswirken. Mittels Analyse von Zellzyklus, DNA-Schäden, DNA-Schadensantwort

sowie Apoptose sollten die Effekte auf die Zellviabilität als Maß für Zytotoxizität und antitumorigene Wirkung auf mechanistischer Ebene aufgeklärt werden (Abbildung 1.10). Nephrotoxische Effekte wirken sich fast immer dosislimitierend auf die Behandlung mit Cisplatin aus (Miller *et al.*, 2010). Eine Beeinträchtigung der Nieren ist bei Carboplatin seltener und tritt erst bei sehr hohen Dosierungen auf (Go & Adjei, 1999). Um zu überprüfen, ob sich eine Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit den Modulatoren auf die Nephrotoxizität auswirkt und um Hinweise auf eine etwaige Verbesserung der therapeutischen Breite zu erhalten, erfolgte vergleichend eine Untersuchung der Zytotoxizität in humanen renalen proximalen Tubuluszellen (RPTEC).

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentell erhobenen Daten sollte die Grundlage geschaffen werden, um die *in vitro* vielversprechenden Kombinationen aus Platinverbindung und PARP- oder CHK1-Inhibitor *in vivo* im Tierexperiment eingehender erforschen zu können. Zudem sollten die Ergebnisse dieser Arbeit die Basis bilden, um später im Rahmen eines anderen Projektes vergleichende Untersuchungen an der *N-MYC*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie IMR-32 durchzuführen, um die Modulation der antitumorigenen Wirksamkeit von Cis- und Carboplatin in Abhängigkeit vom *N-MYC*-Status evaluieren zu können.

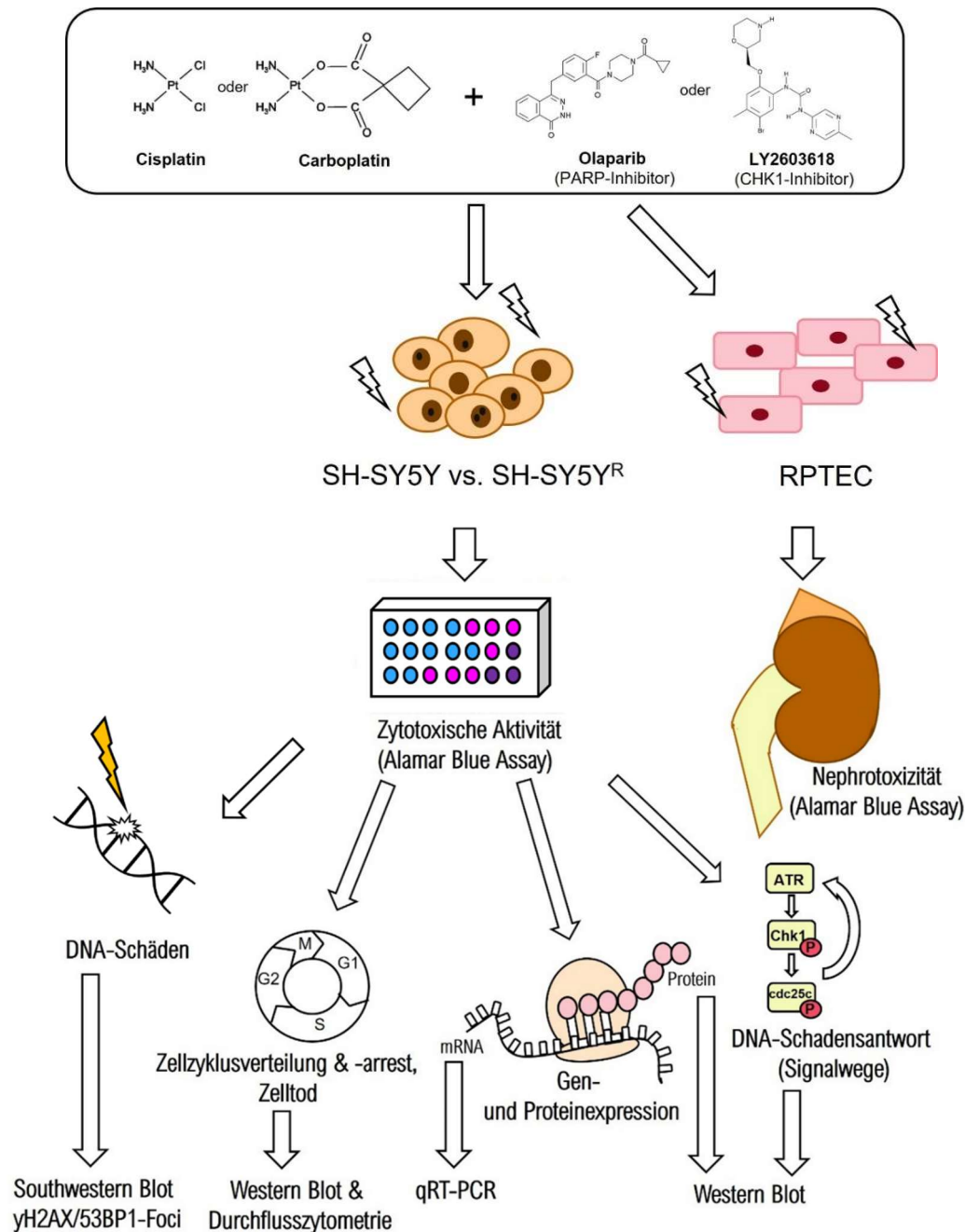


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des dieser Arbeit zugrunde liegenden wissenschaftlichen Projektes

Wildtypische Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) sowie durch Selektion gewonnene Cisplatin-resistente Neuroblastomzellen (SH-SY5Y^R) wurden mit Cisplatin, Carboplatin, dem CHK1-Inhibitor LY2603618 und/oder dem PARP-Inhibitor Olaparib behandelt. Mittels Alamar Blue Assay wurden die Zelllinien- und Substanz-spezifischen IC₂₀ und IC₅₀ ermittelt. Mit diesen Konzentrationen erfolgten Kombinationsbehandlungen aus jeweils einer Platinverbindung mit LY2603618 oder Olaparib. Die Effekte der Kombination von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 wurden hinsichtlich der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen weiter charakterisiert. Hierzu wurden DNA-Schäden mittels Southwestern-Blot und Fluoreszenz-basierter yH2AX/53-BP1-Foci-Analyse untersucht. Die Aktivierung der DNA-Schadensantwort-Signalwege wurde mittels Western Blot näher beleuchtet. Zudem wurde der Einfluss auf den Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie und die Induktion von Apoptose mittels Western Blot analysiert. Mittels qRT-PCR wurden Veränderungen der Genexpression erfasst. Um die Nephrotoxizität einer Kombinationsbehandlung mit den Platinverbindungen und LY2603618 abzuschätzen, wurden zusätzlich die Effekte auf die Zellviabilität humaner renaler proximaler Tubuluszellen (RPTEC) mittels Alamar Blue Assay untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herstellernachweise

Tabelle 2.1: Auflistung der Herstellerhauptsitze

Hersteller	Sitz des Herstellers
abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
ACEA Biosciences	San Diego, USA
Amersham GE Healthcare Life Science	Chicago, Illinois, USA
Apexbio Technology LLC	Houston, Texas, USA
Applied biosystems by Thermo Fisher Scientif.	Waltham, Massachusetts, USA
Axon-Lab	Baden-Dätwill, Schweiz
BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Bethyl Laboratories	Montgomery, Texas, USA
Binder GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, Kalifornien, USA
Biozym Scientific GmbH Scientific GmbH Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Brand GmbH & Co. KG GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Cat Ing. GmbH	Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Cell Signalling Technology	Danvers, Massachusetts, USA
Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Exbio	Vestec, Tschechische Republik
Fluka BioChemika (übernommen v. Sigma)	Buchs, St. Gallen, Schweiz
GE Healthcare Technologies	Chicago, Illinois, USA
Gibco by Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Hettich	Kirchlengern, Deutschland
Invitrogen by Thermo Fischer Scientific	Carlsbad, USA
Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Liebherr-International S.A.	Biberach an der Riß, Deutschland
Marienfeld GmbH & Co. KG GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Melco Engineering Corp.	Glendale Kalifornien USA
Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland

Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Meridian Bioscience	Cincinnati, USA
Miele & Cie. KG	Gütersloh, Deutschland
neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
Olympus	Shinjuku, Tokio, Japan
PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Qiagen N.V.	Hilden, Deutschland
Roche	Basel, Schweiz
Rockland Immunochemicals Inc.	Limerick, USA
Santa Cruz	Santa Cruz, Kalifornien, USA
Sarstedt AG & Co. KG AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Schott AG	Mainz, Deutschland
Scientific Industries Inc.	New York, USA
Selleck Chemicals GmbH	Houston, USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Simax (Kavalierglass)	Sazava, Tschechische Republik
Starlab International GmbH	Hamburg, Deutschland
Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Teva Pharmaceutical Industries Limited	Petach Tikwa, Israel
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Vector Laboratories Inc.	Burlingame, Kalifornien, USA
Vitlab GmbH	Grossostheim, Deutschland
VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Cryoröhrchen Cryo.s™ (steril)	Greiner Bio-One International GmbH
Einmalaufsätze f. Multipette (steril) (verwendete Größen: 0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf SE
Glaspipetten (Größen: 10 ml, 20 ml)	Brand GmbH & Co. KG
Glaspipetten (Größen: 10 ml, 20 ml)	Marienfeld GmbH & Co. KG
Pasteurpipetten (Glas, 145 mm)	Brand GmbH & Co. KG
Parafilm Laboratory Film	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen „Tip One 10/20 µl XL Graduated Tip“	Starlab International GmbH
Pipettenspitzen „Tip One 200 µl Bevelled Tip“	Starlab International GmbH
Pipettenspitzen „SurPhob“ 1000 µl	Biozym Scientific GmbH

Pipettenspitzen „epT.I.P.S. Standard/Bulk“, 0,25 – 2,5 ml	Eppendorf SE
Reaktionsgefäße „Safe-Lock Tubes“ 0,5 ml	Eppendorf SE
Reaktionsgefäße „SafeSeal“ 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG
Reaktionsgefäße „Safe-Lock Tubes“ 2,0 ml	Eppendorf SE
Reaktionsgefäße 15 ml steril „Cellstar tubes“	Greiner Bio-One International GmbH
Reaktionsgefäße 50 ml steril „Cellstar tubes“	Greiner Bio-One International GmbH
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific
6-Well-Platten steril „Cellstar“	Greiner Bio-One International GmbH
12-Well-Platten steril „Cellstar“	Greiner Bio-One International GmbH
24-Well-Platten steril „Cellstar“	Greiner Bio-One International GmbH
96-Well-Platten steril „Cellstar“	Greiner Bio-One International GmbH
6-cm-Zellkulturschalen „Cellstar“	Greiner-Bio-One International GmbH
Zellkulturflaschen „Cellstar“, 50 ml, 25 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturflaschen „Cellstar“, 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH

2.1.3 Geräte

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ChemiDoc Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Durchflusszytometer „BD Accuri C6 Plus“	BD Accuri
Netzteil Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Feinwaage	Kern ABS
Fluoreszenzmikroskop BX 43	Olympus
Vortex-Mischer „Vortex-Genie 2“	Scientific Industries
Heizofen	Memmert
Gefrierbehälter „Mr. Frosty“	Sigma-Aldrich
Gefrierschrank -20°C Liebherr Premium NoFrost	Liebherr
iCelligence-System	ACEA Biosciences
Inkubator (Zellkultur)	Binder (11-15244)
Tischzentrifuge	neoLab
Pipetten „Pipetman“ (Größen: 100-1000 µl, 10 – 100 µl, 1- 10 µl)	Gilson, Eppendorf
Pipette „Easypet 3“	Eppendorf
Pipet-Boy	Gilson
Pumpe „Mini-Vac Power“ inkl. Flasche	Axon-Lab
Thermomixer compact	Eppendorf
Reagenzglasständer	TPP
Sterilbank „Safe 2020“	Thermo Fisher Scientific

QIAcube	Qiagen
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Mikroskop CKX41	Olympus
Multipette M4	Eppendorf
Spectrophotometer „Nanodrop NanoVue™ Plus“	GE Healthcare Life Science
Thermocycler „CFX96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler“	Bio-Rad
Thermocycler „Personal Thermocycler“	Biometra
Waage	Kern PCB
Wasserbad	Memmert
Wippschüttler	Melco Engineering Corp., Glendale Kalifornien USA
Wippschüttler	ST 5 Cat
Vortex-Mischer „Bio Vortex V1“	Peglab
Zentrifuge 5702	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge „Mikro 200R“	Hettich
Sunrise	Tecan
Infinite F200	Tecan

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniumacetat zur Analyse	Merck KGaA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA
Bovines Serum Albumin (BSA), Reinheit 98 %	Merck KGaA
Di-Kalium Hydrogenphosphat	Merck KGaA
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Di-Natrium-Hydrogenphosphat	Merck KGaA
DMSO	Merck KGaA
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Methylenblau	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat wasserfrei	Merck KGaA
Natriumcitrat	Merck KGaA
Natrium-EDTA	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA

Natriumchlorid	VWR Chemicals
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Natrium-Resazurin	Sigma-Aldrich
NP40 (Tergitol)	Sigma-Aldrich
PIC	Merck KGaA
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH & Co. KG
RotiLoad 1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Rotiphorese Gel 40 (gebrauchsfertige 40 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5 : 1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure 32 % Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co. KG
SDS Pellets > 99 % für die Biochemie	Carl Roth GmbH & Co. KG
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Fluka BioChemika
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tween20	Sigma-Aldrich

2.1.5 Kits

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
Chemilumineszenz-Kit „BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)“	Roche
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific
SensiMix SYBR Hi-ROX Kit	Meridian Bioscience
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
DNeasy Blood & Tissue	Qiagen
Proteinbestimmungs-Kit „DC Protein Assay“ (Reagent A + B + S)	Bio-Rad Laboratories GmbH

2.1.6 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium Glucose free	Sigma-Aldrich
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium high glucose	Sigma-Aldrich
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium high glucose without phenol red	Sigma-Aldrich
FCS	Merck KGaA
GlutaMAX (100x)	Gibco
HAM´s F-12 nutrients mix	Sigma-Aldrich
MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x)	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Medium (R8758)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10 mg Streptomycin/ml in 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung (10x, 5 g Trypsin, 2 g EDTA)	Sigma-Aldrich

2.1.7 Wiederverwendbare Materialien

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten wiederverwendbaren Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Glasflaschen, autoklavierbar (Größen: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Schott
Glasflaschen, autoklavierbar (Größen: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	VWR
Messbecher Glas (Größen 25 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml)	Simax (Czech Republic)
Messbecher Plastik (Größen 25 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml)	Vitlab
Messzylinder Plastik (Größen 100 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Vitlab

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primärantikörper

Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Zielstruktur	Spezies	Verdünnung	Medium	Hersteller
53BP1	Kaninchen	1:500 (IHC)	5 % BSA in PBST	Cell Signalling
β-Aktin (C4)	Maus	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Santa Cruz
pATM (Ser1981)	Maus	1:500 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	abcam
pATR (Ser428)	Kaninchen	1:500 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell signalling
BAX	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signalling
Caspase 3	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signalling
cleaved Caspase 3	Kaninchen	1:500 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signalling
Caspase 7	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signalling
cleaved Caspase 7 (D198)	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signalling
pCHK1 (Ser345)	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % BSA in TBST	Cell Signalling
CHK2	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	abcam
pCHK2 (Thr68)	Kaninchen	1:500 (WB)	5 % BSA in TBST	abcam
Cisplatin-modifizierte DNA	Ratte	1:7000 (SWB)	5 % Milchpulver in TBST	abcam
γH2AX (Ser139)	Maus	1:1000 (WB) 1:500 (IHC)	5 % BSA in TBST 5 % BSA in PBST	Millipore
H2AX	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signalling
pKAP-1 (Ser824)	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % BSA in TBST	Bethyl Laboratories
N-Cadherin	Kaninchen	1:2000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Abcam
P21 (Waf1)	Maus	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Exbio
pP38/ pMAPK (T180/Y182)	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % BSA in TBST	Cell Signalling
pP53 (Ser15)	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % BSA in TBST	Cell Signalling
P53	Kaninchen	1:500 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Santa Cruz

PARP (H-250)	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Santa Cruz
pRPA32 (S4/S8)	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % BSA in TBST	Bethyl Laboratories
Talin-1	Kaninchen	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signalling
Vimentin	Maus	1:1000 (WB)	5 % Milchpulver in TBST	abcam

2.1.8.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Medium	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-konjugiert)	Ziege (anti-Kaninchen)	1:2000	5 % Milchpulver in TBS-T	Rockland Immunochemicals
Anti-Maus IgG (Peroxidase-konjugiert)	Ziege (anti-Maus)	1:2000	5 % Milchpulver in TBS-T	Rockland Immunochemicals
Anti-Ratte IgG (Peroxidase-konjugiert)	Ziege (anti-Ratte)	1:2000	5 % Milchpulver in TBS-T	Rockland Immunochemicals
Anti-Kaninchen IgG (H + L), Fluoreszenzgekoppelt: Alexa Fluor 555 nm	Ziege (anti-Kaninchen)	1:2000	5 % BSA in PBST	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
Anti-Maus IgG (H + L), Fluoreszenzgekoppelt: Alexa Fluor 488 nm	Ziege (anti-Maus)	1:2000	5 % BSA in PBST	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific

2.1.9 Primer (qRT-PCR)

Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Real-time PCR-Primer

Bezeichnung	Primersequenz
<i>β-AKTIN</i>	Forward: 5'-TGGCATCCACGAACTACC-3' Reverse: 5'-GTGTTGGCGTACAGGTCTT-3'
<i>ARID1A</i>	Forward: 5'-CAGTTCTCCACCCAAGGCAC-3' Reverse: 5'-GCCGCTTGTAATTCTGCTGT-3'
<i>ATP7A</i>	Forward: 5'-AGGCAGAAGTAAGGTATAATCC-3' Reverse: 5'-CTCACAACAAGTTCCAAAAC-3'
<i>BCL2</i>	Forward: 5'-AGAGGAAGTAGACTGATA-3' Reverse: 5'-TTTATTGGATGTGCTTTG-3'
<i>BIRC5</i>	Forward: 5'-ACCTGAAAGCTTCCTCGACA-3' Reverse: 5'-TAACCTGCCATTGGAACCTC-3'

<i>BRCA1</i>	<i>Forward: 5'-AAGACTTCTACAGAGTGAA-3'</i> <i>Reverse: 5'-CAGTTCCAAGGTTAGAGA-3'</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Forward: 5'-AACAACAATTACGAACCAA-3'</i> <i>Reverse: 5'-AACATTCCCTCCTAAGTCTA-3'</i>
<i>Calpain</i>	<i>Forward: 5'-AGACCATGTTCCGATTTTTC-3'</i> <i>Reverse: 5'-TGCAACCACTTAAACAAGTC-3'</i>
<i>Caspase 6</i>	<i>Forward: 5'-AAGGATATTATTCTCACCGGG-3'</i> <i>Reverse: 5'-TGAGAACTTTCTGTTCAC-3'</i>
<i>Caspase 9</i>	<i>Forward: 5'-CTCTACTTTCCCAGGTTTTG-3'</i> <i>Reverse: 5'-TTTCACCGAAACAGCATTAG-3'</i>
<i>CTR1</i>	<i>Forward: 5'-TGATGCCTATGACCTTCTAC-3'</i> <i>Reverse: 5'-GAATGCTGACTTGTGACTTAC-3'</i>
<i>Dopamin-β-Hydroxylase (DBH)</i>	<i>Forward: 5'-AAGGCCTGACCCTGCTTTTC-3'</i> <i>Reverse: 5'-GTGGACAGTGCCGTCTTCAA-3'</i>
<i>DYRK1B</i>	<i>Forward: 5'-TCAGCATCATTCACTGCG-3'</i> <i>Reverse: 5'-ATATACTGGTAGATCCTCTGG-3'</i>
<i>ERBB2 (HER-2)</i>	<i>Forward: 5'-CCAGCCTGAATATGTGAAC-3'</i> <i>Reverse: 5'-CCCCAAAGGCAAAAACG-3'</i>
<i>ERCC1</i>	<i>Forward: 5'-AGGAAGAAATTTGTGATAC-3'</i> <i>Reverse: 5'-TGTGTAGATCGGAATAAG-3'</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Forward: 5'-CATGAGAAGTATGACAACAG-3'</i> <i>Reverse: 5'-ATGAGTCCTTCCACGATA-3'</i>
<i>GPX1</i>	<i>Forward: 5'-GCCAAGAACGAAGAGATT-3'</i> <i>Reverse: 5'-TCGAAGAGCATGAAGTTG-3'</i>
<i>GSTM1</i>	<i>Forward: 5'-ACTATCCTTCGTGAACATC-3'</i> <i>Reverse: 5'-AGACACAACCACTAACAG-3'</i>
<i>HMOX1</i>	<i>Forward: 5'-CAACAAAGTGCAA GATTC-3'</i> <i>Reverse: 5'-AGAAAGCTGAGTGTAAAG-3'</i>
<i>HSP90</i>	<i>Forward: 5'-AGTTATCCTACACCTGAA-3'</i> <i>Reverse: 5'-CATCATCGCTTACTTCTT-3'</i>
<i>HSPA1B</i>	<i>Forward: 5'-GGACTTTGACAACAGGCT-3'</i> <i>Reverse: 5'-GCTTGTTCTGGCTGATGT-3'</i>
<i>MLH1</i>	<i>Forward: 5'-AAGTTGTTGGCAGGTATT-3'</i> <i>Reverse: 5'-GGTAGTGTCCCTAACATCAG-3'</i>
<i>MRP2</i>	<i>Forward: 5'-AAATTGCTGATCTCCTTTGC-3'</i> <i>Reverse: 5'-GATAGCTGTCCGTACTTTTAC-3'</i>
<i>MSH2</i>	<i>Forward: 5'-CTTCTTCTGGTTCGTCAGTATAGA-3'</i> <i>Reverse: 5'-ATCATTCTCCTTGGATGCCTTAT-3'</i>
<i>MT1A</i>	<i>Forward: 5'-TGGCTCCTGCACCTGCAC-3'</i> <i>Reverse: 5'-GAGCAGCAGCTCTTCTTGC-3'</i>
<i>N-Cadherin</i>	<i>Forward: 5'-TGTGGGAATCCGACGAATGG-3'</i> <i>Reverse: 5'-GCCGCTTTAAGGCCCTCATT-3'</i>
<i>P53</i>	<i>Forward: 5'-AGCACTAAGCGAGCACTG-3'</i> <i>Reverse: 5'-ACGGATCTGAAGGGTGAAA-3'</i>
<i>POLH</i>	<i>Forward: 5'-GGATAGAATACATGGGTGAAC-3'</i>

	<i>Reverse: 5'-TCCTGGGAAGTTCTTACTAC-3'</i>
<i>PPIA</i>	<i>Forward: 5'-AGATCTGGTCAAAGGGATAC-3'</i> <i>Reverse: 5'-AACTTGATTGCTGGGTTAAG-3'</i>
<i>RPL32</i>	<i>Forward: 5'-TCCGGTAGGAGCTGTAATCAAT-3'</i> <i>Reverse: 5'-CTCTGGTTTGCCTTTCTTGACT-3'</i>
<i>TP63</i>	<i>Forward: 5'-AAGACAGTTGAAGGAAATG-3'</i> <i>Reverse: 5'-TGGTGGATCGGTAATAAC-3'</i>
<i>VDAC</i>	<i>Forward: 5'-CACACTAATGTGAATGACGG-3'</i> <i>Reverse: 5'-AGGGTCAATCTGATACTTGG-3'</i>
<i>XAF1</i>	<i>Forward: 5'-GATCCACTTTTGATGTCAGAG-3'</i> <i>Reverse: 5'-CCTGATGTTGATTTAGGATCG-3'</i>
<i>XRCC3</i>	<i>Forward: 5'-CATTGTTCTGTCTTTCCT-3'</i> <i>Reverse: 5'-CTCCTTTACCGATTTCAG-3'</i>
<i>ZEB1</i>	<i>Forward: 5'-CTGACTGTGAAGGTGTACCAGA-3'</i> <i>Reverse: 5'-GCCCTTCCTTTCCTGTGTCATC-3'</i>
<i>18S</i>	<i>Forward: 5'-ATCGGGGATTGCAATTATTC-3'</i> <i>Reverse: 5'-CTCACTAAACCATCCAATCG-3'</i>

2.1.10 Sonstige Materialien

Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten sonstigen Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Carboplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
Cisplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
Elektrophorese-Kämme 15 Wells 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH
Nitrocellulose Blotting Membrane (Amersham Protran 0,2 µm NC)	Amersham GE Healthcare Life Science
LY2603618 (Rabusectib)	Selleck Chemicals
Olaparib (Lynparza)	Apexbio Technology LLC
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Mechanischer Handzähler	Infactory
Vectashield®	Vector Laboratories
Zählkammer (Zellkultur) „Neubauer improved“, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ² Volumen	Marienfeld GmbH & Co. KG Germany

2.1.11 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.12: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Ammoniumacetat-Stammlösung	2 M Ammoniumacetat Aqua bidest
Blotting-Puffer (1 x)	1,92 M Glycin 0,25 M Tris Base 20 % Ethanol Aqua bidest
EDTA-Lösung	500 mM Na ₂ EDTA Aqua bidest
Methylenblau	0,5 M Natriumacetat 0,4 g/l Methylenblau Aqua bidest
PAGE-Laufpuffer (1 x)	192 mM Tris Base 25 mM Tris Base 0,1 % SDS Aqua bidest
PBS (1 x) pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ Aqua bidest
PBS <i>high salt</i> pH 7,4	400 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ Aqua bidest
PBS-T	0,3 % Triton-X-100 PBS
Ponceau S-Lösung	0,15 % Ponceau S 0,5 % Eisessig Aqua bidest
Propidiumiodid-Lösung	50 µg/ml Propidiumiodid 0,1 % Natriumcitrat 0,1 % Triton-X-100 Aqua bidest
Resazurin-Lösung	27,6 mg Resazurin Natriumsalz 250 µl DMF 250 ml NaCl/Pi-Puffer
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCL (pH 8) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP40 (Tergitol) 0,1 % SDS 1 % Natriumdesoxycholat

	1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF 50 mM Natriumfluorid 1 x PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail) Aqua bidest
Sammelgel (5 %, Menge für 2 x 1,5 mm-Gele)	1 ml Sammelgelpuffer (1,5 M Tris Base pH 6,8) 1,3 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung 5,38 ml Aqua bidest 160 µl SDS (10 %) 80 µl TEMED (10%) 80 µl APS (100 mg/ml)
Sammelgelpuffer pH 6,8	1,5 M Tris-Base Aqua bidest
SSC (5 x) pH 7,0	0,75 M NaCl 75 mM Natriumcitrat
TBS (1 x) pH 7,2	150 mM NaCl 50 mM Tris Base
TBS-T (1 x) pH 7,2	0,05 % Tween 20 TBS
TE-Puffer	1 % 1 M Tris-HCl 0,2 % 500 mM EDTA
Tris-HCl-Lösung	1 M Tris-HCl Aqua bidest
Trenngel (6 %, Menge für 2 x 1,5 mm-Gele)	5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris Base pH 8,8) 4 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung 10,44 ml Aqua bidest 200 µl SDS (10 %) 160 µl TEMED (10%) 200 µl APS (100 mg/ml)
Trenngel (12 %, Menge für 2 x 1,5 mm-Gele)	5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris Base pH 8,8) 8 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung 6,52 ml Aqua bidest 200 µl SDS (10 %) 80 µl TEMED (10%) 200 µl APS (100 mg/ml)
Trenngel (15 %, Menge für 2 x 1,5 mm-Gele)	5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris Base pH 8,8) 10 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung 4,52 ml Aqua bidest 200 µl SDS (10 %) 80 µl TEMED (10%) 200 µl APS (100 mg/ml)
Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M Tris-Base Aqua bidest

2.1.12 Software

Tabelle 2.13: Auflistung der verwendeten Software

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
BD Accuri™ C6	BD Biosciences
CellSens Dimension	Olympus
Chemspider	www.chemspider.com
DDCV	Xtmgah (https://xtmgah.github.io/DDCV/)
Fiji (Fiji Is Just ImageJ)	https://fiji.sc
Fusion Software 15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
GraphPad Prism 6	GraphPad
i-control™ 1.8 Software	Tecan Group AG
Microsoft Office (Excel, Powerpoint, Word)	Microsoft
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
RTCA Data Analysis Software 1.0.0.1304	ACEA Biosciences
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
ZEN 2012 (Mikroskopsoftware)	Carl Zeiss Microscopy GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Neuroblastomzellen SH-SY5Y und SH-SY5Y^R wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) kultiviert, welches 10 % fetales Kälberserum (FCS; *fetal calve serum*) und 1 % Penicillin/Streptomycin enthält. Diese Mischung wird im Folgenden als Medium bezeichnet. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und einem CO₂-Anteil von 5 %. Bei einer Konfluenz von etwa 80 – 90 % wurden die Zellen passagiert und in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 *gesplittet*. Die Zellen wurden mithilfe einer dreiminütigen Inkubation bei 37 °C in Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS) abgelöst, durch sanftes Klopfen gegen den Boden der Zellkulturflasche mechanisch abgelöst und nach optischer Kontrolle vorsichtig in frischem Medium resuspendiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2 - 3 Tage. Die Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen wurden vor Beginn der Experimente für diese Dissertation im Institut für Toxikologie durch Selektion mit Cisplatin aus der wildtypischen Linie SH-SY5Y gemäß einem bereits zuvor bei Urothelkarzinomzellen etablierten Schemas (Höhn *et al.*, 2016) generiert. Dazu wurden die Zellen an Tag 1 im Verhältnis 1:3 ausgesät.

Zweimal wöchentlich (jeweils 24 h und 72 h nach Aussaat) wurden die Zellen einer jeweils 4-stündigen Behandlung mit 1 μ M Cisplatin-haltigem Medium ausgesetzt. Diese Konzentration ergab sich aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe, in denen 1 μ M Cisplatin als IC_{50} bei 72 h-Dauerbehandlung von SH-SY5Y im Alamar Blue Assay ermittelt wurde. Zwischen den Behandlungen wurden die Zellen in Zytostatika-freiem Medium kultiviert. Es erfolgten alternierend jeweils eine behandlungsfreie Woche und eine Woche, in der behandelt wurde. Die Selektion war nach 12 Wochen und 6 Zyklen abgeschlossen. Während der Experimente für diese Dissertation kristallisierte sich heraus, dass die SH-SY5Y^R-Zellen zum adäquaten Erhalt der Cisplatin-Resistenz eines stetigen Selektionsdrucks bedürfen. Dazu wurden sie nach dem oben beschriebenen Protokoll zweimal wöchentlich in zweiwöchigem Abstand nachselektiert. Um sicherzustellen, dass die Nachselektion zu einem Erhalt, jedoch nicht zu einer Verstärkung der Cisplatin-Resistenz der SH-SY5Y^R-Zellen führt, wurden begleitend stets regelmäßige Viabilitätsanalysen mittels Alamar Blue Assay durchgeführt.

Um die Effekte der antitumorigenen Behandlung und insbesondere das Ausmaß der Nephrotoxizität einer Kombinationsbehandlung mit den Platinverbindungen und den Modulatoren auf gesundes Gewebe zu untersuchen, wurden exemplarisch immortalisierte humane renale proximale Tubuluszellen der Linie RPTEC untersucht. Diese wurden in einem im Verhältnis 1:1 aus DMEM (*glucose free*) und HAM's F-12 *nutrient mix* zusammengesetzten Medium bei 37 °C und in einer 5 % CO₂ haltigen Atmosphäre kultiviert. Dem Medium wurden 1 % Penicillin/Streptomycin sowie die folgenden Substanzen zugesetzt, sodass diese im fertigen Medium in den angegebenen Konzentrationen vorlagen: 2 mM Glutamin (Glutamax), 5 μ g/ml Insulin, 5 μ g/ml Transferrin, 5 ng/ml Sodium Selenit, 10 ng/ml EGF, 36 ng/ml Hydrocortison. Bei 80 – 90 % Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 passagiert. Dazu wurden diese für 6 min in einer 0,25 %-igen Trypsin-Lösung inkubiert, welche anschließend mit einer 10 %-igen Trypsin-Inhibitor-Lösung (*Soybean*) inaktiviert wurde.

2.2.1.1 Behandlung der Zellen

SH-SY5Y-, SH-SY5Y^R- sowie RPTEC-Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 60.000 Zellen/cm² im entsprechenden Zellkulturmedium in Zellkulturplatten bzw. -schalen ausgesät. Dies entspricht beispielsweise 20.000 Zellen/Well bei Aussaat in einer 96-Well-Platte. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit Ausnahme der iCELLigence-Impedanzmessung (siehe Anhang) stets 24 h nach der

Aussaat, um eine adäquate Zelladhärenz zu gewährleisten. Abhängig vom durchzuführenden Experiment wurden die Zellen entweder für 4 h, 24 h, 48 h oder 72 h behandelt. Für Experimente, bei denen eher die schnell eintretende, kurzfristige Wirkung oder Wirkungen nach Ende der Exposition im Fokus standen, wurden vierstündige Pulsbehandlungen durchgeführt. Nach Ablauf der vierstündigen Pulsbehandlung wurde das Zytostatika- oder Modulator-haltige Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Als Endpunkte wurden Zellen unmittelbar danach (0 h) oder nach 2 h und 24 h Postinkubation analysiert. Für die Dauerbehandlung von 24 h, 48 h oder 72 h erfolgte nach einmaliger Zugabe der Zytostatika und Modulatoren kein Wechsel des Zellkulturmediums.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte in 2 ml-Kryoröhrchen in einer FCS-DMSO-Lösung. Abhängig von der Ursprungszellzahl wurden die Volumina so angepasst, dass jedes Kryogefäß jeweils 3 – 4 Mio. Zellen in jeweils 2 ml 10 % DMSO- und 45 % FCS-haltigem Zellkulturmedium enthielt. Anschließend wurden die Kryogefäße in einen sich auf Raumtemperatur befindlichen Gefrierbehälter (*Mr.Frosty™ Freezing Container*) überführt und für ca. 24 h bei – 80 °C gelagert. Dies gewährleistet durch ein kontinuierliches Absinken der Temperatur um ca. 1 °C/h sowie durch das Vermeiden der Bildung von Eiskristallen durch das DMSO einen schonenden Gefrierprozess. Nach ca. 24 h wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt und bei – 200 °C gelagert.

Um in flüssigem Stickstoff bei –200 °C kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die zellhaltigen Kryoröhrchen für etwa 2 min im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und der Inhalt anschließend zügig in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt. Zur Entfernung des toxisch wirkenden hochkonzentrierten DMSO wurden die Zellen für 5 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 – 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine T25-Kulturflasche überführt. Im Falle der Zelllinien SH-SY5Y und SH-SY5Y^R enthielt das frische Medium einen FCS-Anteil von 20 %. Nach einigen Tagen bzw. bei ausreichendem Zellwachstum wurde dieses durch Medium mit einem FCS-Anteil von 10 % ersetzt. Bei Erreichen von 80 – 90 % Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und in einer T75-Kulturflasche weiterkultiviert.

2.2.2 Analyse der Zellviabilität

2.2.2.1 Alamar Blue Assay

Um die Toxizität der verwendeten Zytostatika Cisplatin und Carboplatin sowie des PARP-Inhibitors Olaparib und des Chk1-Inhibitors LY2603618 (Rabusertib) zu ermitteln, wurde die Zellviabilität als Maß für Zytotoxizität herangezogen. Zur Analyse der Zellviabilität wurde der Alamar Blue Assay (Abbildung 2.1) verwendet. Bei diesem handelt es sich um einen Resazurin-Reduktionstest. Vitale, metabolisch aktive Zellen reduzieren das blaue Resazurin im Rahmen ihrer Stoffwechselaktivität zu pinkfarbenem, fluoreszierendem Resorufin, sodass die Intensität des Farbumschlages mit der Anzahl der vitalen Zellen korreliert. Das entstandene Resorufin emittiert bei Anregung Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm (O'Brien *et al.*, 2000). Zur Durchführung des Assays wurden jeweils 20.000 Zellen/Well in jeweils 100 µl Medium/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen mit substanzhaltigem Medium behandelt. Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurden aufsteigende Konzentrationen von Cisplatin, Carboplatin, Olaparib oder LY2603618 verwendet. Nach Ermittlung der Zelllinien- und substanzspezifischen IC_{20} (*inhibitory concentration 20 %*) und IC_{50} (*inhibitory concentration 50 %*) wurden Kombinationsbehandlungen mit jeweils Cis- oder Carboplatin und Olaparib oder LY2603618 durchgeführt. Es wurden zellfreie Mediumkontrollen, Negativkontrollen mit unbehandelten Zellen sowie DMSO behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Nach 72 h Inkubation wurde das substanzhaltige Medium entfernt und durch jeweils 100 µl Resazurin-Lösung (phenolrotfreies DMEM *high glucose* mit 10 % Resazurin-Stammlösung) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde mithilfe des Mikrotiterplatten-Photometers Infinite F200 die Fluoreszenz bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 535 nm ermittelt. Die Hintergrundfluoreszenz der zellfreien Mediumkontrolle wurde anschließend jeweils abgezogen. Das gemittelte Fluoreszenzsignal der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 100 % Viabilität festgelegt und die gemessenen Werte der behandelten Zellen darauf normiert.

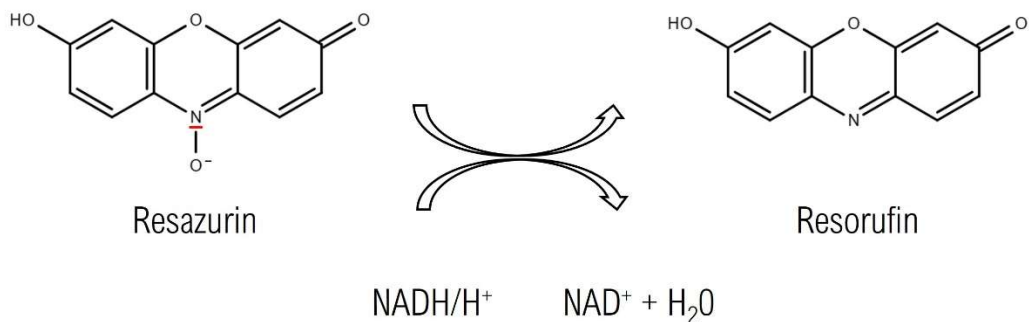


Abbildung 2.1: Reduktion von Resazurin zu Resorufin als Funktionsprinzip des Alamar Blue Assays

Lebende, metabolisch aktive Zellen reduzieren das zugegebene blaue nicht-fluoreszierende Resazurin zu pinkfarbenen fluoreszierendem Resorufin. Dieses wird mittels Photometrie quantitativ nachgewiesen. Die Menge des gebildeten Resorufins wird als Maß für die Viabilität der untersuchten Zellen gewertet. Beschreibung und Abbildung modifiziert nach (Riss *et al.*, 2004).

2.2.2.2 Impedanzmessung zur Ermittlung des Zellindex

Ergänzend zu den Zellviabilitätsmessungen mittels des Alamar Blue Assays wurden Messungen der elektrischen Impedanz durchgeführt. Die Messungen wurden mithilfe des iCELLigence Systems der Firma Agilent Technologies erhoben, welches über wiederholte Messungen der Impedanzveränderungen in Goldmikroelektroden-gekoppelten Zellkulturgefäßen eine Beurteilung der Zellen in Echtzeit erlaubt. Die gemessene Impedanz wird vor allem durch Zelldichte, Zellgröße aber auch durch Zelladhäsion determiniert. Da diese Parameter maßgeblich von der Viabilität der Zellen abhängen, können die Impedanz und der aus der Impedanz errechnete Zellindex als indirektes Maß für die Zellviabilität verwendet werden. Die 8-Well-Platten des iCELLigence Systems wurden zunächst mit jeweils 200 µl zellfreiem Zellkulturmedium pro Well beschickt, um die Impedanz des Zellkulturmediums alleine zu messen. Diese wurde später automatisch durch die Software als Hintergrundsignal subtrahiert. Anschließend wurden jeweils 40.000 Zellen in jeweils 250 µl Zellkulturmedium pro Well zugegeben. Da die Zellen langsamer adhären wurden als in konventionellen Zellkulturgefäßen, wurden sie 48 h nach der Aussaat behandelt. Zur Behandlung wurde die laufende Impedanzmessung pausiert und es wurden jeweils 50 µl Substanzhaltige Lösung pro Well so appliziert, dass sich nach Durchmischung mit dem vorgelegten Medium in 500 µl Gesamtvolumen die gewünschte Zielkonzentration von Cisplatin, Carboplatin oder LY2603618 ergab.

Anschließend wurde die Impedanzmessung in 30-minütigen Messintervallen für 100 h fortgesetzt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der RTCA Data Analysis Software und es wurde ein Zellindex ermittelt. Die Zellindices wurden normiert auf den Zellindex vor Behandlungsbeginn ($= 1.0$). Die Ergebnisse der Messungen dieser ergänzenden Methode sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 6.11).

2.2.3 Analyse der Zellzyklusverteilung

Die Analyse, welcher Anteil an Zellen in einer Population sich jeweils in einer bestimmten Zellzyklusphase befindet, basiert auf der Quantifizierung des DNA-Gehaltes der Zellen mittels Durchflusszytometrie. Sie nutzt die Tatsache, dass Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Phasen unterschiedlich viel DNA aufweisen. In der G2-Phase weisen sie doppelt so viel DNA auf wie in der G1-Phase, während der S-Phase liegt der DNA-Gehalt dazwischen (Darzynkiewicz *et al.*, 2010). Zur Messung des DNA-Gehaltes wird bei der durchgeführten nach Nicoletti *et al.* modifizierten Methode Propidiumiodid (PI) verwendet (Riccardi & Nicoletti, 2006). PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der als Nukleinsäureinterkalator wirkt und auf diese Weise DNA anfärbt. Da im Zuge der Apoptose eine Fragmentierung der DNA in nukleosomale und oligonukleosomale DNA-Fragmente erfolgt, weisen apoptotische Zellen in der Fluoreszenzmessung einen geringeren DNA-Gehalt und somit eine geringere Fluoreszenz auf als Zellen in der G1-Phase. Daher bilden diese vor dem G1-Peak die sogenannte „SubG1-Fraktion“ (Sellins & Cohen, 1987). Da DNA-Degradation in geringerem Ausmaß auch in nekrotischen Zellen erfolgen kann und sich in der SubG1-Fraktion auch Kernfragmente, verklumpte Chromosomen usw. wiederfinden, darf die SubG1-Fraktion allerdings nicht als eindeutige und spezifische Repräsentation apoptotischer Zellen verstanden werden, sondern sollte als Hinweis auf Zelltod und Zellzerfall gewertet werden (Darzynkiewicz *et al.*, 2001; Riccardi & Nicoletti, 2006).

Es wurden 500.000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und 24 h nach der Aussaat behandelt. Nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h Behandlung wurde das Medium mitsamt der darin schwimmenden toten Zellen und Zelldebris in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 1 ml 1 x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Nach optischer Kontrolle der Ablösung wurde die Zellsuspension ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde bei 300 g für 5 min bei 4 °C bei reduzierter Bremse zentrifugiert. Nach Absaugen des zellfreien Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig in jeweils 1,5 ml Propidiumiodid-Lösung

(50 µg/ml Propidiumiodid, 0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton-X-100 in ddH₂O) resuspendiert. Dabei handelte sich um eine hypotone Lösung, um durch osmotischen Flüssigkeitseinstrom und Zellschwellung die Zellmembran permeabler für das PI zu machen. Triton-X-100 wurde als Detergens zugesetzt, um die Membranpermeabilität zu vergrößern. Anschließend wurde die Lösung bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln inkubiert (mindestens ü. N.). Gemessen wurde mit dem Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 im Kanal FL2 mittels linearer Skala. Die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2-Phase) sowie die SubG1-Fraktion wurden mittels der BD Accuri™ C6-Software durch Quantifizierung der Fläche unter den jeweiligen Peaks bestimmt.

2.2.4 Proteinbiochemie

Die in die Prozesse der DNA-Schadensantwort (DDR) und Apoptose involvierten Proteine und Phosphoproteine wurden mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden die Proteine aus den behandelten Zellen extrahiert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und durch Antikörperfärbung spezifisch und relativ quantifizierbar nachgewiesen.

2.2.4.1 Proteinextraktion und -quantifizierung

Je Bedingung wurden jeweils zwei 6 cm-Schalen mit jeweils $1,2 \times 10^6$ Zellen ausgesät und nach 24 h behandelt. Nach Behandlung wurden die Zellen beider Schalen zu einem Zellpellet vereinigt, indem die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und für 5 min bei 300 g bei RT zentrifugiert wurden. Die pelletierten Zellen wurden dann zur Lyse in jeweils 200 µl frisch angesetztem RIPA-Puffer resuspendiert und für ca. 20 min auf Eis inkubiert. Zum weiteren Zellaufschluss und zur Freisetzung des Zellinneren wurden die Proben auf Eis sonifiziert (insgesamt 10 s, davon jeweils 2 s Puls mit 25 – 35 %-iger Ultraschallintensität gefolgt von 1 s Pause). Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Zellyse durch Ultraschallwellen. Die Lysate wurden anschließend für 10 min bei 4 °C bei 10000 g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Das Zelltrümmer-haltige Pellet wurde verworfen. Es erfolgte eine kolorimetrische Bestimmung des Proteingehaltes mittels DC-Protein-Assay-Kit. Hierbei handelt es sich um einen modifizierten Lowry-Assay. Der Lowry-Assay basiert auf einer Färbung des Proteins

durch Reaktion des Proteins mit Kupfer unter alkalischen Bedingungen und der anschließenden Reduktion eines zugegebenen Folin-Reagenz (Lowry *et al.*, 1951). Der modifizierte Lowry-Assay funktioniert mit einem Kupfer-Sulfat-Tartrat-Reagenz, das anders als beim klassischen Lowry-Assay nicht mehr täglich frisch aus einzelnen Reagenzien angesetzt werden muss (Scientific, 2011). Zur Erstellung einer Proteinkonzentrations-Eichgeraden wurden Proben mit definierter aufsteigender BSA-Konzentration verwendet (BSA-Reihe). Die Proteinextrakte wurden mit RIPA-Puffer und Roti-Load-Puffer so vermischt, dass die Proben im Verhältnis 1:4 Roti-Load enthielten. Dies dient der Beschwerung der Proben, sodass diese nicht aus der Geltasche herausdiffundieren. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und in ihre Primärstruktur zu überführen.

2.2.4.2 SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und solubilisiert die zu untersuchenden Proteine und formt mit ihnen negativ geladene Komplexe. Da 1 g Protein ca. 1,4 g SDS bindet, korreliert die Stärke der negativen Ladung annähernd mit dem Molekulargewicht der Proteine, sodass sie auf Basis der unterschiedlich großen Ladung und somit Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden können (Smith, 1984). Bei Anlegen eines elektrischen Feldes migrieren die Proteine aufgrund der negativen Ladung in Richtung Anode. Es wurde ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet, welches durch eine Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht. Je höher der prozentuale Anteil an Acrylamid ist, desto kleiner sind die Poren im auspolymerisierten Gel und desto besser können Proteine von geringem Molekulargewicht voneinander getrennt werden. Daher wurde zur Analyse hochmolekularer Proteine wie der Kinasen ATM und ATR (350 kDa und 300 kDa) ein Trenngel mit 6 %igem Acrylamidgehalt verwendet, während ein 12 – 15 %iges Gel gewählt wurde, wenn kleinere Proteine wie z. B. H2AX (15 kDa) oder Proteine mittlerer Größe wie z. B. P53 (53 kDa) mituntersucht wurden. Ein 5 %iges Sammelgel bewirkt, dass die aufgetragenen Proteine vor Eintritt in das Trenngel konzentriert werden, was zu einer verbesserten Schärfe der einzelnen Proteinbanden führt.

Als Größenstandard wurde je nach Größe der Proteine der Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder oder der Marker Spectra Multicolor High Range Protein Ladder mitgeführt. Es wurden 20 - 25 µg Protein in jeweils 25 µl Volumen pro Geltasche aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte über ca. 2 h mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel. Beendet wurde die Elektrophorese nach Austritt der Lauffront am unteren Gelrand bzw. bei ausreichender Auftrennung der Proteine.

2.2.4.3 Western Blot

Um die zu analysierenden Zielproteine einer Immunodetektion zugänglich zu machen, müssen diese zunächst auf eine Membran transferiert („geblottet“) werden. Hierzu wurde die Technik des Nassblottens verwendet. Das Gel wurde mit einer Nitrozellulose-Membran so in der Blotting-Kammer befestigt, dass die Proteine nach Anlegen der Spannung aus dem Gel migrieren und an die Membran gebunden werden. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für 90 min oder für hochmolekulare Proteine bei 150 mA ü. N (ca. 16 h). Um den Transfererfolg zu überprüfen, wurden die Membranen für 1 min in Ponceau-S-Färbelösung inkubiert. Nach Entfärbung durch Waschen in TBST (1 x 5 min) wurden die Membranen für mindestens 1 h bei RT in einer 5 % Milchpulver-TBST-Lösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran mit Milchpulver abzusättigen. Nach weiteren Waschschritten (3 x 5 min in TBST bei RT) wurden die Membranen mit den jeweils gewünschten targetspezifischen Primärantikörpern inkubiert (1 : 500 bis 1 : 2000 (siehe Tab. 2.8), ü. N. bei 4 °C). Um ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen erneut gewaschen (3 x 5 min in TBST bei RT). Danach erfolgte die Inkubation mit einem spezifisch gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Antikörper). Dieser wurde 1 : 2000 in 5 % Milchpulver-TBST verdünnt und wirkte für 2 h bei RT ein. Nach weiteren Waschschritten (3 x 5 min in TBST bei RT) wurde die jeweilige Membran für 1 min mit einer Chemilumineszenzlösung (ECL-Lösung aus dem *BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Kit* von Roche) inkubiert. Das entstehende Chemilumineszenzsignal der Zielproteinbanden wurde mittels des *ChemiDoc* von Bio-Rad Laboratories GmbH visualisiert und mithilfe des Programms *Fiji/ImageJ* aufbereitet und analysiert. Als Ladekontrolle, auf die das Zielproteinsignal jeweils normiert werden kann, wurde β -Aktin verwendet.

2.2.5 Immunzytochemische Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen

Um die durch die Behandlung entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) zu quantifizieren, wurden die Proteine γ H2AX und 53BP1 (*p53 binding protein 1*) immunzytochemisch angefärbt. γ H2AX ist die durch die Proteinkinasen ATR und ATM an Serin 139 phosphorylierte Variante des Histonproteins H2AX. Die Entstehung von DSBs geht mit der Phosphorylierung von H2AX in der Region um den DSB herum sowie bis zu mehreren Megabasenpaaren entfernt einher, sodass eine örtlich begrenzte γ H2AX-Akkumulation entsteht. Durch Anfärbung von γ H2AX wird dies als nukleärer Focus visualisiert. 53BP1 wird aus dem Zytoplasma in den Zellkern transloziert und akkumuliert ebenfalls als Bestandteil der zellulären Antwort in der Nähe von DSBs (Panier & Boulton, 2014; Zimmermann & de Lange, 2014). Es lenkt die DNA-Schadensantwort in Richtung einer Reparatur durch Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) (Popp *et al.*, 2017). Beide Proteine können somit als Biomarker für DSBs verwendet werden, um fluoreszenzmikroskopisch nicht nur Menge, sondern auch Verteilungsmuster der entstehenden DSBs in einer Zellpopulation zu studieren.

Für die immunzytochemische Analyse wurden 250.000 Zellen/Well in einer mit hitzesterilisierten Deckgläschen bestückten 12-Well-Platte ausgesät. Diese wurden nach 24 h einer 4-stündigen Pulsbehandlung mit den verwendeten Substanzen ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine unterschiedlich lange Postinkubationsphase in frischem, substanzfreiem Zellkulturmedium. Um die Kinetik der Entstehung und Reparatur der DSB zu erfassen, wurden 0 h, 2 h und 24 h als Postinkubationszeiträume gewählt. Nach der Postinkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 15 min bei RT in 5 % Formaldehyd-haltigem PBS fixiert. Nach Entfernung des Formaldehyds erfolgten 3 x 5-minütige Waschschrte in 1 x PBS auf einem Wippschüttler. Es folgten mindestens 20 min Inkubation in eiskaltem Methanol bei -20 °C. Das Methanol wurde verworfen und die Zellen ein weiteres Mal mit 1 x PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mittels 60-minütiger Inkubation in 5 % BSA (Bovines Serum Albumin) haltiger 0,3 % Triton-X-100-PBS-Lösung (PBST) blockiert. Die Primärantikörper (monoklonaler muriner Anti- γ H2AX-Antikörper, monoklonaler Kaninchen-anti-53BP1-Antikörper) wurden jeweils im Verhältnis 1 : 500 in der gleichen 5 % BSA-PBST-Lösung verdünnt und die Deckgläschen mit den verdünnten Antikörpern in einer feuchten Kammer über Nacht (ü. N.) bei 4 °C inkubiert. Es erfolgten mehrere Waschschrte: 2 x 5 min in 1 x PBS, 2 min in 1 x PBS mit erhöhtem Salzgehalt (0,4 M NaCl), 5 min in 1 x 0,3 % PBST. Die Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488 FITC Ziege Anti-Maus-Antikörper, Alexa Fluor® 555 TRITC Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper) wurden

jeweils 1:1000 in 5 % BSA-PBST verdünnt und die Deckgläschen für 1,5 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Abschließend wurde 3 x 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden 2 mal kurz in 1 x PBST geschwenkt und auf mit jeweils 7 µl DAPI-haltigem Vectashield® pro Deckgläschen versehenen Objektträgern eingedeckelt. Um Austrocknungsartefakte zu vermeiden, wurden die Deckgläschen an den Rändern mit Lack versiegelt. Es erfolgte die anschließende Analyse am Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43. Je Behandlung wurden mindestens 50 Zellen fotografiert und mithilfe der Software Fiji/ImageJ ausgewertet. Mithilfe eines programmierten ImageJ-Makros (programmiert von Dr. rer. nat. Andreas Jahn) wurde die Anzahl der γH2AX-Foci, 53BP1-Foci sowie der kolokalisierenden Foci ermittelt.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von genomischer DNA zur Analyse von Pt-(GpG)-DNA-Intrastrangverknüpfungen mittels Southwestern-Blot wurde mithilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits der Firma Qiagen nach dem Protokoll „*Purification of total DNA from Animal Blood or Cells*“ durchgeführt. Für die DNA-Isolierung wurden $61,1 \times 10^6$ Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät. Nach der Versuchs-spezifischen Behandlungsdauer wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin vereinzelt und von der Zellkulturschale abgelöst (5 min, 37 °C). Durch Zentrifugation (300 g, 5 min, RT) wurden die Zellen aus jeweils zwei annähernd konfluenten Zellkulturschalen zu einem Pellet vereint, um eine ausreichende DNA-Ausbeute zu sichern. Anschließend wurden die Proben mit Proteinase K lysiert. Die Anwesenheit von hohen Konzentrationen chaotroper Salze verdrängt das Wasser der hydratisierten DNA-Moleküle und ermöglicht eine Adsorption der DNA an eine Silikamembran, die in einer Minispinn-Säule aufgespannt ist. Durch die schrittweise Zugabe von 96 – 100 %igem Ethanol sowie verschiedenen Waschpuffern und dazwischen erfolgenden Wasch- und Zentrifugationsschritten wird eine Beseitigung kontaminierender Substanzen ermöglicht. Alle Schritte nach Zugabe der Proteinase K erfolgten mithilfe des QIAcubes von Qiagen. Die Konzentration und Reinheit der eluierten DNA wurde photometrisch mithilfe des Spectrophotometers NanoVue™ Plus durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm ermittelt. Liegt der Absorptionsquotient 260 nm/230 nm im Bereich von 2,0 – 2,2 sowie der Absorptionsquotient 260 nm/280 nm bei ca. 1,8 kann von einer

ausreichend reinen DNA ausgegangen werden. Bis zur weiteren Verwendung der DNA wurde diese bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA zur quantitativen Analyse der mRNA mittels qRT-PCR erfolgte mithilfe des RNeasy® Mini Kits sowie des QIAcubes der Firma Qiagen gemäß dem Protokoll „*Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology*“. Die RNA-Isolierung mit diesem Kit basiert gemäß dem Protokoll auf der Bindung der RNA an eine Silikamembran mithilfe eines stark salzhaltigen Puffersystems und Ethanol. Zur Stabilisierung der RNA wurden RNasen inaktiviert und nahezu alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Nach diversen Waschschritten in einer Silikamembran-tragenden Säule wurde die RNA mittels RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die RNA-Isolierung wurden $1,1 \times 10^6$ Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät und 24 h nach Aussaat jeweils für 24 h und 72 h behandelt. Dazu wurden für SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen äquimolare Konzentrationen von Cisplatin oder LY2603618 verwendet. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von SH-SY5Y^R gewählt (2 µM Cisplatin, 2 µM LY2603618). Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und durch Zentrifugation (300 g, 5 min, RT) ein Zellpellet generiert. Dazu wurden jeweils Zellen aus zwei Zellkulturschalen vereint, um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu erzielen. Die Zellpellets wurden in jeweils 350 µl RLT-Puffer versetzt mit 40 µl Dithiothreitol (DTT) resuspendiert und durch vortexen vermischt. Alle weiteren Schritte wurden automatisch mithilfe des QIAcubes durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit der eluierten RNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm mithilfe des Spectrophotometers NanoVue™ Plus ermittelt. Liegt der Absorptionsquotient 260 nm/230 nm im Bereich von 2,0 – 2,2 sowie der Absorptionsquotient 260 nm/280 nm bei ca. 2,0 kann von einer ausreichend reinen RNA ausgegangen werden. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei – 80 °C gelagert.

2.2.6.3 cDNA-Synthese

Die für die qRT-PCR erforderliche cDNA-Synthese wurde mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Thermo Fisher nach Herstelleranleitung durchgeführt. Durch die Zugabe der im Kit enthaltenen Nukleotide, Primer und Reverser Transkriptase wurde in RNase-freiem Wasser zu den mRNA-Molekülen komplementäre cDNA synthetisiert. Aufgrund der Verwendung von *Random Primern*, die komplementär zum Poly-A-Schwanz von mRNA sind, werden zunächst unspezifisch alle in der Probe vorhandenen mRNA-Moleküle in cDNA reverse transkribiert. Zur cDNA-Synthese wurde jeweils 2 µg der zuvor isolierten RNA (Abschnitt 2.2.6.2) angesetzt. Diese RNA-Menge pro Ansatz ermöglicht der Reversen Transkriptase eine effiziente Transkription im oberen noch linearen Bereich der RNA-Konzentrations-Aktivitäts-Kurve. Die Zugabe eines RNase Inhibitors (40 U/µl) diente der Verhinderung einer vorzeitigen RNA-Degradation. Die cDNA-Synthese im PCR Thermocycler erfolgte anschließend nach folgendem Protokoll:

Tabelle 2.14: Dauer und Temperatur der Reaktionszyklen der cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

°C	min
25	10
37	120
85	5
8	bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

2.2.6.4 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Zur Abschätzung der Genexpression wurde eine relative Quantifizierung der transkribierten mRNA mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dabei wurden Zielabschnitte der zuvor mittels reverser Transkription generierten cDNA (Abschnitt 2.2.6.3) amplifiziert und mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR Green quantifiziert. Bei SYBR Green handelt es sich um einen Stoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und diese mit größerer Sensitivität als Ethidiumbromid anfärbt bzw. nachweist (Schneeberger *et al.*, 1995). Verwendet wurde das SensiMix SYBR Hi-ROX Kit der Firma Meridian Bioscience. Pro Reaktionsansatz wurden 20 ng cDNA und 0,25 µM Primer eingesetzt. Die PCR erfolgte mit 45 Zyklen. In jedem Zyklus erfolgten jeweils eine Denaturierung bei 95 °C, eine Primerhybridisierung bei 55 °C sowie eine Elongation bei 72 °C. Nach jedem Reaktionszyklus wurde über die emittierte Fluoreszenz des SYBR Greens indirekt die aktuelle DNA-Menge in jedem Reaktionsansatz in Echtzeit (*real-time*) detektiert. Jedem Zielgen konnte so ein spezifischer Cq-Wert (*quantification cycle value*) zugewiesen werden. Dieser beschreibt die Anzahl an Reaktionszyklen, nach der die detektierte DNA-Menge einen bestimmten Schwellenwert überschreitet und ist ein indirektes Maß für die ursprünglich vorhandene mRNA-Menge und somit für die Expressionsstärke. Die Auswertung erfolgte mit der CFX Maestro Software 2.2 für Real-Time PCR von Bio-Rad. Die mRNA-Expression der Zielgene wurde jeweils auf die mRNA-Expression eines *Housekeeping*-Gens wie z. B. GAPDH oder β-Aktin normiert. Um als auswertbar bzw. nachweisbar zu gelten, musste das zu einem Zielgen gehörende Amplifikat nach maximal 35 Reaktionszyklen nachweisbar sein (Cq-Wert ≤ 35). Die mRNA-Expression wurde für jede Ziel-mRNA jeweils auf die detektierte mRNA-Menge in unbehandelten SH-SY5Y-Zellen normiert (= 1). Als biologisch relevant wurden Veränderungen der mRNA-Mengen bewertet, die das 0,5-fache oder weniger bzw. das 2-fache oder mehr betrug.

2.2.7 Analyse von DNA-Platinaddukten

Die Bildung von Cisplatin-induzierten DNA-Addukten wurde mithilfe des Southwestern Blots analysiert. Dazu wurde aufgereinigte DNA auf eine Membran übertragen und Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mithilfe eines spezifischen Antikörpers immunologisch nachgewiesen.

Nach Isolation der genomischen DNA (Abschnitt 2.2.6.1) wurde diese mit TE-Puffer (1 % 1 M Tris-HCl, 0,2 % 500 mM EDTA) verdünnt, sodass jeweils 0,5 µg DNA in einem Volumen von 100 µl gelöst waren. Anschließend wurde die DNA für 10 min bei 95 °C denaturiert und danach für etwa 3 - 5 min auf Eis abgekühlt. In einem Volumenverhältnis von 1:1 wurde eiskaltes 2 M Ammoniumacetat zur Fällung der DNA zugegeben. Eine Nitrocellulosemembran wurde so lange in 1 M Ammoniumacetat getränkt, bis diese vollständig benetzt war und anschließend in die Slot-Blot-Apparatur eingelegt. Jeweils 200 µl des Ammoniumacetat-DNA-Gemisches/Schlitze wurden in die Apparatur pipettiert. Nicht verwendete Schlitze wurden mit 200 µl TE-Puffer befüllt. Die DNA wurde über 15 - 20 min mithilfe eines durch eine Vakuumpumpe erzeugten Unterdruckes auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran kurz erst mit 1 M Ammoniumacetat und dann mit destilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen. Anschließend wurde sie für 5 min in 5 x SSC inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen Natriumchlorid- und Natriumcitrat-haltigen Standardwaschpuffer für Nukleinsäuren (750 mM NaCl, 75 mM Na-Citrat, pH 7). Danach wurde die Membran für 2 h bei 80 °C im Trockenschrank erhitzt, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Die getrocknete Membran wurde in 5 % Milchpulver-haltigem TBS-T für 60 min blockiert, bevor sie für weitere 60 min bei RT mit dem Primärantikörper gegen Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen inkubiert wurde. Dieser wurde im Verhältnis 1 : 8000 mit TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit TBS-T (3 x 5 min) entfernt, bevor die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Ratte-IgG-Sekundärantikörper inkubiert wurde (Verdünnung 1 : 2000 in 5 % Milchpulver-TBS-T-Lösung, Inkubation 2 h bei RT). Nach weiteren Waschschritten (3 x 5 min) wurde die Membran für 1 min bei RT mit einer ECL-Lösung inkubiert (Chemilumineszenz-Kit „BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)“, 990 µl Lumineszenz-Substrat-Lösung A + 10 µl Start-Lösung B). Die Visualisierung der Signale erfolgte am ChemiDoc von Bio-Rad Laboratories GmbH im automatischen Belichtungsmodus. Nach kurzem Waschen der Membran in ddH₂O wurde die Gesamtheit der gebundenen DNA durch 5 min Inkubation mit Methylenblaulösung und anschließender Entfärbung mittels ddH₂O visualisiert. Die gefärbten DNA-Banden wurden mit dem ChemiDoc fotografiert. Es erfolgte eine densitometrische Auswertung der Cisplatin-DNA-Addukt-Signale und der Methylenblau-

Färbung mit *ImageJ*. Die Signale wurden auf die DNA-Menge der jeweiligen Bande normiert und das Signal aus der unbehandelten Kontrolle subtrahiert, um unspezifische Hintergrundsignale herauszurechnen.

2.2.8 Statistische Analysen

Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten wurden stets als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (*standard deviation*, SD) der Messungen aus unabhängigen Experimenten angegeben. Die Anzahl der unabhängigen Experimente (n) sowie die Anzahl der erhobenen Messwerte pro Experiment (N) sind den Abbildungsunterschriften zu entnehmen. Für eine vergleichende Analyse wurde auf statistische Signifikanz überprüft. Dies erfolgte bei zwei zu vergleichenden Gruppen mithilfe eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests nach Student. Bei mindestens drei zu vergleichenden Gruppen wurde eine *Analysis of Variance* (ANOVA) durchgeführt. Bei Einbezug einer unabhängigen untersuchten Variable wurde eine einfaktorielle ANOVA mit einem Tukey- oder Bonferroni-Post-Hoc-Mehrfachvergleich angewendet. Bei mehreren untersuchten unabhängigen Einflussvariablen erfolgte eine zweifaktorielle ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Mehrfachvergleich. Bei einer errechneten Zufallswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p \leq 0,05$) wurde das Ergebnis als statistisch signifikant bewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden folgendermaßen gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

2.2.9 Kombinationsindex

Um den Effektivität einer Kombinationsbehandlung mit jeweils einem Platinzytostatikum und einem Modulator genauer bewerten zu können, wurde der Kombinationsindex (*combination-index*, CI) ermittelt. Der Kombinationsindex gibt an, ob eine Kombinationsbehandlung einen synergistischen Effekt, einen additiven Effekt oder einen antagonistischen Effekt bewirkt (Chou, 2018). Für diese Arbeit wurde der Kombinationsindex mithilfe der online verfügbaren Software DDCV (*Drug Drug Combination Visualization*) ermittelt (Zhang, 2013). Diese nutzt zur Berechnung ebenso wie die Software CompuSyn das Median-Effekt-Modell (Spinozzi et al., 2022). Ein Kombinationsindex von 0,9 – 1,1 gibt gemäß Chou et. al. eine nahezu additive Wirkung an, bei $< 0,9$ wird ein synergistischer Effekt, bei $> 1,1$ ein antagonistischer Effekt angenommen (Zhang, 2013). Zur Ermittlung des

Kombinationsindex wurden die Daten der Viabilitätsanalysen nach Kombinationsbehandlung verwendet, die mittels Alamar Blue Assay erhoben wurden (Abschnitt 3.1.1.2 und Abschnitt 6.1. im Anhang).

3 Ergebnisse

Zielsetzung dieser Arbeit war die Überprüfung einer potenziell verstärkten antitumorigenen Wirksamkeit von Platinverbindungen in Kombination mit Modulatoren der DNA-Schadensantwort (Abschnitt 1.8). Dazu wurden Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y mit Cisplatin und dem Checkpoint-Inhibitor LY2603618 oder dem PARP-Inhibitor Olaparib behandelt und hinsichtlich zytotoxischer Effekte untersucht. Cisplatin wird bei Neuroblastomen vor allem bei Hochrisiko-Patienten zur Therapie eingesetzt, bei Patienten mit niedrigem bis mittlerem Risiko findet Carboplatin Einsatz in Therapieschemata (Yiallourous, 2009, 2022). Daher wurden die Analysen in dieser Arbeit ebenfalls ergänzend mit Carboplatin durchgeführt. Um die Problematik der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Platinverbindungen adäquat abzubilden, wurde überprüft, ob die eingesetzten Modulatoren auch bei Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y^R effektiv sind und ob möglicherweise eine Resensitivierung der resistenten Zellen gegenüber den Platinverbindungen bewirkt werden kann. Die zytotoxischen Effekte der Substanzen und ihrer Kombinationen wurden auf mechanistischer Ebene untersucht, indem die Ausbildung von DNA-Schäden, die Aktivierung der DNA-Schadensantwort sowie die Veränderung der Expression von DNA-Reparatur-, Apoptose- und Cisplatin-Resistenz-assoziierten Genen analysiert wurde. Zudem wurde der Einfluss auf den Zellzyklus sowie die Induktion von Apoptose überprüft.

3.1 Die Zytotoxizität ausgewählter Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort in Neuroblastomzellen und deren zugrundeliegende molekulare Mechanismen

3.1.1 Analyse der zytotoxischen Effekte ausgewählter Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort in Neuroblastomzellen

3.1.1.1 Zytotoxische Effekte einer Monobehandlung mit Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort

Um die zytotoxische Wirkung der eingesetzten Substanzen für sich zu ermitteln, wurden die Neuroblastomzellen der Linien SH-SY5Y und SH-SY5Y^R für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin, Carboplatin, Olaparib oder LY2603618 inkubiert. Als Maß für die Zytotoxizität wurde anschließend mittels Alamar Blue Assay die Zellviabilität in Form der metabolischen Fähigkeit zur Umsetzung von Resazurin gemessen und mit jener der unbehandelten Zellen in Relation gesetzt. Dabei zeigte sich, dass Carboplatin erst bei etwa fünf- bis zehnfach höheren Konzentrationen ähnlich zytotoxische Wirkungen aufweist wie Cisplatin (Abbildung 3.1 A). Zudem ist deutlich erkennbar, dass bei der Cisplatin-resistenten Zelllinie SH-SY5Y^R nach Behandlung mit den Platinverbindungen im mittleren Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve erst bei etwa zweifach höheren Konzentrationen als bei der Wildtypzelllinie SH-SY5Y eine ähnlich große Reduktion der Zellviabilität eintrat. Dies galt sowohl für Cis- als auch für Carboplatin, was für diese Zelllinie eine Kreuzresistenz Cisplatin-resistenter Zellen gegenüber Carboplatin zeigt (Abbildung 3.1 A). Nach Behandlung mit dem PARP-Inhibitor Olaparib wiesen die Zellen der Linie SH-SY5Y^R zumindest im Bereich mittlerer bis höherer Konzentrationen noch eine etwas höhere Zellviabilität auf als die Zellen der Linie SH-SY5Y (Abbildung 3.1 B). Diese Effekte stellten sich jedoch statistisch nicht signifikant dar, sodass hier nicht von einer biologisch relevanten Resistenz der Linie SH-SY5Y^R ausgegangen wird. Deutlich ist bei beiden Zelllinien der annähernd asymptotische Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve erkennbar, bei der sich im Niedrigdosisbereich bei steigender Olaparib-Konzentration ein rascher Abfall der Zellviabilität zeigt, der sich dann bei weiter steigenden Konzentrationen nur noch deutlich geringfügiger fortsetzt. Auffälligerweise wiesen die SH-SY5Y^R-Zellen eine Kreuzresistenz gegenüber dem CHK-1-Inhibitor LY2603618 auf (Abbildung 3.1 B).

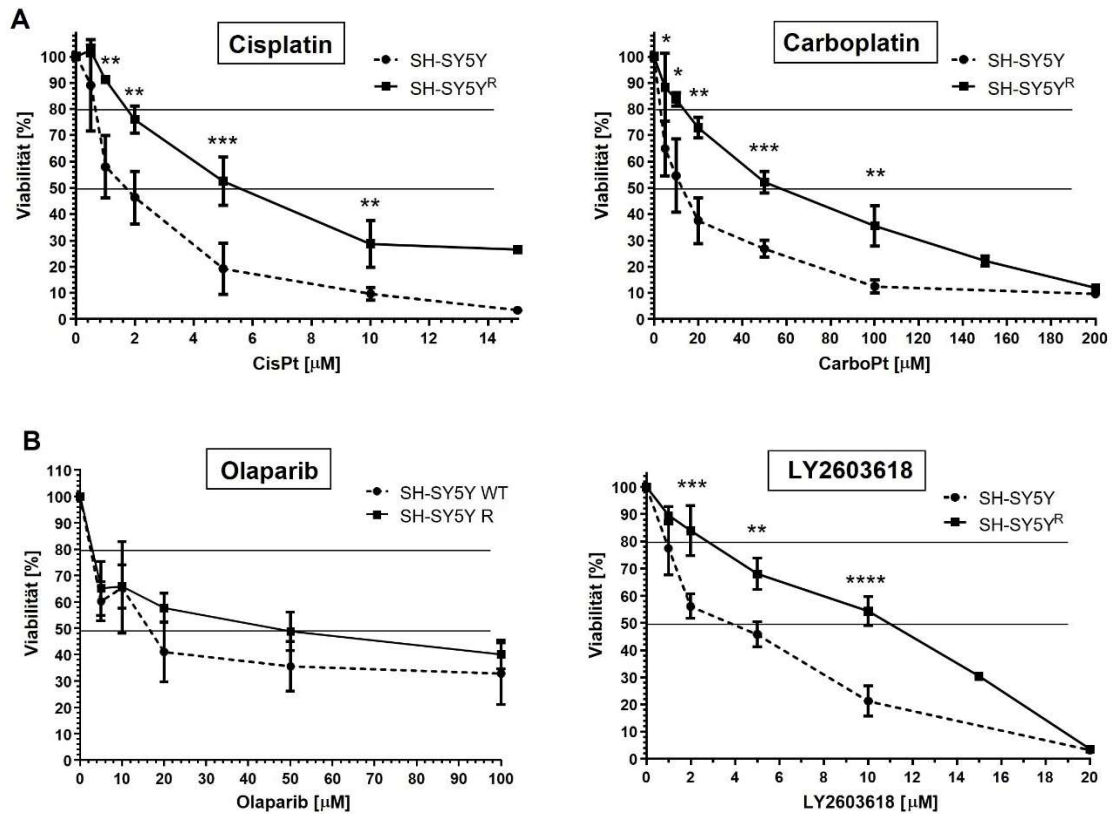


Abbildung 3.1: Einfluss der Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

Dargestellt sind Dosis-Wirkungs-Kurven für die einzelnen Substanzen und Zelllinien. SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) oder Carboplatin (CarboPt) (A) bzw. dem PARP-Inhibitor Olaparib oder dem CHK1-Inhibitor LY2603618 (B) inkubiert. Die Zellviabilität wurde mithilfe des Alamar Blue Assays bestimmt und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen (= 100 %) der jeweiligen Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten ($n = 3$, $N = 4$). Statistik: Student's t-test (zweiseitig, ungepaart) mit $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$.

Anhand der entstandenen Dosis-Wirkungs-Kurven (Abbildung 3.1) wurden IC_{20} (*inhibitory concentration 20 %*) und IC_{50} (*inhibitory concentration 50 %*) für alle Substanzen ermittelt und in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der IC_{20} und IC_{50} der getesteten Substanzen bei Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden zur Ermittlung der Zelllinien- und Substanzspezifischen IC_{20} und IC_{50} für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin oder Carboplatin bzw. dem PARP-Inhibitor Olaparib oder dem Chk1-Inhibitor LY2603618 inkubiert. Anschließend wurde mittels Alamar Blue Assay die Viabilität der Zellen bestimmt. Dargestellt sind die aus den Dosis-Wirkungs-Kurven abgelesenen und gerundeten IC_{20} und IC_{50} (n = 3, N = 4).

Substanz		SH-SY5Y	SH-SY5Y ^R
Cisplatin	IC_{20}	0,5 μ M	2 μ M
	IC_{50}	1 μ M	5 μ M
Carboplatin	IC_{20}	5 μ M	10 μ M
	IC_{50}	10 μ M	50 μ M
Olaparib	IC_{20}	2 μ M	2 μ M
	IC_{50}	20 μ M	20 μ M
LY2603618	IC_{20}	1 μ M	2 μ M
	IC_{50}	5 μ M	10 μ M

3.1.1.2 Zytotoxische Effekte einer der Kombinationsbehandlung mit Platinverbindungen und Modulatoren der DNA-Schadensantwort

Um zu untersuchen, ob und inwiefern der Zusatz der beiden Modulatoren der DNA-Schadensantwort die zytotoxische Wirkung von Cisplatin und/oder Carboplatin beeinflusst, wurden die Neuroblastomzellen für 72 h mit Kombinationen von jeweils Cis- oder Carboplatin und dem PARP-Inhibitor Olaparib oder dem CHK-1-Inhibitor LY2603618 behandelt. Zytotoxische Effekte wurden hier ebenfalls über die Messung der Zellviabilität mittels Alamar Blue Assay quantifiziert. Um in einem ähnlichen Toxizitätsbereich zu arbeiten und die Ergebnisse zwischen den beiden Zelllinien besser vergleichen zu können, wurden die Zelllinien-spezifischen IC_{20} und IC_{50} verwendet (Tab. 3.1) und jeweils die IC_{20} des Modulators mit der IC_{20} oder IC_{50} von Cis- bzw. Carboplatin kombiniert.

Die Analyse der Zellviabilität ergab für alle verwendeten Kombinationen aus Platinverbindung und Modulator eine verstärkte Zytotoxizität verglichen mit der Behandlung mit jeweils einer der Substanzen (Abbildung 3.2 und 3.3). Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei den wildtypischen SH-SY5Y-Zellen als

auch bei den Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen für sowohl Olaparib als auch LY2603618. Im Bereich niedriger Konzentrationen der Platinverbindungen im Bereich der IC₂₀ zeigte sich eine deutlich stärkere relative Zunahme der Zytotoxizität durch Kombinationsbehandlung als im Bereich hoher Cis- bzw. Carboplatin-Konzentrationen. Bei Konzentrationen im Bereich der IC₅₀ führte die Kombinationsbehandlung mit beiden Modulatoren zu geringfügigeren zusätzlichen Abnahmen der Zellviabilität, die sich oft als nicht statistisch signifikant erwiesen. War die Grundtoxizität der Platinverbindung also bereits relativ hoch, ergab sich kein signifikanter Zusatzeffekt einer Kombinationsbehandlung. Das Ausmaß der zu erreichenden Zytotoxizitätssteigerung durch Kombinationsbehandlung mit den Modulatoren zeigte sich für Carboplatin ähnlich ausgeprägt wie für Cisplatin (Abbildung 3.2 und 3.3). Ein Vergleich zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen zeigt, dass eine Kombinationsbehandlung auch bei der Cisplatin-resistenten Zelllinie stärker zytotoxisch wirkte als die Monobehandlung und in einem äquitoxischen Bereich ähnlich starke Zusatzeffekte zu verzeichnen waren. Eine stärkere Ausprägung des zusätzlichen Effektes bei SH-SY5Y^R-Zellen zeigte sich nicht. Trotz der Kreuzresistenz zu LY2603618 bewirkte eine Kombinationsbehandlung im äquitoxischen Bereich bei SH-SY5Y^R-Zellen dennoch eine verstärkte Zytotoxizität (Abbildung 3.2 B und Abbildung 3.3 B).

Zwecks besserer Übersicht und damit besser abgeschätzt werden kann, ob und wie stark der zytotoxische Effekt der Kombinationsbehandlung über den Effekt der Behandlung mit der Platinverbindung alleine hinausgeht, wurde die Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung zusätzlich auf die Zellviabilität nach alleiniger Behandlung mit dem Modulator (= 100 %) normiert und in ergänzenden Diagrammen dargestellt (siehe Anhang Abbildung 6.1 – 6.8). Diese Darstellung zeigt noch einmal deutlicher als die nicht normierte Darstellung, dass die Kombinationsbehandlung von Cis- bzw. Carboplatin sowohl mit Olaparib als auch mit LY2603618 stärker zytotoxisch ist als eine jeweilige Monobehandlung.

Um eine übersichtlichere Darstellung zu gewährleisten, werden in diesem Abschnitt zudem nur die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von LY2603618 und Olaparib aufgeführt. Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen mit Konzentrationen aus dem Bereich der IC₅₀ von LY2603618 und Olaparib mit dazugehörigen Kombinationsindizes befinden sich im Anhang (Abschnitt 6.1.).

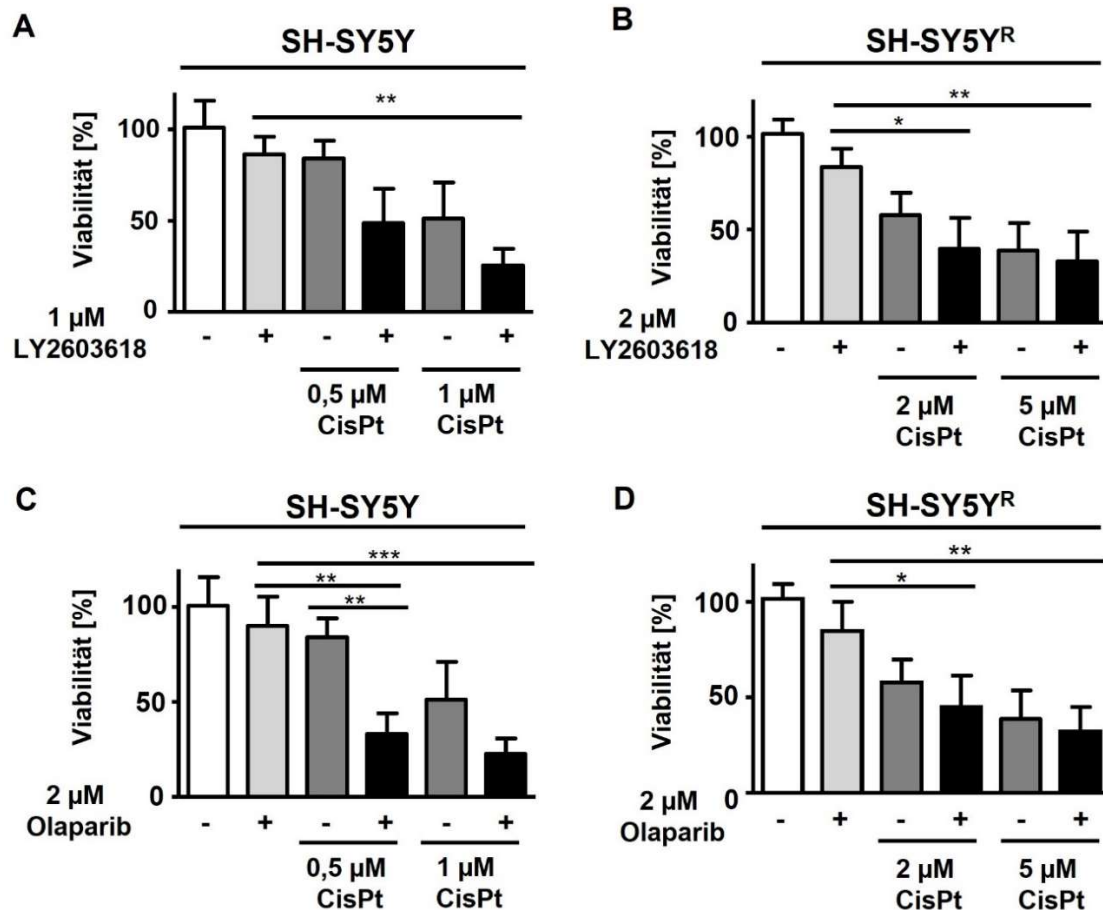


Abbildung 3.2: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und LY2603618 bzw. Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Cisplatin (CisPt) und/oder LY2603618 (A, B) oder Olaparib (C, D) behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von LY2603618 bzw. Olaparib und aus den Bereichen der IC₂₀ und IC₅₀ von CisPt (Tab. 3.1) kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (=100 %). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Statistik: One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

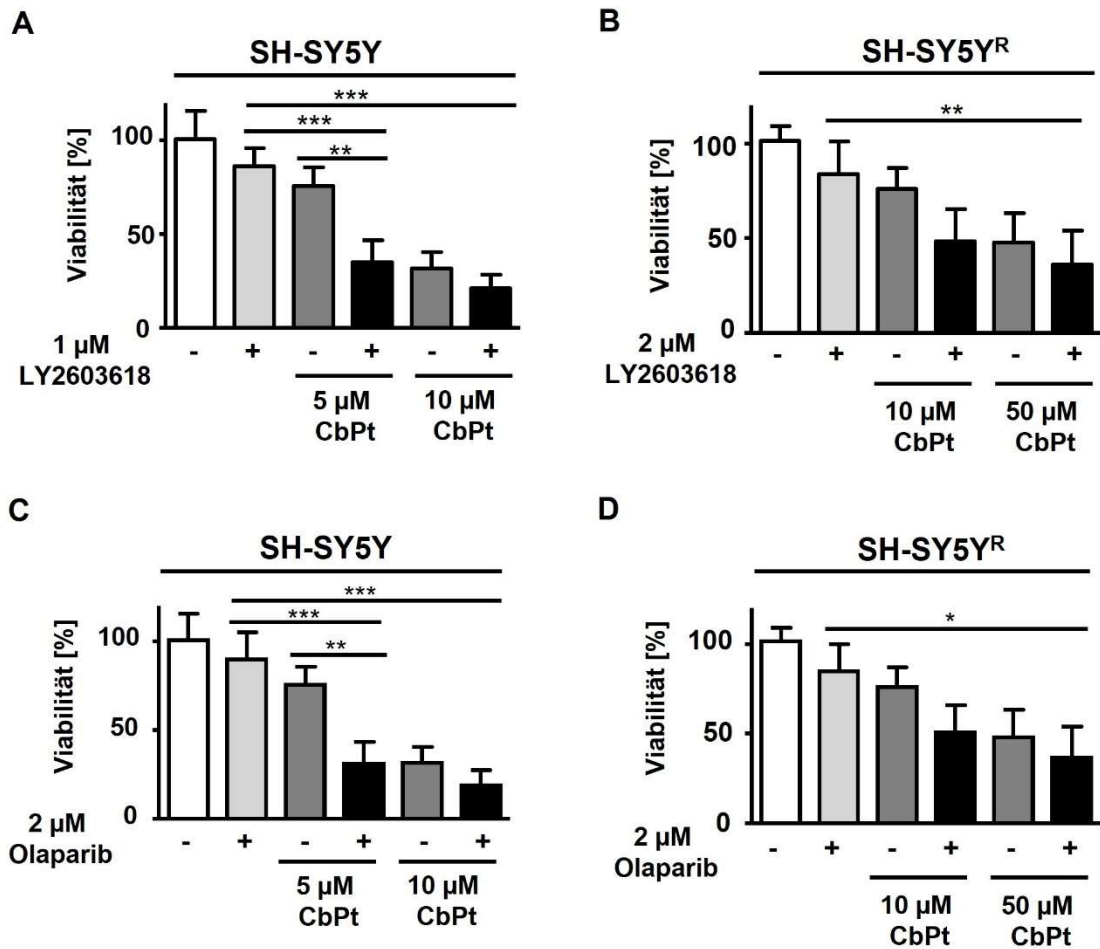


Abbildung 3.3: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 bzw. Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 (A, B) oder Olaparib (C, D) behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von LY2603618 bzw. Olaparib und aus den Bereichen der IC₂₀ und IC₅₀ von CbPt kombiniert (Tab. 3.1). Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (=100 %). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Statistik: One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

Um besser beurteilen und vergleichen zu können, wie effektiv die Modulatoren LY2603618 und Olaparib die zytotoxische Wirkung von Cis- und Carboplatin verstärken, wurde der sogenannte Kombinationsindex (*combination index*, CI) ermittelt. Dieser gibt Aufschluss darüber, ob eine Kombination zweier Substanzen in bestimmten Konzentrationen einen antagonistischen, additiven oder synergistischen Effekt bewirkt (Chou, 2018). Ein synergistischer Effekt ist dann gegeben, wenn die Wirkung zweier Substanzen in Kombination größer ist, als durch die bloße Addition der Effekte der einzelnen Substanzen zu erwarten wäre (Tallarida, 2011). Derartige Effekte können natürlich große therapeutische Vorteile bieten, da für einen gleichermaßen ausgeprägten zytotoxischen Effekt

geringere Dosierungen der einzelnen Substanzen gegeben werden können, was wiederum die Nebenwirkungen verringern kann (Tallarida, 2011). Wie bereits im Methodenteil (Abschnitt 2.2.9) erläutert, gibt gemäß Chou *et al* ein Kombinationsindex von 0,9 – 1,1 eine nahezu additive Wirkung an, bei < 0,9 wird ein synergistischer Effekt und bei > 1,1 ein antagonistischer Effekt angenommen (Chou, 2018; Zhang, 2013).

In Abbildung 3.4 sind die Kombinationsindizes für die Kombinationsbehandlungen mit IC₂₀ bzw. IC₅₀-Konzentrationen von Cis- oder Carboplatin und IC₂₀-Konzentrationen von LY2603618 oder Olaparib aufgeführt. Zwecks übersichtlicherer Darstellung und aufgrund der geringer ausgeprägten Effekte finden sich die entsprechenden Abbildungen für die Kombinationsbehandlungen mit IC₅₀-Konzentrationen von LY2603618 beziehungsweise Olaparib im Anhang (Abbildung 6.9).

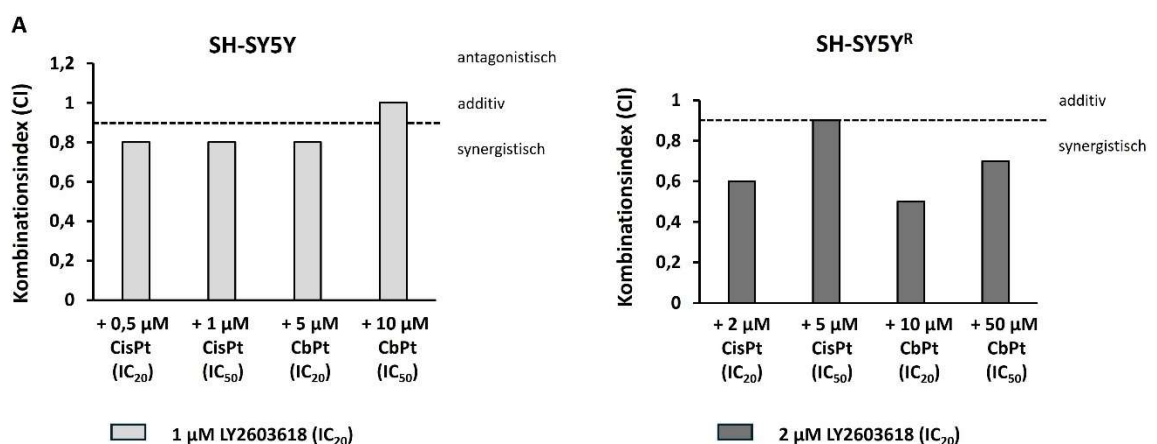
Betrachtet man die Kombinationsindizes, so weisen die meisten der untersuchten Kombinationen von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 oder Olaparib einen Index von < 0,9 auf, sodass synergistische Effekte angenommen werden können. Ausnahmen davon sind bei SH-SY5Y-Zellen die Kombinationen aus 10 µM Carboplatin und 1 µM LY2603618 (CI = 1,0) sowie die Kombination von 10 µM Carboplatin mit 2 µM Olaparib (CI = 0,9). Beide Kombinationen bewirken somit eher additive Effekte. Bei SH-SY5Y^R-Zellen bewirken 2 µM Cisplatin und 2 µM LY2603618 additive Effekte (CI = 0,9).

Die ausgeprägtesten synergistischen Effekte sind für Kombinationen der Modulatoren mit Konzentrationen von Cis- bzw. Carboplatin aus dem Bereich der Zelllinien-spezifischen IC₂₀ zu verzeichnen (Abbildung 3.4). Eine Dosis von 2 µM Olaparib weist bei SH-SY5Y-Zellen sowohl in Kombination mit 0,5 µM Cisplatin (CI = 0,5), als auch in Kombination mit 5 µM Carboplatin (CI = 0,6) starke synergistische Effekte auf. Bei SH-SY5Y^R-Zellen wirken 1 µM Cisplatin sowohl mit 2 µM LY2603618 (CI = 0,6), als auch mit 2 µM Olaparib (CI = 0,6) gleichermaßen stark synergistisch. Die Kombination von 10 µM Carboplatin wirkt sowohl mit 2 µM LY2603618 (CI = 0,5) als auch mit 2 µM Olaparib (CI = 0,4) sogar noch stärker synergistisch.

Die molekularen Mechanismen, die den Effekten der Kombinationsbehandlung zugrunde liegen, sollten nachfolgend sehr ausführlich untersucht werden. Daher sollten in dieser Arbeit alle weiteren Untersuchungen auf die Kombinationsbehandlung mit dem geeigneteren der beiden Modulatoren beschränkt werden. Wie oben herausgearbeitet wurde, sind für SH-SY5Y-Zellen mit dem Modulator Olaparib teilweise etwas besseren Effekte zu verzeichnen. Ein großer Fokus dieser Arbeit lag jedoch auch auf der Eignung pharmakologischer Modulatoren zur Adressierung von Cisplatin-Resistenz. Daher wurde vor allem darauf geachtet, welcher Modulator bei SH-SY5Y^R-Zellen besonders gute

Effekte erzielt. Hier erzielen beide Modulatoren in der Kombinationsbehandlung ähnlich stark synergistische Effekte. Bei Olaparib fallen diese nur minimal stärker aus. Beide Modulatoren haben sich also als grundsätzlich geeignet erwiesen, um mit Cis- bzw. Carboplatin kombiniert zu werden. Für die weiteren Experimente in dieser Arbeit zur Untersuchung der Effekte der Kombinationsbehandlung auf molekularer bzw. mechanistischer Ebene wurde der CHK1-Inhibitor LY2603618 gewählt. Diese Auswahl erfolgte unter anderem, da im Rahmen einer früheren Publikation der Arbeitsgruppe bereits die CHK1-Inhibition bei Medulloblastomzellen in Abhängigkeit vom *C-MYC*-Expressionsstatus untersucht wurde (Krüger *et al.*, 2018). So schien eine Untersuchung der Wirkung eines weiteren CHK1-Inhibitors an Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y eine sinnvolle Ergänzung. Angestrebt war langfristig auch hier ein Vergleich zwischen Neuroblastomzellen mit *N-MYC*- (*N-MYC high*) und ohne *N-MYC*-Amplifikation, wobei SH-SY5Y die Zelllinie ohne *N-MYC*-Amplifikation darstellt (Edsjö *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011). Als Vergleichszelllinie sollten im Rahmen eines anderen Projektes ebenfalls der Einfluss der Modulatoren LY2603618 und Olaparib auf Cisplatin-Resistenz bei der Neuroblastomzelllinie IMR32 untersucht werden, welche eine *N-MYC*-Amplifikation aufweist (Zaizen *et al.*, 1993).

Aufgrund des stärker synergistischen Effektes im Bereich niedrigerer Konzentrationen wurden als Behandlungsbedingungen für die meisten weiteren Untersuchungen sowohl für LY2603618 als auch für Cis- und Carboplatin Konzentrationen im Bereich der zelllinienspezifischen IC_{20} verwendet.



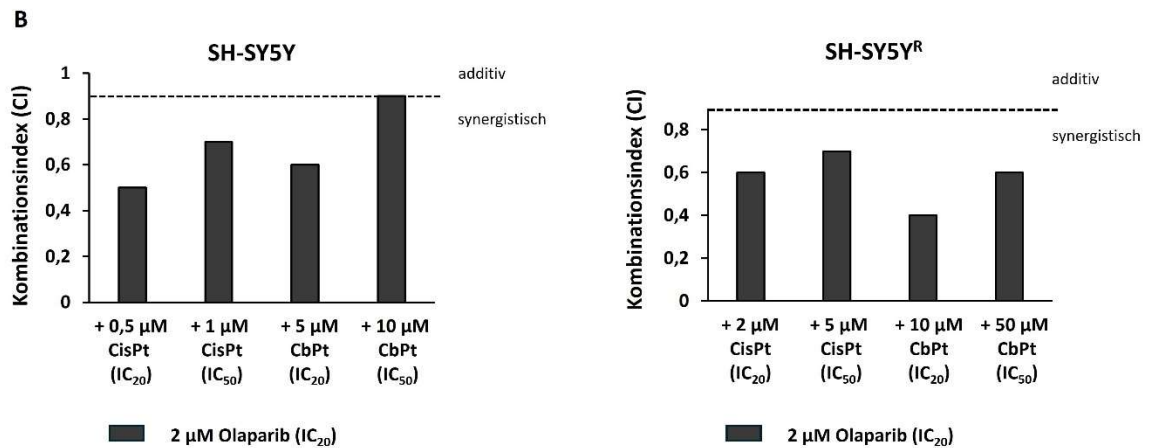


Abbildung 3.4: Kombinationsindizes (CI) der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 oder Olaparib bei SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Cis- (CisPt) oder Carboplatin (CbPt) und LY2603618 (A) oder Olaparib (B) behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von LY2603618 bzw. Olaparib und aus den Bereichen der IC₂₀ und IC₅₀ von CisPt und CbPt kombiniert (Tab. 3.1). Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (=100 %). Um die verschiedenen Kombinationen hinsichtlich des Vorliegens synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte zu überprüfen, wurde der Kombinationsindex (*combination index*, CI) mithilfe der Software DDCV ermittelt. Dargestellt sind die Kombinationsindizes der Kombinationsbehandlungen mit LY2603618 (A) bzw. Olaparib (B). Bei einem Kombinationsindex zwischen 0,9 – 1,1 wird der Effekt als additiv, bei < 0,9 als synergistisch und bei > 1,1 als antagonistisch bewertet.

3.1.2 Analyse der Effekte der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Zellzyklusverteilung in Neuroblastomzellen

Um den Einfluss einer Behandlung mit den Platinverbindungen Cis- und Carboplatin sowie dem CHK1-Inhibitor LY2603618 auf die Verteilung der Zellpopulation auf die einzelnen Zellzyklusphasen zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dazu wurde die Zellzyklusverteilung nach 24 h, 48 h sowie 72 h Behandlung mit den Platinverbindungen bzw. dem CHK1-Inhibitor analysiert. Es sollte herauskristallisiert werden, ob der zuvor beobachtete zytotoxische Effekt bzw. die Verminderung der Zellviabilität nach Behandlung eher auf eine Induktion von Apoptose (Anstieg der subG1-Fraktion) oder auf eine Inhibition der Mitose (Zellzyklus-Arrest in der G1- oder G2-Phase) zurückzuführen ist.

3.1.2.1 Effekte einer Monobehandlung mit Cis- oder Carboplatin bzw. dem CHK1-Inhibitor auf die Zellzyklusverteilung

Die Behandlung mit Cisplatin oder Carboplatin alleine führte bei Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y zu einer Vermehrung der subG1-Fraktion, welche die apoptotischen Zellen beinhaltet (Abbildung 3.5 A). Dieser Effekt zeigte sich jedoch erst nach 72 h Behandlung mit einer deutlichen Tendenz und fiel bei beiden Zelllinien erst nach 72 h statistisch signifikant aus. Nach 48 h waren nur geringfügige Anstiege der subG1-Fraktion zu verzeichnen. Der subG1-Anstieg war bei Cisplatin stärker und bereits nach kürzerer Behandlungsdauer zu verzeichnen als bei äquitoxischen Konzentrationen von Carboplatin. Nach äquitoxischer Behandlung mit Carboplatin war bei beiden Zelllinien zu allen Zeitpunkten eine ähnlich hohe Zunahme in der subG1-Fraktion sichtbar, wohingegen sich bei Cisplatin bei SH-SY5Y^R-Zellen eine größere subG1-Fraktion als bei SH-SY5Y-Zellen zeigte.

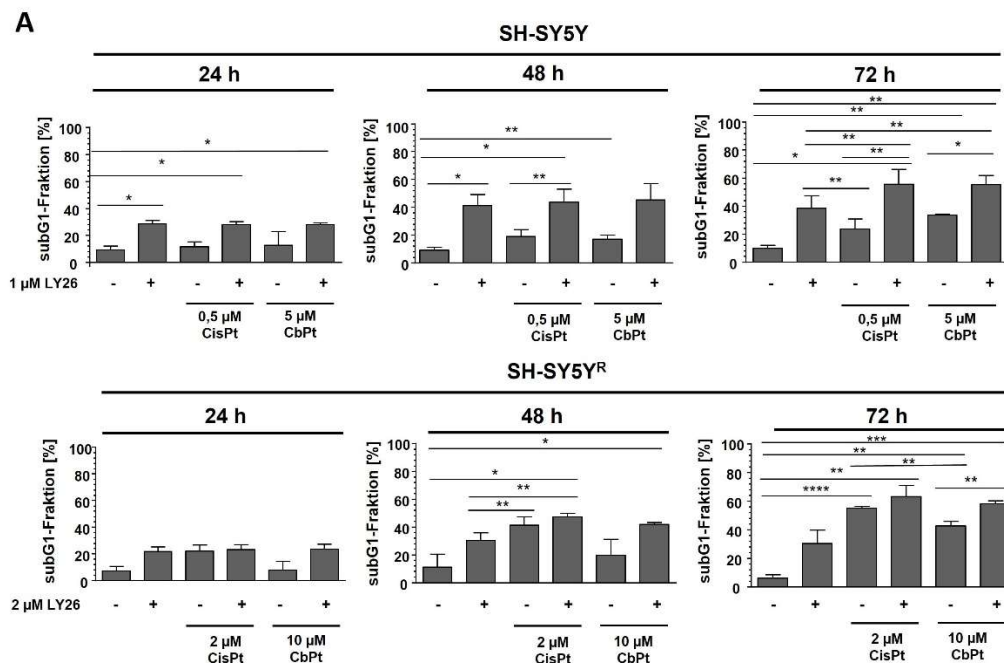
Bei beiden Zelllinien induzierte die Monobehandlung mit den Platinverbindungen mit zunehmender Behandlungsdauer eine tendenzielle Reduktion der prozentualen G1-Fraktion, die bei SH-SY5Y^R-Zellen nach 24 h signifikant, nach 48 h und 72 h jedoch nicht signifikant war (Abbildung 3.5 B). Die Reduktion zeigte sich bei SH-SY5Y-Zellen nach Behandlung mit Carboplatin ausgeprägter als mit Cisplatin. Bei SH-SY5Y^R-Zellen hingegen zeigte sich die Reduktion stärker nach Cisplatin- als nach Carboplatin-Behandlung.

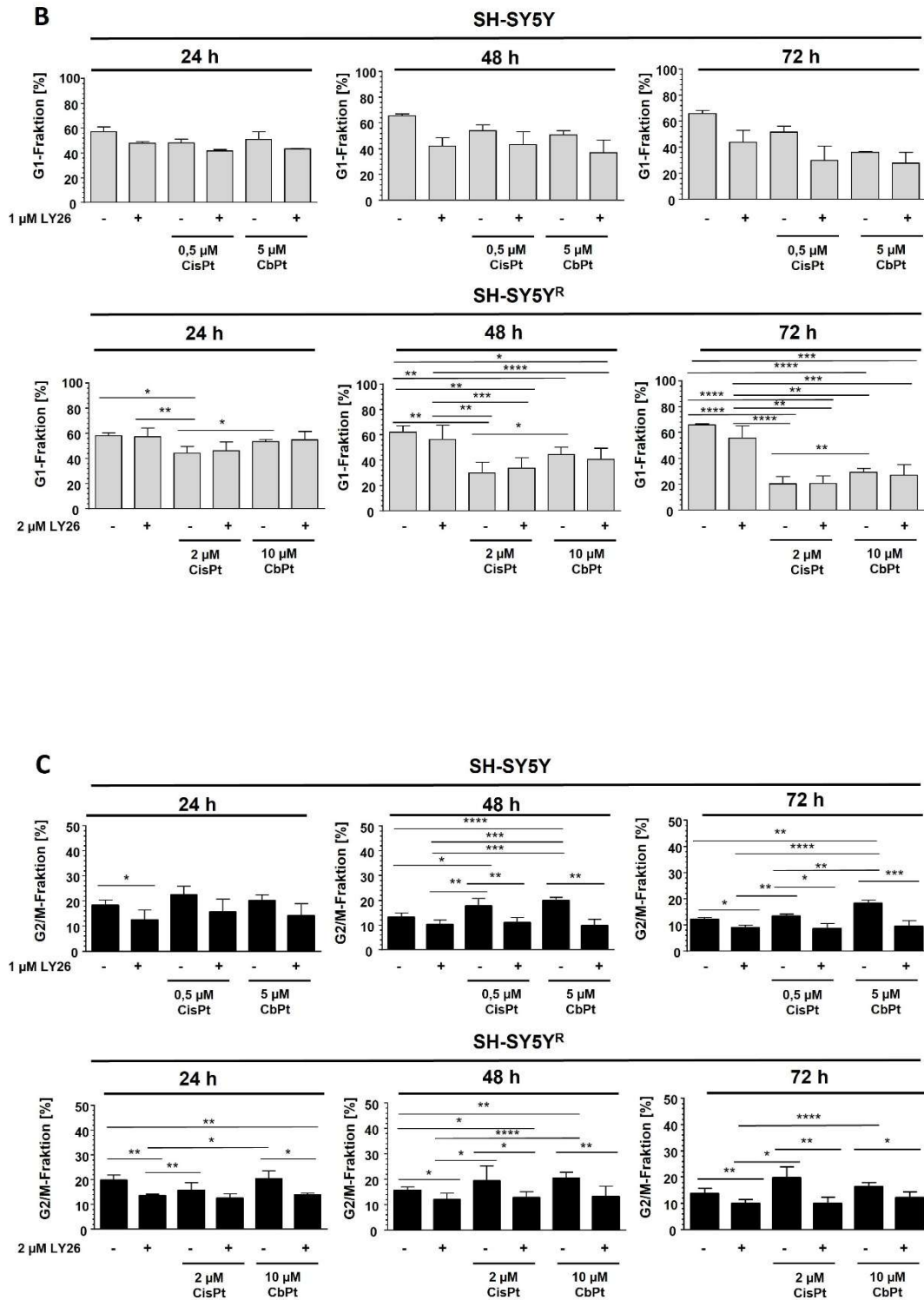
Die Analyse der G2/M-Fraktion, welche sowohl Zellen in der G2-Phase sowie während der Mitose vor der Zytokinese umfasst, ergab für beide Platinsubstanzen und beide Zelllinien einen leichten tendenziellen G2/M-Arrest nach 48 h und 72 h (Abbildung 3.5 C).

Eine Behandlung mit LY2603618 alleine bewirkte in beiden Zelllinien und zu allen gemessenen Zeitpunkten eine Erhöhung der subG1-Fraktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die G2/M-Fraktion nahm nach 24 h bei beiden Zelllinien signifikant ab, die G1-Fraktion unterlag keinen signifikanten Veränderungen (Abbildung 3.5).

3.1.2.2 Effekte einer Kombinationsbehandlung mit Cis- oder Carboplatin und dem CHK1-Inhibitor auf die Zellzyklusverteilung

In den ersten 48 h der Behandlung zeigte sich nach Kombinationsbehandlung eine ähnlich große subG1-Fraktion wie nach Monobehandlung mit LY2603618, aber eine größere als nach Behandlung mit Cis- oder Carboplatin alleine bei SH-SY5Y-Zellen und als mit Carboplatin alleine bei SH-SY5Y^R-Zellen. Erst nach 72 h bewirkte eine Kombinationsbehandlung dann auch eine stärkere Erhöhung der subG1-Fraktion als die Behandlung mit LY2603618 alleine. Die Kombination von LY2603618 und Cisplatin bei SH-SY5Y^R-Zellen erzielte jedoch nur noch eine geringfügige weitere Zunahme der subG1-Fraktion. Dort bewirkte bereits Cisplatin alleine eine sehr ausgeprägte subG1-Induktion (Abbildung 3.5 A). Die Kombination mit LY2603618 zeigte nur bei SH-SY5Y-Zellen und erst nach 72 h eine weitere Reduktion der G1-Fraktion gegenüber der alleinigen Behandlung mit Cis- und Carboplatin. Unter Kombinationsbehandlung wurde der durch Monobehandlung mit Cis- und Carboplatin induzierte G2/M-Arrest aufgehoben (Abbildung 3.5 C).





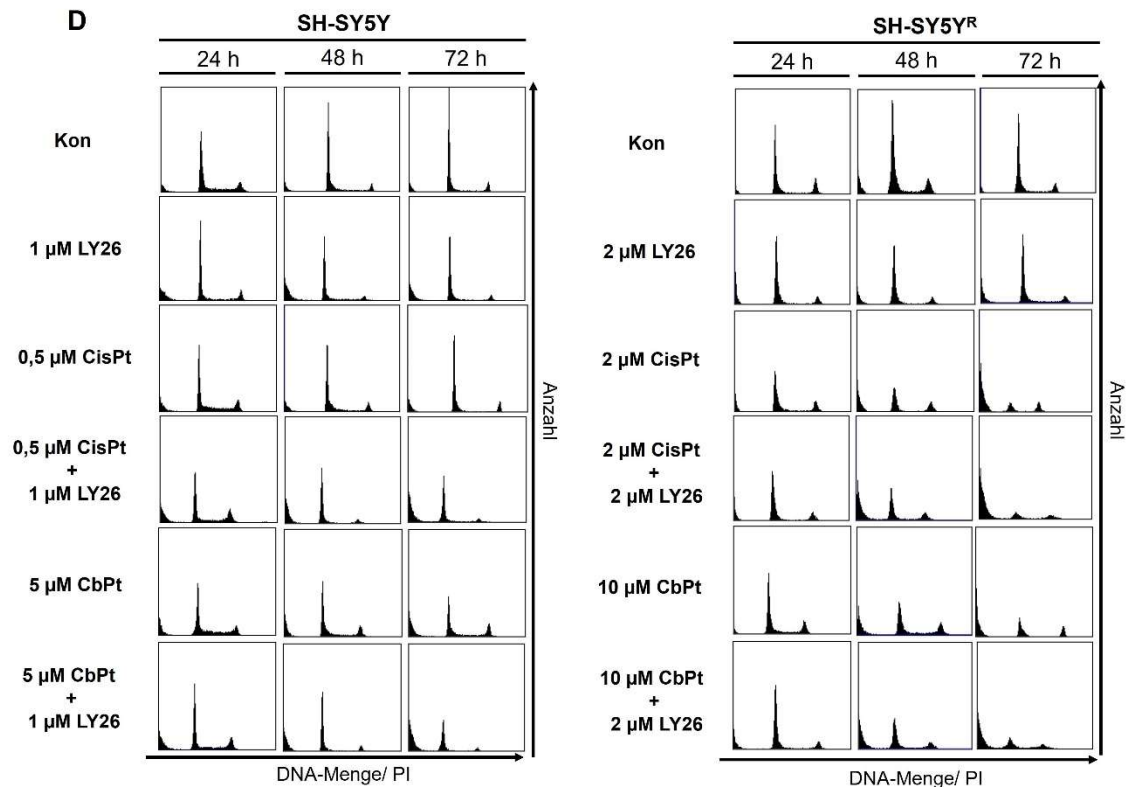


Abbildung 3.5: Einfluss der Mono- und Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 auf die Zellzyklusverteilung

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit Cisplatin (CisPt), Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse mit Messung des DNA-Gehaltes unter Verwendung von Propidiumiodid (PI). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Duplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n=3, N=2). Gezeigt sind jeweils der prozentuale Anteil der subG1-Fraktion (A), der G1-Fraktion (B) und der G2/M-Fraktion (C) sowie exemplarisch die Anzahl der jeweils detektierten Zellen (Peak-Höhe) in Abhängigkeit der Intensität des Propidiumiodidsignals, das äquivalent zur DNA-Menge pro Einzelzelle ist (D). Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc Mehrfachvergleich: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine Zunahme der subG1-Fraktion, einen Rückgang der Zellen in der G1-Phase sowie eine Arretierung in der G2/M-Phase durch Platinverbindungen in wildtypischen und Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen hin. Die Kombination mit einer CHK1-Inhibition durch LY2603618 verminderte den platininduzierten G2/M-Arrest und führte zu einer weiteren Zunahme der subG1-Fraktion.

3.1.3 Analyse der Effekte der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Induktion von apoptotischem Zelltod und die Expression von P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest

3.1.3.1 Einfluss der Platinverbindungen sowie des CHK1-Inhibitors auf die Induktion von apoptotischem Zelltod

Um den Einfluss der Behandlung mit Platinverbindungen und dem CHK1-Inhibitor LY2603618 auf die Induktion von Apoptose evaluieren zu können, wurden Western Blot-Analysen mit den aus den Zellen isolierten Proteinen durchgeführt. Mittels Immunodetektion wurden die proapoptotischen Faktoren P53 und Bcl2-assoziiertes X-Protein (BAX), der CDK-Inhibitor P21 sowie die Effektorcaspasen Caspase 3 und 7 in ihrer inaktiven nativen und ihrer proteolytisch aktivierten Form (*cleaved* Caspasen) visualisiert. Als weiterer Marker für den Ablauf der Apoptose wurde die durch Caspasen vermittelte Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) untersucht. Betrachtet wurden dabei die Veränderungen nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h Dauerbehandlung.

In beiden Zelllinien führten sowohl die Monobehandlung mit LY2603618, Cis- und Carboplatin als auch die Kombinationsbehandlungen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle zu jeweils mindestens einem Messzeitpunkt zu erhöhten Konzentrationen von P21, P53 und BAX. Die Kombinationsbehandlung erzielte dabei tendenziell die stärkste Induktion aller drei Proteine, insbesondere nach 48 h und 72 h (Abbildung 3.6 und 3.7). Vergleicht man Cis- und Carboplatin, so zeigten sich bei Mono- und Kombinationsbehandlung mit Cisplatin frühere und stärkere Anstiege der Proteinmengen der oben genannten Faktoren bei beiden Zelllinien. Die Effekte traten bei LY2603618 meist bereits nach 24 h und damit früher als bei Cis- und Carboplatin in Erscheinung. Die Phosphorylierung von P53 an Serin15 (pP53 S15) verhielt sich analog zur Gesamtproteinmenge an P53. Die Behandlungen führten somit bei einer Erhöhung des Gesamtlevels von P53 stets auch zu einer ähnlich starken Induktion der Phosphorylierung an Serin 15 (S15). Die proteolytische Aktivierung der Caspasen ist anhand des Anstieges der Menge der entsprechenden *cleaved* Caspase sichtbar. Für Caspase 7 zeigte sich nach Behandlung mit Cisplatin und nach Kombinationsbehandlung erst nach 48 h bis 72 h eine deutliche Spaltung und somit Aktivierung. Diese geht allerdings nicht mit einer Reduktion der ungespaltenen Caspase 7 einher. In SH-SY5Y^R-Zellen fiel diese nach Kombinationsbehandlung geringer aus als nach Behandlung mit Cisplatin alleine (Abbildung 3.6 B). Caspase 3 zeigte bei beiden Zelllinien die gleichen Tendenzen wie Caspase 7, jedoch waren die

Signale der gespaltenen Caspase 3 bei gleich starkem Signal in der Positivkontrolle schwächer ausgeprägt als bei Caspase 7.

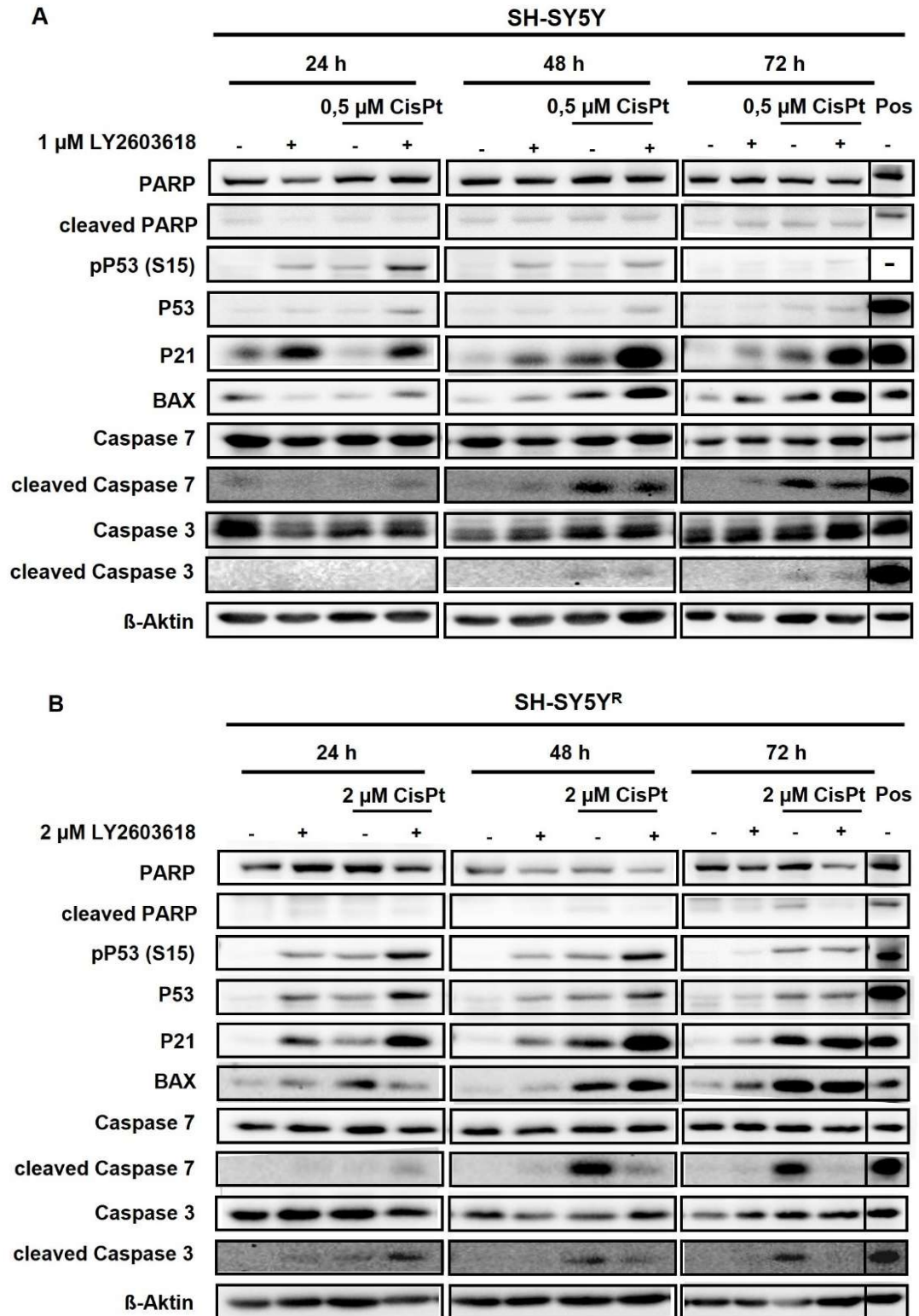
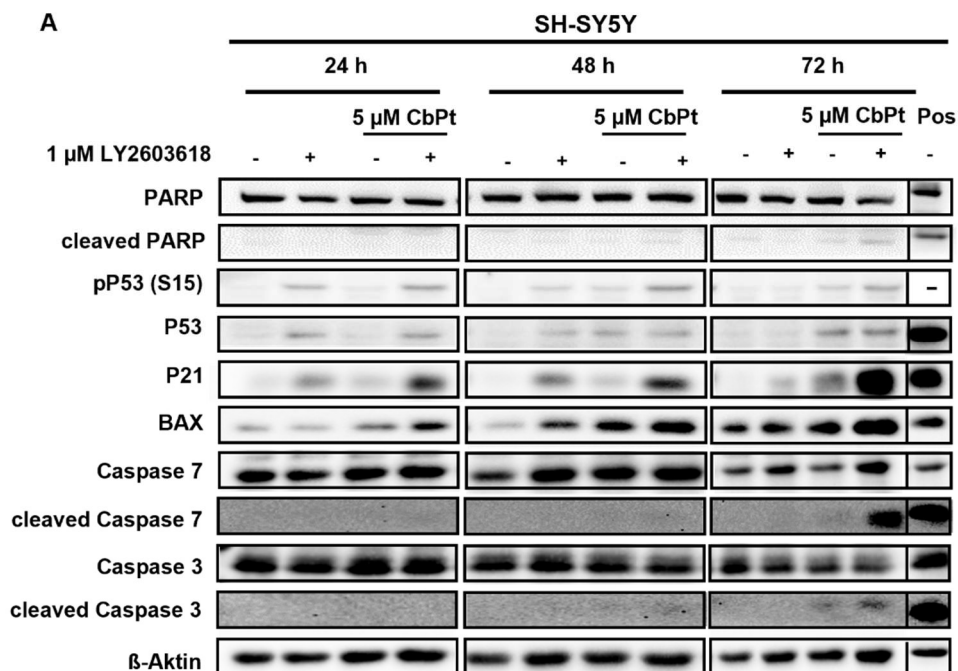


Abbildung 3.6: Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Cisplatin und dem CHK1-Inhibitor LY2603618 auf die Induktion von Apoptose

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit Cisplatin (CisPt) und/oder LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Die aufgetrennten Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper gegen Apoptose-relevante Proteine analysiert. Eine Visualisierung von β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Kon = unbehandelte Kontrolle, Pos = Positivkontrolle (48 h Behandlung mit 15 μ M CisPt). PARP = Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, BAX = BCL-2-assoziertes X-Protein, P21 = CDK-Inhibitor 1 (CDK = cyclin dependent kinase). pP53 = phospho-P53 (phosphoryliert an Serin15)

Nach Carboplatin-Behandlung erfolgte die Proteolyse und Aktivierung von Caspase 3 und 7 bei SH-SY5Y-Zellen weniger stark als nach Cisplatin-Behandlung und zeigte sich erst nach 72 h und nur bei Kombinationsbehandlung mit LY2603618 in einem deutlichen Ausmaß (Abbildung 3.7 A). Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse, die einen schnelleren Anstieg der subG1-Fraktion nach Cisplatin-Behandlung zeigten (Abbildung 3.5 A). Bei SH-SY5Y^R-Zellen bewirkte die Kombinationsbehandlung mit Carboplatin bereits nach 24 h bis 48 h vermehrt detektierbare *cleaved* Caspase 3 und 7. Nach Carboplatin-Behandlung alleine zeigte sich die Caspaseaktivierung mit einer langsameren Kinetik erst nach 72 h (Abbildung 3.7 B). Es fällt auf, dass sich bei beiden Zelllinien nur eine äußerst geringfügige Spaltung von PARP zeigte.



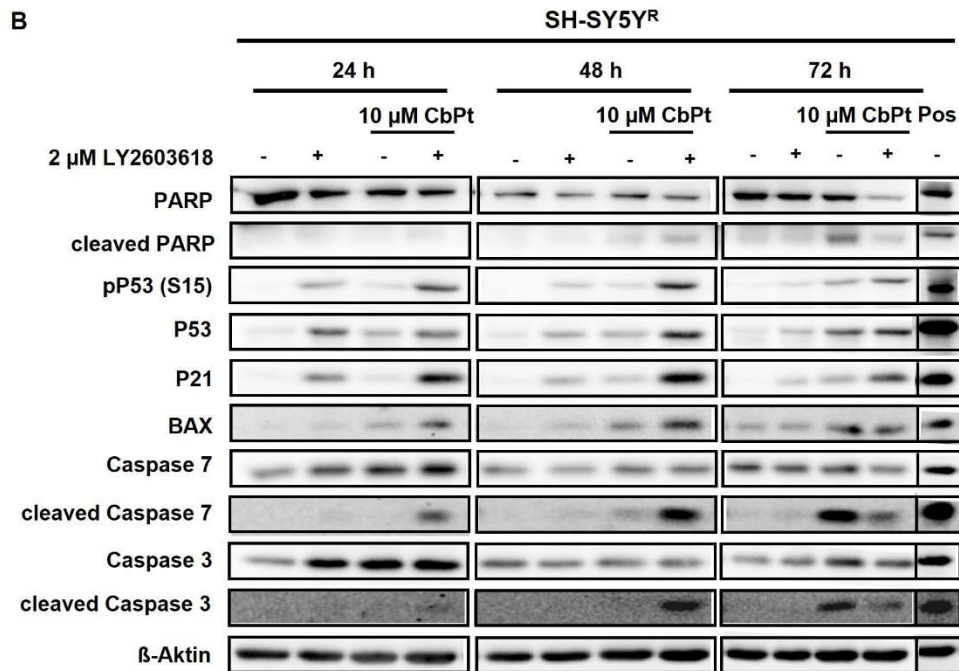


Abbildung 3.7: Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 auf die Induktion von Apoptose und P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Die aufgetrennten Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper gegen Apoptose-relevante Proteine analysiert. Eine Visualisierung von β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Kon = unbehandelte Kontrolle, Pos = Positivkontrolle (48 h Behandlung mit 15 μ M CisPt). PARP = Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, BAX = BCL-2-assoziertes X-Protein, P21 = CDK-Inhibitor 1 (CDK = cyclin dependent kinase). pP53 = phospho-P53 (phosphoryliert an Serin15)

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Daten für beide Zelllinien eine Induktion und Phosphorylierung von P53 sowie eine Induktion von BAX, bevor zu späteren Zeitpunkten Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 erfolgten. Diese Effekte zeigten sich am stärksten nach Kombinationsbehandlung und etwas schwächer und verzögert nach Carboplatin-Behandlung.

3.1.3.2 Einfluss der Platinverbindungen sowie des CHK1-Inhibitors auf die Expression von P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest

Für Cisplatin ist beschrieben, dass es Zellzyklus-Arrest und Seneszenz induzieren kann und dieser Prozess über die Hochregulation von P53 und P21 erfolgen kann (Qu *et al.*, 2013). Die Behandlung mit Cis- bzw. Carboplatin bewirkte in der vorliegenden Arbeit einen leichten G2/M-Arrest (Abschnitt 3.1.2.1) und sowohl unter Behandlung mit Cis- und Carboplatin alleine als auch unter Kombinationsbehandlung mit LY2603618 zeigten sich deutliche Anstiege von P53 im Western Blot

(Abschnitt 3.1.3.1). Daher wurde die Proteinmenge von P21 in den zur Untersuchung der Apoptose durchgeführten Western Blot-Analysen mitdetektiert, um zu überprüfen, ob der im Western Blot zu verzeichnende Anstieg von P53 auch mit einer Hochregulation des Zielproteins P21 einhergeht.

Eine äquitoxische Behandlung mit Cisplatin bewirkte in beiden Zelllinien eine auf Proteinebene detektierbare Induktion von P21, die nach 48 h bis 72 h maximal ausgeprägt war (Abbildung 3.6). Auch LY2603618 führte zu erhöhten Mengen des Proteins P21, allerdings trat dieser Effekt bereits früher als nach Cisplatin-Behandlung ein und nahm nach 48 h und 72 h wieder ab. Nach Kombinationsbehandlung nahm die Menge an P21 jeweils am stärksten zu (Abbildung 3.6 und 3.8). Die Behandlung mit Carboplatin erhöhte ebenfalls in beiden Zelllinien die P21-Proteinmenge, allerdings stieg die Menge langsamer und deutlich weniger stark an als durch Cisplatin-Behandlung. In Kombination mit LY2603618 wurde P21 in SH-SY5Y-Zellen nach 72 h Carboplatin-Behandlung sogar stärker induziert als nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin (Abbildung 3.7 und 3.8). Bei SH-SY5Y^R-Zellen führte die Kombinationsbehandlung mit Carboplatin auch zu einer Hochregulation von P21, allerdings geringfügiger als bei SH-SY5Y-Zellen.

Aufgrund der sehr starken P21-Signale, die einen sehr ausgeprägten Anstieg der Proteinmenge vermuten ließen, wurden densitometrische Auswertungen der Western Blot-Banden angefertigt. Diesen lässt sich entnehmen, dass SH-SY5Y-Zellen tendenziell basal etwas mehr P21 exprimieren als SH-SY5Y^R-Zellen – zumindest nach 24 h – 48 h Inkubation (Abbildung 3.8 A). Darüber hinaus ist durch Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 eine sehr deutliche, im Zeitverlauf zunehmende Vervielfachung der P21-Mengen zu verzeichnen, die insbesondere bei SH-SY5Y^R-Zellen sehr stark ausgeprägt ist. Der höchsten P21-Anstieg auf das bis zu 55 – 65-fache der basal vorliegenden Menge kommt in SH-SY5Y^R-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 zur Darstellung (Abbildung 3.8 B – C).

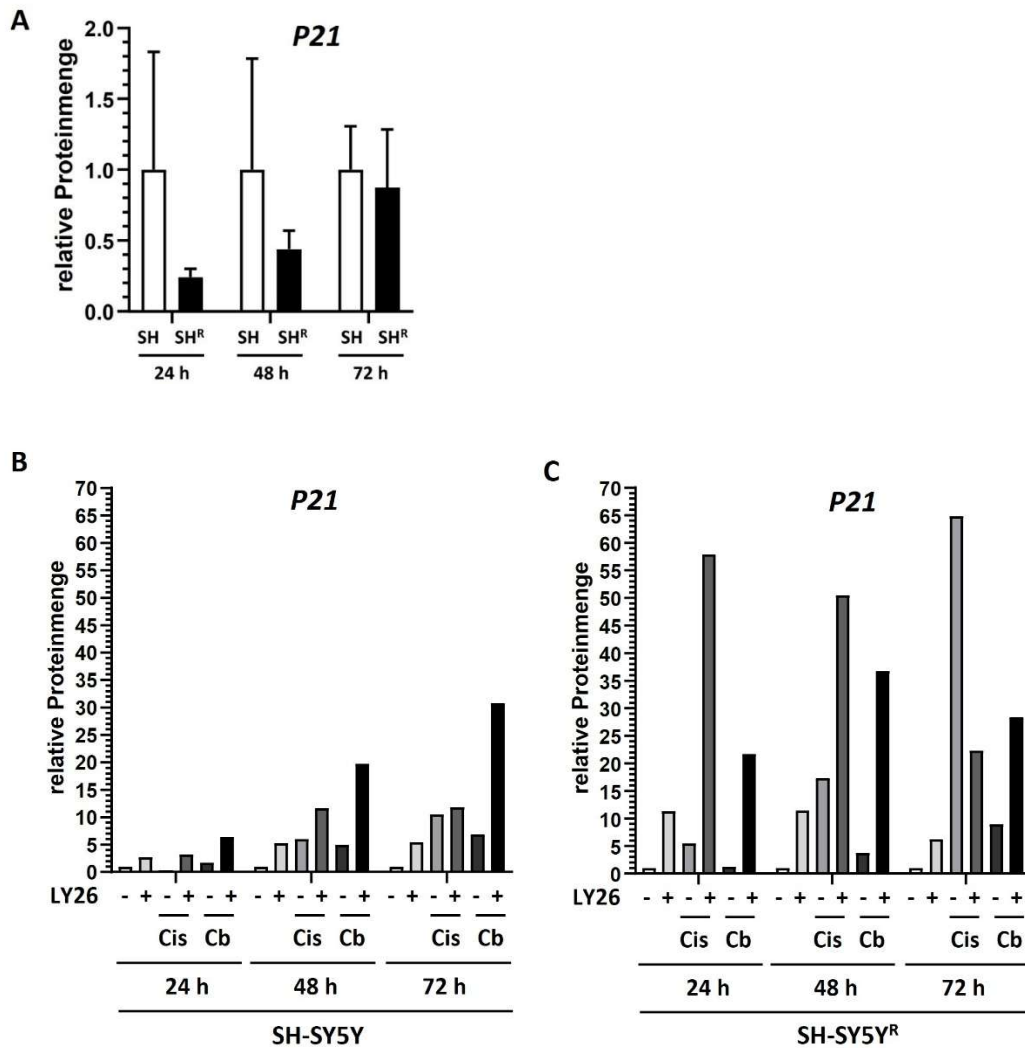


Abbildung 3.8: Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 auf die Induktion von P21 als Marker für Seneszenz und Zellzyklus-Arrest

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit Cisplatin (Cis), Carboplatin (Cb) und/oder LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Die in Abbildung 3.6 und 3.7 dargestellten Western Blots wurden zum besseren Vergleich der relativen Proteinmengen densitometrisch ausgewertet. Die Signaldichte der p21-Bande wurde jeweils auf die Signaldichte der zugehörigen Aktin-Bande normiert. Anschließend wurden die Signaldichten von p21 für SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen jeweils auf die Signaldichte bei unbehandelten Kontrollzellen normiert.

Dargestellt ist die relative basale p21-Proteinmenge in SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h, normiert auf die Menge in unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (A, n = 2, N = 1). Zudem sind die relativen p21-Proteinmengen nach 24 h-, 48 h- und 72 h-Behandlung in SH-SY5Y-Zellen (B) und SH-SY5Y^R-Zellen (C) gezeigt, normiert auf die Menge in unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie zum jeweiligen Zeitpunkt (n = 1, N = 1). Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur.

Zusammenfassend ließ sich nach Behandlung mit allen Substanzen bei beiden untersuchten Zelllinien eine starke Induktion von P21 feststellen, die durch Kombination von Cis- bzw. Carboplatin mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 vor allem bei SH-SY5Y^R-Zellen noch extrem gesteigert werden konnte.

Die hohen P21-Mengen korrelieren von ihren Veränderungen her mit den Mengen an P53 (Abschnitt 3.1.3.1).

3.1.4 Einfluss von Platinverbindungen sowie des CHK1-Inhibitors auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

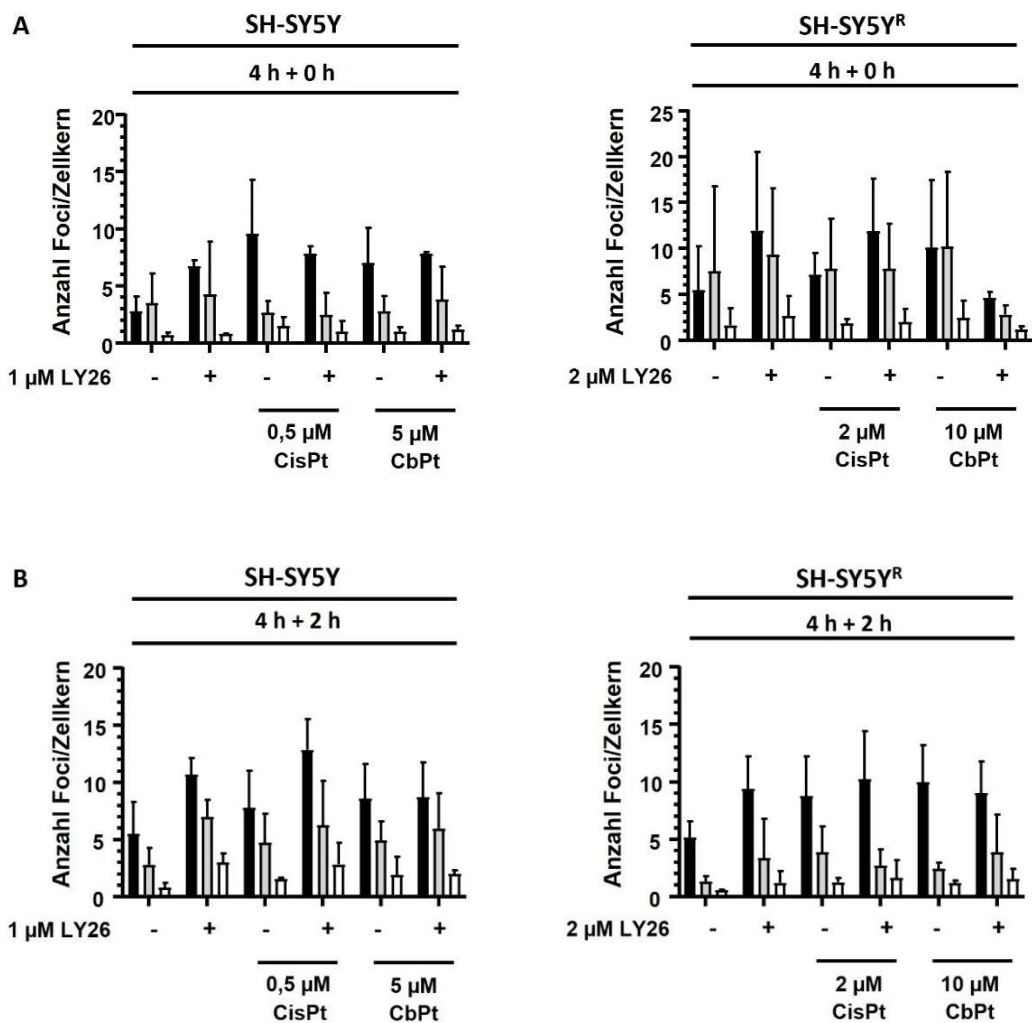
Eine Behandlung mit Cisplatin führt zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Zelle (Huang *et al.*, 2004; Kuo & Yang, 2008). DNA-Doppelstrangbrüche können während der Mitose durch den *Spindle-Assembly-Checkpoint* (SAC) vermittelt zu einer mitotischen Katastrophe mit nachfolgender Seneszenz oder Zelltod führen (Thompson *et al.*, 2019). Um sie zu detektieren und nachfolgend zu reparieren, sind vor allem das Histon H2AX und die an Serin 139 phosphorylierte Variante γ H2AX sowie das P53 bindende Protein 1 (53BP1) von essenzieller Bedeutung, die im Bereich von DNA-Doppelstrangbrüchen akkumulieren und detektierbare punktförmige Foci bilden (Yuan *et al.*, 2010).

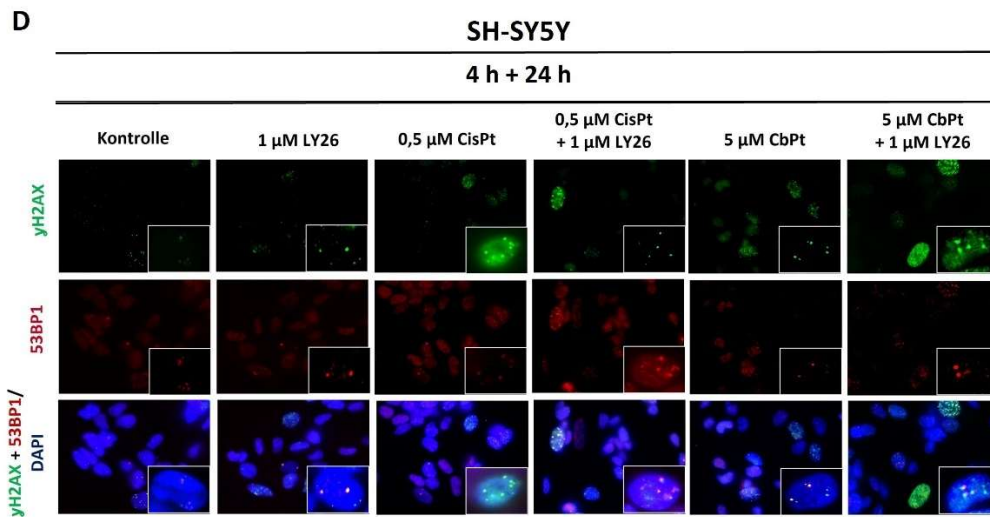
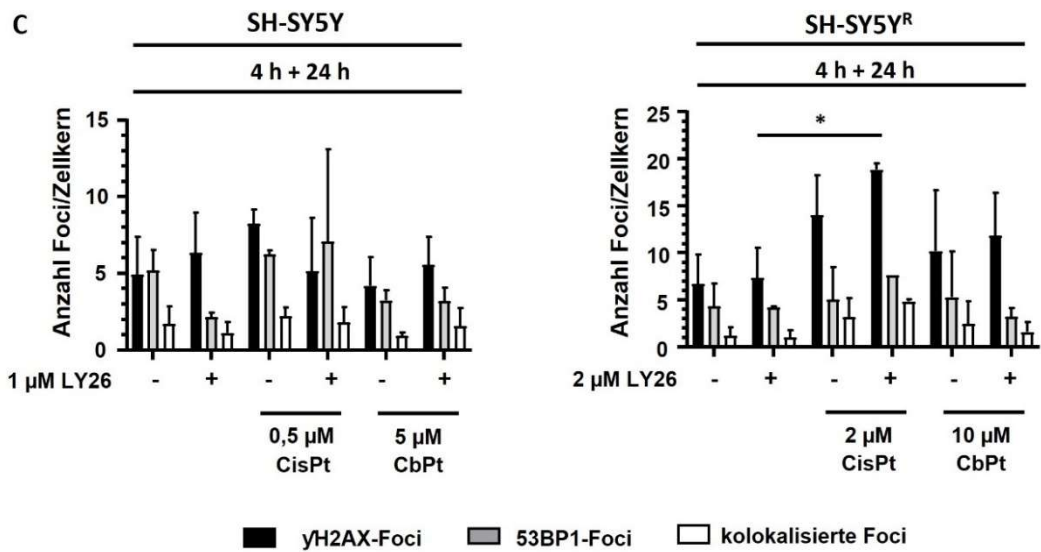
Auf Grundlage dieser Zusammenhänge wurde die Antikörper-basierte Fluoreszenzmarkierung und -detektion von γ H2AX und 53BP1 auch in dieser Arbeit zur quantitativen Darstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen genutzt. Es wurde untersucht, in welchem Ausmaß eine Behandlung mit Cis- bzw. Carboplatin Doppelstrangbrüche induziert und ob der Zusatz von LY2603618 das Ausmaß der gebildeten Doppelstrangbrüche verändern kann. Zudem wurde überprüft, ob die Cisplatin-resistente Zelllinie SH-SY5Y^R in gleichem oder geringerem Maße Doppelstrangbrüche ausbildet als wildtypische SH-SY5Y-Zellen. Dazu wurden die Neuroblastomzellen der Linien SH-SY5Y und SH-SY5Y^R für 4 h mit Konzentrationen aus den Bereichen der IC₂₀ behandelt und jeweils nach 0 h, 2 h und 24 h Agenzien-freier Postinkubationszeit analysiert. Untersucht und dargestellt wurden sowohl γ H2AX-Foci und 53BP1-Foci, als auch die in der Übereinanderlagerung beider Fluoreszenzkanäle ausgezählten kolokalisierten Foci (Abbildung 3.9).

Grundsätzlich fiel die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro ausgewerteter Zelle hier höher aus als die Anzahl der 53BP1-Foci. Die Anzahl der kolokalisierten Foci war in beiden Zelllinien und unter allen untersuchten Bedingungen noch einmal deutlich geringer als die der γ H2AX- und 53BP1-Foci. Die Zahl der γ H2AX-Foci zeigte dabei unter Einfluss der Behandlung die größte Variabilität. Es ist zu erwähnen, dass auch die unbehandelten Kontrollzellen Foci aufwiesen. Nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin oder auch dem CHK1-Inhibitor LY2603618 alleine war in beiden Zelllinien stets zu mindestens einem der drei untersuchten Zeitpunkte die Tendenz zu einer erhöhten Anzahl an γ H2AX- ,

53BP1-Foci und kolokalisierten Foci erkennbar (Abbildung 3.9). Nach Monobehandlung mit LY2603618 zeigte sich bereits früh eine vermehrte Bildung von γ H2AX-Foci, die bei SH-SY5Y-Zellen 2 h nach Behandlung und bei SH-SY5Y^R-Zellen bereits 0 h nach Behandlung ihr Maximum erreichte. Danach war die Anzahl der Foci jeweils wieder leicht rückläufig. Dies deutet auf eine schnelle Induktion von DNA-Schäden durch LY2603618 hin und passt gut zu der im Western Blot ermittelten frühen Aktivierung der DNA-Schadensantwort (siehe Abschnitt 3.1.5).

Die größte Anzahl an Foci pro Zelle wurde bei beiden Zelllinien nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 erreicht. Die verstärkte Foci-Bildung zeigte sich dabei am deutlichsten für γ H2AX mit durchschnittlich 13 Foci pro Zelle 2 h nach Behandlung bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.9 B). Bei SH-SY5Y^R-Zellen trat das Maximum der detektierbaren Foci später ein. Hier waren maximal 18 Foci pro Zelle 24 h nach Behandlung zu verzeichnen (Abbildung 3.9 C).





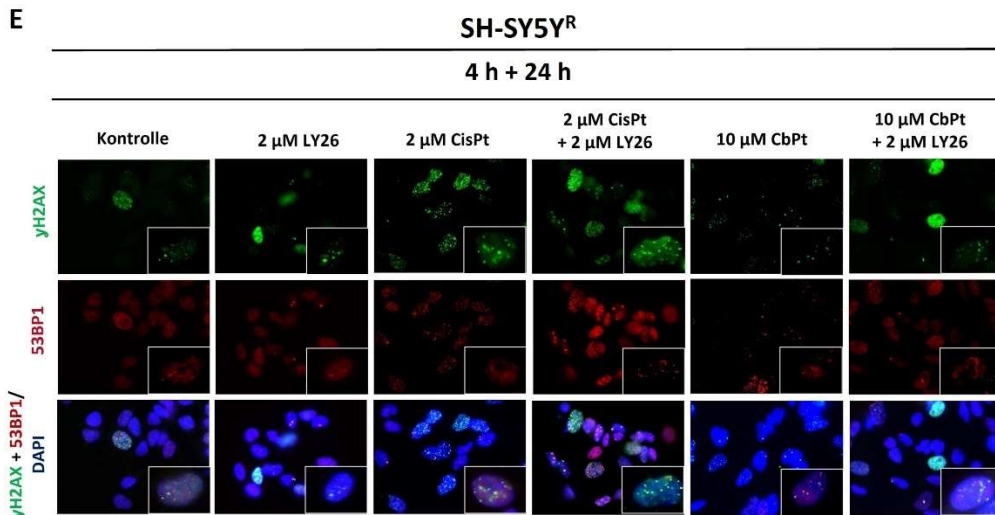


Abbildung 3.9: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 4 h mit Cisplatin (CisPt), Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Unmittelbar nach der Behandlung (A), nach 2 h (B) und nach 24 h Postinkubation (C) wurden yH2AX und 53BP1 immunzytochemisch markiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Pro Bedingung wurden jeweils mindestens 50 Zellkerne ausgewertet und die Anzahl an yH2AX-, 53BP1-Foci und kolokalisierten Foci ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2, N = 2) (A – C) sowie repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der yH2AX-, 53BP1- und kolokalisierten Foci 24 h nach Behandlung (D – E). Dargestellt sind jeweils eine Übersichtsaufnahme sowie eine repräsentative Einzelzelle. Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc Mehrfachvergleich: *p ≤ 0,05.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass die Kombinationsbehandlung mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 und Cisplatin bei beiden Neuroblastomzelllinien tendenziell zu einer erhöhten Anzahl an yH2AX-Foci führte. Dies traf unter den gewählten Bedingungen nicht für die Kombination von Carboplatin und LY2603618 zu. Nach Behandlung mit ungefähr äquitoxischen Konzentrationen aller Substanzen waren bei der Cisplatin-resistenten Zelllinie nicht weniger Foci bzw. mutmaßliche DNA-Doppelstrangbrüche nachweisbar als bei wildtypischen SH-SY5Y-Zellen.

3.1.5 Auswirkungen der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die DNA-Schadensantwort (DDR)

Viele Zytostatika bewirken in Tumorzellen die Entstehung von DNA-Schäden (Woods & Turchi, 2013). Diese werden z. B. durch direkte Modifikation der Basen, durch Interkalation der chemotherapeutischen Agenzien in die DNA oder durch Bildung von DNA-Quervernetzungen induziert (Cheung-Ong *et al.*, 2013). DNA-Schäden bewirken eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort

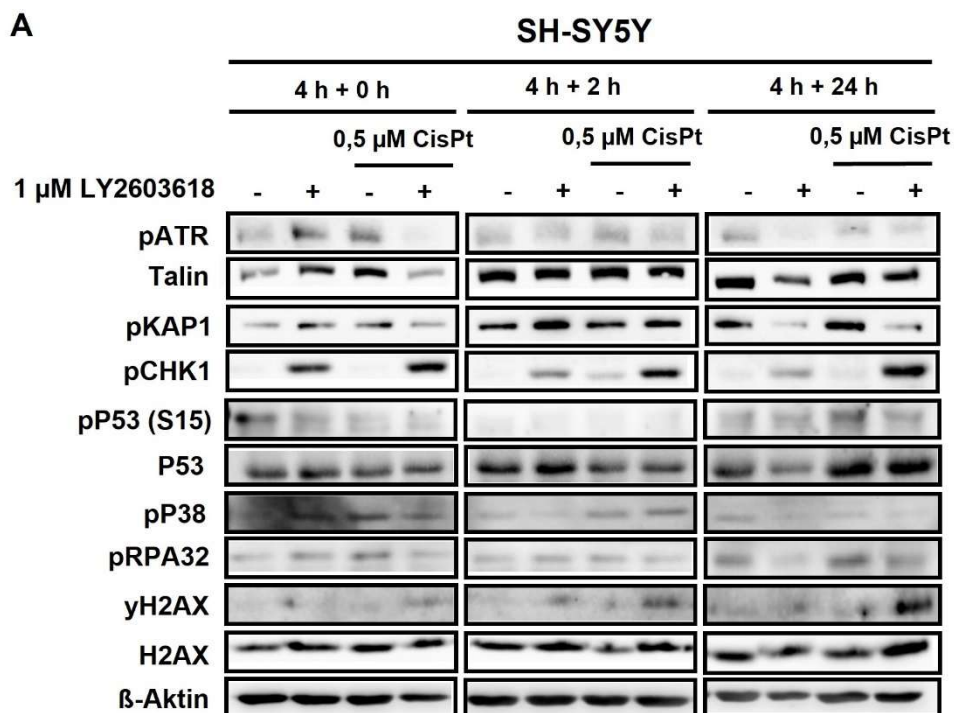
(DDR), die nachgeschaltete Prozesse wie DNA-Reparatur, Zellzyklusprogression und Apoptose steuert (Burgess *et al.*, 2014). Um die DNA-Schadensantwort im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, wurden die Neuroblastomzellen einer vierstündigen Pulsbehandlung ausgesetzt. Wie in allen weiterführenden Experimenten zur Analyse der Mechanismen der Zytotoxizität wurden hier für alle Agenzien Konzentrationen aus den Bereichen der jeweiligen IC₂₀ verwendet.

Um zu ermitteln, welche Signalwege der DNA-Schadensantwort durch Cis- und Carboplatin-Behandlung bei SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen aktiviert und durch LY2603618 moduliert werden, wurden unmittelbar nach Behandlung (0 h) sowie 2 h und 24 h später Western Blot-Analysen durchgeführt. So konnte der zeitliche Verlauf der Aktivierung der Signalwege abgebildet werden, indem Signalproteine der DNA-Schadensantwort bzw. ihr phosphorylierter, aktivierter Zustand über Immunodetektion nachgewiesen wurden.

Die Pulsbehandlung mit Cisplatin löste in SH-SY5Y-Zellen eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort aus, die sich am deutlichsten nach 24 h Postinkubation in Form einer Zunahme der Phosphorylierung von *KRAB-associated protein 1* (KAP1), dem Tumorsuppressor P53 und der 32 kDa-Untereinheit des Replikationsproteins A (RPA32) manifestierte (Abbildung 3.10 A). Ebenso zeigte sich neben der gesteigerten Phosphorylierung auch ein Anstieg bzw. eine Stabilisierung des unphosphorylierten P53. Zwei Stunden nach der Pulsbehandlung bestand eine leichte Aktivierung der Checkpoint-Kinase 1 (CHK1), die nach 24 h bereits wieder rückläufig war. Für die P38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) trat mit zunehmender Postinkubationszeit eher eine Abnahme der Phosphorylierung ein. Bei SH-SY5Y^R-Zellen zeigte sich nach einer äquitoxischen Cisplatinbehandlung ein ähnliches Aktivierungsmuster der DNA-Schadensantwortproteine wie bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.10 B). Die Aktivierung von RPA32 erfolgte bei SH-SY5Y^R-Zellen allerdings etwas früher, da sie bereits nach 0 h Postinkubation sichtbar und dann rückläufig war. Zudem trat nach 24 h Postinkubation bereits eine Phosphorylierung des Histons H2AX (γH2AX) auf, was bei SH-SY5Y-Zellen noch nicht der Fall war. Nach 2 h und 24 h fand sich auch eine größere Menge der phosphorylierten *Ataxia teleangiectasia and RAD3-related*-Kinase (ATR) sowie eine vermehrte Aktivierung des ATR-Zielproteins CHK1 durch Cisplatin-Behandlung als bei SH-SY5Y-Zellen. Der CHK1-Inhibitor LY2603618 bewirkte in beiden Zelllinien vor allem unmittelbar nach Behandlung eine verstärkte CHK1-Phosphorylierung, die innerhalb von 24 h wieder etwas abnahm. Darüber hinaus zeigte sich unregelmäßig die Tendenz einer leichten KAP1-Aktivierung. Anders als bei SH-SY5Y-Zellen induzierte LY2603618 bei SH-SY5Y^R-

Zellen nach 24 h Postinkubation eine sichtbare Hochregulation des Tumorsuppressors P53 (Abbildung 3.10 B).

Die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 bewirkte bei beiden Zelllinien eine stärkere Phosphorylierung von CHK1 als nach Monobehandlung. Zudem trat diese Phosphorylierung bereits unmittelbar nach Behandlung auf und zeigte sich noch nach 24 h Postinkubation. Somit ist nach Kombinationsbehandlung von einem länger auf CHK1 einwirkenden Aktivierungsstimulus auszugehen. Dieser Effekt war bei SH-SY5Y^R-Zellen zu allen Zeitpunkten stärker ausgeprägt als bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.10). Als Hinweis auf eine vermehrte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen waren nach Kombinationsbehandlung bei beiden Zelllinien vor allem nach 24 h erhöhte Mengen an γ H2AX detektierbar. Bei SH-SY5Y^R-Zellen fand sich auch nach 24 h eine deutlich verstärkte KAP1-Phosphorylierung, die bei SH-SY5Y-Zellen hingegen nicht auftrat. Beide Zelllinien zeigten nach Kombinationsbehandlung eine Hochregulation von P53 (Abbildung 3.10). Diese war jedoch nur bei SH-SY5Y^R-Zellen größer als nach Behandlung mit Cisplatin alleine und ging mit einer deutlichen Phosphorylierung von P53 einher.



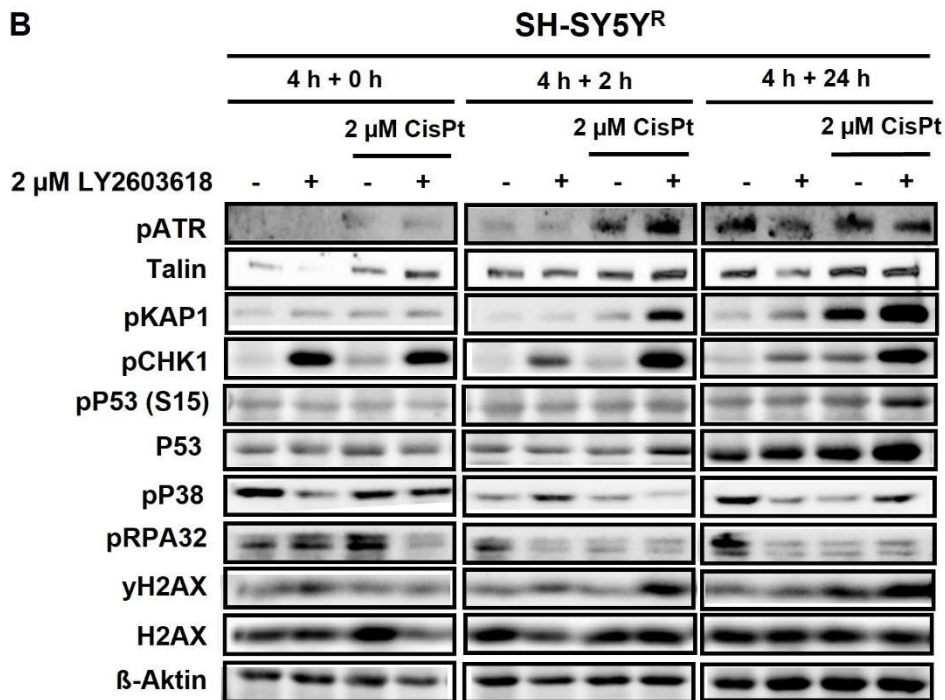
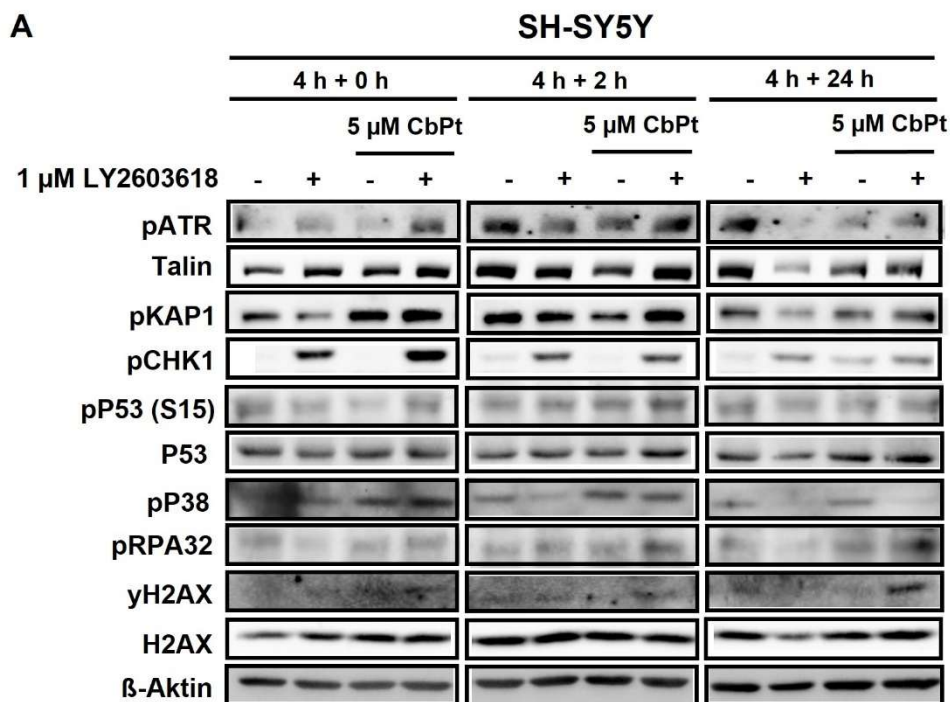


Abbildung 3.10: Einfluss von LY2603618 auf die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 4 h mit Cisplatin (CisPt) und/oder LY2603618 behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Unmittelbar nach der Behandlung (0 h), nach 2 h und nach 24 h Postinkubation wurden zelluläre Proteine extrahiert und der Phosphorylierungsstatus von Faktoren der DNA-Schadensantwort mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrollen wurden β -Aktin und Talin verwendet. Gezeigt sind exemplarische Western Blots. Pos: Positivkontrolle, p: phosphorylierte Form. *cleaved*: proteolytisch aktivierte Form, ATR: *ataxia telangiectasia and RAD3-related kinase*, KAP1: *KRAB-associated protein 1*, CHK1: Checkpoint-Kinase 1, P53: Tumorsuppressorprotein, P38: P38-mitogenaktivierte Proteinkinase, RPA32: 32 kDa-Untereinheit des Replikationsproteins A, yH2AX: Variante des Histons H2A, an Ser139 phosphorylierte Form, H2AX: Variante des Histons H2A.

Vergleicht man die Aktivierung der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit Carboplatin mit der nach äquitoxischer Cisplatin-Exposition, so fällt auf, dass sich sowohl nach Monobehandlung als auch nach Kombinationsbehandlung mit LY2603618 sehr ähnliche Aktivierungsmuster zeigen, jedoch mit einer anderen Kinetik (Abbildung 3.10 und 3.11). Anders als die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin bewirkte die Kombinationsbehandlung mit Carboplatin nicht nach 2 h, sondern erst nach 24 h Postinkubation einen merklichen Anstieg des phosphorylierten H2AX, welcher zudem etwas schwächer ausfiel als bei Cisplatin. Dies gilt für beide Zelllinien und liefert Hinweise auf eine verzögert eintretende und etwas geringere Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Kombinationsbehandlung mit Carboplatin.

Bei den SH-SY5Y-Zellen ließ sich weder nach Mono- noch nach Kombinationsbehandlung mit den Carboplatin und dem CHK1-Inhibitor eine Hochregulation und Phosphorylierung von P53 nachweisen (Abbildung 3.11 A). Bei SH-SY5Y^R-Zellen fielen Hochregulation und Phosphorylierung von P53 geringer aus als nach Mono- und Kombinationsbehandlung mit Cisplatin. Ebenso wie Cisplatin bewirkte auch Carboplatin nach Mono- und Kombinationsbehandlung in SH-SY5Y^R-Zellen nach 2 h bzw. 24 h Postinkubation tendenziell eine Aktivierung von ATR (Abbildung 3.11 B). Bei SH-SY5Y-Zellen konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden, da das Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungsniveau der unbehandelten Kontrolle nicht sichtbar überschritten wurde. Es fällt auf, dass sich nach Kombinationsbehandlung mit Carboplatin bereits unmittelbar nach der Behandlung und somit deutlich früher als nach Kombination mit Cisplatin eine verstärkte KAP1-Phosphorylierung in beiden Zelllinien zeigte (Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11). Konstant zeigt sich hingegen, dass pP38 im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Proteinen durch jedes der Agenzien und bei beiden Zelllinien nach 24 h Postinkubation vermindert phosphoryliert und aktiviert wurde.



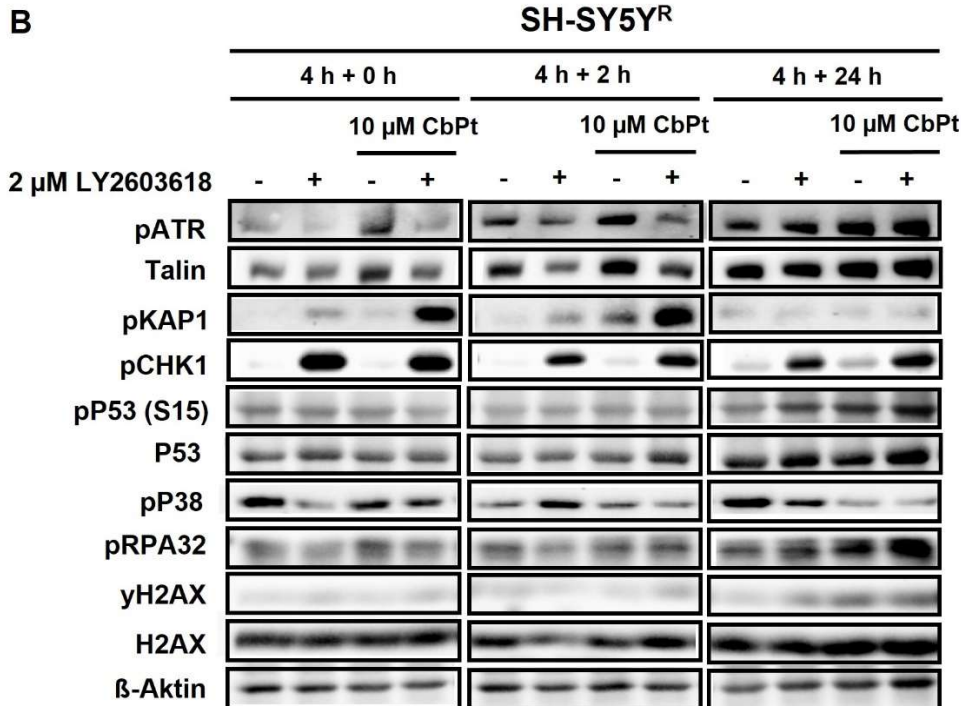


Abbildung 3.11: Einfluss von LY2603618 auf die Carboplatin-induzierte DNA-Schadensantwort

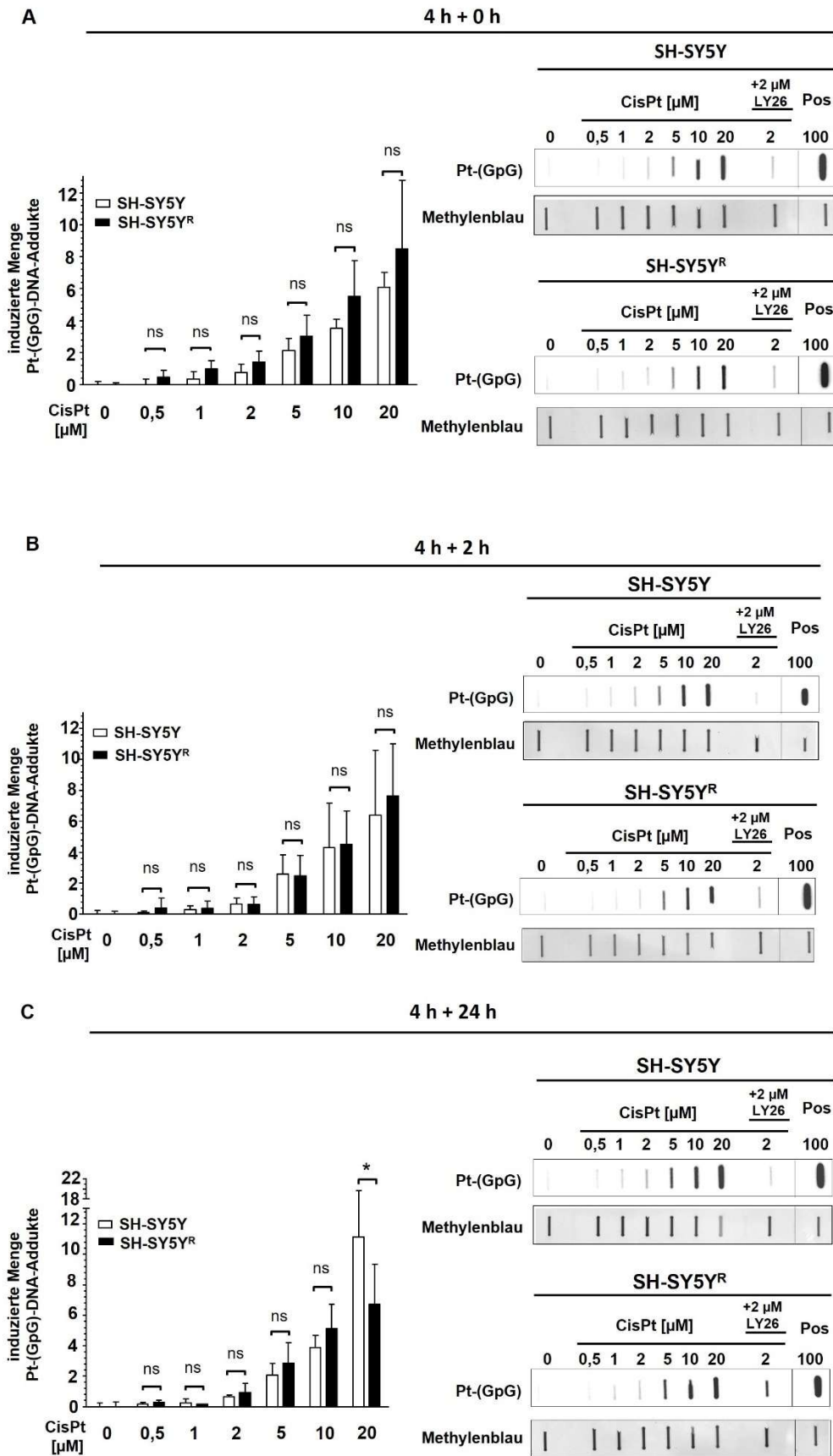
SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 4 h mit Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Unmittelbar nach der Behandlung (0 h), nach 2 h und nach 24 h Postinkubation wurden zelluläre Proteine extrahiert und der Phosphorylierungsstatus von Faktoren der DNA-Schadensantwort mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrollen wurden β -Aktin und Talin verwendet. Gezeigt sind exemplarische western Blots. Pos: Positivkontrolle. p: phosphorylierte Form. *cleaved*: proteolytisch aktivierte Form, ATR: *ataxia telangiectasia and RAD3-related kinase*, KAP1: *KRAB-associated protein 1*, CHK1: Checkpoint-Kinase 1, P53: Tumorsuppressorprotein, P38: P38-mitogenaktivierte Proteinkinase, RPA32: 32 kDa-Untereinheit des Replikationsproteins A, yH2AX: Variante des Histons H2A, an Ser139 phosphorylierte Form, H2AX: Variante des Histons H2A.

Zusammenfassend bewirkte eine Monobehandlung mit Cisplatin und Carboplatin in beiden Zelllinien eine Aktivierung von Signalwegen der DNA-Schadensantwort, die nach Carboplatin-Behandlung etwas geringer ausfiel als nach Behandlung mit äquitoxischen Konzentrationen von Cisplatin. Eine Kombinationsbehandlung mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618, welcher alleine vor allem eine starke Phosphorylierung von CHK1 selbst bewirkte, führte zu einer Verstärkung der durch die Platinverbindungen alleine hervorgerufenen Hochregulation und Phosphorylierung von P53. Zudem stieg die Menge an phosphoryliertem Histon H2AX und phosphorylierter CHK1-Kinase. Die Aktivierung von CHK1 fiel in SH-SY5Y^R-Zellen stärker aus, sodass die ATR-CHK1-Signalkaskade in SH-SY5Y^R-Zellen etwas stärker aktiviert zu werden scheint als in SH-SY5Y-Zellen.

3.1.6 Einfluss einer Behandlung mit Cisplatin und dem CHK1-Inhibitor auf die Entstehung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen

Eine Resistenz gegenüber Cisplatin kann durch unterschiedliche Prozesse verursacht werden. Dazu zählen z. B. verminderter Transport in die Zelle, gesteigerter Efflux oder Verminderung der Toxizität durch gesteigerte Bereitstellung detoxifizierender Substanzen wie Glutathion (Galluzzi *et al.*, 2012). Andere Resistenzmechanismen hingegen greifen, indem durch Hochregulation von Faktoren der DNA-Reparatur DNA-Schäden nach ihrer Entstehung effizienter repariert werden (Bhattacharjee *et al.*, 2022). Um den Resistenzmechanismus bei Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y^R genauer zu spezifizieren und den zusätzlichen zytotoxischen Effekt der Kombinationsbehandlung mit LY2603618 mechanistisch zu untersuchen, wurde die Ausbildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen sowohl in SH-SY5Y- als auch in SH-SY5Y^R-Zellen analysiert. Dazu wurden die Zellen für 4 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin behandelt und die Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen unmittelbar danach sowie nach weiteren 2 h und 24 h Inkubation in Cisplatin-freiem Medium analysiert. Letztere Zeitpunkte dienten der Erfassung von sowohl verzögert gebildeten Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen als auch von etwaigen Reparaturprozessen und ihrer Kinetik. Die Detektion der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen erfolgte mittels Southwestern Blot-Analyse mithilfe eines spezifisch gegen diese Cisplatin-Addukte gerichteten Antikörpers.

Es konnte gezeigt werden, dass die Menge der Cisplatin-induzierten Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mit steigender Cisplatin-Konzentration deutlich zunahm (Abbildung 3.12 A-C). Nach 2 h und 24 h Postinkubation zeigten sich nicht signifikant mehr oder weniger Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen als unmittelbar nach Behandlung. Dies spricht sowohl gegen eine nachträgliche Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen durch bereits in die Zelle aufgenommenes Cisplatin als auch gegen eine in diesem Zeitraum einsetzende Reparatur. Lediglich nach Behandlung mit 20 µM Cisplatin bestand in SH-SY5Y-Zellen 24 h nach der vierstündigen Exposition (Abbildung 3.12 C). Die SH-SY5Y^R-Zellen zeigten auch bei 20 µM Cisplatin nach 24 h keinen weiteren Anstieg der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen und wiesen bei dieser Konzentration signifikant weniger Addukte auf als die SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.12 C).



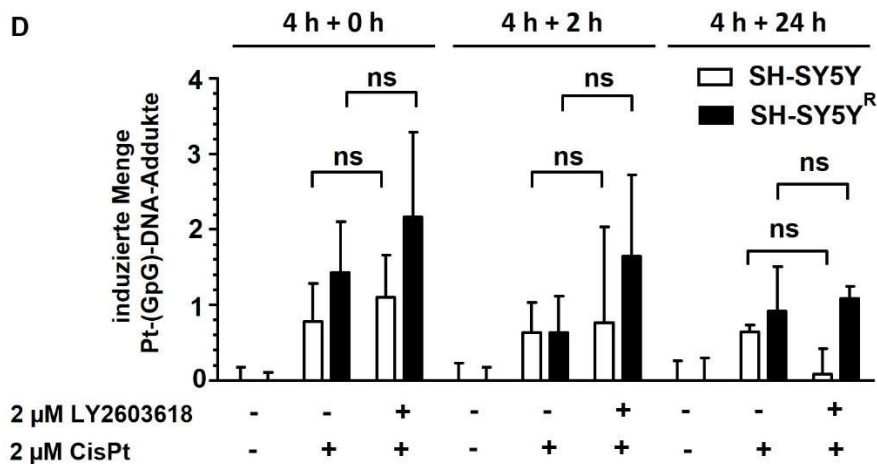


Abbildung 3.12: Einfluss von Cisplatin und LY2603618 auf die Bildung Cisplatin-induzierter Pt-(GpG)-Intrastrang-Verknüpfungen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 4 h mit aufsteigenden Konzentrationen von Cisplatin (CisPt) oder mit 2 µM CisPt und 2 µM LY2603618 (LY26) behandelt. Unmittelbar nach der Behandlung (0 h), nach 2 h und nach 24 h Postinkubation wurde die DNA isoliert und die Menge der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mittels Southwestern Blot analysiert. Das Hintergrundsignal der DNA unbehandelter Kontrollzellen wurde subtrahiert. Als Positivkontrolle wurde DNA nach einer Behandlung mit 100 µM Cisplatin gewählt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Normierung auf die jeweils aufgetragene DNA-Menge (Methylenblaufärbung). Gezeigt sind exemplarische Blots aus unabhängigen Versuchen (A-C) sowie densitometrische Auswertungen (Signalintensität der unbehandelten Kontrollzellen = 0) (A-D). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus jeweils 2 – 3 unabhängigen in Triplikaten durchgeführten Experimenten (n = 2 – 3, N = 3). Statistik: zweifaktorielle ANOVA mit Sidak's Post-Hoc-Mehrfachvergleich: *p ≤ 0,05.

Um den Einfluss von LY2603618 auf die Entstehung von DNA-Schäden unter Cisplatin-Behandlung zu analysieren, wurde die Menge an Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach 24 h Kombinationsbehandlung mit 2 µM Cisplatin und 2 µM LY2603618 untersucht. Nach 24 h Monobehandlung mit 2 µM Cisplatin zeigte sich kein Unterschied in der Menge der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen. Nach 24 h Kombinationsbehandlung mit LY2603618 zeigte sich bei beiden Zelllinien eine signifikant höhere Menge an Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen als nach Exposition gegenüber Cisplatin alleine (Abbildung 3.13). Demnach ist von einer gesteigerten Bildung oder einer verminderten Reparatur von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen durch Kombination mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 auszugehen. Dies betraf wildtypische und Cisplatin-resistente Zellen gleichermaßen.

Die 4 h Pulsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 bewirkte bei beiden Zelllinien zu keinem Zeitpunkt eine stärkere Induktion von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen als die Monobehandlung mit Cisplatin (Abbildung 3.12 D).

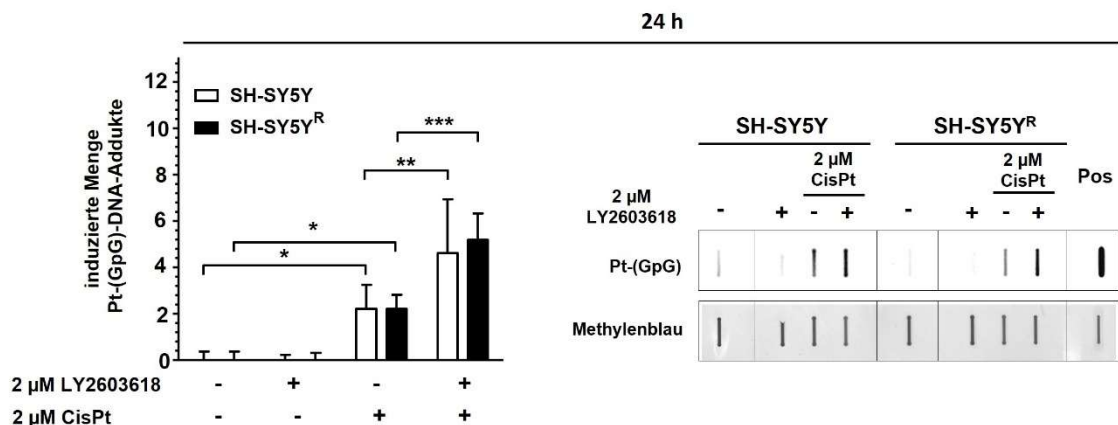


Abbildung 3.13: Einfluss einer Cisplatin- und LY2603618-Dauerbehandlung auf die Bildung Cisplatin-induzierter Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 24 h mit 2 µM Cisplatin (CisPt) und 2 µM LY2603618 behandelt. Danach wurde die DNA isoliert und die Menge der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen mittels Southwestern Blot analysiert. Das Hintergrundsignal der DNA unbehandelter Kontrollzellen wurde subtrahiert. Als Positivkontrolle wurde DNA nach einer Behandlung mit 100 µM Cisplatin gewählt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Normierung auf die jeweils aufgetragene DNA-Menge (Methylenblaufärbung). Gezeigt ist ein exemplarischer Blot aus unabhängigen Versuchen sowie eine densitometrische Auswertung (Signalintensität der unbehandelten Kontrollzellen = 0). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus jeweils 2 – 3 unabhängigen in Triplikaten durchgeführten Experimenten (n = 2 – 3, N = 3). Statistik: zweifaktorielle ANOVA mit Sidak's Post-Hoc-Mehrfachvergleich: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

Zusammenfassend induzierten geringe äquimolare Cisplatin-Konzentrationen bei SH-SY5Y-Zellen und SH-SY5Y^R-Zellen bei einer 4 h Pulsbehandlung nicht signifikant unterschiedliche Mengen an Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen. Zudem zeichnete sich bei beiden Zelllinien unter Dauerbehandlung mit Cisplatin eine vermehrte Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen durch Kombination mit LY2603618 ab.

3.1.7 Einfluss von Cisplatin und LY2603618 auf die Expression von ausgewählten Cisplatin-Resistenzfaktoren

Um auf mechanistischer Ebene genauer zu beleuchten, worauf die Cisplatin-Resistenz bei den SH-SY5Y^R-Zellen basiert, wurde die Expression von Genen analysiert, die mit Cisplatin-Resistenz in Tumoren assoziiert sind (Galluzzi *et al.*, 2012). Dazu zählen Gene, die Apoptose bzw. Zellüberleben steuern, Gene für Transporter, die Import und Efflux von Cisplatin regulieren und Gene für Enzyme der antioxidativen Stressantwort der Zelle. Während die Genprodukte der letzten beiden Kategorien die effektiv zellschädigend wirksame Cisplatin-Konzentration senken, so können auch DNA-Reparatur-

Faktoren hochreguliert sein, die bereits entstandene DNA-Schäden reparieren und die Cisplatin-Sensitivität der Zellen so herabsetzen (Galluzzi *et al.*, 2012).

Für die Expressionsanalyse der mit Cisplatin-Resistenz assoziierten Gene wurden SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen für 24 h oder 72 h mit Cisplatin oder mit Cisplatin und dem CHK1-Inhibitor LY2603618 behandelt. Ziel war es, zu überprüfen, welche Gene durch Cisplatin-Exposition verstärkt exprimiert werden und ob die Zugabe von LY2603618 die Expression Cisplatin-Resistenz-assoziiierter Gene verändert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden hier äquimolare Konzentrationen der Substanzen verwendet. Die nach Behandlung detektierten mRNA-Mengen wurden jeweils auf die mRNA-Mengen in unbehandelten Kontrollzellen der entsprechenden Zelllinie normiert (Abbildung 3.15). Um die basale Expression in beiden Zelllinien zu vergleichen, wurden die basalen mRNA-Mengen in SH-SY5Y^R-Zellen separat auch auf die mRNA-Mengen in SH-SY5Y-Zellen (= 1) normiert und in einem separaten Diagramm dargestellt (Abbildung 3.14). Es handelt sich daher um eine relative Quantifizierung, die keine Aussage über die absoluten mRNA-Mengen ermöglicht. Veränderungen der mRNA-Menge um den Faktor 2 und 0,5 wurden als Grenzwerte für die biologische Relevanz der Expressionsveränderungen determiniert.

Als biologisch relevant betrachtete Unterschiede in der basalen Expression zeigten sich für mehrere Gene, die mit Apoptose und Zellüberleben in Zusammenhang stehen. So wiesen SH-SY5Y^R-Zellen eine geringere Menge des Caspase-Inhibitors *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5* (*BIRC5/Survivin*) und eine höhere Menge an *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B* (*DYRK1B*) auf. Zudem wird in diesen basal eine größere Menge der mRNA von *GSTM1* - einem Enzym der oxidativen Stressantwort - sowie eine größere Menge von *MRP2* - einem Efflux-Transportprotein - exprimiert. Die basale Expression von DNA-Reparatur-Genen hingegen unterschied sich zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen nicht (Abbildung 3.14). Für die an der Implementierung der Apoptose beteiligte Protease Calpain sowie für die Initiator-Caspase 9 und die Effektor-Caspase 6 konnten bei SH-SY5Y^R-Zellen basal fast doppelt so hohe mRNA-Mengen verzeichnet werden wie bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.14). Die zuletzt genannten Ergebnisse entsprechen zunächst nicht den erwarteten Veränderungen, da sie auf ein pro-apoptotisches Gleichgewicht in der Cisplatin-resistenten Zelllinie hindeuten.

Betrachtet man die Expression der Apoptose- und *Survival*-assoziierten Gene nach 24 h Einwirkung von 2 µM Cisplatin, so zeigte sich bei SH-SY5Y-Zellen eine Herunterregulation von *BIRC5/Survivin*. Zudem wurde der pro-apoptotische *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) associated factor 1* (*XAF1*)

in SH-SY5Y^R-Zellen auf etwa das 25-fache der Menge der unbehandelten SH-SY5Y-Kontrollzellen hochreguliert, während eine deutliche Veränderung in SH-SY5Y selbst ausblieb. Nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 zeigten sowohl SH-SY5Y- als auch SH-SY5Y^R-Zellen eine weitere Verminderung der Menge an *BIRC5/Survivin*-mRNA verglichen mit der Menge nach Cisplatin-Behandlung alleine (Abbildung 3.15 A und B). Anders als nach alleiniger Cisplatin-Exposition bewirkte die Kombinationsbehandlung in beiden Zelllinien einen Anstieg der *XAF1*-mRNA auf das 2 - 3-fache der Menge in den Kontrollzellen. Für SH-SY5Y^R-Zellen war *XAF1* somit nach Kombinationsbehandlung deutlich weniger stark hochreguliert als nach alleiniger Cisplatin-Behandlung. Für die anderen Apoptose-assoziierten Gene zeigten sich keine weiteren Veränderungen oder allenfalls leichte Tendenzen in Richtung einer unter Cisplatin-Behandlung und Kombinationsbehandlung sukzessive gesteigerten Expression wie z. B. bei *Calpain*. Anders als die unter Behandlung gesteigerte Proteinmenge vermuten lässt (Abschnitt 3.1.3 und 3.1.5), scheint der Tumorsuppressor *P53* zumindest nach 24-stündiger Behandlung nicht vermehrt auf mRNA-Ebene nachweisbar zu sein (Abbildung 3.15 A und B).

Unter den untersuchten Import- und Export-Proteinen bzw. Transportern zeigten sich nicht nur basal ausschließlich beim Efflux-Transporter *MRP2* signifikante Veränderungen. Auch nach Behandlung veränderte sich die Expression von *copper transport protein 1 (CTR1)* und *ATPase copper transporting alpha (ATP7A)* in beiden Zelllinien nicht. Die *MRP2*-Expression zeigte nur bei SH-SY5Y^R-Zellen Veränderungen im Sinne einer weiteren Hochregulation nach Cisplatin-Behandlung. Nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 entsprach die Menge an *MRP2*-mRNA der basal in SH-SY5Y^R-Zellen exprimierten Menge und fiel damit geringer aus als nach Kombinationsbehandlung (Abbildung 3.15 A und B).

Unter den Enzymen und Faktoren der antioxidativen Stressantwort war für die Glutathion-Peroxidase 1 (*GPX1*) und die Häm-Oxygenase 1 (*HMOX1*) in beiden Zelllinien nach 24 h Kombinationsbehandlung ein etwa 3-4-facher Anstieg der Genexpression zu verzeichnen. Basal unterschieden sich die Mengen nicht, unter Cisplatin-Monobehandlung wiesen *GPX1* und *HMOX* nur bei SH-SY5Y^R-Zellen eine leicht steigende Tendenz auf. In beiden Zelllinien sank die Menge der mRNA von *heat shock protein 90 (HSP90)* nach Kombinationsbehandlung auf etwa die Hälfte der basal vorhandenen Menge. Die *GSTM1*-Expression wurde nach Cisplatin-Behandlung in beiden Zelllinien nicht weiter gesteigert. Nach Kombinationsbehandlung zeigte *GSTM1* einen starken Abfall der mRNA-Menge, allerdings nur bei SH-SY5Y-Zellen.

Die 24-stündige Cisplatin-Exposition bewirkte in beiden Zelllinien tendenziell eine Herunterregulation des an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen beteiligten Tumorsuppressors *breast cancer gene 1* (*BRCA1*), die durch Kombinationsbehandlung mit LY2603618 noch weiter verstärkt wurde. Analog dazu sank auch die Expression von *breast cancer gene 2* (*BRCA2*) deutlich ab, allerdings erst nach Kombinationsbehandlung (Abbildung 3.15 C und D). Dieselbe Tendenz zeigte sich auch beim für die Homologe Rekombination wichtigen Faktor *X-Ray Repair Cross Complementing 3* (*XRCC3*) und beim am Prozess der *Mismatch*-Reparatur beteiligten *MutS-homolog 2* (*MSH2*). Für letzteren Faktor trat die Herunterregulation dabei bei SH-SY5Y-Zellen bereits nach alleiniger Cisplatin-Behandlung ein, wohingegen sich bei SH-SY5Y^R-Zellen erst nach Kombinationsbehandlung eine deutlich geminderte mRNA-Menge zeigte.

Der Transkriptionsregulator *AT-Rich Interaction Domain 1A* (*ARID1A*) war in SH-SY5Y^R- und SH-SY5Y-Zellen basal ähnlich stark exprimiert und wurde durch alle Behandlungen tendenziell herunterreguliert. Erst eine sehr lange Cisplatin-Behandlung von 72 h führte bei SH-SY5Y-Zellen zu einer signifikanten Reduktion von *ARID1A*. SH-SY5Y^R-Zellen wiesen unter diesen Bedingungen zwar auch eine verminderte, aber noch eine signifikant höhere *ARID1A*-Expression auf als SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.15 E und F). Das Proto-Onkogen *N-MYC* wurde in beiden Zelllinien in ähnlichem Ausmaße exprimiert und sowohl durch eine länger andauernde Cisplatin-Behandlung von 72 h als auch durch eine Kombinationsbehandlung mit LY2603618 herunterreguliert (Abbildung 3.15 E und F).

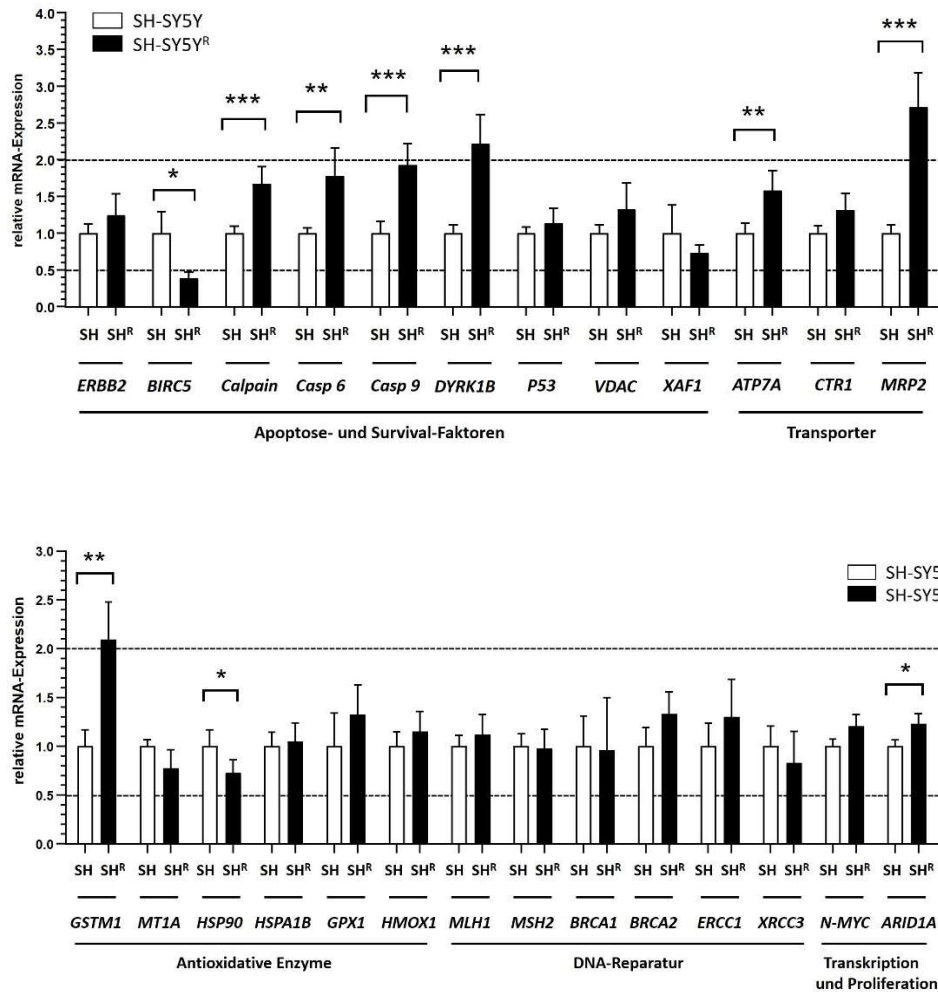


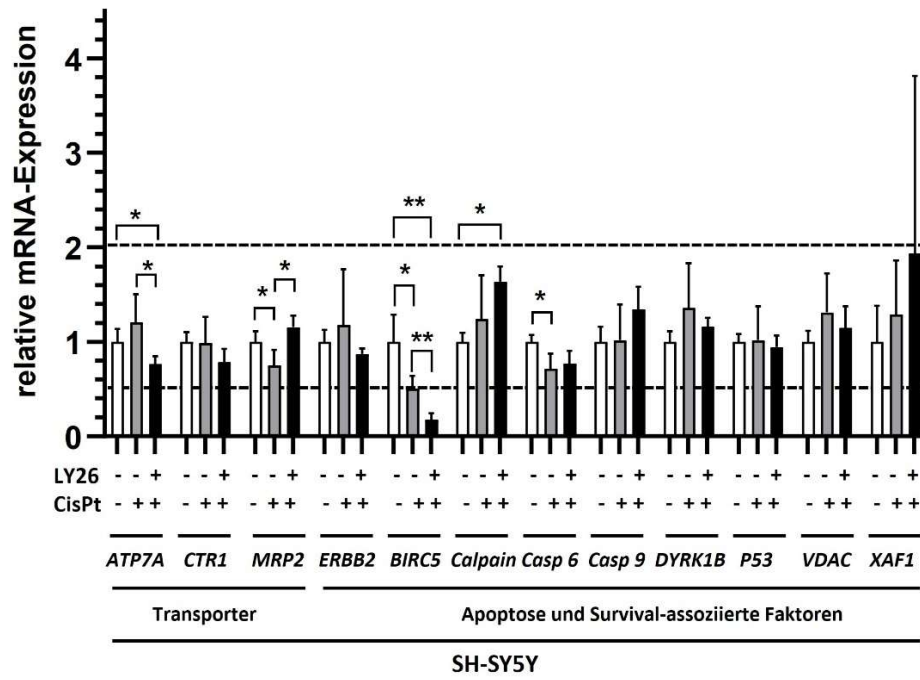
Abbildung 3.14: Die basale mRNA-Expression Cisplatin-Resistenz-assoziiierter Faktoren in SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen

SH-SY5Y (SH)- und SH-SY5Y^R-Zellen (SH^R) wurden für 24 h ohne Zusatz von Cisplatin, Carboplatin oder LY2603618 kultiviert. Anschließend wurde die mRNA-Menge mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD aus Triplikaten einer qRT-PCR ($n = 1$, $N = 3$, mRNA gepoolt aus drei unabhängigen Versuchen). Die mRNA-Expression wurde relativ zur Expression in unbehandelten Zellen der Linie SH-SY5Y nach 24 h dargestellt (Expression in SH-SY5Y = 1). Expressionsunterschiede $\leq 0,5$ und ≥ 2 wurden als biologisch relevant bewertet.

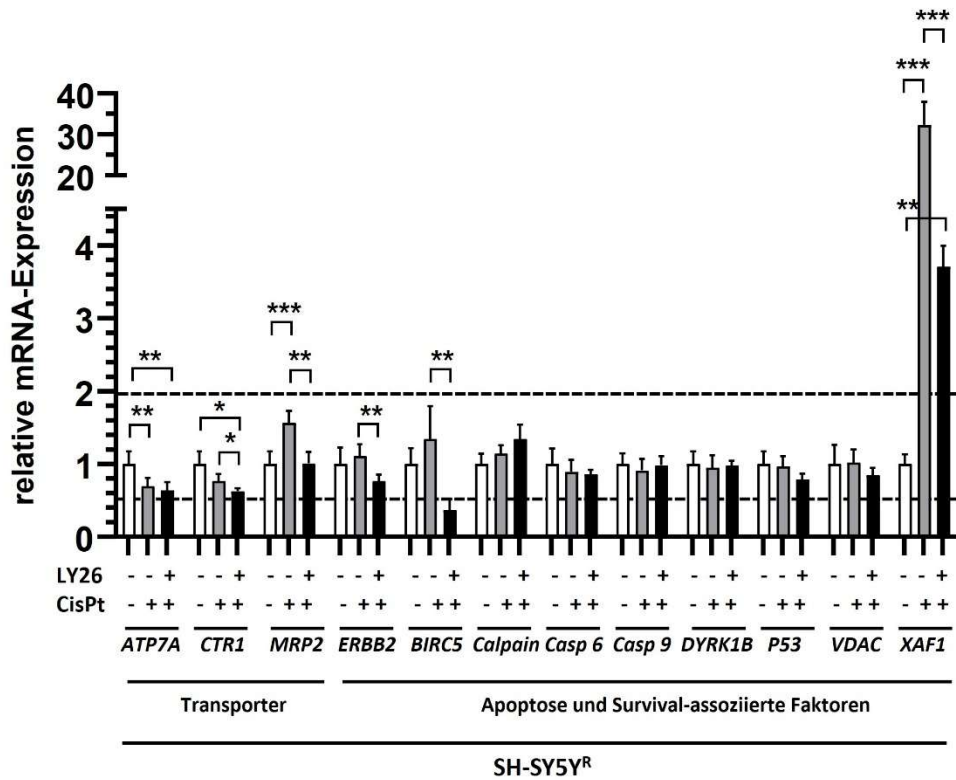
Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

ARID1A: AT-rich interaction domain 1A; ATP7A: ATPase copper transporting alpha; BIRC5: baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; BRCA1: breast cancer gene 1; BRCA2: breast cancer gene 2; Casp 6: Caspase 6; Casp 9: Caspase 9; CTR1: copper transporter 1; DYRK1B: dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B; ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; ERCC1: excision repair cross-complementing 1; GPX1: Glutathion-Peroxidase 1; GSTM1: glutathion S-transferase M1; HMOX1: Häm-Oxygenase 1; HSP90: heat shock protein 90; HSPA-1B: heat shock protein family A (Hsp70) member 1B; MLH1: MutL protein homolog 1; MRP2: multidrug resistance-associated protein 2; MSH2: MutS-homolog 2; MT1A: Metallothionein 1A; N-MYC: Neuroblastoma-Derived V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Related Oncogene; VDAC: voltage-dependent anion-selective channel; XAF1: X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1; XRCC3: X-Ray Repair Cross Complementing 3.

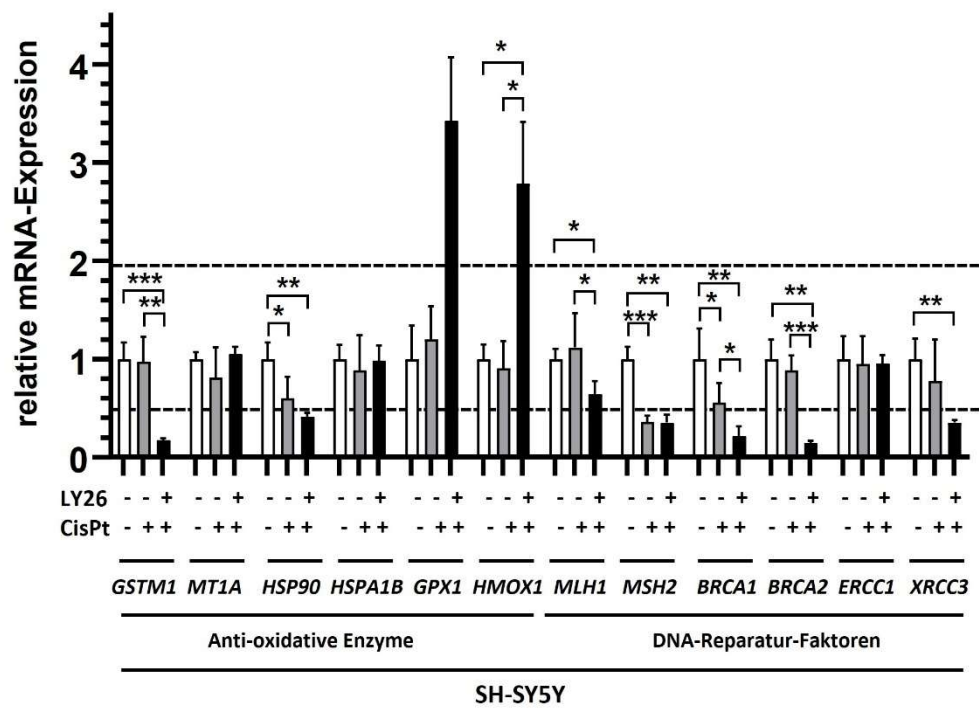
A



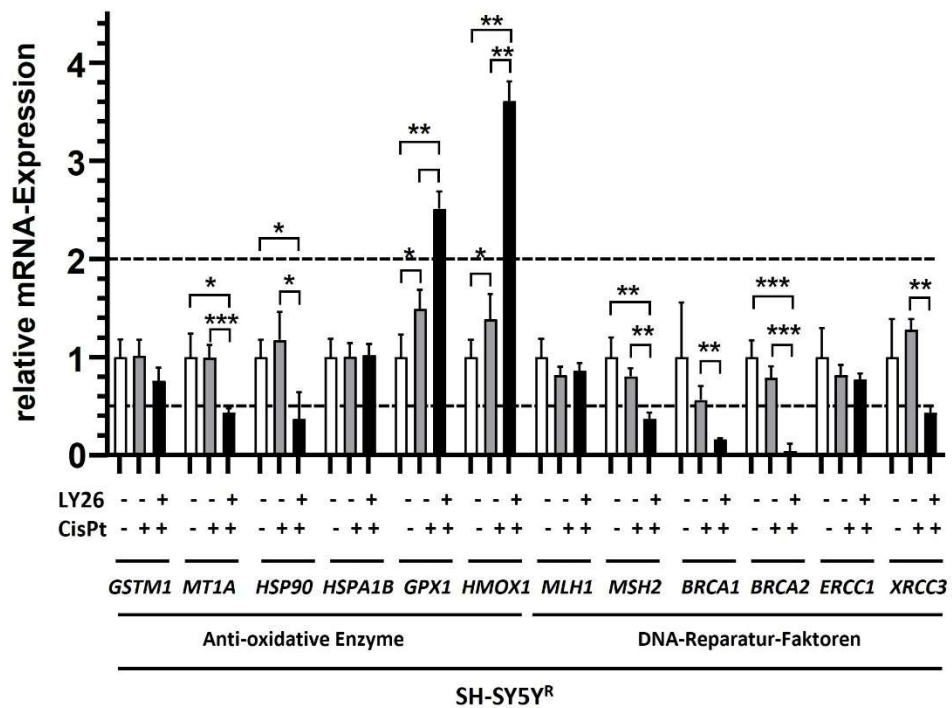
B



C



D



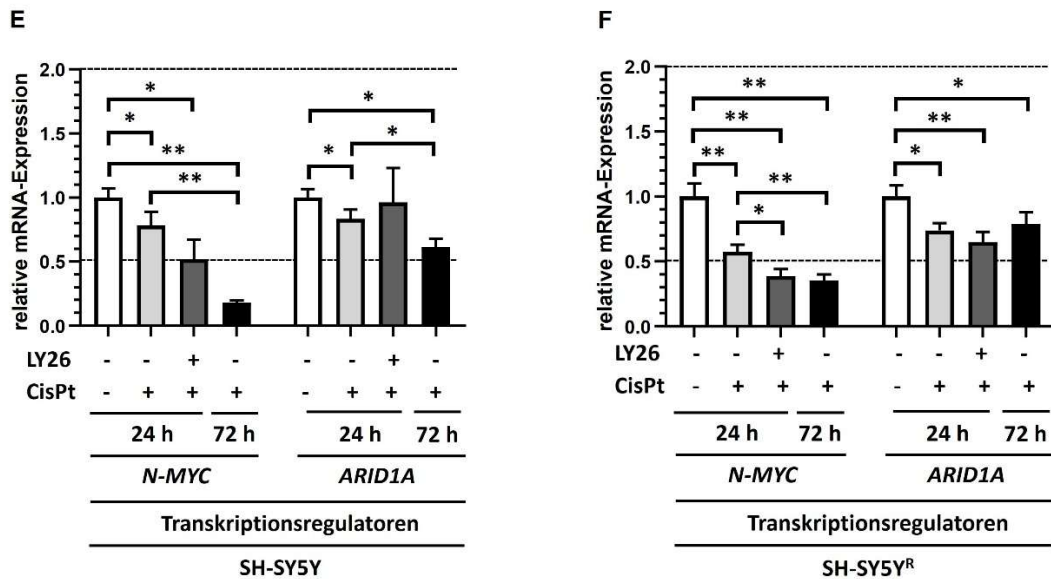


Abbildung 3.15: Einfluss von Cisplatin und LY260318 auf die Expression Cisplatin-Resistenz-assoziiierter Faktoren in SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 24 h bzw. 72 h mit Cisplatin (CisPt) oder für 24 h mit CisPt und LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden Konzentrationen aus Bereichen der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Anschließend wurde die mRNA-Menge mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD aus Triplikaten einer qRT-PCR ($n = 1$, $N = 3$, mRNA gepoolt aus drei unabhängigen Versuchen). Die mRNA-Expression der behandelten Zellen wurde relativ zur Expression in unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie nach 24 h dargestellt (Expression in unbehandelten SH-SY5Y = 1, Expression in unbehandelten SH-SY5Y^R-Zellen = 1). Expressionsunterschiede $\leq 0,5$ und ≥ 2 wurden als biologisch relevant bewertet. Gezeigt ist jeweils die relative mRNA-Expression von Transportern und Apoptose- und Survival assoziierten Faktoren in SH-SY5Y (A) und SH-SY5Y^R (B), die relative mRNA-Expression von Anti-oxidativen Enzymen und DNA-Reparatur-Faktoren in in SH-SY5Y (C) und SH-SY5Y^R (D) und die relative mRNA-Expression von einzelnen Transkriptionsregulatoren in SH-SY5Y (E) und SH-SY5Y^R (F). Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch's-Korrektur: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

ARID1A: AT-rich interaction domain 1A; ATP7A: ATPase copper transporting alpha; BIRC5: baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; BRCA1: breast cancer gene 1; BRCA2: breast cancer gene 2; Casp 6: Caspase 6; Casp 9: Caspase 9; CTR1: copper transporter 1; DYRK1B: dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B; ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; ERCC1: excision repair cross-complementing 1; GPX1: Glutathion-Peroxidase 1; GSTM1: glutathion S-transferase M1; HMOX1: Häm-Oxygenase 1; HSP90: heat shock protein 90; HSPA-1B: heat shock protein family A (Hsp70) member 1B; MLH1: MutL protein homolog 1; MRP2: multidrug resistance-associated protein 2; MSH2: MutS-homolog 2; MT1A: Metallothionein 1A; N-MYC: Neuroblastoma-Derived V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Related Oncogene; VDAC: voltage-dependent anion-selective channel; XAF1: X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1; XRCC3: X-Ray Repair Cross Complementing 3.

Zusammenfassend konnte bei SH-SY5Y^R-Zellen bereits basal eine stärkere Expression des Efflux-Transporters *MRP2*, des antioxidativ wirkenden Enzyms *GSTM1* sowie des Zellüberleben-fördernden Faktors *DYRK1B* nachgewiesen werden als bei SH-SY5Y-Zellen. Die Behandlung mit Cisplatin bewirkte bei SH-SY5Y^R-Zellen im Unterschied zu SH-SY5Y eine weitere Hochregulation von *MRP2* sowie eine Hochregulation von *XAF1*. Die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY26036218 induzierte in beiden Zelllinien eine starke Hochregulation der Expression der antioxidativ wirkenden

Enzyme *GPX1* und *HMOX1*. Zudem bewirkte diese in beiden Zelllinien eine herunterregulierte Expression der DNA-Reparaturfaktoren *BRCA1*, *BRCA2*, *MSH2* und *XRCC3* sowie des Zellüberlebensfördernden Faktors *BIRC5/Survivin*.

3.1.8 Einfluss der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Induktion einer Noradrenerg-Mesenchymalen-Transition (NMT)

Die Umwandlung von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Zelltyp – die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) – wird als ein mit Tumorprogression und Metastasierung verknüpfter Mechanismus betrachtet (Iwatsuki *et al.*, 2010). In der Literatur wird dieser Prozess beim Neuroblastom als nicht epithelialer Tumor auch als Noradrenerg-Mesenchymale Transition (NMT) bezeichnet (Gautier *et al.*, 2021).

Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y bestand die Zellpopulation aus zwei lichtmikroskopisch unterscheidbaren Phänotypen. Darunter befand sich ein eher kleinerer Zelltyp mit verzweigten Zellfortsätzen, der morphologisch verzweigten Neuronen ähnelte. Der zweite Zelltyp wies einen flacheren, deutlich breiteren und unverzweigten Zellkörper auf. Die Morphologie dieser beiden Zelltypen passt zum in der Literatur beschriebenen Konzept der neuroblastischen N-Typ und Substrat-adhärenenten S-Typ-Zellen bei Neuroblastomzellen (Biedler *et al.*, 1973; Gautier *et al.*, 2021). Lichtmikroskopisch fiel zudem auf, dass die Cisplatin-resistente Zelllinie SH-SY5Y^R deutlich mehr Zellen vom zweiten Typ (S-Typ) aufwies und dass die Exposition gegenüber Cisplatin und Carboplatin ebenfalls zu einem relativen Überwiegen dieses flacheren Zelltyps führte (Abbildung 3.16).

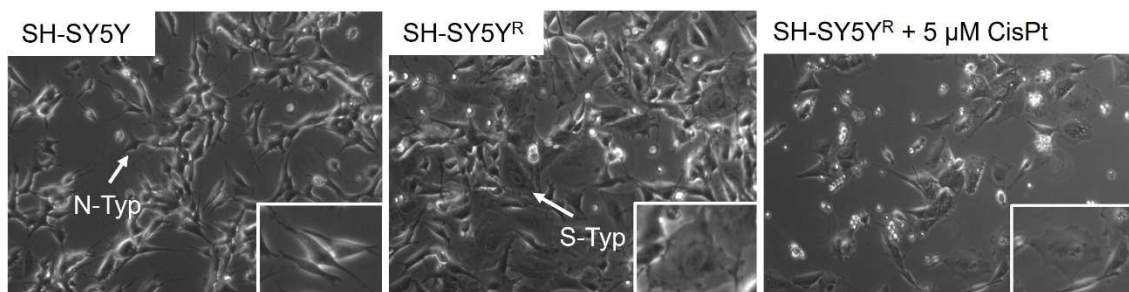


Abbildung 3.16: Einfluss des Cisplatin-Resistenzstatus und einer Cisplatin-Behandlung auf den Phänotyp von SH-SY5Y-Zellen

Dargestellt sind lichtmikroskopische Bilder unbehandelter SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen sowie mit 5 µM CisPt behandelter SH-SY5Y^R-Zellen in der Übersichtsaufnahme sowie repräsentative Einzelzellen.

Um die Fragestellung zu klären, ob auch in Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y eine nachweisbare Induktion von EMT bzw. NMT durch Platinverbindungen erfolgt und ob der CHK1-Inhibitor LY2603618 diesen Prozess beeinflusst, wurden ergänzend zur den lichtmikroskopischen Untersuchungen (Abbildung 3.16) die im folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt. Dabei wurde auch untersucht, ob die in der Cisplatin-resistenten Zelllinie SH-SY5Y^R morphologisch überwiegenen und nach Cisplatin-Behandlung vermehrt auftretenden flachen S-Typ-Zellen tatsächlich einem mesenchymalen Zelltyp entsprechen und Resistenz-assoziiert sein könnten. Dazu wurden die Zellen für 24 h, 48 h und 72 h dauerhaft mit Cisplatin, Carboplatin und/oder LY2603618 behandelt. Verwendet wurden wie in den vorausgegangenen Experimenten Konzentrationen aus den Bereichen der IC₂₀. Anschließend wurden epitheliale bzw. noradrenerge und mesenchymale Marker mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene und mithilfe von Western-Blot-Analysen auf Proteinebene untersucht, um durch Anstieg oder Rückgang der spezifischen Marker auf eine EMT bzw. NMT schließen zu können. Während für die Western Blot-Analysen äquitoxische Konzentrationen zur Behandlung von SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen verwendet wurden, wurden für die Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR der eindeutigeren Vergleichbarkeit wegen äquimolare Stoffkonzentrationen appliziert.

Bei SH-SY5Y^R-Zellen war basal bereits eine größere Menge *N-Cadherin*-mRNA detektierbar als bei SH-SY5Y-Zellen. Nach 72 h Cisplatin-Behandlung wurde *N-Cadherin* in beiden Zelllinien mit knapp mehr als der zweifachen mRNA-Menge als basal relevant mehr exprimiert. Die 24 h Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 steigerte die *N-Cadherin*-Expression bei SH-SY5Y-Zellen nur tendenziell, bei SH-SY5Y^R-Zellen gar nicht (Abbildung 3.17 B und C). Ein Marker für N-Typ-Zellen ist die Dopamin-β-Hydroxylase (DBH), ein Enzym der Noradrenalin-Synthese (Gautier *et al.*, 2021). Das *Dopamin-β-Hydroxylase (DBH)*-Gen wurde bei SH-SY5Y^R-Zellen basal signifikant weniger exprimiert als bei SH-SY5Y-Zellen und wurde nach Kombinationsbehandlung signifikant weiter herunterreguliert. Nach Cisplatin-Monobehandlung zeigten sich für SH-SY5Y^R-Zellen abhängig von der Behandlungsdauer wechselhafte Effekte (Abbildung 3.17 C). Bei SH-SY5Y-Zellen wurde *DBH* vor allem mit zunehmender Dauer der Cisplatin-Behandlung herunterreguliert (Abbildung 3.17 B). Die Expression des Transkriptionsfaktors *Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1)*, welcher morphologisch sichtbar EMT induziert und eine Herunterregulation von *E-Cadherin* sowie eine Hochregulation von *Vimentin* bewirkt (Zhang *et al.*, 2014), wurde ebenfalls auf mRNA-

Ebene quantifiziert. In beiden Neuroblastomzellen konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen der mRNA-Menge von *ZEB1* festgestellt werden.

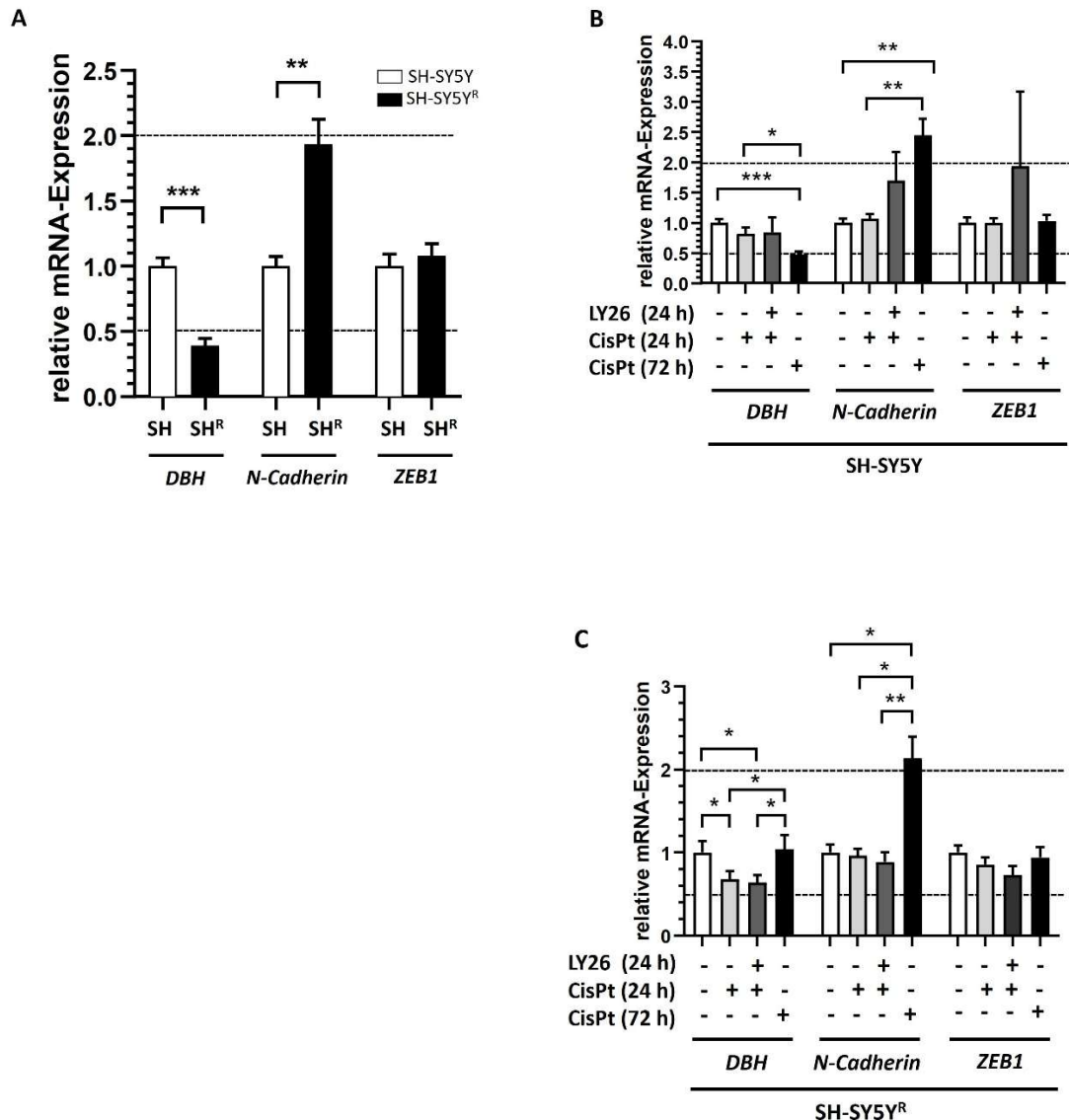


Abbildung 3.17: Einfluss von Cisplatin und LY2603618 auf die mRNA-Expression noradrenerger und mesenchymaler Marker als Indikator einer Noradrenerg-Mesenchymalen Transition (NMT)

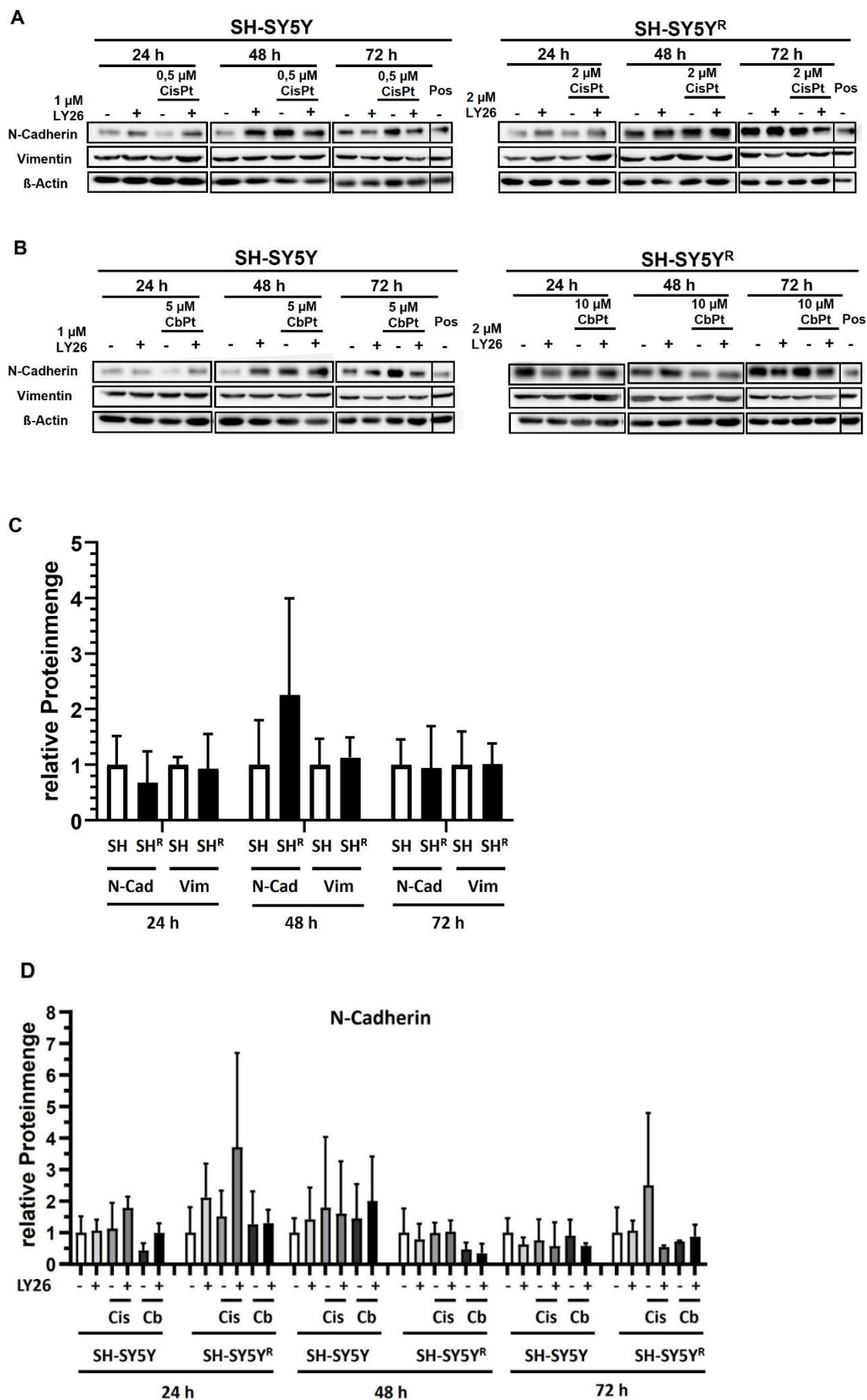
SH-SY5Y (SH)- und SH-SY5Y^R-Zellen (SH^R) wurden für 24 h oder 72 h mit Cisplatin (CisPt) und LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden äquimolare Konzentrationen verwendet (2 μ M Cisplatin, 2 μ M LY2603618). Anschließend wurde die mRNA-Menge mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD aus Triplikaten einer qRT-PCR (n = 1, N = 3, mRNA gepoolt aus drei unabhängigen Versuchen). Gezeigt ist die basale relative mRNA-Expression bei unbehandelten SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen (Expression in unbehandelten SH-SY5Y = 1) (A). Dargestellt ist auch die relative mRNA-Expression der behandelten Zellen relativ zur Expression in unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie nach 24 h (Expression in unbehandelten SH-SY5Y = 1, Expression in unbehandelten SH-SY5Y^R-Zellen = 1) (B und C). Expressionsunterschiede $\leq 0,5$ und ≥ 2 wurden als biologisch relevant bewertet. *DBH*: Dopamin- β -Hydroxylase; *ZEB1* = Zinc finger E-box binding homeobox 1. Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur: *p $\leq 0,05$, ***p $\leq 0,001$.

Auf Proteinebene wurden die Mengen an N-Cadherin und Vimentin evaluiert. Auch Vimentin gilt als wichtiger Marker für eine Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) (Zeisberg & Neilson, 2009).

Korrelierend zur entsprechenden mRNA-Menge wiesen SH-SY5Y^R-Zellen auch auf Proteinebene bereits basal tendenziell mehr des EMT-fördernde Adhäsionsmoleküls N-Cadherin auf als SH-SY5Y-Zellen, allerdings nur nach 48 h und nicht statistisch signifikant (Abbildung 3.18 A – C). N-Cadherin wurde zudem mit steigender Kultivierungsdauer in beiden Zelllinien heraufreguliert. Dieser Effekt ist in den Western Blot-Banden erkennbar (Abbildung 3.18 A und B), kommt jedoch in den densitometrischen Auswertungen nicht zur Darstellung, da dabei auf die Proteinmenge in unbehandelten Kontrollzellen zum gleichen Zeitpunkt normiert wurde.

N-Cadherin wurde bei SH-SY5Y-Zellen auf Proteinebene sowohl nach Monobehandlung mit Cis- bzw. Carboplatin, als auch nach Kombinationsbehandlung mit Cis- oder Carboplatin und LY2603618 zumindest zu einem der gemessenen Zeitpunkte tendenziell hochreguliert (Abbildung 3.18 A, B, D). Bei SH-SY5Y^R-Zellen kamen nach 72 h Monobehandlung mit Cisplatin sowie nach 24 h Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 deutliche Anstiege der N-Cadherin-Menge zur Darstellung, welche bei SH-SY5Y-Zellen deutlich geringer ausfielen (Abbildung 3.18 D). Die Kombinationsbehandlung bewirkte hier einen schnelleren und auch leicht höheren N-Cadherin-Anstieg als die Monobehandlung. Tendenzuell führte die Kombinationsbehandlung auch bei SH-SY5Y-Zellen zu ganz geringfügig höheren N-Cadherin-Mengen als die Monobehandlung.

Die Menge des zweiten untersuchten mesenchymalen Markers Vimentin war in beiden Zelllinien basal ähnlich hoch und unterlag in beiden Zelllinien weniger deutlichen Behandlungs-induzierten Veränderungen (Abbildung 3.18 A, B, C und E). Hierbei fällt jedoch auf, dass die tendenziell größeren Vimentin-Mengen ebenso wie bei N-Cadherin bei SH-SY5Y^R-Zellen nach 24 h Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 und nach 72 h Monobehandlung mit Cisplatin auftraten (Abbildung 3.18 E).



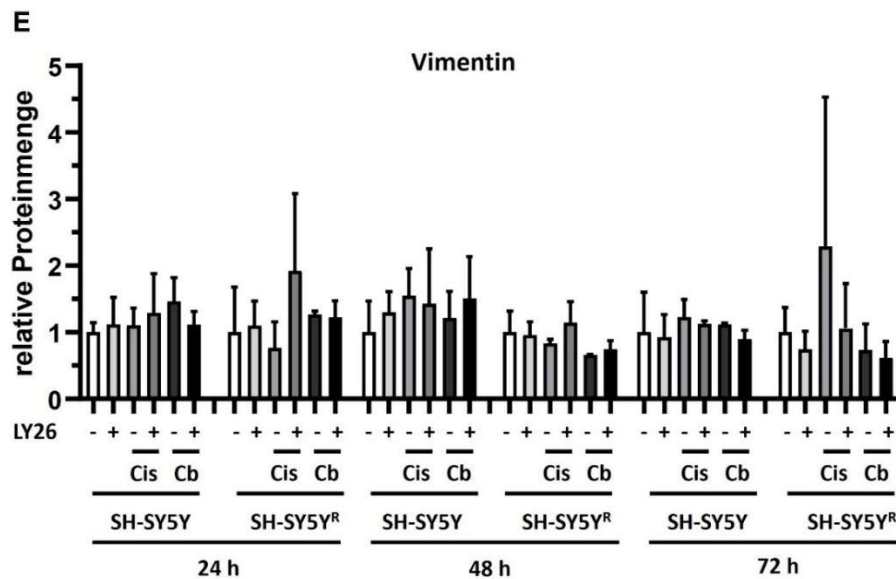


Abbildung 3.18: Einfluss der Platinverbindungen und LY2603618 auf die Proteinmenge noradrenerger und mesenchymaler Marker als Indikator einer Noradrenerg-Mesenchymalen Transition (NMT)

SH-SY5Y (SH)- und SH-SY5Y^R-Zellen (SH^R) wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit Cisplatin (CisPt, Cis), Carboplatin (CbPt, Cb) und/oder LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden äquitoxische Konzentrationen im Bereich der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels Western Blot analysiert. Eine Visualisierung von β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Gezeigt sind exemplarische Western Blots (A und B). Die Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet (n = 2, N = 1). Dargestellt sind die Mittelwerte der basalen relativen Proteinmengen von N-Cadherin (N-Cad) und Vimentin (Vim) nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Proteinmenge bei SH-SY5Y^R wurde relativ zur Proteinmenge bei SH-SY5Y zum jeweiligen Zeitpunkt dargestellt (Proteinmenge in SH-SY5Y = 1) (C). Gezeigt sind zudem die Mittelwerte der relativen Proteinmengen von N-Cadherin (D) und Vimentin (E) nach 24 h, 48 h und 72 h Behandlung bei SH-SY5Y und SH-SY5Y^R. Die Proteinmengen wurden jeweils auf die Proteinmenge der unbehandelten Kontrollzellen der jeweiligen Zelllinie zum gleichen Zeitpunkt dargestellt (Proteinmenge in SH-SY5Y unbehandelt = 1, Proteinmenge in SH-SY5Y^R unbehandelt = 1). Statistik: ungepaarter t-Test.

Insgesamt betrachtet deuten die Ergebnisse der EMT- bzw. NMT-Marker-Analysen stark darauf hin, dass die Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen bereits basal vermehrt Zellen des mesenchymalen Phänotyps aufweisen. Beide Zelllinien wiesen spätestens nach 72 h Cis- oder Carboplatin-Behandlung eine mindestens leichte Hochregulation des mesenchymalen Markers *N-Cadherin* sowie eine Herunterregulation des noradrenergen Markers *DBH* auf. Die Kombinationsbehandlung mit LY2603618 bewirkte nach 24 h und 48 h auf Proteinebene keine weiteren Veränderungen der NMT-Marker gegenüber der Behandlung mit Cis- oder Carboplatin alleine. *ZEB1* zeigte keine Induktion oder Herunterregulation.

3.2 Einfluss des CHK1-Inhibitors LY2603618 auf die Zytotoxizität der Platinverbindungen bei humanen renalen proximalen Tubuluszellen

Um den Aspekt der Nephrotoxizität der Platinverbindungen in die Analysen miteinzubinden und vor allem eine mögliche unerwünschte Verstärkung der nephrotoxischen Wirkung durch die Kombination der Platinverbindungen mit LY2603618 nicht zu übersehen, wurden ergänzend die Effekte der Behandlung auf Nierenzellen untersucht. Da vor allem proximale Nierentubulusepithelien von Platin-induzierter Nekrose betroffen sind (Leonard *et al.*, 1971), wurden hier humane renale proximale Tubuluszellen der Linie RPTEC verwendet. Diese wurden zunächst für 72 h mit aufsteigenden Konzentrationen der einzelnen Substanzen behandelt, um die grundlegenden Dosis-Wirkungs-Beziehungen über Viabilitätsmessungen mittels Alamar Blue Assays zu ermitteln. Anschließend erfolgten Kombinationsbehandlungen mit Cis- oder Carboplatin und LY2603618 mit den gleichen Konzentrationen, mit denen auch SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen behandelt wurden.

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven geht hervor, dass die Sensitivität der Nierentubuluszellen der Linie RPTEC sowohl gegenüber Cis- und Carboplatin als auch gegenüber LY2603618 deutlich geringer war als bei beiden verwendeten Neuroblastomzelllinien (vgl. Abbildung 3.19 und Abbildung 3.1 sowie Tab. 3.1 und Tab. 3.2). Um nach 72 h Inkubation eine ähnlich stark toxische Wirkung wie in SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen zu erreichen, müssten je nach Substanz und erwünschter Toxizität zwei- bis zehnfach so hohe Konzentrationen verwendet werden.

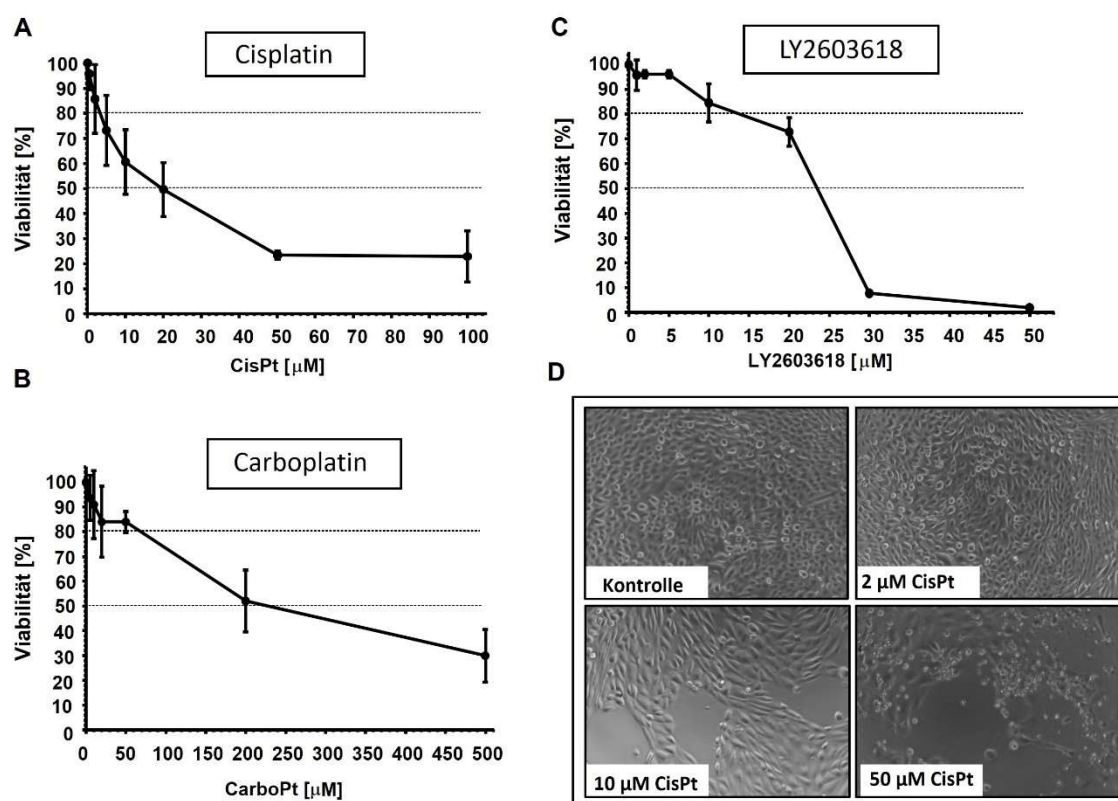


Abbildung 3.19: Einfluss der Platinverbindungen und des CHK1-Inhibitors auf die Viabilität von proximalen Nierentubuluszellen der Linie RPTEC

Humane renale proximale Tubuluszellen der Linie RPTEC wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin (CisPt, A), Carboplatin (CarboPt, B) oder LY2603618 (C) inkubiert. Die Zellviabilität wurde mithilfe des Alamar Blue Assays bestimmt und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen (= 100 %) normiert. Dargestellt sind Dosis-Wirkungs-Kurven für die einzelnen Substanzen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten, die in Quadruplikaten angesetzt wurden ($n = 3$, $N = 4$) (A - C) sowie lichtmikroskopische Aufnahmen von RPTEC ohne Behandlung und nach 72 h Behandlung mit Cisplatin (D).

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der IC_{20} und IC_{50} der getesteten Substanzen bei proximalen Nierentubuluszellen der Linie RPTEC

Humane renale proximale Tubuluszellen der Linie RPTEC wurden zur Ermittlung der Substanzspezifischen IC_{20} und IC_{50} für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cis- oder Carboplatin bzw. LY2603618 inkubiert. Anschließend wurde mittels Alamar Blue Assay die Viabilität der Zellen bestimmt. Dargestellt sind die aus den Dosis-Wirkungs-Kurven abgelesenen und gerundeten IC_{20} und IC_{50} ($n = 3$, $N = 4$).

Substanz		Konzentration
Cisplatin	IC_{20}	3 μ M
	IC_{50}	20 μ M
Carboplatin	IC_{20}	70 μ M
	IC_{50}	220 μ M
LY2603618	IC_{20}	13 μ M
	IC_{50}	24 μ M

Um die Versuchsbedingungen der bei den Neuroblastomzellen applizierten Kombinationsbehandlung mit LY2603618 so genau wie möglich auf Nierenzellen zu übertragen, wurden für nachfolgende Viabilitätsuntersuchungen mittels Alamar Blue Assays Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 in den gleichen Konzentrationen und Kombinationen verwendet wie jeweils bei SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, zeigten sich sowohl nach Mono- als auch nach Kombinationsbehandlung mit den Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen bei RPTEC-Zellen kaum zytotoxische Effekte (Abbildung 3.20 A - B). Da die Zellen der Linie RPTEC keine Tumorzellen sind und Zellteilungen deutlich langsamer erfolgen als bei den beiden Neuroblastomzelllinien, wurden auch Zellviabilität bzw. Zytotoxizität nach 120 h ermittelt. Zytotoxische Effekte, die erst verzögert auftreten, nachdem eine größere Anzahl an Zellen den Zellzyklus und die Zellteilung durchlaufen hat, sollten dadurch mitberücksichtigt werden. Für die Stoffkonzentrationen aus dem IC₂₀-Bereich der wildtypischen SH-SY5Y-Zellen (1 µM LY2603618, 0,5 µM Cisplatin und 5 µM Carboplatin) zeigte sich auch nach 120 h nur für die Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 ein geringer Rückgang der Zellviabilität auf ca. 90 % der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.20 A). Statistisch signifikante zytotoxische Effekte waren nach 120 h nur für die Behandlung mit Konzentrationen aus dem IC₂₀-Bereich der SH-SY5Y^R-Zellen (2 µM LY2603618, 2 µM Cisplatin und 10 µM Carboplatin) erfassbar (Abbildung 3.20 B). Nach Kombinationsbehandlung mit LY2603618 lag die Zellviabilität sowohl für Cis- als auch für Carboplatin bei ca. 65 % in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen. Es zeigte sich zudem, dass die Kombinationsbehandlung auch bei RPTEC stärker zytotoxisch wirkte als eine Behandlung mit den jeweiligen Substanzen alleine.

Um zu überprüfen, ob eine Verstärkung des zytotoxischen und somit potenziell nephrotoxischen Effekts durch Kombination mit LY2603618 bei höheren Stoffkonzentrationen zu verzeichnen ist, wurden ergänzende Viabilitätsanalysen nach 72 h Behandlung mit 5 µM Cisplatin, 50 µM Carboplatin und/oder 10 µM LY2603618 durchgeführt (Abbildung 3.20 C). Diese Konzentrationen entsprechen etwa der IC₅₀ von SH-SY5Y^R-Zellen (siehe Tab. 3.1). Auch hier zeigte sich nach Kombinationsbehandlung eine tendenziell stärker verminderte Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung als nach Behandlung mit den Substanzen alleine. Eine statistisch signifikant geringere Zellviabilität als nach Behandlung mit LY2603618 alleine zeigte sich jedoch nur für die Kombination mit Carboplatin.

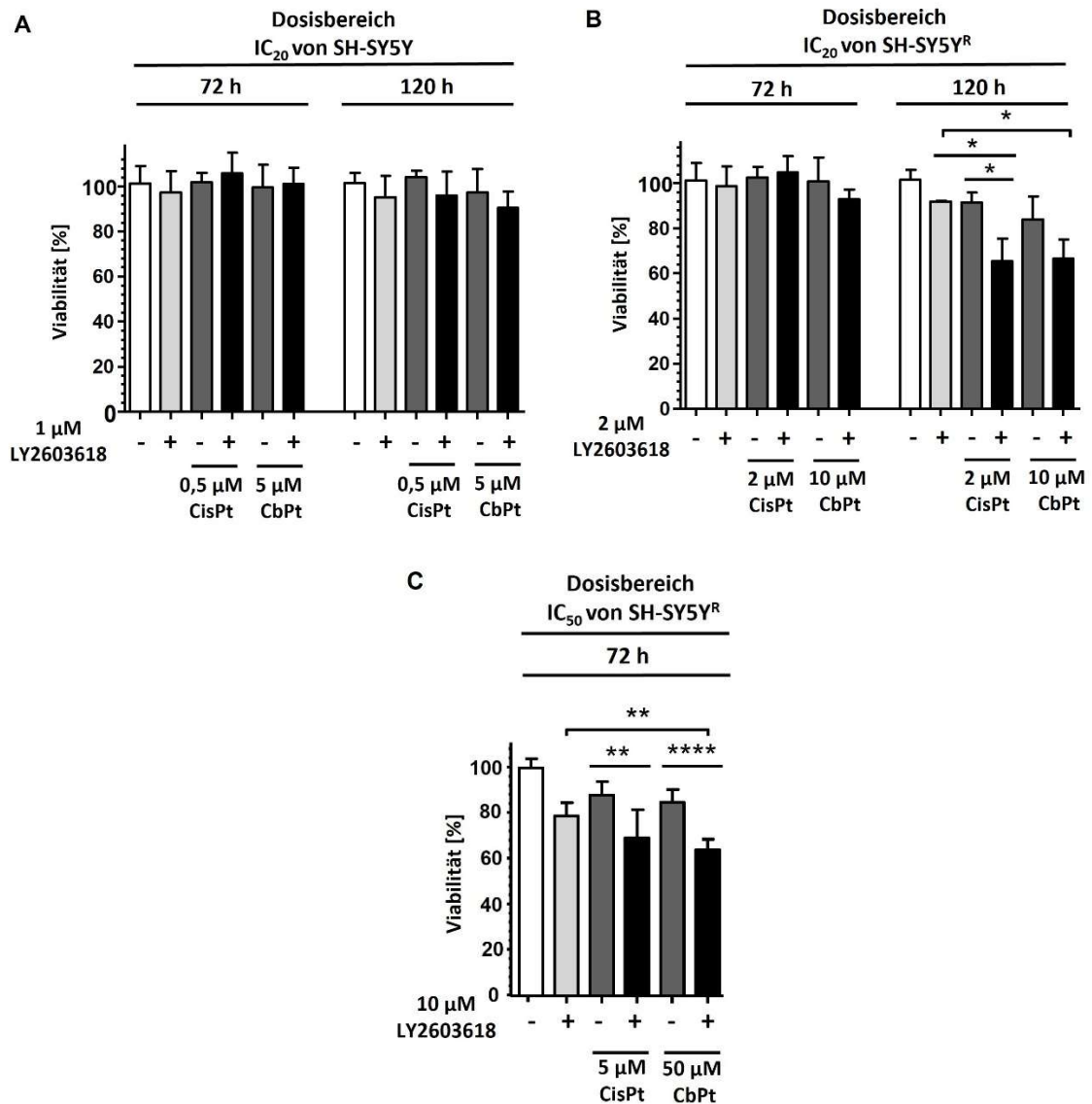
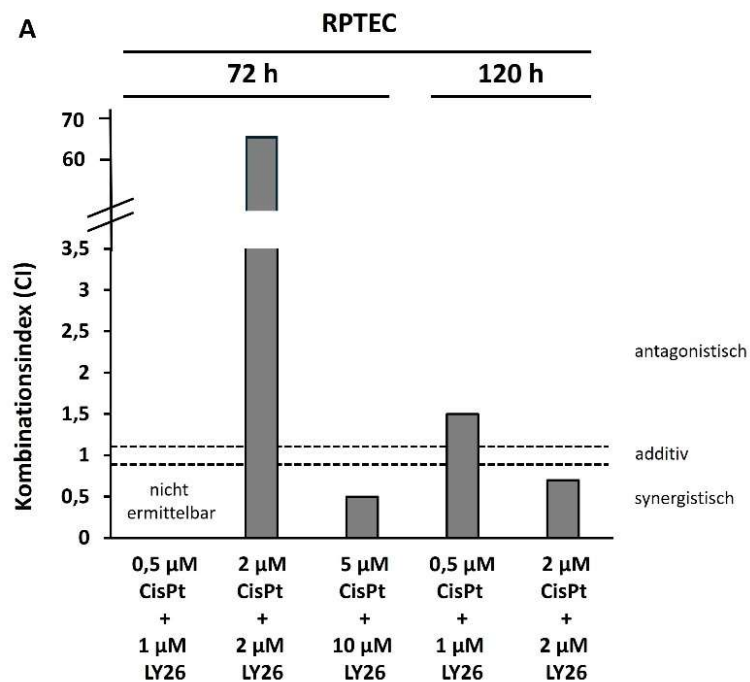


Abbildung 3.20: Einfluss einer Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 auf die Viabilität von humanen renalen proximalen Tubuluszellen der Linie RPTEC

Humane renale proximale Tubuluszellen der Linie RPTEC wurden für 72 h bzw. 120 h mit Cisplatin (CisPt) oder Carboplatin (CarboPt) und/oder LY2603618 behandelt. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen dabei den zuvor in den Experimenten mit SH-SY5Y- bzw. SH-SY5Y^R-Zellen verwendeten Konzentrationen aus dem Bereich der IC_{20} und IC_{50} (siehe Tab. 3.1). Die Zellviabilität wurde mithilfe des Alamar Blue Assays bestimmt und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen (= 100 %) normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 3 - 4 mindestens in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Versuchen ($n = 3 - 4$, $N = 4 - 8$). Statistik: einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Mehrfachvergleich: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.

Ebenso wie für die SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen (Abschnitt 3.1.1) wurde auch für die Kombinationsbehandlungen bei humanen renalen proximalen Tubuluszellen der Linie RPTEC der Kombinationsindex (*combination index*, CI) ermittelt.

Für die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 zeigten sich insbesondere bei geringen Stoffkonzentrationen und vor allem bei der kürzeren Inkubationszeit von 72 h Kombinationsindizes, die bereits im antagonistischen Bereich liegen. So betrug der CI bei Behandlung mit 2 μ M Cisplatin und 2 μ M LY2603618 nach 72 h 65, nach 120 h lag er allerdings mit 0,7 im synergistischen Bereich. Für die 72 h Behandlung mit 0,5 μ M Cisplatin und 1 μ M LY2603618 konnte mittels der Software DDCV kein CI ermittelt werden, vermutlich, da die Viabilität nach Behandlung sogar höher war als in den Kontrollzellen. Auch nach 120 h lag der CI für diese Kombination mit 1,5 knapp im antagonistischen Bereich. Ähnlich dazu lag der CI für die Kombinationsbehandlung mit 5 μ M Carboplatin und 1 μ M LY2603618 sowohl nach 72 h als auch nach 120 h mit 3,3 und 1,4 im antagonistischen Bereich. Erst die Behandlungen mit höheren Stoffkonzentrationen von Carboplatin und LY2603618 ergaben Kombinationsindizes von $< 0,9$, die auf synergistische Wirkungen hindeuten (Abbildung 3.21 B).



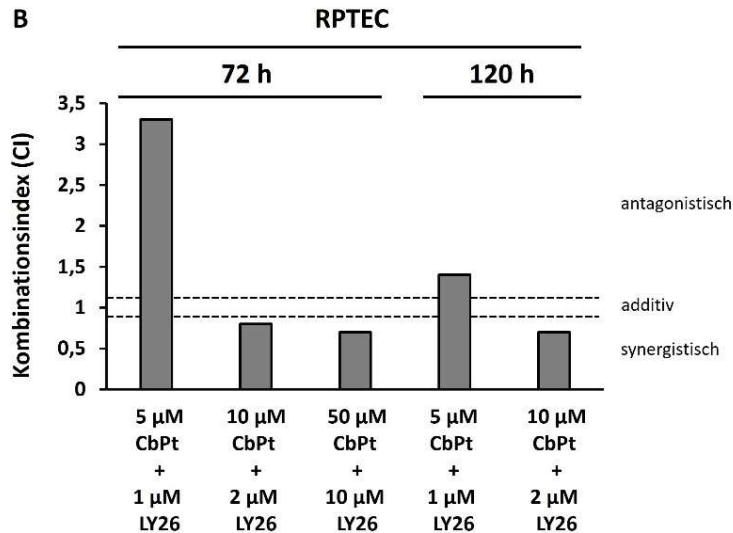


Abbildung 3.21: Kombinationsindizes (CI) der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 bei humanen renalen proximalen Tubuluszellen der Linie RPTEC

Humane renale proximale Tubuluszellen der Linie RPTEC wurden für 72 h bzw. 120 h mit Cisplatin (CisPt) oder Carboplatin (CarboPt) und/oder LY2603618 behandelt. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen dabei den zuvor in den Experimenten mit SH-SY5Y- bzw. SH-SY5Y^R-Zellen verwendeten Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ (siehe Tab. 3.1). Die Zellviabilität wurde mithilfe des Alamar Blue Assays bestimmt und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen (= 100 %) normiert. Um die verschiedenen Kombinationen hinsichtlich des Vorliegens synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte zu überprüfen, wurde der Kombinationsindex (*combination index*, CI) mithilfe der Software DDCV ermittelt. Dargestellt sind die Kombinationsindizes der Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin und LY2603618 (A) bzw. Carboplatin und LY2603618 (B). Bei einem Kombinationsindex zwischen 0,9 – 1,1 wird der Effekt als additiv, bei < 0,9 als synergistisch und bei > 1,1 als antagonistisch bewertet.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich bei gleicher Expositionszeit eine im Vergleich zu den beiden Neuroblastomzelllinien verminderte Empfindlichkeit der proximalen Nierentubuluszellen gegenüber Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 *in vitro* annehmen. Der nach 120 h messbare Viabilitätsabfall lässt vermuten, dass die zytotoxischen Effekte bei den proximalen Nierentubuluszellen erst verzögert eintraten. Ebenso wie auf Tumorzellen übte der CHK1-Inhibitor LY2603618 auch auf Nierentubuluszellen eine dosisabhängige toxische Wirkung aus. Eine Kombination der Platinverbindungen mit LY2603618 führte wie bei den Neuroblastomzellen zu einer weiteren Steigerung der Zytotoxizität, allerdings erst bei längerer Expositionsdauer oder bei höheren Dosierungen.

4 Diskussion

Das Neuroblastom zählt als häufigster solider und extrakranieller maligner Tumor bei Kindern zu den relevantesten Tumorerkrankungen dieser Altersgruppe (Matthay *et al.*, 2016). Es ist verantwortlich für ca. 8 – 10 % aller Krebserkrankungen bei Kindern und ca. 15 % der krebsbedingten Todesfälle in dieser Patientengruppe (Park *et al.*, 2010). Der Tumor zeigt sich zunächst meist sensitiv und unter einer multimodalen Therapie, die eine Chemotherapie beinhaltet, gelingt bei 70 % der Patienten mit *high-risk* Neuroblastom zumindest initial eine Vollremission (Habib *et al.*, 2012). Eingesetzt werden dabei abhängig vom Risikoprofil des Tumors Cisplatin, aber auch Etoposid und Carboplatin oder Busulfan und Melphalan im Rahmen von Hochdosischemotherapien (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board Neuroblastoma Treatment, 2024). Mit Progression der Erkrankung und zunehmender Chemotherapeutika-Exposition während der Behandlungszyklen kann ein Teil der Tumorzellen eine zunehmende Resistenz gegen Chemotherapeutika wie z. B. Cisplatin entwickeln. Vor allem Zellen aus Rezidivtumoren nach Knochenmark-ablativer Chemotherapie und Knochenmarktransplantation weisen ein besonders breites Resistenzprofil mit einer IC_{90} im Bereich klinisch nicht mehr erreichbarer Konzentrationen auf (Keshelava *et al.*, 1997). Einen Ansatz, um der generellen Problematik der Cisplatin-Resistenz in malignen Tumoren therapeutisch zu begegnen, stellt die zusätzliche Verwendung von Substanzen dar, die die DNA-Reparaturwege beeinflussen. Diese können oftmals die Effizienz einer Cisplatin-Behandlung verbessern (Kiss *et al.*, 2021). Für verschiedene Tumorentitäten wie z. B. Harnblasenkarzinome oder kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC) konnte *in vitro* eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin durch Kombination mit Checkpoint-Kinase-1 (CHK1)-Inhibitoren als eine solche Substanz gezeigt werden (Hsu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2016). Ein Beispiel für einen vielfach untersuchten CHK1-Inhibitor ist LY2603618. Bei diesem handelt es sich um einen selektiven Inhibitor, der seine Wirkung über eine Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle der Kinase CHK1 vermittelt (King *et al.*, 2014). Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von durch Chemotherapeutika induzierten DNA-Schäden ist CHK1 von essenzieller Bedeutung für Zellzyklus-Regulation und Zellüberleben (McNeely *et al.*, 2014). Die Serin-/Threonin-Kinase CHK1 ist an der Regulation der DNA-Reparatur beteiligt und induziert zudem einen Zellzyklus-Arrest. Sie wird ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*)-abhängig aktiviert, sobald im Rahmen von DNA-Schäden einzelsträngige DNA (ssDNA) auftritt und

durch Replikationsprotein A (RPA) markiert worden ist (Zhang & Hunter, 2014). Nicht nur *in vitro*, sondern auch in Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass CHK1 und das Tumorsuppressorgen P53 synthetisch lethal sind (Origanti *et al.*, 2013). Dies bedeutet, dass der funktionelle Verlust einer der beiden Gene – durch Mutation oder pharmakologische Inhibition – kompensiert werden kann, der Verlust beider jedoch lethal wirkt (Kaelin, 2005). Da je nach Entität ca. 10 – 100 % der Tumore P53-Mutationen aufweisen, könnte eine kombinierte Behandlung mit CHK1-Inhibitoren und Zytostatika einen vielversprechenden Ansatz darstellen (Rivlin *et al.*, 2011).

Als weitere Substanz zur Anwendung in Kombination mit Platinzytostatika wurde in dieser Arbeit Olaparib untersucht. Bei Olaparib handelt es sich um einen unter dem Handelsnamen Lynparza vertriebenen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitor (PARP1-Inhibitor), der auch bereits für die Behandlung rezidivierender BRCA (*breast cancer gene*)-mutierter Ovarialkarzinome zugelassen ist (Bochum *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Wirkung von Cisplatin hinsichtlich Zytotoxizität, Induktion von DNA-Schäden, Aktivierung der DNA-Schadensantwort, Einfluss auf den Zellzyklus und Induktion von Apoptose bei Neuroblastomzellen charakterisiert. Da auch Carboplatin in Therapieschemata zur Behandlung des Neuroblastoms eingesetzt wird, wurden die Wirkungen von Carboplatin stets vergleichend mitanalysiert (GPOH, S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019).

Ebenso wie bei Erwachsenen stellt auch bei Kindern die durch Cisplatin induzierte Nephrotoxizität eine häufige Nebenwirkung dar (Schofield *et al.*, 2024). Cisplatin bewirkt sowohl glomeruläre Schäden als auch Schäden der proximalen Nephronen (Skinner *et al.*, 1998). Mit diesen Erkenntnissen als Grundlage ist es essenziell, weitere nephrotoxische Auswirkungen durch kombinierte Gabe von CHK1-Inhibitoren oder PARP-Inhibitoren zusätzlich zu Platinzytostatika zu beachten. Daher waren Untersuchungen der Auswirkungen der gewählten Behandlungsmodalitäten auf humane renale proximale Tubuluszellen ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit.

4.1 Molekulare Wirkungen von Cis- und Carboplatin, LY2603618 und Olaparib auf Neuroblastomzellen mit und ohne Cisplatinresistenz

4.1.1 Einfluss von Cis- und Carboplatin, LY2603618 und Olaparib auf die Zellviabilität

Die ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven für eine 72-stündige Monobehandlung mit den Platinzytostatika, Olaparib und LY2603618 (Abbildung 3.1, Tab. 3.1) zeigen deutlich, dass sowohl die wildtypischen Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y als auch die Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y^R resistenter gegenüber Carboplatin als gegenüber Cisplatin sind. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den Ergebnissen anderer Publikationen, die z. B. für Ovarialkarzinomzellen *in vitro* ebenfalls eine deutlich höhere Toxizität von Cisplatin verglichen mit Carboplatin nachweisen konnten (Fanning *et al.*, 1990). Es wird angenommen, dass diese unterschiedliche Zytotoxizität in der unterschiedlichen Wirkungskinetik und der geringeren chemischen Reaktivität von Carboplatin begründet ist. Der Dicarboxylat-Ring von Carboplatin erfährt eine langsamere Hydrolyse und damit Umwandlung in die aktive Form, die mit Proteinen und DNA reagiert, als bei Cisplatin (Doz *et al.*, 1991; Micetich *et al.*, 1985). Ab der erfolgten Reaktion mit der DNA ist der Toxizitätsmechanismus für Cis- und Carboplatin zwar der gleiche, aber die Bildung eines ähnlichen Ausmaßes an DNA-Intrastrang-Verknüpfungen erfolgt nicht nur langsamer, sondern erfordert bis zu 40-fach höhere Konzentrationen von Carboplatin als von Cisplatin (Knox *et al.*, 1986). Die hier für die Cisplatin-resistente Zelllinie SH-SY5Y^R nachgewiesene Kreuzresistenz zu Carboplatin wurde bereits für zahlreiche Krebsarten gezeigt (Zhou *et al.*, 2020). Dies ist vermutlich unter anderem darin begründet, dass sich bekannte Cisplatin-Resistenzmechanismen aufgrund der Ähnlichkeit im Wirkmechanismus auch auf die molekulare Wirkung von Carboplatin auswirken. Da beispielsweise auch Carboplatin genau wie Cisplatin mittels des Kupfertransporters CTR1 (*Copper transporter 1*) in die Zelle hineintransportiert wird, führt eine Herunterregulation bzw. ein *knock-out* von CTR1 zu einer geringeren Aufnahme nicht nur von Cisplatin, sondern auch von Carboplatin (Holzer *et al.*, 2006). Dieser Zusammenhang verdeutlicht als Beispiel die häufig entstehende Kreuzresistenz in Tumorzellen.

Das von Höhn *et al.* übernommene Selektionschema, mit dem die Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen generiert wurden (Abschnitt 2.2.1), sollte möglichst einem klinischen Behandlungsschema ähneln, um die Entstehung von Cisplatin-Resistenzen in der klinischen Praxis adäquat abzubilden (Höhn *et al.*, 2016). In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Selektion Cisplatin-resistenter Tumorzelllinien beschrieben. So ist es geläufig, die Zellen entweder für längere Zeit geringen

Konzentrationen auszusetzen, die schrittweise gesteigert werden, oder aber die Zellen pulsatil kurzen mit gleichbleibenden eher hohen Konzentrationen zu behandeln (Bahar *et al.*, 2020). Grundsätzlich ähnelt ein pulsatiles Behandlungsschema natürlich mehr der klinischen Applikationsweise einer Chemotherapie mit mehrstündigen Behandlungen, die zyklusweise erfolgen (Watson *et al.*, 2007). Bei Cisplatin wird ca. 90 % der Menge innerhalb weniger Stunden detoxifiziert, allerdings dauert es ca. 30 Tage, bis eine vollständige *Clearance* erfolgt ist, sodass der Tumor kurzfristig höheren Dosierungen ausgesetzt ist und dann für einen langen Zeitraum geringen Konzentrationen (Balis *et al.*, 1983; Watson *et al.*, 2007). Die Pulsatilität der Behandlung wird durch das hier verwendete Selektionsschema gut abgedeckt, allerdings wurden die SH-SY5Y^R-Zellen nur wenige Stunden lang 1 μ M Cisplatin ausgesetzt und ansonsten immer in Cisplatin-freiem Medium kultiviert, sodass der klinische Aspekt einer langsam absinkenden Cisplatin-Konzentration natürlich nicht abgebildet wird. In einer anderen Arbeit zur Untersuchung von Cisplatin-Resistenz bei Neuroblastomzellen wurde die Zelllinie SH-SY5Y kontinuierlich mit 10 μ M Cisplatin kultiviert und die Konzentration sukzessive über 6 Wochen gesteigert auf 80 μ M, was im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen extrem hohe Konzentrationen darstellt (Yang *et al.*, 2017). Möglicherweise könnten Selektionsschemata mit derart hohen Konzentrationen eine höhere Stabilität der Cisplatin-Resistenz bieten, wohingegen das hier applizierte Selektionsschema Nachselektionen erfordert, den klinischen Bedingungen jedoch mehr ähnelt. Für eine weitere Arbeit wiederum wurde ebenfalls mit kontinuierlich steigenden Konzentrationen Selektionsdruck ausgeübt, jedoch in Konzentrationsbereichen von anfangs 1 nM bis hin zu 1 μ M (D'Aguanno *et al.*, 2011). Auch für SH-SY5Y sind also sehr verschiedene Selektionsschemata in Verwendung, was natürlich möglicherweise in verschiedenen Arbeiten auch sehr unterschiedliche molekulare Resistenzmechanismen hervorbringen könnte und die Vergleichbarkeit etwas einschränkt.

Die verringerte Zellviabilität auch nach Behandlung mit LY2603618 alleine (Abbildung 3.1 B) deutet darauf hin, dass der CHK1-Inhibitor auch ohne Kombination mit einem klassischen Chemotherapeutikum bereits zytotoxisch wirkt. Dies lässt sich vermutlich darin begründen, dass eine CHK1-Inhibition nicht nur durch DNA-Schäden induzierten Zellzyklus-Arrest aufhebt, sondern auch selbst replikativen Stress induziert (Bryant *et al.*, 2014). Das ist vor allem auf das vermehrte Auftreten von Replikationsursprüngen und stockenden bzw. blockierten Replikationsgabeln zurückzuführen, die zu DNA-Strangbrüchen führen (King *et al.*, 2014).

Die Behandlung mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 führt sowohl bei Kombinationsbehandlung mit Cis- als auch mit Carboplatin zu einer stärkeren Verminderung der Zellviabilität als jeweils beide Substanzen alleine. Dies gilt für SH-SY5Y- ebenso wie für SH-SY5Y^R-Zellen (Abschnitt 3.1.1.2) und deckt sich grundsätzlich mit den Erwartungen. Für die Kombinationsbehandlung wurden dabei Konzentrationen von Cis- oder Carboplatin und LY2603618 jeweils im Bereich der IC₂₀ oder IC₅₀ verwendet.

Dass die Kombinationstherapie nicht zu noch stärkeren Effekten führt, könnte im P53-Status von SH-SY5Y-Zellen begründet sein. Bei den SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um eine Neuroblastomzelllinie mit P53-Wildtyp-Status (Goldschneider *et al.*, 2004). Ebenso wie weitere Faktoren der DNA-Schadensantwort wie ATR, ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und Wee1, so verhält sich auch CHK1 synthetisch lethal zu P53 (Li *et al.*, 2020). So ist bekannt, dass CHK1-Inhibitoren vor allem P53-defiziente Tumore gegenüber einer klassischen Chemotherapie und Bestrahlung sensitivieren, da Zellen mit P53-Defekt hinsichtlich ihrer DNA-Schadens-Checkpoints besonders auf CHK1 angewiesen sind (Chen *et al.*, 2006). Für SH-SY5Y-Zellen ist keine Mutation in P53 beschrieben und in dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass P53-abhängige Zielproteine wie P21 und BAX (Bcl2-assoziiertes X-Protein) induziert werden können (Abbildung 3.6 und 3.7), was auf ein funktionsfähiges P53 schließen lässt (Goldschneider *et al.*, 2004). Auch die gezeigten Zellzyklusveränderungen stützen diese These. So ist ein Cis- und Carboplatin induzierter Zellzyklus-Arrest zu verzeichnen (Abbildung 3.5). Dies passt dazu, dass der Tumorsuppressor P53 einen DNA-Schaden-abhängigen Zellzyklus-Arrest bewirkt (Ozaki & Nakagawara, 2011). Aufgrund der fehlenden P53-Mutation erscheint aber auch möglich, dass SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen bei Induktion von DNA-Schäden durch Cis- oder Carboplatin bei gleichzeitiger CHK1-Inhibition immernoch auf den P53-abhängigen Weg zum Zellzyklus-Arrest zwecks DNA-Reparatur zurückgreifen können. Dennoch konnte für die Kombinationsbehandlung von Cisplatin bzw. Carboplatin mit LY2603618 für die meisten Substanzkonzentrationen mittels des Kombinationsindex ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden. Insbesondere die Kombinationsbehandlung mit Stoffkonzentrationen aus den Bereichen der IC₂₀ führte bei SH-SY5Y^R-Zellen zu geringeren Kombinationsindizes, also stärker synergistischen Wirkungen als bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.4). Demzufolge sind trotz des Fehlens einer P53-Mutation sehr gute Kombinationseffekte zu erzielen und diese sind bei SH-SY5Y^R-Zellen ausgeprägter, was angesichts der therapeutischen Problematik von Cisplatin-Resistenzen wünschenswert ist.

Die bereits im Rahmen einer anderen Arbeit von Krüger *et al.* bei Medulloblastomzellen gezeigte vom *C-MYC*-Amplifikationsstatus unabhängige Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber einer Cisplatin-Behandlung durch einen ergänzenden CHK1-Inhibitor konnte also auf Neuroblastomzellen übertragen werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass mit AZD-7762 ein anderer CHK1-Inhibitor für die Kombinationsbehandlung verwendet wurde (Krüger *et al.*, 2018).

Der PARP-Inhibitor Olaparib stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Sensitivierung von Tumoren gegenüber einer Chemotherapie mit Cisplatin dar (Cheng *et al.*, 2012). Für SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen konnte in dieser Arbeit eine dosisabhängige Zytotoxizität gegenüber Olaparib nachgewiesen werden (Abbildung 3.1 B). Auffälligerweise zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve nach einem raschen Abfall der Zellviabilität im Bereich geringer Konzentrationen dann im Bereich mittlerer bis hoher Konzentrationen einen näherungsweise asymptotischen Verlauf. Dies lässt darauf schließen, dass ab einer Konzentration von ca. 20 µM eine weitere Dosissteigerung die Zytotoxizität nur noch geringfügig weiter steigert. Möglicherweise ist ab einer Konzentration von ca. 20 µM bereits ein Großteil der PARP-Enzyme inhibiert bzw. ein Großteil der Bindungsstellen für Olaparib besetzt. Die Kombinationsbehandlung mit Cis- oder Carboplatin und Olaparib wurde jeweils mit Konzentrationen im Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ durchgeführt und bewirkte sowohl bei SH-SY5Y- als auch bei SH-SY5Y^R-Zellen stärker zytotoxische Effekte als die jeweilige Monobehandlung (Abbildung 3.2 C - D und 3.3 C - D). Die ermittelten Kombinationsindizes konnten auch hier synergistische Effekte nachweisen, die ähnlich wie bei LY2603618 bei SH-SY5Y^R-Zellen ausgeprägter sind als bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.4). Dies ist unter anderem dadurch erklärbar, dass sich PARP infolge der Inhibition durch Olaparib nach Bindung im Bereich geschädigter DNA aufgrund der inhibierten auto-PARYlierung nicht mehr von der DNA ablösen kann (PARP-*trapping*) (Shen *et al.*, 2013). Dadurch kann die Läsion nicht repariert werden und es entstehen Doppelstrangbrüche, wenn die Replikationsgabel in der S-Phase auf die Läsion trifft (Rose *et al.*, 2020). Demnach kann angenommen werden, dass die Olaparib-bedingte PARP-Inhibition zu einer verminderten Reparatur Cis- oder Carboplatin-induzierter DNA-Schäden führt, sodass mehr DNA-Schäden akkumulieren und ein Absterben der Tumorzellen bewirken. Zellen mit Mutationen in Genen von für die HR essenziellen Faktoren wie BRCA1 und BRCA2 sind sensibler gegenüber PARP-Inhibitoren, da durch PARP-Inhibition Läsionen wie DNA-Einzelstrangbrüche nicht mehr effektiv repariert werden können und daraus Doppelstrangbrüche entstehen (Farmer *et al.*, 2005). Diese wiederum werden am effektivsten durch HR repariert (Farmer *et al.*, 2005; McCarthy, 2005). In der Literatur finden sich zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit keine Hinweise auf bekannte Mutationen bzw. Defekte von Faktoren der homologen Rekombination

(HR) in SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen. Daher ist anzunehmen, dass die PARP-induzierten Effekte in Mono- und Kombibehandlung bei den in dieser Arbeit verwendeten SH-SY5Y-Zellen etwas geringer ausgeprägt sind als in HR-defizienten Zellen.

Bemerkenswert ist, dass die Cisplatin-resistente Zelllinie SH-SY5Y^R eine Kreuzresistenz zum CHK1-Inhibitor LY2603618 aufweist (Abbildung 3.1 B). Über Resistenz speziell gegenüber LY2603618 oder aber gegenüber CHK1-Inhibitoren allgemein bei Neuroblastomzellen ist in der Literatur nichts bekannt. Für Lymphomzellen jedoch beispielsweise wird als möglicher Resistenzmechanismus gegenüber CHK1-Inhibitoren eine kompensatorische Heraufregulation bzw. stärkere Aktivierung des PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)/Akt- und des RHO (RAS-homolog)/RAC (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate*)/PAK (*P21-activated kinase*)-Signalweges postuliert, wodurch die Zellen weniger abhängig von CHK1 im Falle replikativen Stresses sein sollen (Black *et al.*, 2022). Diese Signalwege wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, weshalb zur Aktivierung dieser Signalwege in SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen keine Aussage getroffen werden kann. Für Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC), welche resistent gegenüber dem CHK1-Inhibitor Prexasertib sind, konnte eine Hochregulation der Kinase Wee1 sowie eine Herunterregulation der Cyclin-abhängigen Kinase CDK1 und der Phosphatase CDC25c nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2021). Die Serin-/Threonin-Kinase CDK1 reguliert unter anderem den Übergang zwischen G2-Phase und Mitose (Massacci *et al.*, 2023). Wee1 ist eine Kinase und CDC25c eine von mehreren Phosphatasen, die über Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung die Aktivität der CDK1 kontrollieren (Massacci *et al.*, 2023). Wee1 phosphoryliert CDK1 und inhibiert dadurch die Aktivierung des CDK1/Cyclin B-Komplexes und verhindert so den Übergang in die Mitose am G2/M-Checkpoint, sodass die Zellen anschließend Zeit haben, die DNA-Schäden zu reparieren und einer mitotischen Katastrophe und Apoptose zu entgehen (Moseley, 2017). Auch eine Inaktivierung bzw. Herunterregulation von CDC25c verhindert den Übergang am G2/M-Checkpoint, da CDC25c die CDK1 durch Dephosphorylierung aktiviert und somit den Übergang in die Mitose fördert (K. Liu *et al.*, 2020). Um dies zu überprüfen und die CHK1-Kreuzresistenz bei SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen mechanistisch zu beleuchten, müsste noch eine Untersuchung der zuvor genannten Faktoren erfolgen.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der Viabilitätsanalysen dafür, dass sowohl der CHK1-Inhibitor LY2603618 als auch der PARP-Inhibitor Olaparib in Neuroblastomzellen die zytotoxische Wirkung einer Chemotherapie mit Cisplatin oder Carboplatin verstärken können. Cisplatin-resistente Neuroblastomzellen weisen neben einer Kreuzresistenz zu Carboplatin auch eine Kreuzresistenz zu

LY2603618 auf, deren molekularer Mechanismus noch ungeklärt ist. Trotz dieser Kreuzresistenz zeigt eine Kombinationsbehandlung auch bei Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen eine synergistisch verstärkte Zytotoxizität und könnte daher eine gute Möglichkeit darstellen, bei Cisplatin-resistenten Neuroblastomen eine antitumorigene Wirkung zu erzielen, ohne Cis- oder Carboplatin auf für Normalgewebe extrem toxische Dosierungen zu erhöhen. Noch stärker ausgeprägte synergistische Effekte wären mit Olaparib möglicherweise bei Tumorzellen mit HR-Defizienz und mit LY2603618 bei Tumorzellen mit *P53*-Mutation zu verzeichnen.

4.1.2 Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf Zellzyklus und Apoptose

Sowohl eine Behandlung mit Cis- bzw. Carboplatin alleine als auch in Kombination mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 führte tendenziell zu einer Induktion der subG1-Fraktion (Abbildung 3.5 A). Die subG1-Fraktion erfasst Zellen mit einem geringeren DNA-Gehalt als bei Zellen der G1-Phase. Es wird angenommen, dass die Apoptose-bedingte Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen dazu führt, dass kleine, niedermolekulare DNA-Fragmente aus der Zelle austreten und so eine Fraktion von Zellen mit einer geringeren DNA-Menge detektiert werden kann. Diese entspricht den apoptotischen Zellen (Plesca *et al.*, 2008). Die subG1-Induktion bzw. Apoptose ist nach LY2603618-Behandlung bereits nach 48 h maximal ausgeprägt, infolge der Cis- und Carboplatin-Behandlung erst nach 72 h (Abbildung 3.5 A). Diese frühere Induktion von Zelltod korreliert mit der festgestellten frühen Abnahme des Zellindex in der Impedanzmessung (Anhang Abbildung 6.11.) nach Exposition gegenüber LY2603618 und spricht für ein früheres Einsetzen des durch den CHK1-Inhibitor vermittelten zytotoxischen Effektes. Zumindest bei den SH-SY5Y-Zellen fällt auf, dass LY2603618 alleine zu allen Zeitpunkten stärker subG1 induziert als eine Monobehandlung mit Cis- oder Carboplatin, obwohl letztere zu einer stärkeren Expression von BAX und proteolytischen Aktivierung von Caspase 3 und 7 führen als LY2603618 (Abbildung 3.6 und 3.7). Die Zellviabilität fällt nach allen drei Monobehandlungen ähnlich groß aus (Abbildung 3.2 und 3.3). Dies könnte einen Hinweis dafür darstellen, dass Cis- und Carboplatin bei SH-SY5Y-Zellen stärker Apoptose-induzieren, während LY2603618 möglicherweise etwas weniger Apoptose, aber zusätzlich andere Zelltodarten wie z. B. Nekrose induziert. Eine durchflusszytometrische Analyse mit Annexin-V-Markierung könnte helfen, um genauer zwischen apoptotischen Zellen und anderen toten Zellen in der subG1-Fraktion zu differenzieren.

Eine gleichzeitige Behandlung mit Cis- oder Carboplatin und LY2603618 führt in beiden Zelllinien zumindest nach 72 h zu einer tendenziell stärkeren subG1-Induktion als eine Monobehandlung mit den jeweiligen Substanzen (Abbildung 3.5 A). In Einklang mit diesen Ergebnissen führt eine Kombinationsbehandlung zu einem deutlich schnelleren und stärkeren Abfall der elektrischen Impedanz, was darauf hindeuten könnte, dass schneller und vermehrt Zellen absterben und sich von der Wuchsoberfläche ablösen bzw. weniger Zellwachstum erfolgt (Anhang Abbildung 6.11).

Die durch alle Substanzen und Kombinationen bewirkte tendenzielle Abnahme der G1-Fraktion ist vermutlich vor allem darin begründet, dass behandlungsinduziert vermehrt Zellen in der subG1-Fraktion zu finden sind, also Zelltod unterliegen. In der Literatur ist für eine Behandlung mit Cisplatin im Bereich ähnlicher Konzentrationen auch bei Promyelozytischen Leukämiezellen eine Abnahme der G1-Fraktion bei gleichzeitiger Zunahme vor allem der subG1-Fraktion beschrieben (Velma *et al.*, 2016). Ein Checkpoint-induzierter G1-Arrest ist nach Behandlung mit Cis- und Carboplatin in beiden Neuroblastom-Zelllinien nicht nachweisbar, obwohl ein solcher für andere Zellen beschrieben worden ist (Un, 2007). Da Tumorzellen nach Exposition gegenüber DNA-schädigenden Agenzien P53- und P21-vermittelt in G1-Arrest treten (Waldman *et al.*, 1995), ist der fehlende G1-Arrest vor allem in Anbetracht der behandlungsinduzierten P53- und P21-Heraufregulation unerwartet (Abbildung 3.6, 3.7 und 3.8). Ein mutationsbedingter Ausfall der P53-Funktion ist aufgrund der Hochregulation von P21 unwahrscheinlich, zumal P53 in SH-SY5Y-Zellen wie bei den meisten Neuroblastomzellen nicht mutiert ist (Goldschneider *et al.*, 2004; Pirou *et al.*, 2017). Möglicherweise überwiegen die anderen pro-apoptotischen Funktionen von P53 gegenüber einer Induktion von G1-Arrest.

Die Behandlung mit Cis- und Carboplatin zeigte sowohl in SH-SY5Y- als auch in SH-SY5Y^R-Zellen einen leichten Anstieg der G2/M-Fraktion (Abbildung 3.5 C). Dieser war nicht für alle Zeitpunkte und Zelllinien signifikant, zeigte jedoch stets die gleiche Tendenz. Der G2/M-Checkpoint reguliert den Übergang der Zellen in die Mitosephase und wird unter anderem infolge von DNA-Schäden aktiviert, um einen unkontrollierten Übertritt in die Mitose mit nachfolgendem Zelltod zu verhindern (Stark & Taylor, 2006). Eine Arretierung von Zellen am G2/M-Checkpoint wird über die Aktivierung der dafür essenziellen CHK1 induziert (Liu *et al.*, 2000). CHK1 bewirkt dann über die aktivierende Phosphorylierung der Kinase WEE1 eine inhibitorische Phosphorylierung von CDK1, sodass kein aktiver CDK1-CyclinB1-Komplex gebildet wird. Zudem phosphoryliert CHK1 die Phosphatase CDC25c, welche dann degradiert wird und nicht mehr die inhibitorische Phosphorylierung von CDK1 abspalten kann (Uto *et al.*, 2004; Zhang & Hunter, 2014). Möglicherweise wird CDC25c nach

Behandlung mit Cisplatin herunterreguliert, was insbesondere im Zusammenspiel mit einer Schaden-induzierten CHK1-Aktivierung (Abbildung 3.10 – 3.11) einen G2/M-Arrest begünstigen könnte. Der oben beschriebene mögliche Zusammenhang könnte auch erklären, weshalb sich nach Kombinationsbehandlung mit Cis- oder Carboplatin und dem CHK1-Inhibitor LY2603618 in beiden Zelllinien eine statistisch signifikant geringere G2/M-Fraktion zeigt als nach Behandlung mit Cis- bzw. Carboplatin alleine (Abbildung 3.5 C). Die CHK1-Inhibition hebt vermutlich den Cis- oder Carboplatin induzierten G2/M-Arrest auf, welcher zwecks DNA-Reparatur initiiert wurde. Als Folge dessen unterliegen verstärkt Zellen dem Zelltod, was sich in der bereits beschriebenen parallel steigenden subG1-Fraktion zeigt. Es wird angenommen, dass der hauptsächliche zytotoxische Mechanismus von Cisplatin die DNA-Schaden-induzierte Apoptose darstellt, auch wenn abhängig von Faktoren wie Cisplatin-Dosis und Energiestatus der Zelle auch nekrotischer Zelltod erfolgt (Gonzalez *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Induktion von Apoptose ergänzend zu der zuvor diskutierten veränderten Zellzyklusverteilung (subG1-Induktion) mittels Western Blot-Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich bei beiden Zelllinien nach Monobehandlung mit Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 jeweils eine Induktion von P53, pP53, P21 und BAX (Abbildung 3.6 und 3.7). Diese verstärkte sich tendenziell mit steigender Dauer der Behandlung und fiel bei Carboplatin etwas schwächer und zeitverzögert aus als bei Cisplatin. Nach LY2603618-Monobehandlung war die schwächste Induktion zu verzeichnen (Abbildung 3.6 und 3.7). Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl in Cisplatin-sensitiven als auch -resistenten Neuroblastomzellen alle Substanzen alleine potenziell Apoptose auslösen. Dass auch LY2603618 bzw. eine CHK1-Inhibition alleine Apoptose-auslösend wirkt, passt dazu, dass auch bei Medulloblastomzellen eine CHK1-Inhibition zu vermehrter Apoptose führt (Krüger *et al.*, 2018). Die gleichsinnige Induktion von pP53, P53, P21 und BAX ist darin begründet, dass aktiviertes P53 die Transkription von P21 und BAX vermittelt (Reinke & Lozano, 1997). BAX wird durch Interaktion mit BIM (*Bcl2 interacting mediator of cell death*) und tBID (*BH3 interacting domain death agonist*) aktiviert und oligomerisiert mit BAK (*Bcl2-homologous antagonist/killer 1*) unter Insertion in die äußere Mitochondrienmembran zu einem Poren-bildenden Komplex. Dadurch wird die äußere Mitochondrienmembran permeabel (*mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP*), Cytochrom C tritt aus und induziert die Formation des Apoptosoms, wodurch erst die Pro-Caspase 9 aktiviert wird. Diese aktiviert anschließend die Effektor-Caspasen 3 und 7 (Chen, 2016). Somit aktivieren alle oben genannten Substanzen den intrinsischen, mitochondrialen Weg der Apoptose. Ebenso wie für Platinzytostatika ist die Induktion von Apoptose auch für LY2603618 bereits bekannt (Gonzalez *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014). Der Nachweis der aktivierten gespaltenen Formen der

Effektorcaspasen 3 und 7 fiel nach LY2603618 Behandlung alleine jedoch deutlich geringer aus als nach Cis- oder Carboplatin-Behandlung. Dies lässt bei den verwendeten äquitoxischen Dosen auf eine vorhandene, aber schwächere Apoptose-Induktion durch LY2603618 alleine schließen. Da die äquitoxische Behandlung mit LY2603618 aber zu einer ähnlich starken Induktion der subG1-Fraktion führt wie Cis- oder Carboplatin (Abbildung 3.5 A), antworten die Zellen auf eine Behandlung mit LY2603618 möglicherweise auch mit anderen Zelltodarten wie Nekrose. Die im Vergleich zur Cisplatin-Behandlung später einsetzende Caspase-Aktivierung bzw. Apoptose nach Carboplatin-Behandlung lässt sich durch die langsamere Kinetik in der Bildung von DNA-Addukten durch Carboplatin begründen (Blommaert *et al.*, 1996). Dass auch in der Kombination von Carboplatin mit LY2603618 eine stärkere bzw. frühere Caspase-Aktivierung erfolgt, war zu erwarten, da trotz unterschiedlicher Kinetik dosisabhängig dieselben DNA-Addukte entstehen wie nach Cisplatin-Behandlung (Blommaert *et al.*, 1996).

Die Kombinationsbehandlung bewirkt in beiden Zelllinien eine stärkere Expression von P53, P21 und BAX sowie eine vermehrte Phosphorylierung von P53 an Serin 15 (pP53 S15) verglichen mit der jeweiligen Monobehandlung. Für die Kombination von Carboplatin und LY2603618 zeigt sich auch zumindest zwischenzeitlich eine stärkere Zunahme der aktivierten gespaltenen Caspasen 3 und 7 verglichen mit der Monobehandlung (Abbildung 3.6 und 3.7). Für die Kombination von Cisplatin und LY2603618 zeigt sich nach 24 h in beiden Zelllinien eine stärkere Zunahme der aktivierten gespaltenen Caspasen 3 und 7 als in der Monobehandlung, nach 48 h und 72 h zeigt sich nach Monobehandlung mit Cisplatin jedoch eine deutlich stärkere Zunahme (Abbildung 3.6). Dass lediglich die Kombinationsbehandlung mit Carboplatin vermehrt Apoptose induziert, erscheint jedoch unwahrscheinlich. Zumindest bei SH-SY5Y^R-Zellen wurde nach 24 h eine stärkere Caspase 3- und 7-Aktivierung nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 als nach Monobehandlung nachgewiesen (Abbildung 3.6 B). Dies lässt die Vermutung zu, dass zwischen dem 24 h- und 48 h-Zeitpunkt eine maximale Aktivierung nach Kombinationsbehandlung auftrat, die nicht erfasst worden ist und nach 48 h bereits wieder abgenommen hat. Es fällt zudem auf, dass sich auch nach Kombinationsbehandlung nur sehr geringe Mengen des 89 kDa-großen PARP1-Spaltproduktes nachweisen ließen. PARP1 wird durch aktivierte Caspasen gespalten, was ein Kennzeichen von Apoptose darstellt (Chaitanya *et al.*, 2010). Da insbesondere Caspase 3 PARP1 spaltet und die aktivierte gespaltene Caspase 3 im Zeitverlauf hier teilweise recht schwach und relativ spät nachweisbar war, ist denkbar, dass der Großteil der PARP-Spaltung erst später erfolgt (Herceg & Wang, 1999). Weiterhin schließt theoretisch selbst eine fehlende PARP1-Spaltung einen

apoptotischen Zelltod nicht aus, eine fehlende PARP-Funktion ist jedoch mit einer begleitend verstärkten Induktion von Nekrose assoziiert (Herceg & Wang, 1999).

Insgesamt lässt sich eine verstärkte Induktion von Apoptose durch Kombination von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 für die hier untersuchten Zeitpunkte und Dosierungen annehmen und das auch in Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen. Ursächlich für die verstärkte Apoptose ist vermutlich das nach Kombinationsbehandlung vermehrte Auftreten von DNA-Schäden, welche im Rahmen der Analyse der Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen, γ H2AX-Foci und der DNA-Schadensantwort nachgewiesen werden konnten (Abschnitte 3.1.4 - 3.1.6) und die im folgenden Absatz eingehend beschrieben werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine vermutlich P53-vermittelte Induktion des intrinsischen Weges der Apoptose durch Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 nachgewiesen werden, die durch eine Kombinationsbehandlung mit jeweils einer der beiden Platinverbindungen und mit LY2603618 weiter verstärkt werden konnte. Dies konnte sowohl in wildtypischen, als auch in Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen gezeigt werden. Mechanistisch liegt diesem Effekt unter anderem wahrscheinlich eine Aufhebung des Cis- bzw. Carboplatin-induzierten G2/M-Arrests durch die CHK1-Inhibition zugrunde.

4.1.3 Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Induktion von DNA-Schäden und die Aktivierung der DNA-Schadensantwort

4.1.3.1 Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Aktivierung der Signalwege der DNA-Schadensantwort

Die Behandlung von Neuroblastomzellen der Linien SH-SY5Y und SH-SY5Y^R mit Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 bewirkt in beiden Zelllinien eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort. In beiden Zelllinien erfolgt sowohl infolge einer jeweiligen Monobehandlung, als auch noch etwas stärker infolge der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 eine Phosphorylierung von ATR (Abbildung 3.10 und 3.11). Es fällt auf, dass die Phosphorylierung von ATR bei SH-SY5Y-Zellen einer anderen Kinetik folgt als bei SH-SY5Y^R-Zellen. In ersteren kann am meisten pATR nach 0 h Postinkubation (Cisplatin) bzw. nach 2 h Postinkubation nachgewiesen werden, wohingegen SH-SY5Y^R-Zellen am meisten pATR nach 2 h und 24 h Postinkubation nach 4 h

Behandlung mit äquitoxischen Dosierungen aufweisen. Die zeitlich verzögerte Phosphorylierung von ATR in SH-SY5Y^R-Zellen deutet darauf hin, dass ATR-aktivierende DNA-Schäden im Sinne von einzelsträngiger DNA im Bereich von Strangbrüchen und kollabierenden Replikationsgabeln bei SH-SY5Y^R-Zellen später auftreten könnten als bei SH-SY5Y-Zellen (Goldstein & Kastan, 2015). Dagegen spricht jedoch, dass in dieser Arbeit nach 0 h, 2 h, und 24 h Postinkubation jeweils ein gleiches Ausmaß an Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen in beiden Zelllinien nachgewiesen wurde und somit zumindest diese Form der DNA-Schäden in beiden Zelllinien ähnlich schnell induziert zu werden scheint (siehe auch Abschnitt 4.1.3.3). Die Signalkaskaden der DNA-Schadensantwort bzw. Faktoren wie ATR und ATM, können jedoch auch durch andere Stimuli aktiviert werden, wie z. B. durch vermehrte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen oxidativen Stresses (Srinivas *et al.*, 2019). Cisplatin bewirkt auch eine vermehrte Produktion von ROS, die zur Zytotoxizität beiträgt (Marullo *et al.*, 2013). In SH-SY5Y^R-Zellen konnte eine Hochregulation der mRNA von antioxidativ wirkenden Faktoren wie GSTM1 (Glutathion-S-Transferase M1) und DYRK1B (*dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B*) nachgewiesen werden (siehe auch Abschnitt 4.1.4). Daher lässt sich spekulieren, dass SH-SY5Y^R-Zellen durch diese Anpassung kurzfristig weniger Cisplatin-induzierten oxidativen Stress haben könnten und daher erst nach längerer Zeit ATR aktiviert wird. Möglicherweise liegt bei SH-SY5Y-Zellen auch basal etwas mehr oxidativer und replikativer Stress vor als bei SH-SY5Y^R-Zellen.

Passend zum Anstieg der aktivierenden Phosphorylierung von ATR wurde in beiden Zelllinien nach Behandlung mit LY2603618 auch vermehrt pCHK1 nachgewiesen. Anders als man vielleicht zunächst annehmen könnte, steht dies nicht im Widerspruch zur CHK1-Inhibition, da es sich bei der detektierten Phosphorylierung an Serin 345 (S345) um eine bei DNA-Schäden durch pATR katalysierte Phosphorylierung handelt (Liu *et al.*, 2000), nicht um eine Autophosphorylierung. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass auch eine Behandlung mit LY2603618 alleine eine DNA-Schadensantwort auslöst, vor allem in Form einer frühen Aktivierung des ATR/CHK1-Signalweges nach 0 h und 2 h Postinkubation. Dies ist damit begründbar, dass auch eine CHK1-Inhibition ohne Zufügen weiterer DNA-Schäden durch vermehrte Replikationsursprünge und ins Stocken geratene Replikationsgabeln zu DNA-Strangbrüchen führt (King *et al.*, 2014). In beiden Zelllinien ließ sich der stärkste pCHK1-Anstieg aber nach Kombinationsbehandlung nachweisen, was auf eine stärkere Aktivierung des ATR-CHK1-Signalweges nach Kombinationsbehandlung hindeutet. Daraus lässt sich schließen, dass die Kombinationsbehandlung mit LY2603618 mehr DNA-Schäden induziert, als eine Behandlung mit Cis- oder Carboplatin alleine. Es konnte gezeigt werden, dass nach 4 h Pulsbehandlung zumindest

tendenziell mehr Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen und nach 24 h Dauerbehandlung auch signifikant mehr Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach Kombinationsbehandlung entstehen als nach Monobehandlung (Abbildung 3.12 und 3.13). Dies passt zur stärkeren Aktivierung des ATR-CHK1-Signalweges nach Kombinationsbehandlung. Auch γ H2AX nimmt in beiden Zelllinien am meisten nach Kombinationsbehandlung zu. Die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin in beiden Zelllinien zeigt bereits nach 2 h Postinkubation einen erkennbaren Anstieg von γ H2AX, mit Carboplatin jedoch erst nach 24 h. Dies ist gut vereinbar mit der bereits zuvor diskutierten unterschiedlichen Kinetik. Carboplatin bindet langsamer an die DNA (Hah *et al.*, 2006), sodass DNA-Schäden vermutlich später eintreten.

Auch der ATM-CHK2 (Checkpoint-Kinase 2)-Signalweg wird vermutlich in beiden Zelllinien aktiviert. Für beide Zelllinien konnte eine Zunahme von P53 und an S15 phosphoryliertem P53 nach Behandlung verzeichnet werden, die nach Kombinationsbehandlung am stärksten ausfiel. Da P53 DNA-Doppelstrangbruch-induziert durch die Kinasen ATM und DNA-PK an Serin 15 (S15) phosphoryliert wird, ist eine Aktivierung des ATM-CHK2-Signalweges naheliegend (Cheng & Chen, 2010). In beiden Zelllinien zeigt sich ein Anstieg von pKAP1 (*KRAB-associated protein 1*), welcher insbesondere bei SH-SY5Y^R-Zellen besonders deutlich nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin oder Carboplatin und LY2603618 in Erscheinung tritt (Abbildung 3.10 und 3.11). KAP1 wird im Heterochromatin ATM-abhängig infolge von DNA-Schäden phosphoryliert (White *et al.*, 2012). So deutet auch das Muster der KAP1-Aktivierung auf eine DNA-Doppelstrangbruch-induzierte ATM-Aktivierung hin.

Dass die Aktivierung der ATM/CHK2-Achse im Zeitverlauf hier tendenziell später als die der ATR-CHK1-Achse erfolgt, passt dazu, dass der ATM/CHK2-Signalweg eher durch Doppelstrangbrüche aktiviert wird (Shibata & Jeggo, 2021). Diese entstehen ebenso wie γ H2AX-Foci vermutlich verzögert, wenn die durch Cisplatin induzierten DNA-Crosslinks die S-Phase durchlaufen haben (Olive & Banáth, 2009).

Auffälligerweise führen Mono- und Kombinationsbehandlung eher zu einer Verringerung der Phosphorylierung von P38 MAPK (Abbildung 3.10 und 3.11). Da der P38 MAPK-Signalweg durch Faktoren wie UV-Licht, ionisierende Strahlung, oxidativen Stress, aber auch durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird (Wood *et al.*, 2009), wäre eher eine Behandlungs-induzierte Zunahme von pP38 zu erwarten.

Zusammenfassend konnte deutlich gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung mit LY2603618 und den Platinverbindungen sowohl bei SH-SY5Y als auch bei SH-SY5Y^R-Zellen zu einer vermehrten Aktivierung der DNA-Schadensantwort führt.

4.1.3.2 Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Bildung von γ H2AX/53BP1-Foci

Die an Serin 139 phosphorylierte Histonvariante H2AX sowie das P53-bindende Protein 1 (53BP1) akkumulieren im Bereich von DNA-Doppelstrangbrüchen und bilden dadurch detektierbare Foci, die die Analyse der Bildung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ermöglicht (Popp *et al.*, 2017).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Monobehandlung mit LY2603618, Cisplatin oder Carboplatin jeweils zu einer leichten Zunahme der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle führt. Eine Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 bewirkt eine Induktion von lediglich geringfügig mehr γ H2AX-Foci als die jeweilige Monobehandlung. In SH-SY5Y-Zellen sind diese nach 2 h Postinkubation und in SH-SY5Y^R-Zellen verzögert nach 24 h Postinkubation nachweisbar (Abbildung 3.9). Dabei gilt zu beachten, dass es sich lediglich um Tendenzen und nicht um statistisch signifikante Unterschiede handelt. Zudem zeigte sich eine sehr ungleichmäßige Verteilung der Foci in den Zellen. Wie auf den ausgewählten repräsentativen Fluoreszenzbildern erkennbar ist (Abbildung 3.9 D und E sowie Anhang Abbildung 6.10), traten häufig nach Behandlung wenige Zellen mit sehr vielen Foci auf, während gleichzeitig auch viele Zellen mit äußerst wenigen Foci sichtbar waren. Es wird angenommen, dass die Bildung von γ H2AX-Foci maßgeblich in der S-Phase erfolgt, wenn DNA-Replikationsgabeln auf noch nicht reparierte Cisplatin induzierte DNA-Crosslinks treffen und dadurch DNA-Doppelstrangbrüche entstehen (Olive & Banáth, 2009). Für SH-SY5Y-Zellen werden sehr variable Verdopplungszeiten zwischen 27 h und 55 h beschrieben (Feles *et al.*, 2022), im Rahmen der Experimente für diese Arbeit wurden je nach Zellkulturpassage durchschnittlich 50 h nachgewiesen. Betrachtet man diese für Tumorzellen eher langsame Verdopplungszeit und die dazugehörige Zellzyklusverteilung (Abbildung 3.5), so wird deutlich, dass innerhalb der untersuchten 0 h, 2 h und 24 h Postinkubationszeit nur ein Teil der Zellen die S-Phase durchlaufen haben kann. Dies könnte bedeuten, dass deshalb auch nur ein Teil der Zellen zu diesen Zeitpunkten bereits DNA-Doppelstrangbrüche erworben hat und daher vermehrt Foci aufweist. Um dies zu überprüfen, könnte

eine durchflusszytometrische Analyse mit Anfärbung von γ H2AX durchgeführt werden, die eine Zuordnung des Ausmaßes der Ausbildung von γ H2AX zu den einzelnen Zellzyklusphasen erlaubt.

Es fällt auf, dass die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung ihr Maximum bei SH-SY5Y-Zellen nach 2 h Postinkubation erreicht und danach wieder abnimmt, wohingegen das Maximum bei SH-SY5Y^R-Zellen erst nach 24 h Postinkubation erreicht ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen bei SH-SY5Y^R-Zellen vermutlich später einsetzt als bei SH-SY5Y-Zellen. Wie in Abschnitt 4.1.3.3 diskutiert, sind nach 0 h, 2 h und 24 h Postinkubation nach äquimolarer Behandlung ähnliche Mengen an 1,2-GpG-Intrastrangverknüpfungen in beiden Zelllinien nachweisbar (Abbildung 3.12), sodass die Ausbildung der Addukte gleich schnell zu erfolgen scheint. Also scheint bei SH-SY5Y^R-Zellen der Schritt der Ausbildung der Doppelstrangbrüche im Bereich der Addukte möglicherweise langsamer abzulaufen. Gegen eine verzögerte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen bei SH-SY5Y^R-Zellen sprechen jedoch die Ergebnisse der γ H2AX-Detektion in der Western Blot-Analyse (Abbildung 3.10 und 3.11). Diese zeigten für beide Zelllinien die größte Menge γ H2AX zeitgleich nach 24 h Postinkubation nach Kombinationsbehandlung. Um die Kinetik der Entstehung von γ H2AX bzw. DNA-Doppelstrangbrüchen genauer zu klären, könnte daher eine gesamtfloreszenzbasierte Analyse von γ H2AX hilfreich sein.

Dass sich nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 lediglich eine leichte Tendenz zu einer vermehrten γ H2AX-Foci-Ausbildung zeigte und die Kombinationsbehandlung mit Carboplatin ähnlich viele γ H2AX-Foci wie die Monobehandlung ergab, widerspricht ebenfalls den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen. Aus letzteren ging für alle Kombinationsbehandlungen in beiden Zelllinien sowohl eine stärkere Induktion der DNA-Schadensantwort als auch eine größere Gesamtmenge an γ H2AX hervor als nach Monobehandlung (Abbildung 3.10 und 3.11). Dies könnte aber auch darin begründet sein, dass im Western Blot die gesamte Menge an γ H2AX gemessen wird, wohingegen die Foci-Analyse lediglich nukleäres und in Form von Foci akkumuliertes γ H2AX erfasst.

In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen wurde auch in anderen Publikationen eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch LY2603618 alleine gezeigt (Zhao *et al.*, 2016). Die durch LY2603618 bewirkte CHK1-Inhibition verhindert die CHK1-vermittelte Stabilisation von Replikationsgabeln in der S-Phase und bewirkt so weitere DNA-Doppelstrangbrüche (King *et al.*, 2014). DNA-Doppelstrangbrüche entstehen auch basal z. B. im Rahmen endogener Prozesse wie DNA-Replikation und Transkription (Cannan & Pederson, 2016). Dies erklärt, weshalb auch die unbehandelten Kontrollzellen γ H2AX-Foci aufweisen (Abbildung 3.9).

Die durchschnittliche Anzahl an 53BP1-Foci fiel unter allen Bedingungen deutlich geringer aus und zeigte weniger behandlungsinduzierte Variabilität als die Anzahl der γ H2AX-Foci. Die Anzahl der 53BP1-Foci und kolokalisierten Foci zeigte nach 2 h Postinkubation nach Monobehandlung bei allen Substanzen in beiden Zelllinien eine geringfügige tendenzielle, aber statistisch nicht signifikante Zunahme. Die Kombinationsbehandlung induzierte dabei nicht mehr 53BP1- und kolokalisierte Foci als die Monobehandlung (Abbildung 3.9). Dieses Ergebnis ist damit vereinbar, dass die Menge der Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach nur 4-stündiger Kombinationsbehandlung auch nur tendenziell leicht und nicht statistisch signifikant höher ausfällt als nach Monobehandlung (Abbildung 3.12 D).

Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 führen demzufolge also zu einer vermehrten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, die sich durch Kombinationsbehandlung nicht signifikant weiter steigern lässt. Dies widerspricht den Erwartungen, da die Kombinationsbehandlung in dieser Arbeit nachweislich zu mehr Zelltod, Viabilitätsverlust und Apoptose führt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Analysen von Zellzyklus, Zellviabilität und Apoptose unter anderen Bedingungen erfolgten. Für diese wurde eine Dauerbehandlung von 24 h, 48 h und 72 h gewählt, die Foci-Analyse erfolgte hingegen nach 4-stündiger Pulsbehandlung und 0 h, 2 h sowie 24 h substanzfreier Postinkubation.

Es ist denkbar, dass die Kombination mit LY2603618 erst unter Dauerbehandlung zu vermehrten Zelltod-induzierenden DNA-Doppelstrangbrüchen führt. Diese These wird durch die Analyse der 1,2-GpG-Intrastrangverknüpfungen nach 24 h Dauerbehandlung gestützt. In dieser ließen sich nach 24 h Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 signifikant mehr 1,2-GpG-Intrastrangverknüpfungen nachweisen als nach Monobehandlung mit Cisplatin (Abbildung 3.13). Da Platin-DNA-Addukte in DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren, wenn die Replikationsgabel auf diese trifft, sind auch vermehrte DNA-Doppelstrangbrüche nach 24 h kombinierter Dauerbehandlung wahrscheinlich (Olive & Banáth, 2009). Um dies zu überprüfen, wäre eine Analyse der residualen γ H2AX-Foci nach 24 h Dauerbehandlung aufschlussreich.

Andererseits ist auch denkbar, dass die verstärkte Zytotoxizität und Apoptoseinduktion durch Kombinationsbehandlung nicht hauptsächlich durch vermehrte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen bedingt ist, sondern z. B. durch eine vermehrte toxische Wirkung auf Proteine oder eine unabhängig von DNA-Schäden erfolgende Aktivierung proapoptotischer Signalwege.

Dass SH-SY5Y^R-Zellen bei äquitoxischer Behandlung nicht weniger DNA-Doppelstrangbrüche aufweisen als SH-SY5Y-Zellen passt dazu, dass sie nach äquimolarer Behandlung gleich viele Pt-GpG-Intrastrangverknüpfungen aufweisen (Abbildung 3.12 A-C).

4.1.3.3 Einfluss von Cisplatin sowie LY2603618 auf die Bildung von Pt-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen

Einen Großteil der Cisplatin-induzierten DNA-Schäden stellen Intrastrangverknüpfungen dar, wovon den größten Anteil Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen ausmachen (Rabik & Dolan, 2007). Diese werden als die hauptsächlichen zytotoxischen Läsionen unter den Cisplatin-induzierten DNA-Schäden angesehen, da sie anders als z. B. 1,3-Intrastrangverknüpfungen weniger effektiv durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben werden (Moggs *et al.*, 1997; Rabik & Dolan, 2007; Zamble *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde nur die Bildung von Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach Cisplatin-Behandlung untersucht, nicht jedoch nach Carboplatin-Behandlung, obwohl die meisten anderen Experimente mit beiden Platinverbindungen durchgeführt wurden. Innerhalb der Zelle werden Cisplatin und Carboplatin in dieselbe aktivierte hydrolysierte Form umgewandelt, da sowohl die Chloridliganden bei Cisplatin als auch der 1,1-Cyclobutandicarboxylat-Ligand bei Carboplatin durch Wassermoleküle substituiert werden (Oliveira *et al.*, 2018). Dies führt zu der Annahme, dass nach Cis- und Carboplatin die gleichen Addukte entstehen. Die maximale Menge an Addukten entsteht nach Behandlung mit Carboplatin jedoch erst 6 – 12 Stunden später als nach Behandlung mit Cisplatin, weist also eine langsamere Kinetik auf (Blommaert *et al.*, 1995; Micetich *et al.*, 1985). Der Fokus bei der Untersuchung der Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen lag darin zu ermitteln, ob sich Unterschiede in der Menge der Addukte und der Kinetik der Entstehung der Addukte zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen zeigen und ob die Kombination mit dem CHK1-Inhibitor diese beeinflusst. Da die gleichen Addukte entstehen, genügte für die Betrachtung dieser Zusammenhänge die Untersuchung mit Cisplatin.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 24 h nach einer vierstündigen Cisplatin-Pulsbehandlung für Konzentrationen bis einschließlich 10 µM keine relativen Unterschiede in der entstandenen Menge an Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen festgestellt werden (Abschnitt 3.1.6). Dies gilt zumindest für Cisplatin-Konzentrationen im Bereich von 0,5 – 10

μM und für die Zeitpunkte 0 h, 2 h sowie 24 h nach der Pulsbehandlung (Abbildung 3.12). Dies leitet zu der Annahme, dass geringe Cisplatin-Konzentrationen zur Entstehung eines ähnlichen Ausmaßes an Addukten in beiden Zelllinien führen. Zudem scheinen die Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen die entstandenen Addukte nicht schneller zu reparieren als die Zellen des Wildtyps, da sonst zumindest 24 h nach Behandlung bei SH-SY5Y^R-Zellen weniger Addukte zu erwarten wären. Eine verminderte Bildung von Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen oder eine gesteigerte NER-Kapazität erscheint als Resistenzmechanismus hier somit unwahrscheinlich. Dies lässt sich zumindest für den Bereich niedrigerer Cisplatin-Konzentrationen postulieren, wie sie auch in dieser Arbeit für die Kombinationsbehandlung mit dem CHK1-Inhibitor gewählt wurden. Die fehlenden Expressionsunterschiede des DNA-Exzisionsreparaturproteins ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*) bei resistenten und nicht-resistenten Neuroblastomzellen nach äquimolarer Behandlung stützt diese These ebenfalls (Abbildung 3.15 C und D). Nach Behandlung mit 20 μM Cisplatin wiesen SH-SY5Y^R-Zellen 24 h später weniger Addukte auf als SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.12 C). Dies könnte darauf hindeuten, dass im Bereich höherer Cisplatin-Konzentrationen bei SH-SY5Y^R-Zellen die NER effektiver bzw. schneller funktioniert als bei SH-SY5Y-Zellen. Es könnte auch bedeuten, dass ein etwaiger Unterschied in der Reparaturkapazität erst bei höheren Konzentrationen in Erscheinung tritt, wenn die Kapazitäten der NER in SH-SY5Y-Zellen erschöpft sind. Auch eine vermehrte Detoxifizierung oder vermehrter Efflux von Cisplatin durch resistente Zellen nach Exposition gegenüber höheren Konzentrationen wäre möglich. Um diese Thesen widerlegen oder bekräftigen zu können, wären weitere Analysen der Intrastrang-Addukt-Mengen sowie Expressionsanalysen im Bereich hoher Cisplatin-Konzentrationen notwendig. Die Genexpressionsanalysen (Abschnitt 3.1.7) zeigen, dass der Efflux-Transporter MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) in SH-SY5Y^R-Zellen bereits basal stärker exprimiert wird und anders als bei SH-SY5Y-Zellen im Bereich niedriger Cisplatin-Konzentrationen (2 μM) noch weiter hochreguliert wird (Abbildung 3.15 A und B). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass bei SH-SY5Y^R-Zellen vermehrt Cisplatin exportiert wird, bei gleicher Konzentration somit weniger Cisplatin intrazellulär vorliegt und die Cisplatin-Resistenz somit dadurch bedingt sein könnte. Dies widerspricht der Tatsache, dass nach Behandlung mit 2 μM Cisplatin nicht weniger 1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen bei SH-SY5Y^R- als bei SH-SY5Y-Zellen zu finden waren (Abbildung 3.12 A-C). Da sich auch nach 24 h Dauerbehandlung gleiche Mengen an 1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen in beiden Zelllinien zeigen (Abbildung 3.13), scheint auch die Möglichkeit unwahrscheinlich, dass die Cisplatin-resistenten Zellen erst nach längerer Behandlungsdauer relevant verstärkten Efflux oder Detoxifizierung zeigen. Die im Rahmen der

Zellviabilitäts-Analyse nachgewiesene Cisplatin-Resistenz ist somit vermutlich eher durch andere Mechanismen wie z. B. eine größere Apoptose-Resistenz gegenüber vorhandenen DNA-Schäden begründet.

Die Kombination mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 führte nach 24 h Dauerbehandlung in Cisplatin-resistenten und wildtypischen Neuroblastomzellen gleichermaßen zu annähernd der doppelten Menge an Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung. Nach 4 h Pulsbehandlung und Postinkubation besteht nur eine leichte Tendenz zu vermehrten 1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen nach Kombinationsbehandlung (Abbildung 3.12 D). Die Zunahme der Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen ist vermutlich darin begründet, dass die LY2603618 bedingte CHK1-Inhibition den Abbau der Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen inhibiert bzw. vermindert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass CHK1-Inhibition über eine Aufhebung des DNA-Schaden-induzierten G2-Arrests und den daraus folgenden verfrühten Eintritt in die Mitose zu einer Chemosensitivierung führt (King *et al.*, 2014; Morgan *et al.*, 2010). Das vermehrte Auftreten der Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen passt zu dem in Abschnitt 4.1.2 diskutierten aufgehobenen G2-Arrest. Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen werden durch die NER repariert (Ober & Lippard, 2008). Eine Aufhebung des G2-Arrests hindert die Tumorzellen jedoch an der Reparatur der DNA-Schäden vor Eintritt in die Mitose (Bucher & Britten, 2008). Über diesen Mechanismus könnte LY2603618 bei Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y und der Cisplatin-resistenten Variante SH-SY5Y^R gleichermaßen eine Chemosensitivierung gegenüber Cisplatin durch vermehrte DNA-Schäden bewirken.

4.1.3.4 Zusammenfassung des Einflusses von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Bildung von DNA-Schäden und die Aktivierung der DNA-Schadensantwort

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Dosis-abhängige Bildung von Pt-1,2-GpG-Intrastrangverknüpfungen nach Behandlung mit Cisplatin. Weiterhin induzieren Cis- und Carboplatin, aber auch LY2603618 vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche. Cisplatin-resistente Neuroblastomzellen weisen dabei bei gleichen Dosierungen nicht weniger Intrastrangverknüpfungen und DNA-Doppelstrangbrüche auf, sodass eine verminderte Ausbildung oder effizientere Reparatur von DNA-Schäden als Resistenzmechanismus im Bereich der gewählten Stoffkonzentrationsbereiche und Behandlungszeiten eher ausgeschlossen werden kann. Unabhängig davon bewirkt eine

Kombinationsbehandlung mit LY2603618 bei Dauerbehandlung vermehrt Intrastrangverknüpfungen, aber nicht eindeutig mehr DNA-Doppelstrangbrüche. Die Aktivierung der DNA-Schadensantwort wird in wildtypischen und Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen nach Cis- und Carboplatin-Behandlung zwar mit einer leicht unterschiedlichen Kinetik, aber vom Muster her sehr ähnlich ausgelöst. Dabei wird sowohl der ATR/CHK1- als auch der ATM/CHK2-Signalweg aktiviert. Nach Kombinationsbehandlung mit LY2603618 wird die DNA-Schadensantwort in beiden Zelllinien noch stärker aktiviert, was vermutlich einen der molekularen Mechanismen hinter der gesteigerten Zytotoxizität durch Kombinationsbehandlung darstellt.

4.1.4 Einfluss von Cisplatin sowie LY2603618 auf die Expression Cisplatinresistenz-assoziierter Faktoren

4.1.4.1 Unterschiede der basalen Genexpression zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen

Betrachtet man die basale Expression von Genen, die nach Galluzzi *et al.* als relevant für Cisplatin-Resistenz definiert wurden, so zeigten sich bei einigen Genen signifikante Unterschiede. Im Bereich der Apoptose- und Survival-assozierten Gene exprimierte die Cisplatin-resistente Linie SH-SY5Y^R etwa die zweifache Menge an *DYRK1B* im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.14). Auch in der Literatur ist eine Assoziation von *DYRK1B* mit Cisplatin-Resistenz beschrieben (Galluzzi *et al.*, 2012). Für *DYRK1B* wurde unter anderem in dukalen Adenokarzinomen des Pankreas eine fördernde Wirkung auf das Überleben der Tumorzellen gezeigt (Deng *et al.*, 2006). An Pankreaskarzinomzellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Kinase *DYRK1B* durch die Induktion antioxidativer Enzyme den Gehalt an ROS senkt und somit die Tumorzellen vor oxidativem Stress schützt (Deng, 2009). Zudem verhindert die Kinase *DYRK1B* einen Übergang ruhender Tumorzellen zurück in den Zellzyklus und vermindert in ruhenden Zellen die Menge an ROS über die Induktion antioxidativer Faktoren (Deng, 2009; Jin *et al.*, 2009). Da Cisplatin oxidativen Stress in Zellen induziert (Kumar & Tchounwou, 2015), kann angenommen werden, dass eine Heraufregulation von *DYRK1B* auch bei SH-SY5Y-Zellen potenziell die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Cisplatin steigert. Mit *GSTM1* (Glutathion S-Transferase M1) ist ein weiterer Faktor mit antioxidativer Wirkung bereits basal in SH-SY5Y^R-Zellen erhöht (Abbildung 3.14). Glutathion-S-Transferasen katalysieren die Verbindung nicht-polarer

Verbindungen mit Glutathion über einen nukleophilen Angriff (Hayes *et al.*, 2005). Für Lungenkarzinomzellen konnte bereits eine Resensitivierung Cisplatin-resistenter Tumorzellen gegenüber Cisplatin durch pharmakologische Inhibition von GSTM1 gezeigt werden (Wang *et al.*, 2011). Die mehr als zweifache Heraufregulation des Efflux-Transporters *MRP2* in SH-SY5Y^R-Zellen gemessen an der basalen Expression in SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.14) lässt einen gesteigerten Cisplatin-Efflux bei Cisplatin-resistenten Zellen vermuten. Die bisher genannten Veränderungen der Genexpression legen nahe, dass der Resistenzmechanismus in einer Verringerung der intrazellulär wirksamen Cisplatin-Konzentration durch eine Kombination aus gesteigerter Detoxifikation durch GSTM1 und DYRK1B und gesteigertem Efflux über *MRP2* liegen könnte. Diese Hypothese würde jedoch auch zu der Annahme führen, dass aufgrund einer geringeren effektiven intrazellulären Cisplatin-Konzentration eine verminderte Induktion von DNA-Schäden wie Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen und DNA-Doppelstrangbrüchen vorliegen müsste. Dieser Annahme widersprechen die Ergebnisse aus der Analyse der DNA-Intrastrangverknüpfungen, welche nach Behandlung mit äquimolaren Cisplatin-Konzentrationen bei SH-SY5Y-Zellen und SH-SY5Y^R-Zellen eine ähnliche Menge von Addukten zeigt (Abbildung 3.12). Dass nach Exposition gegenüber 20 µM Cisplatin anders als bei geringeren Konzentrationen signifikant weniger DNA-Intrastrangverknüpfungen in den Cisplatin resistenten SH-SY5Y^R-Zellen ausgebildet wurden als in SH-SY5Y-Zellen, könnte darauf hindeuten, dass die stärkere Expression von *MRP2*, *DYRK1B* und *GSTM1* möglicherweise erst bei etwas höheren Cisplatin-Konzentrationen relevant wird. So kann diskutiert werden, ob die größere Kapazität von SH-SY5Y^R-Zellen zur Detoxifikation und zum Efflux von Cisplatin bei geringeren Konzentrationen womöglich noch keinen Unterschied macht, da sich bei geringeren Konzentrationen auch bei SH-SY5Y-Zellen die entsprechenden Enzyme und Transporter noch nicht in der Sättigung befinden. Die Ergebnisse der Untersuchung der Induktion von γH2AX- und 53BP1-Foci als Hinweis auf DNA-Doppelstrangbrüche weisen in eine ähnliche Richtung (siehe Abschnitt 4.1.3.2). Hier zeigten sich nach äquitoxischer Behandlung mit Cis- und Carboplatin bei SH-SY5Y^R nicht weniger γH2AX-, 53BP1- und kolokalisierte Foci. Somit kann eine ähnlich starke Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in Cisplatin-resistenten Zellen und Wildtyp-Zellen angenommen werden – zumindest unter den im Rahmen diese Arbeit untersuchten Bedingungen mit 4 h Pulsbehandlung mit eher niedrigeren Cis- und Carboplatin-Konzentrationen aus dem Bereich der jeweiligen IC₂₀ nach 72 h. Für eine bessere Vergleichbarkeit könnte man noch die Menge der γH2AX-, 53BP1- und kolokalisierten Foci nach 24 h-, 48 h- oder 72 h-Dauerbehandlung analysieren. Dennoch sollten angesichts der etwa gleichen Menge an induzierten DNA-Schäden in beiden Zelllinien andere

Ursachen für die Cisplatin-Resistenz der SH-SY5Y^R-Zellen diskutiert werden. So kann Cisplatin nicht nur durch Induktion von DNA-Schäden Apoptose auslösen, sondern beispielsweise auch vermittelt über eine Aktivierung von Caspasen durch die Induktion von Endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress (Rabik & Dolan, 2007). Um zu überprüfen, ob SH-SY5Y^R-Zellen als Resistenzmechanismus besser ER-Stress kompensieren können oder ob durch die Heraufregulation von detoxifizierenden Enzymen wie GSTM1 weniger ER-Stress entsteht, wäre eine Untersuchung der ER-Stress-Antwort und von Proteinen wie z. B. den ER-Stress-assoziierten Transkriptionsfaktoren ATF4 (*activating transcription factor 4*) und ATF6 (*activating transcription factor 6*) oder dem ER-Chaperon GRP78 (*Glucose-regulated protein 78*) von Relevanz (Chen *et al.*, 2023).

Da die Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen der Cisplatin-Toxizität nicht durch eine verminderte Bildung von DNA-Intrastrangverknüpfungen und DNA-Doppelstrangbrüchen entgegenzuwirken scheinen, liegt der Resistenzmechanismus zumindest im Bereich der gewählten Cisplatin-Konzentrationen vermutlich eher in einer veränderten Antwort bzw. Reaktion der Zellen auf die gebildeten DNA-Schäden. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Induktion der DNA-Schadensantwort, so zeigen sich bei äquitoxischer Behandlung tendenziell ähnliche Reaktionsmuster (Abbildung 3.10 und 3.11). Wie aus der Genexpressionsanalyse hervorgeht, zeigte die Expression der untersuchten DNA-Reparatur-Gene basal keine Unterschiede zwischen den Zelllinien. Auffälligerweise exprimieren SH-SY5Y^R-Zellen basal weniger *BIRC5/Survivin* (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*) als SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.14). Survivin stellt einen Inhibitor der Apoptose dar (*inhibitor of apoptosis*, IAP), wird vor allem in der G2/M-Phase des Zellzyklus exprimiert, assoziiert sich mit Mikrotubuli des Spindelapparates und inhibiert die Effektor-Caspasen 3 und 7 (Ambrosini *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Liston *et al.*, 1996; Uren *et al.*, 1996). Eine Herunterregulation von *BIRC5/Survivin* konnte Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region gegenüber Cisplatin sensitivieren (Khan *et al.*, 2012). Umso überraschender ist die verminderte Expression in Cisplatin-resistenten SH-SY5Y^R-Zellen. Eine Erklärung dafür wäre, dass andere anti-apoptotische und protektive Mechanismen bei SH-SY5Y^R-Zellen mechanistisch im Vordergrund stehen, welche den nun verminderten anti-apoptotischen Effekt von *BIRC5/Survivin* kompensieren. Oder aber, die um etwa die Hälfte gegenüber SH-SY5Y-Zellen verringerte Expression ist noch nicht so gering, dass biologische Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien durch diese in Erscheinung treten würden.

4.1.4.2 Einfluss einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 auf die Expression Cisplatin-Resistenz-assoziiierter Faktoren

Nach Behandlung mit Cisplatin zeigten sich bei SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen teils gleichsinnige, teils gegenläufige Veränderungen der Genexpression von Cisplatin-Resistenz-assoziierten Faktoren.

SH-SY5Y-Zellen wiesen basal eine mehr als doppelt so starke Expression von *BIRC5/Survivin* verglichen mit SH-SY5Y^R-Zellen auf. Bei SH-SY5Y-Zellen erfolgte nach Cisplatin-Behandlung jedoch eine Herunterregulation, die bei SH-SY5Y^R-Zellen nicht erfolgte, sodass unter Behandlung ähnliche Expressionslevel bestanden (Abbildung 3.15 A und B). Somit scheint *BIRC5/Survivin* zumindest bei den in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzellen für die Cisplatin-Resistenz mechanistisch nicht wichtig zu sein. Möglicherweise sind SH-SY5Y^R-Zellen durch andere anti-apoptotische Anpassungsmechanismen weniger auf die Expression des *BIRC5/Survivin*-Gens angewiesen als SH-SY5Y-Zellen.

Die starke Induktion der Expression von *XAF1* durch Cisplatin-Behandlung in SH-SY5Y^R-Zellen erscheint widersprüchlich, bedenkt man, dass das Protein XAF1 die anti-apoptotischen Effekte des Caspase-Inhibitors XIAP aufheben kann und für Neuroblastomzellen einer anderen Linie bereits gezeigt werden konnte, dass eine *XAF1*-Überexpression Apoptose induziert (Choo *et al.*, 2016; Liston *et al.*, 2001). Dieses unerwartete Ergebnis wurde so auch bereits in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen beobachtet und eine akzidentielle, aber nicht kausale Korrelation oder aber unbekannte Zelllinien-spezifische überlebensfördernde Mechanismen darin vermutet (Höhn *et al.*, 2016). Das Auftreten dieses Phänomens in bereits zwei unabhängig voneinander durch Selektion generierten Cisplatin-resistenten Tumorzelllinien deutet darauf hin, dass XAF1 möglicherweise doch eine bisher unbekannte ambivalente Funktion aufweisen könnte, die unter Cisplatin-Behandlung das Zellüberleben fördert. Hierzu bedarf es jedoch weiterreichender Untersuchungen.

Die in beiden Zelllinien sehr konstant bleibende Expression des Tumorsuppressorgens *P53* bei gleichzeitig nachgewiesenem behandlungsinduzierten Anstieg auf Proteinebene (Abbildung 3.6, 3.7, 3.15 A und B) legt nahe, dass die Erhöhung der Proteinmenge eher nicht durch gesteigerte Genexpression erfolgt. Die Untersuchungen auf Proteinebene wurden allerdings nach 24 h, 48 h und 72 h Behandlung durchgeführt, die Genexpressionsanalysen jedoch nur nach 24 h dauerhafter Behandlung. Daher wäre ebenso möglich, dass zumindest nach 48 h und 72 h auch die Genexpression

hochreguliert wird, nur eben nicht bereits nach 24 h. Zu diesem frühen Zeitpunkt könnte der Anstieg auf Proteinebene aber durch Stabilisierung und verminderten Abbau des Proteins erfolgen.

Die meisten quantitativ sehr deutlichen Hochregulationen infolge der Kombinationsbehandlung finden sich im Bereich der Transportproteine und antioxidativen Enzyme (Abbildung 3.15 A - D). Die bereits basal gesteigerte Expression von *MRP2* stieg bei SH-SY5Y^R-Zellen nach 24 h Cisplatin-Behandlung noch weiter an, blieb bei SH-SY5Y-Zellen jedoch unter allen hier untersuchten Bedingungen konstant (Abbildung 3.15 A – B). Dies deutet auf den ersten Blick ebenfalls auf einen für die Cisplatin-Resistenz wichtigen Mechanismus hin. Im Widerspruch dazu steht jedoch die im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen gleiche Menge an induzierten DNA-Intrastrangverknüpfungen und DNA-Doppelstrangbrüchen, wie bereits unter den Abschnitten 4.1.3.2 und 4.1.3.3 erläutert. Die für antioxidative Enzyme kodierenden Gene *GPX1* (Glutathion-Peroxidase 1) und *HMOX1* (Häm-Oxygenase 1) wiesen nach Cisplatin-Monobehandlung bei SH-SY5Y^R Zellen eine statistisch signifikant stärkere Expression auf als bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.15 C und D). Nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 stieg bei beiden Zelllinien die Expression beider Enzyme auf das Drei- bis Vierfache an. Dies deutet auf eine ausgeprägte Erhöhung des oxidativen Stresses durch Kombinationsbehandlung hin. Dazu passt, dass eine gesteigerte Generierung von ROS infolge einer Inhibition von CHK1 auch in der Literatur bereits beschrieben ist (Ju *et al.*, 2020).

Bei Betrachtung der DNA-Reparatur-Gene fallen vor allem die Herunterregulation von *BRCA1* nach Cisplatin-Behandlung und die noch stärkere Herunterregulation nach Kombinationsbehandlung mit LY2603618 auf (Abbildung 3.15 C und D). Letztere erfolgte auch bei *BRCA2*. Für chronisch myeloische Leukämiezellen konnte bereits eine Herunterregulation der *BRCA1*-Expression nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von *CHK1* gezeigt werden (Fan *et al.*, 2020). So erscheint möglich, dass *BRCA1* auch in SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen aufgrund der pharmakologischen Inhibition von CHK1 durch LY2603618 weniger exprimiert wird. Da *BRCA1* und *BRCA2* wichtig für die DNA-Reparatur durch Homologe Rekombination sind (Ambjørn *et al.*, 2021; Powell & Kachnic, 2003), könnte die durch Kombinationsbehandlung induzierte Herunterregulation eine verminderte Homologe Rekombination und so eine verminderte Reparatur und ein vermehrtes Anfallen von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Folge haben. In dieser Arbeit konnte für beide Zelllinien jedoch nur eine leichte Tendenz einer vermehrten Induktion von γH2AX-Foci nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 im Vergleich zu einer Monobehandlung mit einer dieser Substanzen nachgewiesen werden (Abbildung 3.9). Weiterhin fällt auf, dass die mRNA von *MSH2*, die für das

Mismatch-Repair-Protein MSH2 (MutS-homolog 2) kodiert, in SH-SY5Y-Zellen herunterreguliert wurde, jedoch in SH-SY5Y^R-Zellen zumindest nach Monobehandlung mit Cisplatin nicht relevant abfiel (Abbildung 3.15 C und D). Dies ermöglicht bei SH-SY5Y^R-Zellen möglicherweise unter alleiniger Cisplatin-Exposition eine effizientere *Mismatch*-Repair als bei SH-SY5Y-Zellen. Da es sich trotz statistischer Signifikanz jedoch eher um Abweichungen um einen geringen Faktor handelt, muss ein biologisch relevanter Effekt hier dennoch kritisch hinterfragt werden. Die fehlenden Unterschiede zwischen SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen in der Expression des *ERCC1* (*excision repair cross-complementing 1*)-Gens, dessen Produkt als Endonuklease der NER fungiert (Faridounnia *et al.*, 2018), sind gut vereinbar mit dem Nachweis einer eher gleichen Menge an residualen Pt-1,2-GpG-Intrastrangverknüpfungen in beiden Zelllinien (Abbildung 3.12). Die Reparatur von Pt-1,2-GpG-Intrastrangverknüpfungen erfolgt hauptsächlich über die NER (Chu, 1994), sodass eine Hochregulation von Faktoren der NER eigentlich mit einer gesteigerten Reparaturkapazität und weniger Addukten einhergehen sollte. Passend dazu wurde für Ovarialkarzinomzellen eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe der *ERCC1*-Expression und der Menge an Cisplatin-DNA-Addukten nachgewiesen (Li *et al.*, 2000). Hierbei bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass noch weitere Faktoren für die NER notwendig sind, welche untersucht werden sollten, um eine eindeutige Aussage zu treffen.

Betrachtet man die Expression von *N-MYC*, so ist es wichtig, die vielfältigen Funktionen und teilweise ambivalenten Effekte von *N-MYC* insbesondere im Hinblick auf Cisplatin-Resistenz zu betonen. Für die Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, eine ebenfalls nicht *N-MYC*-amplifizierte Vorläuferzelllinie von SH-SY5Y, konnte eine gesteigerte Cisplatin-Resistenz durch *N-MYC*-Amplifikation und damit einhergehende gesteigerte mitochondriale Biogenese und Funktion aufgezeigt werden (Casinelli *et al.*, 2016; Kovalevich & Langford, 2013). Andererseits wurde eine *N-MYC*-abhängige P53-vermittelte Sensitivierung von Neuroblastomzellen gegenüber Apoptoseinduktion infolge von DNA-Schäden beschrieben (Petroni *et al.*, 2011). SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen zeigten auf mRNA-Ebene eine ähnlich hohe *N-MYC*-Expression, welche tendenziell in beiden Zelllinien durch Behandlung mit Cisplatin abnahm, was durch Kombinationsbehandlung mit LY2603618 noch weiter forciert wurde (Abbildung 3.15 E und F). Es fällt auf, dass die *N-MYC*-Expression nach 72 h Behandlung mit Cisplatin alleine bei SH-SY5Y-Zellen stärker abnahm und nur etwa halb so hoch ausfiel wie bei SH-SY5Y^R-Zellen (Abbildung 3.15 E und F). Da die Expression zu diesem Zeitpunkt jedoch in beiden Zelllinien sehr gering ausfiel, muss beachtet werden, ob die Unterschiede überhaupt biologisch relevant sind. Der Einfluss des Faktors *N-MYC* auf die Resistenz gegenüber Cisplatin ließe sich im Rahmen einer experimentellen Herunterregulation von *N-MYC* mit shRNA sowie durch weitere, im Rahmen eines

weiteren Projektes geplante Untersuchungen an einer *N-MYC*-amplifizierten-Neuroblastomzellen wie der Zelllinie IMR-32 weiter untersuchen (Campos Cogo *et al.*, 2020). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit nur die mRNA-Menge betrachtet wurde und weitere Untersuchungen von N-MYC auf Proteinebene für eine Bewertung des Einflusses von N-MYC auf die Cisplatin-Resistenz bei SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen notwendig wären. Für Medulloblastomzellen konnte zuvor in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem CHK1-Inhibitor AZD-7762 bei *C-MYC*-amplifizierten Zellen zu einer Herunterregulation des C-MYC-Proteins führt (Krüger *et al.*, 2018). Es könnte daher vermutet werden, dass eine Behandlung mit LY2603618 in Neuroblastomzellen ebenfalls eine Herunterregulation von N-MYC bewirken könnte. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass hier die mRNA-Menge und nicht die Proteinmenge untersucht wurde. Zudem wurde die Herunterregulation der *N-MYC*-mRNA in dieser Arbeit nach Kombinationsbehandlung mit LY2603618 und Cisplatin festgestellt. Um zu überprüfen, inwieweit dieser Effekt welcher der beiden Substanzen zuzurechnen ist, müsste noch eine ergänzende Überprüfung der mRNA-Menge nach alleiniger LY2603618-Behandlung durchgeführt werden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass Cisplatin-resistente Neuroblastomzellen über die verstärkte Expression der Gene des Efflux-Transporters *MRP2* und des Enzyms *GSTM1* möglicherweise eine gesteigerte Export- und Detoxifikations-Kapazität als Resistenzmechanismen aufweisen, mit der sie Cisplatin-induzierte Zellschäden vermindern. Auch die Hochregulation der Expression des *DYRK1B*-Gens dürfte die antioxidative Kapazität der Zellen steigern und zudem auch über andere Wege das Zellüberleben fördern. Eine verstärkte Expression von Proteinen der DNA-Reparatur war in dieser Arbeit jedoch nicht detektierbar, sodass eine gesteigerte DNA-Reparaturkapazität als Resistenzmechanismus weniger wahrscheinlich ist. Letzteres ist mit den Ergebnissen der quantitativen Analysen der Induktion von Pt-1,2-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen (Abschnitt 3.1.6) und DNA-Doppelstrangbrüchen (Abschnitt 3.1.5) vereinbar, die für SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen auf ein ähnliches Ausmaß an DNA-Schäden hindeuten. Auf mRNA-Ebene zeigten sich Hinweise, dass die Kombination einer Cisplatin-Behandlung mit LY2603618 über eine Verminderung des anti-apoptotischen Faktors BIRC5/Survivin eine vermehrte Apoptose begünstigen könnte und über eine Depletion an DNA-Reparaturproteinen wie MSH2, BRCA1, BRCA2 und XRCC3 eine erhöhte Zytotoxizität bewirken könnte. Die nach Kombinationsbehandlung verstärkte Induktion der antioxidativen Enzyme GPX1 und HMOX1 bei gleichzeitig größerer Zytotoxizität (Abschnitt 3.1.1) liefert einen Hinweis auf vermehrten oxidativen Stress durch die Kombination mit LY2603618. Diesem scheinen die Zellen durch Enzyminduktion als Kompensationsmechanismus zu begegnen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cisplatin-resistente Neuroblastomzellen im Vergleich zu wildtypischen Neuroblastomzellen basal stärker Gene Efflux-vermittelnder Transportproteine wie *MRP2* sowie detoxifizierender Faktoren wie *GSTM1* und *DYRK1B* exprimierten. Unter Behandlung mit Cisplatin wurden in Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen *MRP2* sowie die detoxifizierenden Enzyme *GPX1* und *HMOX1* noch weiter hochreguliert. In wildtypischen Neuroblastomzellen erfolgte dies nicht. Zudem regulierten letztere das anti-apoptotische *BIRC5/Survivin* herunter. Dies lässt auf eine verstärkte Zellzyklus-Checkpoint-Aktivierung und einen besseren Erhalt anti-apoptotischer Signale als potenzielles Spektrum an Resistenzmechanismen in Neuroblastomzellen schließen. Das Expressionsprofil nach Kombination von Cisplatin mit LY2603618 wies unabhängig vom Cisplatin-Resistenz-Status eine Heraufregulation von *GPX1* und *HMOX1* sowie eine Hochregulation der DNA-Reparatur-Gene *BRCA1*, *BRCA2* und *XRCC3* auf. Dies könnte zusammenfassend auf ein Zusammenspiel aus vermehrtem oxidativen Stress bzw. vermehrtem Aufkommen von ROS und einer verminderten DNA-Reparatur als zytotoxische Mechanismen der Kombinationsbehandlung hinweisen.

4.1.4.3 Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Expression von P21

Die Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 resultierte in beiden Zelllinien in einer gesteigerten Expression von P21 auf Proteinebene, welche nach Kombinationsbehandlung noch einmal deutlich stärker ausfiel und bei SH-SY5Y^R-Zellen ausgeprägter war als bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.6 – 3.8). Interessanterweise führte auch eine alleinige Behandlung mit LY2603618 zu einer Heraufregulation von P21 in beiden Zelllinien. Dieser Effekt konnte bei Medulloblastomzellen durch Behandlung mit dem CHK1-Inhibitor AZD-7762 ebenfalls nachgewiesen werden, allerdings nur bei *C-MYC*-amplifizierten Zellen, nicht jedoch bei Fehlen der Amplifikation (Krüger *et al.*, 2018). Hier jedoch scheint derselbe Effekt trotz Fehlens der *N-MYC*-Amplifikation bei SH-SY5Y-Zellen eingetreten zu sein. Dies könnte möglicherweise auf unterschiedliche Wechselwirkungen von P21 und *N-MYC* bzw. *C-MYC* bei SH-SY5Y-Zellen und Medulloblastomzellen hindeuten oder durch die ambivalente biologische Wirkung von P21 zurückzuführen sein. Bei der Interpretation der Ergebnisse gilt es generell, die komplexen und teilweise ambivalenten Funktionen von P21 sorgfältig zu berücksichtigen. Der Cyclin-abhängige-Kinase (CDK)-Inhibitor P21 wird P53-induziert bei DNA-Schäden oder oxidativem Stress exprimiert und bewirkt einen Zellzyklus-Arrest (Shamloo & Usluer, 2019). So wird

der geschädigten Zelle P21-vermittelt Zeit zur DNA-Reparatur gewährt und sie wird vor Apoptose geschützt (Han *et al.*, 2002; Karimian *et al.*, 2016). Zudem moduliert P21 DNA-Reparatur-Prozesse (Abbas & Dutta, 2009). Durch den Zellzyklus-Arrest sowie die Inhibition von *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) kann P21 einerseits das Tumorwachstum begrenzen und als Tumorsuppressor fungieren. Andererseits kann sich P21 für den Tumor als förderlich erweisen, da eben jene Mechanismen auch vor der Akkumulation von DNA-Schäden schützen (Shamloo & Usluer, 2019; Viale *et al.*, 2009). Diese hinsichtlich des Tumorwachstums zweiseitigen Funktionen werden auch durch Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten widerspiegelt. So geht eine erhöhte P21-Expression u. a. beim Ösophaguskarzinom eher mit einer schlechteren Prognose einher (Sarbia & Gabbert, 2000), wohingegen die P21-Expression beim Lungenkarzinom eher mit längerem Überleben und besserer Prognose korreliert ist (Komiya *et al.*, 1997). In Anbetracht dieser Ambivalenz ist es auch möglich, dass die erhöhte P21-Expression der Cisplatin-resistenten Neuroblastomzelllinie hier den Tumorzellen einen Selektionsvorteil verschafft. Dass SH-SY5Y^R-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin deutlich mehr P21 aufweisen als SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.8 B und C) und dabei gleichzeitig weniger von der zytotoxischen Wirkung betroffen sind, lässt eine schützende Wirkung von P21 möglich erscheinen. Für Hodentumore und das Ovarialkarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass ein erhöhtes zytoplasmatisches Vorkommen von P21 mit Cisplatin-Resistenz einhergeht (Koster *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Zellen mit *P21*-knockout sensibler gegenüber einer Kombinationsbehandlung mit Irinotecan und dem CHK1-Inhibitor UCN-01 sind als Wildtyp-Zellen und *P53*-null Zellen. Es wurde dort auch herausgearbeitet, dass P21 wesentlich mitbestimmt, wie Normal- als auch Tumorzellen auf eine Kombinationstherapie mit einem CHK1-Inhibitor ansprechen (Origanti *et al.*, 2013). Dies lässt möglich erscheinen, dass eine Hochregulation von P21 protektiv gegenüber einer CHK1-Inhibition und einer Kombinationsbehandlung mit einem CHK1-Inhibitor wie LY2603618 wirken könnte. Die bereits basal und auch nach Behandlung in SH-SY5Y^R-Zellen erhöhte P21-Expression könnte daher womöglich auch die Kreuzresistenz von SH-SY5Y^R-Zellen gegenüber LY2603618 erklären. Über die Inhibition der Kinaseaktivität von CDK1 und CDK2 verhindert P21 bei DNA-Schäden den Übergang von der G1- in die S-Phase und auch von der G2-Phase in die Mitose (Abbas & Dutta, 2009). Die Kinase CHK1 bewirkt nach Aktivierung infolge von DNA-Schäden über eine Inhibition der Cdc25-Phosphatasen ebenso eine Inhibition von CDK1 und CDK2 (King *et al.*, 2014). Somit erscheint plausibel, dass bei Inhibition von CHK1 durch LY2603618 ein Zellzyklus-Arrest durch P21 erfolgen muss. Daher könnte P21 kompensatorisch hochreguliert werden und die Zellen vor ungehindertem Zellzyklusprogress trotz DNA-Schäden und

einer folgenden mitotischen Katastrophe schützen. Nichtsdestotrotz kann nicht eindeutig abgeleitet werden, ob die Hochregulation von P21 als Resistenzmechanismus fungiert, oder ob eine Korrelation ohne Kausalität vorliegt. Dazu wären weitere Analysen der Cisplatin-Sensitivität unter Knockdown von *P21* oder pharmakologischer Inhibition von P21 notwendig. Eine mögliche Assoziation von Cisplatin-Resistenz und P21-Expression ist beim Neuroblastom bisher in der Literatur nicht beschrieben.

4.1.5 Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Induktion Noradrenerg-Mesenchymaler Transition (NMT)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cisplatin-resistente Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y^R bereits basal ein Expressionsprofil aufweisen, das stark auf eine vermehrte Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) hindeutet. So war auf mRNA-Ebene der mesenchymalen Marker *N-Cadherin* hochreguliert (Abbildung 3.17 A). Zwar erreichen die Expressionsunterschiede nicht ganz den als biologisch relevant gewählten *cut-off*-Wert von 2, allerdings befinden sie sich nur sehr knapp darunter, sodass biologisch relevante Effekte zumindest zu diskutieren sind. Für E-Cadherin ist bereits hinreichend bekannt, dass eine Herunterregulation eine vermehrte Migrationsfähigkeit von Zellen und EMT bewirkt und für Metastasierung verschiedener Tumorentitäten erforderlich ist (Wendt *et al.*, 2011). Für N-Cadherin ist hier eine differenziertere Betrachtung notwendig. Eine vermehrte Expression von N-Cadherin konnte mehrfach als Zeichen für den Ablauf von EMT identifiziert werden, allerdings wurde beim Neuroblastom auch schon umgekehrt eine Korrelation von Metastasierung und niedrigen N-Cadherin-Leveln gezeigt (Lammens *et al.*, 2012; Loh *et al.*, 2019). Es muss berücksichtigt werden, dass es sich bei letzterem um eine Korrelation ohne Nachweis eines kausalen molekularen Zusammenhangs handelt, die einen Zusammenhang zwischen N-Cadherin-Heraufregulation und EMT nicht widerlegt hat. Zudem wurde bereits konkret für SH-SY5Y-Zellen gezeigt, dass N-Cadherin ebenso wie Vimentin positiv mit EMT und verstärkter Migration korreliert sind (Zhang *et al.*, 2022).

Da die Tumorzellen des Neuroblastoms anders als z. B. Kolon- oder Mammarkarzinomzellen nicht von epithelialen Zellen abstammen, sondern von neuroblastischen Zellen, wurde für den EMT-ähnlichen Prozess beim Neuroblastom der Begriff Noradrenerg-Mesenchymale-Transition (NMT) vorgeschlagen (Gautier *et al.*, 2021). Demnach kommen beim Neuroblastom noradrenerge N-Typ-Zellen vor, die Enzyme der Neurotransmittersynthese wie Tyrosin-Hydroxylase (TH), Dopamin- β -Hydroxylase (DBH),

aber auch neuroendokrine Marker wie Chromogranin exprimieren. Zudem gibt es S-Typ-Zellen, die Mesenchym-artigen Zellen entsprechen und z. B. Vimentin exprimieren (Gautier *et al.*, 2021). Aus diesem Grund wurde DBH hier als noradrenerger Marker verwendet. Die basale Herunterregulation der Expression des *DBH*-Gens in SH-SY5Y^R-Zellen stützt die These der NMT-Induktion in den verwendeten Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen. Nach 72 h hingegen wiesen beide Zelllinien eine deutliche Hochregulation von *N-Cadherin* verglichen mit dem Zelllinien-spezifischen Ausgangswert auf. Dies deutet ebenso wie die Herunterregulation der mRNA von *DBH* bei SH-SY5Y-Zellen auf eine NMT-Induktion durch Cisplatin hin (Abbildung 3.17 B und C).

Unter Berücksichtigung der Effekte nach 72 h Behandlung führt Cisplatin möglicherweise zu einem Erwerb der Fähigkeit zur NMT und begünstigt eine Selektion eben jener Zellen. Für diese Möglichkeit spricht, dass NMT bzw. allgemeiner EMT mit Cisplatin-Resistenz assoziiert ist und die Assoziation mit Cisplatin-Resistenz auch für das Neuroblastom bereits gezeigt werden konnte (Piskareva *et al.*, 2015).

EMT kann durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. *snail family transcriptional repressor 1* (SNAIL), *snail family transcriptional repressor 2* (SLUG), *twist family bHLH transcription factor 1* (TWIST) sowie *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* (ZEB1) und *Zinc finger E-box-binding homeobox 2* (ZEB2) aktiviert werden (Lamouille *et al.*, 2014). ZEB1 wird durch ATM phosphoryliert und stabilisiert und führt seinerseits zur Stabilisierung und Zunahme von CHK1, indem es die USP7-vermittelte Deubiquitylierung von CHK1 fördert und damit die proteasomale Degradation vermindert (Zhang *et al.*, 2014). Daraus lässt sich schließen, dass ZEB1 ein Bindeglied zwischen EMT und DNA-Schadensantwort darstellen könnte. Aufgrund dessen und wegen der Interaktion mit CHK1 als Zielstruktur von LY2603618 wurde ZEB1 exemplarisch als EMT-vermittelnder Transkriptionsfaktor mitanalysiert. Es zeigten sich allerdings in beiden Zelllinien ähnliche Expressionslevel und keine statistisch relevante Induktion oder Suppression von *ZEB1*-mRNA (Abbildung 3.17). Dies betrifft jedoch nur die Genexpression. Auf Proteinebene könnte ZEB1 theoretisch dennoch durch verminderten Abbau bzw. Stabilisation oder vermehrte Translation erhöht sein. Um dies zu überprüfen, müssten z. B. Western Blot-Analysen durchgeführt werden. Wenn ZEB1 auch auf Proteinebene nicht vermehrt detektierbar wäre, könnte die Induktion von EMT in den beiden Neuroblastomzelllinien möglicherweise aber auch verstärkt über die anderen oben genannten Transkriptionsfaktoren erfolgen und nicht über ZEB1.

Die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und LY2603618 führte in beiden Zelllinien nur zu leichten Genexpressionsveränderungen, die nicht richtungsweisend für eine verstärkte EMT bzw. NMT oder

ihre Umkehr sind. Dies gilt zumindest auf Proteinebene für N-Cadherin ebenso bei Kombinationsbehandlung mit Carboplatin (Abbildung 3.18). Nach 72 h zeigten sich auf Proteinebene nach allen Kombinationsbehandlungen etwas geringere Mengen N-Cadherin als nach Behandlung mit Cis- bzw. Carboplatin alleine. Um daraus eine verminderte EMT nach längerer Kombination mit LY2603618 ableiten zu können, bedarf es aber weiterführender Analysen von weiteren epithelialen und mesenchymalen Markern. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die densometrischen Auswertungen der Western Blot-Analysen keine statistische Signifikanz, sondern lediglich Tendenzen zeigen.

Schlussfolgern lässt sich insgesamt eine vermehrte NMT bei den hier verwendeten Cisplatin-resistenten Neuroblastomzellen sowie eine weitere Induktion von NMT durch Cis- und Carboplatin. Diese betrifft beide Zelllinien und wurde zumindest kurzfristig (24 h) nicht eindeutig durch Kombination mit LY2603618 moduliert. Ob die vermehrte NMT bei der Cisplatin-resistenten Zelllinie lediglich mit ihrer Resistenz korreliert oder aber die Resistenz kausal durch die verstärkte NMT mitbedingt ist, bleibt spekulativ und bedürfte zur Klärung weitere Experimente.

Zusammenfassend wiesen Cisplatin-resistente Neuroblastomzellen verstärkt einen mesenchymalen Phänotyp auf, dessen Expressionsprofil auf eine NMT hinweist, die mit Cisplatin-Resistenz assoziiert ist. Dieser Phänotyp wurde durch Cis- und Carboplatin-Behandlung verstärkt induziert. Eine Kombination mit dem CHK1-Inhibitor LY2603618 bewirkte nach 24 h auf Genexpressionsebene keine eindeutig einer Verstärkung oder Umkehr der NMT zuzuordnende Veränderungen.

4.2 Einfluss von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618 auf die Zellviabilität in proximalen Nierentubulusepithelzellen als Modell zur Abschätzung der Zytotoxizität in Normalzellen

Nephrotoxizität stellt bekanntermaßen eine therapeutisch relevante Dosis-limitierende Nebenwirkung von Cisplatin dar und resultiert aus einem Zusammenspiel aus Schäden nukleärer und mitochondrialer DNA in renalen Epithelzellen, Aktivierung Zelltod-induzierender Signalwege und einer inflammatorischen Zellantwort (Miller *et al.*, 2010). Die Nephrotoxizität ist vor allem bedingt durch die Aufnahme von Cisplatin in die proximalen Tubuluszellen in den Nephronen (Rabik & Dolan, 2007). Zur Untersuchung der Nephrotoxizität einer Behandlung mit Cis- oder Carboplatin in Kombination mit

LY2603618 wurde in dieser Arbeit daher eine proximale Nierentubulusepithelzelllinie herangezogen. Bei den verwendeten proximalen renalen Tubulusepithelzellen RPTEC/TERT1 handelt es sich um humane Zellen, welche ihre ursprüngliche Differenzierung beibehalten, genetisch stabil sind und als *in vitro* Modell für toxikologische Untersuchungen und die Entwicklung von Medikamenten geeignet sind (Wieser *et al.*, 2008). Es muss berücksichtigt werden, dass es sich bei proximalen Tubulusepithelzellen nur um eine von zahlreichen in der gesamten Niere vorkommenden Zellentitäten handelt. Für einen Vergleich mit der Situation *in vivo* müsste die Gesamtheit der Zellen betrachtet werden (Simon-Friedt *et al.*, 2015).

Eine Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 alleine zeigte sich bei humanen renalen proximalen Tubulusepithelzellen der Linie RPTEC/TERT1 erst bei Verwendung deutlich höherer Konzentrationen als ähnlich zytotoxisch wie bei den zuvor untersuchten Neuroblastomzellen (Abbildung 3.1 und 3.19 sowie Tab. 3.1 und 3.2). So betrug die IC₂₀ für Cisplatin bei SH-SY5Y-Zellen 0,5 µM, bei SH-SY5Y^R-Zellen 2 µM, während sie bei RPTEC/TERT1-Zellen mit 3 µM noch höher ausfiel. Für den CHK1-Inhibitor LY2603618 fiel der Unterschied zugunsten einer geringeren Zytotoxizität in den RPTEC/TERT1-Zellen noch deutlicher aus. Die IC₂₀ für LY2603618 lag bei SH-SY5Y-Zellen bei 1 µM, bei SH-SY5Y^R-Zellen bei 2 µM, während sie bei RPTEC/TERT1-Zellen erst bei 13 µM lag (Tab 3.1 und Tab. 3.2). Aufgrund der oben erwähnten Nephrotoxizität von insbesondere Cisplatin scheinen diese Ergebnisse zunächst den Erwartungen zu widersprechen. Untersuchungen haben jedoch auch eine geringere Cisplatin-Sensitivität für RPTEC/TERT1 als für diverse Nierenzellkarzinomzelllinien ergeben (Asakura *et al.*, 2005). Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass Zellen der Linie RPTEC/TERT1 verstärkt P-Glykoprotein und γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase (γGCS) exprimieren (Asakura *et al.*, 2005). Cisplatin ist kein Substrat von P-Glykoprotein, wird also nicht durch dieses aus der Zelle transportiert (Gibalová *et al.*, 2012). Bei der γGCS handelt es sich um das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym der Glutathion-Synthese (Dalton *et al.*, 2000) und eine Überexpression von γGCS führt über einen vermehrten Export von Glutathion-konjugiertem Cisplatin zu gesteigerter Cisplatin-Resistenz in Lungenkrebszellen (Kurokawa *et al.*, 1995). Daher könnte die hohe γGCS-Expression zur vergleichsweise geringeren Cisplatin-Sensitivität der Zelllinie RPTEC/TERT1 beitragen.

Die eher geringe Zytotoxizität von LY2603618 alleine ist gut damit vereinbar, dass klinische Studien mit LY2603618 und anderen CHK1-Inhibitoren wie Prexasertib keine nephrotoxischen Nebenwirkungen verzeichnen konnten (Kristeleit *et al.*, 2023; Scagliotti *et al.*, 2016). Die

Metabolisierung von LY2603618 erfolgt hauptsächlich hepatisch über Cyp3A4, im Urin finden sich nur 3 % der applizierten Dosis wieder (Wickremsinhe *et al.*, 2014). Daraus lässt sich schließen, dass bei LY2603618 keine renale Exkretion und Anreicherung des Stoffes im Urin erfolgt. So ist davon auszugehen, dass humane renale proximale Tubulusepithelzellen *in vivo* nicht deutlich höheren Konzentrationen LY2603618 als im Blut ausgesetzt sind, die zu deutlich größeren nephrotoxischen Effekten führen könnten als im *in vitro* Experiment abgebildet wird. Generell finden sich aber zu Wirkungen von LY2603618 und CHK1-Inhibition in humanen renalen proximalen Tubulusepithelzellen kaum Untersuchungen. Dass Carboplatin erst bei deutlich höheren Konzentrationen ähnlich zytotoxisch wirkte wie Cisplatin passt dazu, dass für Carboplatin auch in klinischen Studien eine geringere Nephrotoxizität gezeigt wurde – auch bei Kindern, was für die Therapie des Neuroblastoms natürlich von besonderer Relevanz ist (English *et al.*, 1999).

In Anbetracht einer klinischen Anwendung wäre natürlich wünschenswert, dass die Kombinationsbehandlung in RPTEC/TERT1 nicht stärker zytotoxisch wirkt als die Monobehandlung mit Cis- oder Carboplatin. Die Zytotoxizität nach 72 h Behandlung zeigte nach Mono- und Kombinationsbehandlung keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.20 A – B). Auch der Kombinationsindex lag für die meisten Kombinationsbehandlungen mit Stoffkonzentrationen aus den Bereichen der IC₂₀ von SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen sogar im antagonistischen Bereich (Abbildung 3.21). Daraus ist jedoch nicht abzuleiten, dass die Kombinationsbehandlung förderlich auf die Viabilität von RPTEC/TERT1 und somit nephroprotektiv wirkt. In Zusammenschau mit den unten aufgeführten zytotoxischen Wirkungen nach längerer Inkubationszeit ist vielmehr davon auszugehen, dass der Eintritt der zytotoxischen Wirkung lediglich länger dauert. Die Verdoppelungszeit von RPTEC/TERT1 beträgt ca. 96 h (Wieser *et al.*, 2008) und ist damit deutlich länger als bei den in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y. Wie bereits in Abschnitt 4.1.3.2 diskutiert wurde, finden sich für SH-SY5Y-Zellen in der Literatur sehr variable Verdoppelungszeiten zwischen 27 h und 55 h (Feles *et al.*, 2022) und es wird angenommen, dass die Zytotoxizität von Cisplatin vor allem abhängig ist von der Menge an noch vorhandenen DNA-Crosslinks in der S-Phase (Olive & Banáth, 2009). Daher ist denkbar, dass sich Cisplatin in RPTEC/TERT1 erst verzögert zytotoxisch auswirkt, da durch die längere Verdopplungszeit erst nach längerer Zeit entsprechend viele Zellen die S-Phase durchlaufen haben. Auf Grundlage dieser Hypothese wurde die Zytotoxizität auch nach 120 h Behandlung analysiert. Nach 120 h Behandlung zeigte sich zumindest für die Konzentrationen, wie sie zur Behandlung von SH-SY5Y^R-Zellen verwendet wurden, eine deutlich verstärkte zytotoxische Wirkung nach Kombinationsbehandlung mit LY2603618 (Abbildung 3.20 B), was die Hypothese eher

bekräftigt. Somit zeigte sich die deutliche Verstärkung der Zytotoxizität durch Kombination mit LY2603618 nicht nur bei den Tumorzellen, sondern auch bei RPTEC/TERT1, allerdings erst später. Dabei fällt auf, dass die Kombinationsindices nach 120 h Dauerbehandlung für die Kombination von Cisplatin und LY2603618 ähnlich hoch ausfallen wie für Carboplatin und LY2603618 (Abbildung 3.21 A und B). So scheint Carboplatin zwar in der Monobehandlung weniger nephrotoxisch zu sein, die Kombinationsbehandlung aber nach längerer Dauer und in höheren Konzentrationen dennoch synergistische Effekte zu entfalten, die im Hinblick auf Nebenwirkungen unerwünscht sind. Der verzögerte Eintritt einer starken Wirkung ist möglicherweise durch eine langsamere Kinetik der Entstehung Zelltod-induzierender DNA-Doppelstrangbrüche aufgrund der oben beschriebenen längeren Verdopplungszeit zu begründen. Um die Suszeptibilität humaner renaler proximaler Tubulusepithelzellen genauer abschätzen zu können, wären weitere Untersuchungen vor allem hinsichtlich der Induktion von Apoptose, Zell-Zyklus und DNA-Schadensantwort eine sinnvolle Ergänzung.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit wie erwartet eine geringere Nephrotoxizität von Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin. Humane renale proximale Tubulusepithelzellen schienen eine geringere Suszeptibilität gegenüber CHK1-Inhibition durch LY2603618 aufzuweisen, was gegen eine therapeutisch relevante Nephrotoxizität spricht. Die Kombinationsbehandlung mit LY2603618 bewirkte in den humanen renalen proximalen Tubulusepithelzellen nach 72 h keine höhere Zytotoxizität als die Behandlung mit Cis- oder Carboplatin alleine. Nach 120 h zeigte sich eine vermehrte Zytotoxizität, allerdings erst bei höheren Konzentrationen (Abbildung 3.20 B). Dies deutet darauf hin, dass eine Chemotherapie mit Platinverbindungen und LY2603618 die nephrotoxischen Wirkungen der Platinverbindungen zumindest nicht deutlich verstärkt. Da die gesteigerte Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung in Tumorzellen aber in der klinischen Anwendung Einsparungen an der Cis- oder Carboplatin-Dosis bei gleicher antitumorigener Wirksamkeit ermöglichen könnte, könnten sich in der Praxis möglicherweise günstige Gesamteffekte hinsichtlich der Nephrotoxizität ergeben.

4.3 Schlussfolgerungen hinsichtlich einer klinischen Anwendbarkeit

Zielsetzung dieser Arbeit war, mittels *in vitro* Experimenten Hinweise darauf zu finden, ob sich eine potenzielle Anwendung einer Kombinationsbehandlung von Cisplatin oder Carboplatin mit einem Modulator wie dem PARP-Inhibitor Olaparib oder CHK1-Inhibitor LY2603618 günstig auf die Toxizität auswirkt. Zu beachten sind dabei natürlich die toxischen Nebenwirkungen auf Normalgewebe, insbesondere auf die Niere. Hierbei gilt es mehrere Aspekte zu bedenken und zu diskutieren. Dabei muss vor allem auch der klinisch wichtigen Tatsache Rechnung getragen werden, dass das Neuroblastom vor allem eine im Kindesalter auftretende Tumorentität ist mit einem Durchschnittserkrankungsalter von 19 Monaten (Louis & Shohet, 2015). Für den CHK1-Inhibitor LY2603618, auch als Rabusertib bezeichnet, finden sich keine klinischen Studien mit Kindern, was eine Bewertung hinsichtlich einer Anwendbarkeit in dieser Altersgruppe natürlich erschwert. Allerdings existieren Ergebnisse klinischer Studien mit anderen CHK1-Inhibitoren. So erfolgte bereits eine Phase 1-Studie mit LY2606368, auch bekannt als Prexasertib, bei pädiatrischen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 9,5 Jahren mit rezidivierenden oder behandlungsrefraktären soliden Tumoren. In dieser Studie zeigten sich in 100 % der Fälle eine Grad 3 – 4 Neutropenie, oftmals eine generelle Leukopenie und mit absteigenden Häufigkeiten auch Thrombozytopenie, Lymphopenie und Anämie. Dosis-limitierende Nebenwirkungen traten jedoch nicht auf (Cash *et al.*, 2021). Im Vordergrund scheint bei Kindern also die Hämatotoxizität zu stehen. Natürlich besteht nur eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf LY2603618, da LY2606368 sowohl CHK1 als auch CHK2 inhibiert (Angius *et al.*, 2020), wohingegen LY2603618 selektiver CHK1 hemmt (King *et al.*, 2014). Darüber hinaus muss auch berücksichtigt werden, dass die Studie lediglich eine Monotherapie untersucht hat und im Durchschnitt nur ein Therapiezyklus berücksichtigt wurde (Cash *et al.*, 2021), sodass nicht ausgeschlossen ist, dass weitere und ggf. auch Dosis-limitierende Nebenwirkungen bei mehreren Zyklen auftreten könnten. Es konnte durch die Behandlung in der Studie keine Remission erzielt werden. Das beste Ansprechen auf die Therapie bestand in einer Stabilisierung des Tumorgeschehens ohne Progression (Cash *et al.*, 2021). In der Studie wurden allerdings auch völlig andere Tumorentitäten als das Neuroblastom behandelt und untersucht.

Angesichts des jungen Erkrankungsalters ist natürlich auch der Einfluss einer Behandlung auf die Fertilität von Bedeutung. Für eine CHK1-Inhibition mit dem Inhibitor AZD-7762 konnte an Experimenten mit dem Nematoden *C. elegans* eine vermehrte Apoptose von ovariellen Zellen

nachgewiesen werden (Krüger *et al.*, 2018). Einschränkend ist hierbei anzumerken, dass es sich um einen anderen CHK1-Inhibitor handelte und eine Übertragbarkeit auf Menschen natürlich nur bedingt möglich ist. In einer anderen Arbeit von Xu *et al.* wurden für den CHK1-Inhibitor AZ-H im Tierexperiment ovotoxische Effekte nachgewiesen, vermittelt durch CHK1-Inhibition in Granulosazellen des Ovars. Auch eine deutliche Verstärkung der Gemcitabine vermittelten Ovotoxizität bei Kombinationsbehandlung wurde beschrieben (Xu *et al.*, 2020).

Da insbesondere Carboplatin als myelotoxisch gilt (Ho *et al.*, 2016), lässt sich vermuten, dass vor allem eine Kombinationsbehandlung mit Carboplatin und LY2603618 zu starken hämatotoxischen Nebenwirkungen wie Neutropenien führen könnte, die möglicherweise auch ausgeprägter sein könnten als bei einer Kombination von Cisplatin und LY2603618.

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den klinischen Alltag zu diskutieren, müssen auch die verwendeten Stoffkonzentrationen mit klinischen Dosierungen verglichen werden. Für das oben erwähnte durchschnittliche Erkrankungsalter von 19 Monaten liegt gemäß den WHO *Growth Charts* des National Centers for Health Statistics ein Durchschnittsgewicht von 10,8 kg bei einer Durchschnittsgröße von 83,0 cm vor, wenn man die abgelesenen Werte für Jungen und Mädchen mittelt (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), WHO Growth Charts, 2006). Berechnet man mithilfe der Haycock-Formel die Körperoberfläche, so beträgt diese 0,5079 m². Die Haycock-Formel wird im Vergleich mehrerer Formeln als passend bewertet, um die Körperoberfläche bei Kindern zu ermitteln (Wu *et al.*, 2022). Gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und dem Europäischen Referenznetzwerk für Pädiatrische Onkologie zur Behandlung des High-Risk-Neuroblastoms wird eine Applikation von Cisplatin mit einer Konzentration von 80 mg/m²/24 h als Induktionstherapie vorgeschlagen, für Carboplatin eine Dosierung von 750 mg/m² über 60 min (SIOP Europe, High-risk Neuroblastoma Standard Clinical Practice Recommendations, 2020). Daraus ergibt sich eine Applikation von 40,63 mg Cisplatin in 24 h bei oben genannter Größe und Gewicht, bei der gemäß dem *Pediatric Blood Volume Calculator* ein Blutvolumen von 825 ml anzunehmen ist (Koperska, 2024). Unter Berücksichtigung der molaren Masse von Cisplatin (301,1 g/mol) ergibt sich daraus eine Cisplatin-Konzentration von 163 µM im Blut. Dies wäre jedoch nur der Fall, wenn die Dosis in einem Bolus appliziert werden würde. Sie wird jedoch, wie oben vermerkt, über 24 h appliziert (SIOP Europe, High-risk Neuroblastoma Standard Clinical Practice Recommendations, 2020). Näherungsweise würden 40,63 mg Cisplatin pro Stunde eine Blutkonzentration von ca. 6,8 µM betragen (Berechnungen im Anhang, Abschnitt 6.2). Derartige

Annahmen sind natürlich nie genau, sondern theoretische Annäherungen, da das Cisplatin vermutlich kontinuierlich über einen Perfusor appliziert wird und einer metabolischen Umwandlung unterliegt, die nicht genau quantifiziert werden kann. Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Cisplatin-Konzentrationen (Abbildung 3.1, Tabelle 3.1) liegen diese in etwas niedrigeren Bereichen. Für Carboplatin läge die Blutkonzentration bei Verwendung der vorgeschlagenen Dosierung von 750 mg/m² über 60 min bei 1240 µM, also deutlich oberhalb der für diese Arbeit verwendeten Konzentrationen (Anhang Abschnitt 6.2). Dies leitet zu der Vermutung, dass in der klinischen Anwendung möglicherweise höhere Nebenwirkungen und auch ggf. eine stärkere Nephrotoxizität zu erwarten wäre, als die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen – insbesondere im Rahmen einer Kombinationsbehandlung.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen an proximalen Tubulusepithelzellen der Linie RPTEC in dieser Arbeit, so zeigte sich für LY2603618 wie bei Tumorzellen eine dosisabhängige Toxizität, äquitoxische Effekte zeigten sich jedoch erst bei höheren Konzentrationen (Abschnitt 3.2). Dies lässt zumindest keine ausgeprägte Nephrotoxizität erwarten. Auch in klinischen Studien wurde selbst bei Kombination mit verschiedenen klassischen Chemotherapeutika nicht von nephrotoxischen Effekten berichtet (Calvo *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2013). Dass nach 72 h Kombinationsbehandlung mit Cisplatin oder Carboplatin und LY2603618 für RPTEC zunächst keine signifikante oder tendenzielle Toxizitätssteigerung gezeigt werden konnte (Abbildung 3.20, Abschnitt 4.2), stützt diese These. Die in dieser Arbeit festgestellte Toxizitätssteigerung nach 120 h Dauerbehandlung (Abschnitt 4.2) könnte im Kontext einer klinischen Anwendung in den Hintergrund treten, da für LY2603618 in Studien Plasmahalbwertszeiten zwischen 10,5 h (Wickremsinhe *et al.*, 2014) und 14,4 h nachgewiesen wurden, was deutlich kürzer ist als 120 h (Scagliotti *et al.*, 2016). LY2603618 wird *in vivo* hauptsächlich hepatisch metabolisiert mittels Cyp3A4, während die Substanz im *in vitro*-Experiment wie in dieser Arbeit natürlich nicht abgebaut wird, sondern eventuell nur durch unspezifische Reaktionen mit Molekülen mit der Zeit in seiner Stoffkonzentration sinkt (Wickremsinhe *et al.*, 2014). Tendenziell ist also nicht sicher von einer Dosis-limitierenden Nephrotoxizität einer Kombinationsbehandlung mit LY2603618 auszugehen, jedoch erfordert diese Vermutung eine Verifizierung durch weitergehende *in vivo*-Experimente am Tiermodell und in klinischen Studien. Dies ist auch deshalb essenziell, da eine Dauerbehandlung von Zellkulturen mit den Substanzen natürlich generell nur eingeschränkt auf Patienten übertragbar ist, da pharmakokinetische Effekten nicht miteinfließen. Darüber hinaus muss hinsichtlich einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine klinische Anwendung auch berücksichtigt werden, dass Experimente mit einer spezifischen Neuroblastomzelllinie natürlich nicht die molekulare

Vielfalt der Tumorentität Neuroblastom widerspiegeln kann. So könnte beispielsweise ein Neuroblastom mit einer Amplifikation des *N-MYC*-Gens wieder völlig andere Reaktionen auf die Kombinationsbehandlung zeigen. Da *N-MYC*-amplifizierte Neuroblastomzelllinien ebenfalls etabliert sind, wäre auch die bereits geplante Durchführung der Experimente aus dieser Arbeit mit einer solchen Zelllinie (IMR-32) weiterhin von Interesse. Darüber hinaus bedarf es weiterführender *in vivo*-Experimente und klinischer Studien.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbas, T. & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400-414.
- Ahnesorg, P. et al. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2), 301-313.
- Alberts B, J. A., Lewis J, et al. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition. In: Garland Science
- Alnemri, E. S. et al. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Altmeyer, M. & Lukas, J. (2013). To spread or not to spread--chromatin modifications in response to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, 23(2), 156-165.
- Ambjørn, S. M. et al. (2021). A complex of BRCA2 and PP2A-B56 is required for DNA repair by homologous recombination. *Nature Communications*, 12(1), 5748.
- Ambrosini, G. et al. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 3(8), 917-921.
- Angius, G. et al. (2020). Prexasertib, a checkpoint kinase inhibitor: from preclinical data to clinical development. *Cancer Chemother Pharmacol*, 85(1), 9-20.
- Arellano, M. & Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol*, 29(4), 559-573.
- Asakura, T. et al. (2005). Relationship between expression of drug-resistance factors and drug sensitivity in normal human renal proximal tubular epithelial cells in comparison with renal cell carcinoma. *Oncol Rep*, 14(3), 601-607.
- Asghar, U. et al. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 14(2), 130-146.
- Bahar, E. et al. (2020). Establishment of Acquired Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines Characterized by Enriched Metastatic Properties with Increased Twist Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7613.
- Baik, M. H. et al. (2003). Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc*, 125(46), 14082-14092.
- Balis, F. M. et al. (1983). Clinical pharmacokinetics of commonly used anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*, 8(3), 202-232.
- Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol*, 1170, 29-40.
- Bartek, J. (2011). DNA damage response, genetic instability and cancer: from mechanistic insights to personalized treatment. *Mol Oncol*, 5(4), 303-307.
- Basourakos, S. P. et al. (2017). Combination Platinum-based and DNA Damage Response-targeting Cancer Therapy: Evolution and Future Directions. *Curr Med Chem*, 24(15), 1586-1606.
- Basu, A. & Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*, 2010.
- Bhat, Z. Y. et al. (2015). Understanding the Risk Factors and Long-Term Consequences of Cisplatin-Associated Acute Kidney Injury: An Observational Cohort Study. *PLoS One*, 10(11), e0142225.
- Bhattacharjee, R. et al. (2022). Cellular landscaping of cisplatin resistance in cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113345.

- Biedler, J. L. et al. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33(11), 2643-2652.
- Black, E. M. et al. (2022). Keeping RelA ψ in Chk: molecular mechanisms of Chk1 inhibitor resistance in lymphoma. *Biochem J*, 479(22), 2345-2349.
- Blommaert, F. A. et al. (1996). The formation and persistence of carboplatin-DNA adducts in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 38(3), 273-280.
- Blommaert, F. A. et al. (1995). Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry*, 34(26), 8474-8480.
- Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 725-731.
- Bochum, S. et al. (2018). Olaparib. *Recent Results Cancer Res*, 211, 217-233.
- Boland, K. et al. (2013). Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death Dis*, 4(7), e725.
- Bolderson, E. et al. (2012). Kruppel-associated Box (KRAB)-associated co-repressor (KAP-1) Ser-473 phosphorylation regulates heterochromatin protein 1 β (HP1- β) mobilization and DNA repair in heterochromatin. *J Biol Chem*, 287(33), 28122-28131.
- Bryant, C. et al. (2014). Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*, 14, 570.
- Bryant, H. E. et al. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913-917.
- Bucher, N. & Britten, C. D. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*, 98(3), 523-528.
- Burgess, R. C. et al. (2014). Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep*, 9(5), 1703-1717.
- Burma, S. et al. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42462-42467.
- Calvert, A. H. et al. (1985). Phase I studies with carboplatin at the Royal Marsden Hospital. *Cancer Treat Rev*, 12 Suppl A, 51-57.
- Calvert, A. H. et al. (1989). Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol*, 7(11), 1748-1756.
- Calvo, E. et al. (2016). Phase I Study of CHK1 Inhibitor LY2603618 in Combination with Gemcitabine in Patients with Solid Tumors. *Oncology*, 91(5), 251-260.
- Campos Cogo, S. et al. (2020). An overview of neuroblastoma cell lineage phenotypes and in vitro models. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245(18), 1637-1647.
- Canavese, M. et al. (2012). Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther*, 13(7), 451-457.
- Cancer-Therapy-Advisor. (2011). *Body Surface Area (BSA) Calculator: Haycock Formula*. <https://www.cancertherapyadvisor.com/home/tools/medical-calculators/body-surface-area-bsa-calculator-haycock-formula/>
- Cannan, W. J. & Pederson, D. S. (2016). Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*, 231(1), 3-14.
- Carén, H. et al. (2010). High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4323-4328.
- Cash, T. et al. (2021). A phase 1 study of prexasertib (LY2606368), a CHK1/2 inhibitor, in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors, including CNS tumors: A report from the

- Children's Oncology Group Pediatric Early Phase Clinical Trials Network (ADVL1515). *Pediatr Blood Cancer*, 68(9), e29065.
- Casinelli, G. et al. (2016). N-Myc overexpression increases cisplatin resistance in neuroblastoma via deregulation of mitochondrial dynamics. *Cell Death Discovery*, 2(1), 16082.
- Castri, P. et al. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and its cleavage products differentially modulate cellular protection through NF- κ B-dependent signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(3), 640-651.
- Cejka, P. (2015). DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(38), 22931-22938.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Health Statistica, WHO Growth Charts, 2006, <https://www.cdc.gov/growthcharts/who-growth-charts.htm>
- Chaitanya, G. V. et al. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8(1), 31.
- Chang, H. H. Y. et al. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8), 495-506.
- Chang, H. H. Y. et al. (2016). Different DNA End Configurations Dictate Which NHEJ Components Are Most Important for Joining Efficiency. *J Biol Chem*, 291(47), 24377-24389.
- Chapman, J. R. et al. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, 47(4), 497-510.
- Chattaraj, A. et al. (2023). Cisplatin-Induced Ototoxicity: A Concise Review of the Burden, Prevention, and Interception Strategies. *JCO Oncology Practice*, 19(5), 278-283.
- Chen et al. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem*, 283(12), 7713-7720.
- Chen, J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(3), a026104.
- Chen, S. H. & Chang, J. Y. (2019). New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 20(17).
- Chen, X. et al. (2023). Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 352.
- Chen, Z. et al. (2006). Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. *Int J Cancer*, 119(12), 2784-2794.
- Cheng, H. et al. (2012). PARP inhibition selectively increases sensitivity to cisplatin in ERCC1-low non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 34(4), 739-749.
- Cheng, Q. & Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle*, 9(3), 472-478.
- Cheung-Ong, K. et al. (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol*, 20(5), 648-659.
- Choo, Z. et al. (2016). XAF1 promotes neuroblastoma tumor suppression and is required for KIF1B β -mediated apoptosis. *Oncotarget*, 7(23), 34229-34239.
- Chou, T.-C. (2018). The combination index (CI < 1) as the definition of synergism and of synergy claims. *Synergy*, 7, 49-50.
- Chow, J. P. et al. (2011). Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Mol Cell Biol*, 31(7), 1478-1491.
- Chu, G. (1994). Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, 269(2), 787-790.
- Chvátlová, K. et al. (2007). Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res*, 35(6), 1812-1821.

- Ciarimboli, G. et al. (2005). Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol*, 167(6), 1477-1484.
- Cohen, Y. & Adar, S. (2023). Novel insights into bulky DNA damage formation and nucleotide excision repair from high-resolution genomics. *DNA Repair*, 130, 103549.
- D'Aguanno, S. et al. (2011). New insights into neuroblastoma cisplatin resistance: a comparative proteomic and meta-mining investigation. *J Proteome Res*, 10(2), 416-428.
- D'Amours, D. & Jackson, S. P. (2002). The MRE11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), 317-327.
- Daley, J. M. & Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 34(8), 1380-1388.
- Dalton, T. P. et al. (2000). Knockout of the Mouse Glutamate Cysteine Ligase Catalytic Subunit (Gclc) Gene: Embryonic Lethal When Homozygous, and Proposed Model for Moderate Glutathione Deficiency When Heterozygous. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 324-329.
- Darzynkiewicz, Z. et al. (2001). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*, 38(2), 179-193.
- Darzynkiewicz, Z. et al. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv Exp Med Biol*, 676, 137-147.
- Dasari, S. & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740, 364-378.
- Davis, A. J. & Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*, 2(3), 130-143.
- De Bernardi, B. et al. (1992). Standard-dose and high-dose peptichemio and cisplatin in children with disseminated poor-risk neuroblastoma: two studies by the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 10(12), 1870-1878.
- De Paoli, P. & Carbone, A. (2013). Carcinogenic viruses and solid cancers without sufficient evidence of causal association. *International Journal of Cancer*, 133(7), 1517-1529.
- Deng. (2009). Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res*.
- Deng, X. et al. (2006). The kinase Mirk/Dyrk1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 66(8), 4149-4158.
- Ding, L. et al. (2020). The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(6).
- Dobyan, D. C. et al. (1980). Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 213(3), 551-556.
- Doherty, A. J. & Jackson, S. P. (2001). DNA repair: How Ku makes ends meet. *Current Biology*, 11(22), R920-R924.
- Donzelli, M. & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*, 4(7), 671-677.
- dos Santos, N. A. G. et al. (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Archives of Toxicology*, 86(8), 1233-1250.
- Doz, F. et al. (1991). Comparison of the cytotoxic activities of cisplatin and carboplatin against glioma cell lines at pharmacologically relevant drug exposures. *Journal of Neuro-Oncology*, 11(1), 27-35.
- DuBois, S. G. et al. (2022). High-Risk and Relapsed Neuroblastoma: Toward More Cures and Better Outcomes. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*(42), 768-780.
- Dubrovsky, J. G. & Ivanov, V. B. (2003). Celebrating 50 years of the cell cycle. *Nature*, 426(6968), 759-759.

- Dudas, J. et al. (2020). Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells*, 9(2).
- Dunuweera, S. & Rajapakse, R. (2017). Discovery, Chemistry, Anticancer Action and Targeting of Cisplatin. *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, 02, 65-74.
- Eastman, A. (1987). The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & Therapeutics*, 34(2), 155-166.
- Eidsjö, A. et al. (2004). Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation. *Laboratory Investigation*, 84(4), 406-417.
- Egorin, M. J. et al. (1984). Pharmacokinetics and dosage reduction of cis-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum in patients with impaired renal function. *Cancer Res*, 44(11), 5432-5438.
- El-Deiry, W. S. et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 54(5), 1169-1174.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.
- Ems, M. et al. (2025). A safe haven for cancer cells: tumor plus stroma control by DYRK1B. *Oncogene*, 44(6), 341-347.
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*, 29(5), 946-960.
- English, M. W. et al. (1999). Dose-related nephrotoxicity of carboplatin in children. *Br J Cancer*, 81(2), 336-341.
- Erdlenbruch, B. et al. (2001). Cisplatin nephrotoxicity in children after continuous 72-h and 3x1-h infusions. *Pediatr Nephrol*, 16(7), 586-593.
- Fan, Z. et al. (2020). Checkpoint kinase-1 inhibition and etoposide exhibit a strong synergistic anticancer effect on chronic myeloid leukemia cell line K562 by impairing homologous recombination DNA damage repair. *Oncol Rep*, 44(5), 2152-2164.
- Fanning, J. et al. (1990). Comparison of cisplatin and carboplatin cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines using the MTT assay. *Gynecologic Oncology*, 39(2), 119-122.
- Faridounnia, M. et al. (2018). Function and Interactions of ERCC1-XPF in DNA Damage Response. *Molecules*, 23(12).
- Farmer, H. et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917-921.
- Feles, S. et al. (2022). Streamlining Culture Conditions for the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: A Prerequisite for Functional Studies. *Methods Protoc*, 5(4).
- Fichtinger-Schepman, A. M. J. v. d. V., J.L.; den Hartog, J.H.J.; Lohman, P.H.M.; Reedijk, J. (1985). *Biochemistry*.
- Florentin, A. & Arama, E. (2012). Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell. *Journal of Cell Biology*, 196(4), 513-527.
- Fong, P. C. et al. (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*, 361(2), 123-134.
- Freeman, A. K. & Monteiro, A. N. A. (2010). Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell Communication and Signaling*, 8(1), 27.
- Galluzzi, L. et al. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869-1883.
- Gautier, M. et al. (2021). Plasticity in Neuroblastoma Cell Identity Defines a Noradrenergic-to-Mesenchymal Transition (NMT). *Cancers (Basel)*, 13(12).
- Georgakopoulos-Soares, I. et al. (2020). EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer [Review]. *Frontiers in Oncology*, 10.

- Germain, M. et al. (1999). Cleavage of Automodified Poly(ADP-ribose) Polymerase during Apoptosis: EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF CASPASE-7*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28379-28384.
- Gersten, B. K. et al. (2020). Ototoxicity and Platinum Uptake Following Cyclic Administration of Platinum-Based Chemotherapeutic Agents. *J Assoc Res Otolaryngol*, 21(4), 303-321.
- GPOH (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie),
S1-Leitlinie Neuroblastom, 2019, AWMF Leitlinienregister,
https://register.awmf.org/assets/guidelines/025-008l_S1_Neuroblastom_2019-07-abgelaufen.pdf, letzter Zugriff 24.08.2025
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88, 102925.
- Giam, M. et al. (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*, 27(1), S128-S136.
- Gibálová, L. et al. (2012). P-glycoprotein depresses cisplatin sensitivity in L1210 cells by inhibiting cisplatin-induced caspase-3 activation. *Toxicology in Vitro*, 26(3), 435-444.
- Giglia-Mari, G. et al. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), a000745.
- Go, R. S. & Adjei, A. A. (1999). Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*, 17(1), 409-422.
- Goldschneider, D. et al. (2004). Differential response of p53 target genes to p73 overexpression in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Journal of Cell Science*, 117(2), 293-301.
- Goldstein, M. & Kastan, M. B. (2015). The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 129-143.
- Gonzalez, V. M. et al. (2001). Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Molecular Pharmacology*, 59(4), 657-663.
- Grillo-López, A. J. et al. (2000). Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol*, 1(1), 1-9.
- Grooten, J. et al. (1993). Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: Early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine*, 5(6), 546-555.
- Gu, J. et al. (2007). Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res*, 35(17), 5755-5762.
- Gunda, V. et al. (2020). Amino Acids Regulate Cisplatin Insensitivity in Neuroblastoma. *Cancers (Basel)*, 12(9).
- Habib, E. E. et al. (2012). Management of neuroblastoma: a study of first- and second-line chemotherapy responses, a single institution experience. *Oncol Rev*, 6(1), e3.
- Hah, S. S. et al. (2006). Kinetics of carboplatin-DNA binding in genomic DNA and bladder cancer cells as determined by accelerator mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, 19(5), 622-626.
- Hallett, A. & Traunecker, H. (2012). A review and update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health*, 22(3), 103-107.
- Hamidi, H. et al. (2017). Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion. *Bio Protoc*, 7(24).
- Han, Z. et al. (2002). Role of p21 in Apoptosis and Senescence of Human Colon Cancer Cells Treated with Camptothecin*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 17154-17160.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hassan, M. et al. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014, 150845.

- Hayes, J. D. et al. (2005). GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 51-88.
- Hégarat, N. et al. (2011). Aurora A and Aurora B jointly coordinate chromosome segregation and anaphase microtubule dynamics. *Journal of Cell Biology*, 195(7), 1103-1113.
- Hegde, M. L. et al. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*, 18(1), 27-47.
- Heiss, B. L. et al. (2024). US Food and Drug Administration Approval Summary: Talazoparib in Combination With Enzalutamide for Treatment of Patients With Homologous Recombination Repair Gene-Mutated Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol*, 42(15), 1851-1860.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Herceg, Z. & Wang, Z. Q. (1999). Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 19(7), 5124-5133.
- Hill, J. M. & Speer, R. J. (1982). Organo-platinum complexes as antitumor agents (review). *Anticancer Res*, 2(3), 173-186.
- Himpel, S. et al. (2001). Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem J*, 359(Pt 3), 497-505.
- Ho, G. Y. et al. (2016). Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 102, 37-46.
- Höhn, A. et al. (2016). Distinct mechanisms contribute to acquired cisplatin resistance of urothelial carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(27), 41320-41335.
- Holloman, W. K. (2011). Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, 18(7), 748-754.
- Holzer, A. K. et al. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol*, 70(4), 1390-1394.
- Hongo, A. et al. (1994). A comparison of in vitro platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin. *Int J Biochem*, 26(8), 1009-1016.
- Howard, A. & Pelc, S. (1953). Heredity. *Suppl*, 6, 261.
- Hsu, W. H. et al. (2019). Checkpoint Kinase 1 Inhibition Enhances Cisplatin Cytotoxicity and Overcomes Cisplatin Resistance in SCLC by Promoting Mitotic Cell Death. *J Thorac Oncol*, 14(6), 1032-1045.
- Hu, C. et al. (2012). Roles of Kruppel-associated Box (KRAB)-associated Co-repressor KAP1 Ser-473 Phosphorylation in DNA Damage Response*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 18937-18952.
- Hu, J. & Friedman, E. (2010). Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes Cancer*, 1(8), 803-811.
- Huang, R. et al. (2011). MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas. *Faseb j*, 25(12), 4138-4149.
- Huang, R. & Zhou, P.-K. (2021). DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 254.
- Huang, X. et al. (2004). Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry A*, 58(2), 99-110.
- Irwin, M. S. et al. (2021). Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 39(29), 3229-3241.
- Ishida, S. et al. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 14298-14302.

- Iwatsuki, M. et al. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*, 101(2), 293-299.
- Javle, M. & Curtin, N. J. (2011). The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer*, 105(8), 1114-1122.
- Jiang, Y. K. et al. (2023). ARID1A Inactivation Increases Expression of circ0008399 and Promotes Cisplatin Resistance in Bladder Cancer. *Curr Med Sci*, 43(3), 560-571.
- Jin, K. et al. (2009). Mirk Regulates the Exit of Colon Cancer Cells from Quiescence*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), 22916-22925.
- Ju, J. Q. et al. (2020). CHK1 monitors spindle assembly checkpoint and DNA damage repair during the first cleavage of mouse early embryos. *Cell Prolif*, 53(10), e12895.
- Kaelin, W. G., Jr. (2005). The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 5(9), 689-698.
- Kanev, P.-B. et al. (2024). PARP1 roles in DNA repair and DNA replication: The basi(c)s of PARP inhibitor efficacy and resistance. *Seminars in Oncology*, 51(1), 2-18.
- Karimian, A. et al. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*, 42, 63-71.
- Kastan, M. B. & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584.
- Kelliher, J. L. et al. (2024). Evolved histone tail regulates 53BP1 recruitment at damaged chromatin. *Nature Communications*, 15(1), 4634.
- Keshelava, N. et al. (1997). Drug resistance in human neuroblastoma cell lines correlates with clinical therapy. *European Journal of Cancer*, 33(12), 2002-2006.
- Khan, Z. et al. (2012). Induction of apoptosis and sensitization of head and neck squamous carcinoma cells to cisplatin by targeting survivin gene expression. *Curr Gene Ther*, 12(6), 444-453.
- Kim, M. et al. (2022). Two interaction surfaces between XPA and RPA organize the preincision complex in nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(34), e2207408119.
- King, C. et al. (2014). Characterization and preclinical development of LY2603618: a selective and potent Chk1 inhibitor. *Invest New Drugs*, 32(2), 213-226.
- Kiss, R. C. et al. (2021). Targeting DNA Damage Response and Repair to Enhance Therapeutic Index in Cisplatin-Based Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*, 22(15).
- Knox, R. J. et al. (1986). Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res*, 46(4 Pt 2), 1972-1979.
- Kojima, Y. et al. (2017). Cell Cycle Machinery and Its Alterations in Pancreatic Cancer. In J. P. Neoptolemos, R. Urrutia, J. Abbruzzese & M. W. Büchler (Eds.), *Pancreatic Cancer* (pp. 1-31). Springer New York
- Komiya, T. et al. (1997). p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res*, 3(10), 1831-1835.
- Koperska, M. (2024). *Pediatric Blood Volume Calculator*
<https://www.omnicalculator.com/health/pediatric-blood-volume>
- Koster, R. et al. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3594-3605.
- Kothakota, S. et al. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278(5336), 294-298.

- Kovalevich, J. & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, 1078, 9-21.
- Kristeleit, R. et al. (2023). A Phase 1/2 trial of SRA737 (a Chk1 inhibitor) administered orally in patients with advanced cancer. *British Journal of Cancer*, 129(1), 38-45.
- Kröning, R. et al. (1999). Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *Br J Cancer*, 79(2), 293-299.
- Krüger, K. et al. (2018). Multiple DNA damage-dependent and DNA damage-independent stress responses define the outcome of ATR/Chk1 targeting in medulloblastoma cells. *Cancer Lett*, 430, 34-46.
- Kumar, N. et al. (2020). Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: From DNA lesions to proteins. *Genet Mol Biol*, 43(1 suppl. 1), e20190104.
- Kumar, S. & Tchounwou, P. B. (2015). Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*, 6(38), 40734-40746.
- Kunkel, T. A. & Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*, 74, 681-710.
- Kuo, L. J. & Yang, L.-X. (2008). γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo*, 22(3), 305-309.
- Kurokawa, H. et al. (1995). γ -Glutamylcysteine Synthetase Gene Overexpression Results in Increased Activity of the ATP-Dependent Glutathione S-Conjugate Export Pump and Cisplatin Resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216(1), 258-264.
- Kwok, M. & Stankovic, T. (2019). Chapter 10 - Targeting the Ataxia Telangiectasia and Rad3 Signaling Pathway to Overcome Chemoresistance in Cancer. In D. E. Johnson (Ed.), *Targeting Cell Survival Pathways to Enhance Response to Chemotherapy* (Vol. 3, pp. 203-230). Academic Press
- Lamarche, B. J. et al. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett*, 584(17), 3682-3695.
- Lamkanfi, M. & Kanneganti, T. D. (2010). Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(1), 21-24.
- Lammens, T. et al. (2012). N-cadherin in neuroblastoma disease: expression and clinical significance. *PLoS One*, 7(2), e31206.
- Lamouille, S. et al. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196.
- Lanz, M. C. et al. (2019). DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *EMBO J*, 38(18), e101801.
- Leal-Esteban, L. C. & Fajas, L. (2020). Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165715.
- Lee, F. H. et al. (1983). New platinum complexes in clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 10(1), 39-51.
- Lee, J.-H. & Paull, T. T. (2021). Cellular functions of the protein kinase ATM and their relevance to human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Lee, J. H. & Paull, T. T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*, 304(5667), 93-96.
- Lee, S. H. et al. (2023). ARID1A Mutation from Targeted Next-Generation Sequencing Predicts Primary Resistance to Gemcitabine and Cisplatin Chemotherapy in Advanced Biliary Tract Cancer. *Cancer Res Treat*, 55(4), 1291-1302.
- Leonard, B. J. et al. (1971). Antileukaemic and Nephrotoxic Properties of Platinum Compounds. *Nature*, 234(5323), 43-45.

- Letai, A. & de The, H. (2025). Conventional chemotherapy: millions of cures, unresolved therapeutic index. *Nature Reviews Cancer*, 25(3), 209-218.
- Li, C. et al. (2018). Vandetanib inhibits cisplatin-resistant neuroblastoma tumor growth and invasion. *Oncol Rep*, 39(4), 1757-1764.
- Li, C. C. et al. (2016). ATR-Chk1 signaling inhibition as a therapeutic strategy to enhance cisplatin chemosensitivity in urothelial bladder cancer. *Oncotarget*, 7(2), 1947-1959.
- Li, F. et al. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396(6711), 580-584.
- Li, M. et al. (2021). ISL1 promoted tumorigenesis and EMT via Aurora kinase A-induced activation of PI3K/AKT signaling pathway in neuroblastoma. *Cell Death & Disease*, 12(6), 620.
- Li, Q. et al. (2000). Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res*, 20(2a), 645-652.
- Li, S. et al. (2014). Evidence that the DNA endonuclease ARTEMIS also has intrinsic 5'-exonuclease activity. *J Biol Chem*, 289(11), 7825-7834.
- Li, S. et al. (2020). Development of synthetic lethality in cancer: molecular and cellular classification. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 241.
- Li, X. & Heyer, W. D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*, 18(1), 99-113.
- Li, X. & Heyer, W. D. (2009). RAD54 controls access to the invading 3'-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 37(2), 638-646.
- Lieberthal, W. et al. (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 2), F700-708.
- Lisby, M. & Rothstein, R. (2015). Cell biology of mitotic recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(3), a016535.
- Liston, P. et al. (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol*, 3(2), 128-133.
- Liston, P. et al. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379(6563), 349-353.
- Liu, B. et al. (2024). Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 175.
- Liu, H. et al. (2017). Improvement of Pharmacokinetic Profile of TRAIL via Trimer-Tag Enhances its Antitumor Activity in vivo. *Sci Rep*, 7(1), 8953.
- Liu, K. et al. (2020). The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: a systematic review. *Cancer Cell International*, 20(1), 213.
- Liu, Q. et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, 14(12), 1448-1459.
- Liu, W. et al. (2020). Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the CCL20-CCR6 axis. *Cancer Letters*, 472, 59-69.
- Loh, C. Y. et al. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10).
- Lomonosova, E. & Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27(1), S2-S19.
- Lord, C. J. & Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355(6330), 1152-1158.
- Louis, C. U. & Shohet, J. M. (2015). Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 49-63.

- Lowry, O. H. et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Lu, H. et al. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res*, 4(4), 221-233.
- Lugones, Y. et al. (2022). Cisplatin Resistance: Genetic and Epigenetic Factors Involved. *Biomolecules*, 12(10).
- Ma, T. et al. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev*, 14(18), 2298-2313.
- Majka, J. et al. (2006). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem*, 281(38), 27855-27861.
- Makin, G. (2018). Principles of chemotherapy. *Paediatrics and Child Health*, 28(4), 183-188.
- Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol*, 53(2), 148-158.
- Malinge, J.-M. et al. (1999). Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 77(1), 23-29.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, 1(3), 222-231.
- Manohar, S. & Leung, N. (2018). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of Nephrology*, 31(1), 15-25.
- Marchini, S. et al. (2013). Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, 49(2), 520-530.
- Marteijn, J. A. et al. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 465-481.
- Marullo, R. et al. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One*, 8(11), e81162.
- Massacci, G. et al. (2023). The Cyclin-dependent kinase 1: more than a cell cycle regulator. *British Journal of Cancer*, 129(11), 1707-1716.
- Matthay, K. K. et al. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16078.
- Matthews, H. K. et al. (2021). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- McCarthy, N. (2005). A positive defect. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 333-333.
- McCarthy, N. & Evan, G. I. (1998). Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Current topics in developmental biology*, 36, 259-278.
- McKinnon, P. J. (2004). ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep*, 5(8), 772-776.
- McNeely, S. et al. (2014). CHEK again: Revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(1), 1-10.
- Menear, K. A. et al. (2008). 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Med Chem*, 51(20), 6581-6591.
- Mercer, S. E. et al. (2005). Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem*, 280(27), 25788-25801.
- Micetich, K. C. et al. (1985). A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effects of cis-(diammino)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) and cis-diamminedichloroplatinum(II) on L1210 cells. *Cancer Res*, 45(9), 4043-4047.
- Miller, R. P. et al. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*, 2(11), 2490-2518.

- Min, H.-Y. & Lee, H.-Y. (2022). Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(10), 1670-1694.
- Moggs, J. G. et al. (1997). Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*, 25(3), 480-491.
- Mollaei, M. et al. (2021). Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? *Transl Oncol*, 14(5), 101056.
- Montemorano, L. et al. (2019). Role of Olaparib as Maintenance Treatment for Ovarian Cancer: The Evidence to Date. *Onco Targets Ther*, 12, 11497-11506.
- Morgan, M. A. et al. (2010). Mechanism of radiosensitization by the Chk1/2 inhibitor AZD7762 involves abrogation of the G2 checkpoint and inhibition of homologous recombinational DNA repair. *Cancer Res*, 70(12), 4972-4981.
- Moseley, J. B. (2017). Wee1 and Cdc25: Tools, pathways, mechanisms, questions. *Cell Cycle*, 16(7), 599-600.
- Muggia, F. M. et al. (2015). Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery. *J Clin Oncol*, 33(35), 4219-4226.
- Murai, J. et al. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*, 72(21), 5588-5599.
- Nagl, N. G., Jr. et al. (2005). The p270 (ARID1A/SMARCF1) subunit of mammalian SWI/SNF-related complexes is essential for normal cell cycle arrest. *Cancer Res*, 65(20), 9236-9244.
- Negrini, S. et al. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3), 220-228.
- Nieto-Jimenez, C. et al. (2020). Checkpoint Kinase 1 Pharmacological Inhibition Synergizes with DNA-Damaging Agents and Overcomes Platinum Resistance in Basal-Like Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(23).
- O'Brien, J. et al. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267(17), 5421-5426.
- O'Connell, M. J. et al. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G₂ DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 16(3), 545-554.
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*, 81(4), 1133-1143.
- Ober, M. & Lippard, S. J. (2008). A 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link influences the rotational and translational setting of DNA in nucleosomes. *J Am Chem Soc*, 130(9), 2851-2861.
- Okuda, M. et al. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 103(1), 127-140.
- Olive, P. L. & Banáth, J. P. (2009). Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 76B(2), 79-90.
- Oliveira, L. et al. (2018). Carboplatin as an alternative to Cisplatin in chemotherapies: New insights at single molecule level. *Biophysical Chemistry*, 241, 8-14.
- Origanti, S. et al. (2013). Synthetic lethality of Chk1 inhibition combined with p53 and/or p21 loss during a DNA damage response in normal and tumor cells. *Oncogene*, 32(5), 577-588.
- Ou, Y. H. et al. (2005). p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Mol Biol Cell*, 16(4), 1684-1695.
- Ozaki, T. & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*, 3(1), 994-1013.
- Ozok, A. & Edelstein, C. L. (2014). Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int*, 2014, 967826.

- Pabla, N. & Dong, Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*, 73(9), 994-1007.
- Pabla, N. et al. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 283(10), 6572-6583.
- Panier, S. & Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 7-18.
- Park, J. R. et al. (2010). Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24(1), 65-86.
- Park, W. et al. (2023). Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(8), 1573-1594.
- Parrish, A. B. et al. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6).
- Pasetto, L. M. et al. (2006). The development of platinum compounds and their possible combination. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 60(1), 59-75.
- Patil, M. et al. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci*, 70(21), 4009-4021.
- PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Neuroblastoma Treatment (PDQ®): Patient Version, 2024 Oct 23. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65838/>
- Petroni, M. et al. (2011). MYCN sensitizes human neuroblastoma to apoptosis by HIPK2 activation through a DNA damage response. *Mol Cancer Res*, 9(1), 67-77.
- Pinto et al. (2015). Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):3008-17. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4648. Epub 2015 Aug 24. PMID: 26304901; PMCID: PMC4567703.
- Pirou, C. et al. (2017). FGF1 protects neuroblastoma SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis through an intracrine pathway regulated by FGF1 phosphorylation. *Cell Death & Disease*, 8(8), e3023-e3023.
- Piskareva, O. et al. (2015). The development of cisplatin resistance in neuroblastoma is accompanied by epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Cancer Lett*, 364(2), 142-155.
- Plesca, D. et al. (2008). DNA damage response and apoptosis. *Methods Enzymol*, 446, 107-122.
- Popp, H. D. et al. (2017). Immunofluorescence Microscopy of γH2AX and 53BP1 for Analyzing the Formation and Repair of DNA Double-strand Breaks. *J Vis Exp*(129).
- Powell, S. N. & Kachnic, L. A. (2003). Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37), 5784-5791.
- Price, P. M. et al. (2004). Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(2), F378-F384.
- Pryor et al. (2018). Ribonucleotide incorporation enables repair of chromosome breaks by nonhomologous end joining. *Science*, 361(6407), 1126-1129.
- Pryor et al. (2015). Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), E4537-E4545.
- Qiu, Z. et al. (2018). ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. *Radiother Oncol*, 126(3), 450-464.
- Qu, K. et al. (2013). Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 33(9), 1253-1259.
- Quante, A. S. et al. (2016). Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Med*, 5(9), 2649-2656.

- Rabik, C. A. & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*, 33(1), 9-23.
- Ratanaphan, A. (2011). A DNA Repair Protein BRCA1 as a Potentially Molecular Target for the Anticancer Platinum Drug Cisplatin. In I. Kruman (Ed.), *DNA Repair*. IntechOpen
- Reinke, V. & Lozano, G. (1997). Differential activation of p53 targets in cells treated with ultraviolet radiation that undergo both apoptosis and growth arrest. *Radiat Res*, 148(2), 115-122.
- Riballo, E. et al. (2009). XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res*, 37(2), 482-492.
- Riccardi, C. & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1(3), 1458-1461.
- Riss, T. L. et al. (2004). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Jr., Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
- Rivlin, N. et al. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*, 2(4), 466-474.
- RKI, Z. f. K. Z. d. (2021). *Krebs in Deutschland für 2017/2018*.
- Rocha, C. R. R. et al. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)*, 73(suppl 1), e478s.
- Ronco, C. et al. (2017). ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. *Medchemcomm*, 8(2), 295-319.
- Roos, W. P. & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, 332(2), 237-248.
- Rose, M. et al. (2020). PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- Rosenberg, B. et al. (1965). Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205, 698-699.
- Ross, R. A. & Biedler, J. L. (1985). Presence and regulation of tyrosinase activity in human neuroblastoma cell variants in vitro. *Cancer Res*, 45(4), 1628-1632.
- Rottenberg, S. et al. (2008). High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44), 17079-17084.
- Ruggiero, A. et al. (2013). Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs*, 24(10), 1007-1019.
- Rybak, L. P. et al. (2019). Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Prevention. *Semin Hear*, 40(2), 197-204.
- Sahoo, D. et al. (2024). Advancements in platinum-based anticancer drug development: A comprehensive review of strategies, discoveries, and future perspectives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 112, 117894.
- Saldivar, J. C. et al. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(10), 622-636.
- Saraste, A. & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45(3), 528-537.
- Sarbia, M. & Gabbert, H. E. (2000). Modern pathology: prognostic parameters in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Recent Results Cancer Res*, 155, 15-27.

- Savill, J. & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784-788.
- Saxena, S. & Zou, L. (2022). Hallmarks of DNA replication stress. *Molecular Cell*, 82(12), 2298-2314.
- Scagliotti, G. et al. (2016). Phase II evaluation of LY2603618, a first-generation CHK1 inhibitor, in combination with pemetrexed in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs*, 34(5), 625-635.
- Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol*, 35(6), 461-478.
- Schärer, O. D. (2013). Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(10), a012609.
- Schmidt, M. et al. (2017). Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases. *Molecules*, 22(12), 2045.
- Schneeberger, C. et al. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl*, 4(4), 234-238.
- Schoch, S. et al. (2020). Comparative Study of the Mode of Action of Clinically Approved Platinum-Based Chemotherapeutics. *Int J Mol Sci*, 21(18).
- Schofield, J. et al. (2024). Long-term cisplatin nephrotoxicity after childhood cancer: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Nephrol*, 39(3), 699-710.
- Scientific, T. (2011). *Instructions - Modified Lowry Assay Kit* Retrieved 18.06.2024 from https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011229_Mod_Lowry_Protein_Asy_UG.pdf?_ga=2.2221680.1983209302.1718713175-984622027.1674135754
- Seaman, J. E. et al. (2016). Caspases: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell Death Differ*, 23(10), 1717-1726.
- Sellins, K. S. & Cohen, J. J. (1987). Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol*, 139(10), 3199-3206.
- Serrano-Gomez, S. J. et al. (2016). Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular Cancer*, 15(1), 18.
- Shamloo, B. & Usluer, S. (2019). p21 in Cancer Research. *Cancers (Basel)*, 11(8).
- Shen, Y. et al. (2013). BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res*, 19(18), 5003-5015.
- Shibata, A. & Jeggo, P. A. (2021). ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Genes (Basel)*, 12(9).
- Shieh, S. Y. et al. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, 14(3), 289-300.
- Simon-Friedt, B. R. et al. (2015). The RPTEC/TERT1 Cell Line as an Improved Tool for In Vitro Nephrotoxicity Assessments. *Biol Trace Elem Res*, 166(1), 66-71.
- Simon, T. et al. (2017). 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors [2017 GPOH Empfehlungen für Diagnostik und Therapie von Patienten mit neuroblastischen Tumoren]. *Klin Padiatr*, 229(03), 147-167.
- SIOP Europe (European Society for Paediatric Oncology), High-risk Neuroblastoma Standard Clinical Practice Recommendations, 2020, <https://siope.eu/media/documents/escp-high-risk-neuroblastoma-standard-clinical-practice-recommendations.pdf> (letzter Zugriff 24.08.2025)
- Skinner, R. et al. (1998). Cisplatin dose rate as a risk factor for nephrotoxicity in children. *Br J Cancer*, 77(10), 1677-1682.
- Smith, A. J. B. et al. (2024). Prior authorization for FDA-approved PARP inhibitors in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology Reports*, 52, 101335.

- Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*, 1, 41-55.
- Smits, V. A. J. & Gillespie, D. A. (2015). DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *The FEBS Journal*, 282(19), 3681-3692.
- So, S. et al. (2009). Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *J Cell Biol*, 187(7), 977-990.
- Soldani, C. & Scovassi, A. I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis*, 7(4), 321-328.
- Spinozzi, G. et al. (2022). SiCoDEA: A Simple, Fast and Complete App for Analyzing the Effect of Individual Drugs and Their Combinations. *Biomolecules*, 12, 904.
- Srinivas, U. S. et al. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*, 25, 101084.
- Stark, G. R. & Taylor, W. R. (2006). Control of the G2/M transition. *Molecular Biotechnology*, 32(3), 227-248.
- Stracker, T. H. & Petrini, J. H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(2), 90-103.
- Stucki, M. et al. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213-1226.
- Sugasawa, K. et al. (1998). Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Molecular Cell*, 2(2), 223-232.
- Sun, Y. et al. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37), 13182-13187.
- Sung, P. & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(10), 739-750.
- Swain, S. M. et al. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*, 22(2), 101-126.
- Takagi, M. et al. (2022). First phase 1 clinical study of olaparib in pediatric patients with refractory solid tumors. *Cancer*, 128(15), 2949-2957.
- Tallarida, R. J. (2011). Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer*, 2(11), 1003-1008.
- Tatebe, H. et al. (2020). Rad50 zinc hook functions as a constitutive dimerization module interchangeable with SMC hinge. *Nature Communications*, 11(1), 370.
- Tavares, T. S. et al. (2020). Olaparib Synergizes the Anticancer Activity of Daunorubicin via Interaction with AKR1C3. *Cancers (Basel)*, 12(11).
- Thiery, J. P. et al. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890.
- Thoma, B. S. & Vasquez, K. M. (2003). Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair. *Mol Carcinog*, 38(1), 1-13.
- Thompson, R. et al. (2019). How Cells Handle DNA Breaks during Mitosis: Detection, Signaling, Repair, and Fate Choice. *Cells*, 8(9).
- Thorslund, T. & West, S. C. (2007). BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene*, 26(56), 7720-7730.
- Tilsed, C. M. et al. (2022). Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action [Review]. *Frontiers in Oncology, Volume 12 - 2022*.
- Tolbert, V. P. & Matthay, K. K. (2018). Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res*, 372(2), 195-209.

- Tran, K. B. et al. (2022). The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10352), 563-591.
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, 3(11), 697-707.
- Turk, A. A. & Wisinski, K. B. (2018). PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer*, 124(12), 2498-2506.
- Umeda, M. et al. (2019). Gap 2 phase: making the fundamental decision to divide or not. *Current Opinion in Plant Biology*, 51, 1-6.
- Un, F. (2007). G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. *Anti-Cancer Drugs*, 18(4).
- Uren, A. G. et al. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10), 4974-4978.
- Uto, K. et al. (2004). Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *EMBO J*, 23(16), 3386-3396.
- Van Arendonk, K. J. & Chung, D. H. (2019). Neuroblastoma: Tumor Biology and Its Implications for Staging and Treatment. *Children (Basel)*, 6(1).
- van der Weegen, Y. et al. (2020). The cooperative action of CSB, CSA, and UVSSA target TFIIH to DNA damage-stalled RNA polymerase II. *Nature Communications*, 11(1), 2104.
- van Gool, A. J. et al. (1997). The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J*, 16(19), 5955-5965.
- Velma, V. et al. (2016). Low Doses of Cisplatin Induce Gene Alterations, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Biomark Insights*, 11, 113-121.
- Vermeulen, K. et al. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36(3), 131-149.
- Vermorken, J. B. et al. (1984). Pharmacokinetics of free and total platinum species after short-term infusion of cisplatin. *Cancer Treat Rep*, 68(3), 505-513.
- Viale, A. et al. (2009). Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature*, 457(7225), 51-56.
- Volarevic, V. et al. (2019). Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 25.
- Volker, M. et al. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*, 8(1), 213-224.
- Wagner, J. M. & Karnitz, L. M. (2009). Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol*, 76(1), 208-214.
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296(5573), 1635-1636.
- Waldman, T. et al. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, 55(22), 5187-5190.
- Walker, J. R. et al. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), 607-614.
- Wang et al. (2014). The checkpoint 1 kinase inhibitor LY2603618 induces cell cycle arrest, DNA damage response and autophagy in cancer cells. *Apoptosis*, 19(9), 1389-1398.

- Wang, C. H. et al. (2011). Inhibition of glutathione S-Transferase M1 by new gabosine analogues is essential for overcoming cisplatin resistance in lung cancer cells [Article]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(24), 8574-8581.
- Wang, M. et al. (2021). Targeting DNA repair pathway in cancer: Mechanisms and clinical application. *MedComm*, 2(4), 654-691.
- Wang, Y. et al. (2007). Human DNA ligase IV and the ligase IV/XRCC4 complex: analysis of nick ligation fidelity. *Biochemistry*, 46(17), 4962-4976.
- Watanabe, N. et al. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 1U kinase during the cell cycle. *The EMBO Journal*, 14.
- Waters, C. A. et al. (2014). The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during nonhomologous end joining. *Nat Commun*, 5, 4286.
- Watson, M. B. et al. (2007). Establishment of in-vitro models of chemotherapy resistance. *Anticancer Drugs*, 18(7), 749-754.
- Weiss, G. J. et al. (2013). Phase I dose-escalation study to examine the safety and tolerability of LY2603618, a checkpoint 1 kinase inhibitor, administered 1 day after pemetrexed 500 mg/m² every 21 days in patients with cancer. *Invest New Drugs*, 31(1), 136-144.
- Wendt, M. K. et al. (2011). Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol Biol Cell*, 22(14), 2423-2435.
- Westphal, D. et al. (2014). Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*, 21(2), 196-205.
- White, D. et al. (2012). The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation. *Mol Cancer Res*, 10(3), 401-414.
- Wickremsinhe, E. R. et al. (2014). Disposition and metabolism of LY2603618, a Chk-1 inhibitor following intravenous administration in patients with advanced and/or metastatic solid tumors. *Xenobiotica*, 44(9), 827-841.
- Wieser, M. et al. (2008). hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(5), F1365-1375.
- Williams, G. H. & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *J Pathol*, 226(2), 352-364.
- Wolf, B. B. et al. (1999). Caspase-3 Is the Primary Activator of Apoptotic DNA Fragmentation via DNA Fragmentation Factor-45/Inhibitor of Caspase-activated DNase Inactivation*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30651-30656.
- Wood, C. D. et al. (2009). Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *Int J Biol Sci*, 5(5), 428-437.
- Woods, D. & Turchi, J. J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response. *Cancer Biology & Therapy*, 14(5), 379-389.
- Wright, W. D. et al. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 293(27), 10524-10535.
- Wu, Q. et al. (2022). Evaluation of nine formulas for estimating the body surface area of children with hematological malignancies. *Front Pediatr*, 10, 989049.
- Xia, X. et al. (2011). Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 11, 399.
- Xu, J. et al. (2020). A Tiered Female Ovarian Toxicity Screening Identifies Toxic Effects of Checkpoint Kinase 1 Inhibitors on Murine Growing Follicles. *Toxicol Sci*, 177(2), 405-419.
- Xu, X. et al. (2002). Chk2 Activation and Phosphorylation-Dependent Oligomerization. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 4419-4432.
- Yanagisawa, R. et al. (2018). Cisplatin-induced nephrotoxicity in patients with advanced neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 65(9), e27253.

- Yang, C. et al. (2017). YAP promotes tumorigenesis and cisplatin resistance in neuroblastoma. *Oncotarget*, 8(23).
- Yarbro, C. H. (1989). Carboplatin: a clinical review. *Semin Oncol Nurs*, 5(2 Suppl 1), 63-69.
- Yiallourous, M. (2009, 2022). Kurzinformation Neuroblastom.
- Yu, X. et al. (2006). BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev*, 20(13), 1721-1726.
- Yuan, J. et al. (2010). Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. *FEBS Letters*, 584(17), 3717-3724.
- Yuan, J. & Ofengeim, D. (2024). A guide to cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(5), 379-395.
- Zachos, G. et al. (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell*, 12(2), 247-260.
- Zaizen, Y. et al. (1993). The effect of N-myc amplification and expression on invasiveness of neuroblastoma cells. *Journal of Pediatric Surgery*, 28(6), 766-769.
- Zamble, D. B. et al. (1996). Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*, 35(31), 10004-10013.
- Zannini, L. et al. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*, 6(6), 442-457.
- Zeisberg, M. & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119(6), 1429-1437.
- Zhang, F. et al. (2009). PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res*, 7(7), 1110-1118.
- Zhang, M. et al. (2022). Active legumain promotes invasion and migration of neuroblastoma by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Open Life Sciences*, 17(1), 676-685.
- Zhang, P. et al. (2014). ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nature Cell Biology*, 16(9), 864-875.
- Zhang, T. (2013). DDCV: A visualized R Shiny App for Evaluationg Drug-Drug Interaction.
- Zhang, Y. & Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer*, 134(5), 1013-1023.
- Zhang, Y. et al. (2006). The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Research*, 16(1), 45-54.
- Zhao, B. et al. (2020). The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(12), 765-781.
- Zhao, B. et al. (2019). The essential elements for the noncovalent association of two DNA ends during NHEJ synapsis. *Nature Communications*, 10(1), 3588.
- Zhao, J. et al. (2016). Inhibition of CHK1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 7(23), 34785-34799.
- Zhao, X. et al. (2021). Acquired small cell lung cancer resistance to Chk1 inhibitors involves Wee1 up-regulation. *Molecular Oncology*, 15(4), 1130-1145.
- Zhou, J. et al. (2020). The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol*, 11, 343.
- Zimmermann, M. & de Lange, T. (2014). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol*, 24(2), 108-117.
- Zou, L. & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes [Article]. *Science*, 300(5625), 1542-1548.

6 Anhang

6.1 Ergänzende Abbildungen

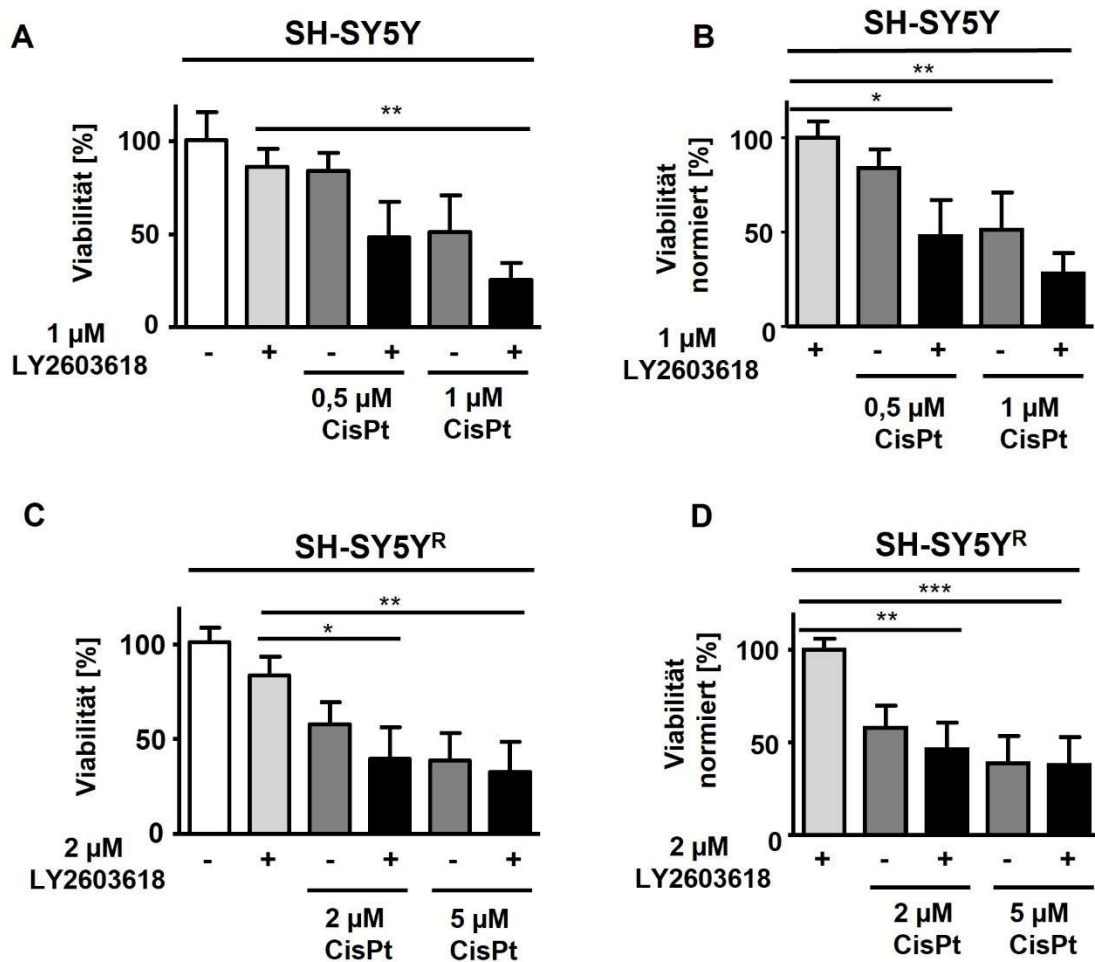


Abbildung 6.1: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Cisplatin (CisPt) und/oder LY2603618 behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von LY2603618 und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CisPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit LY2603618 alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CisPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

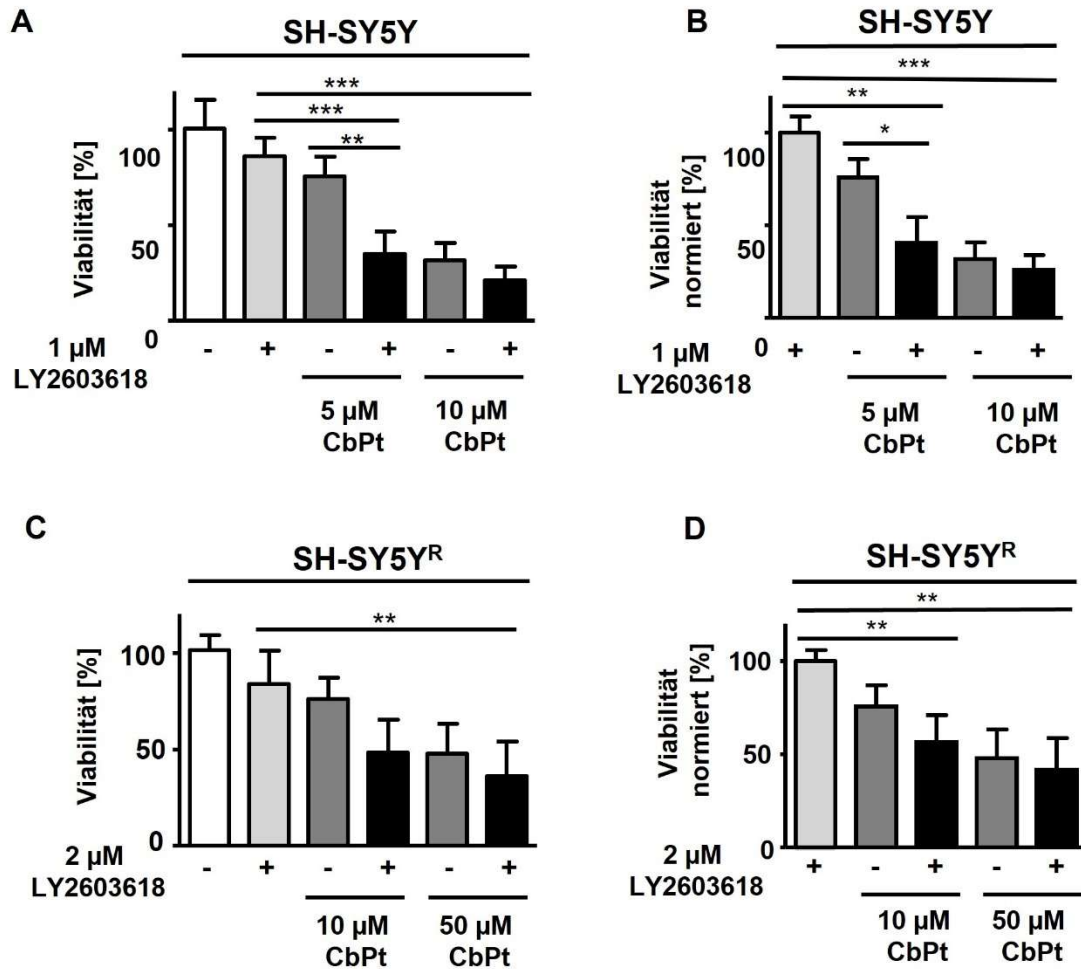


Abbildung 6.2: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von LY2603618 und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CbPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit LY2603618 alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CbPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

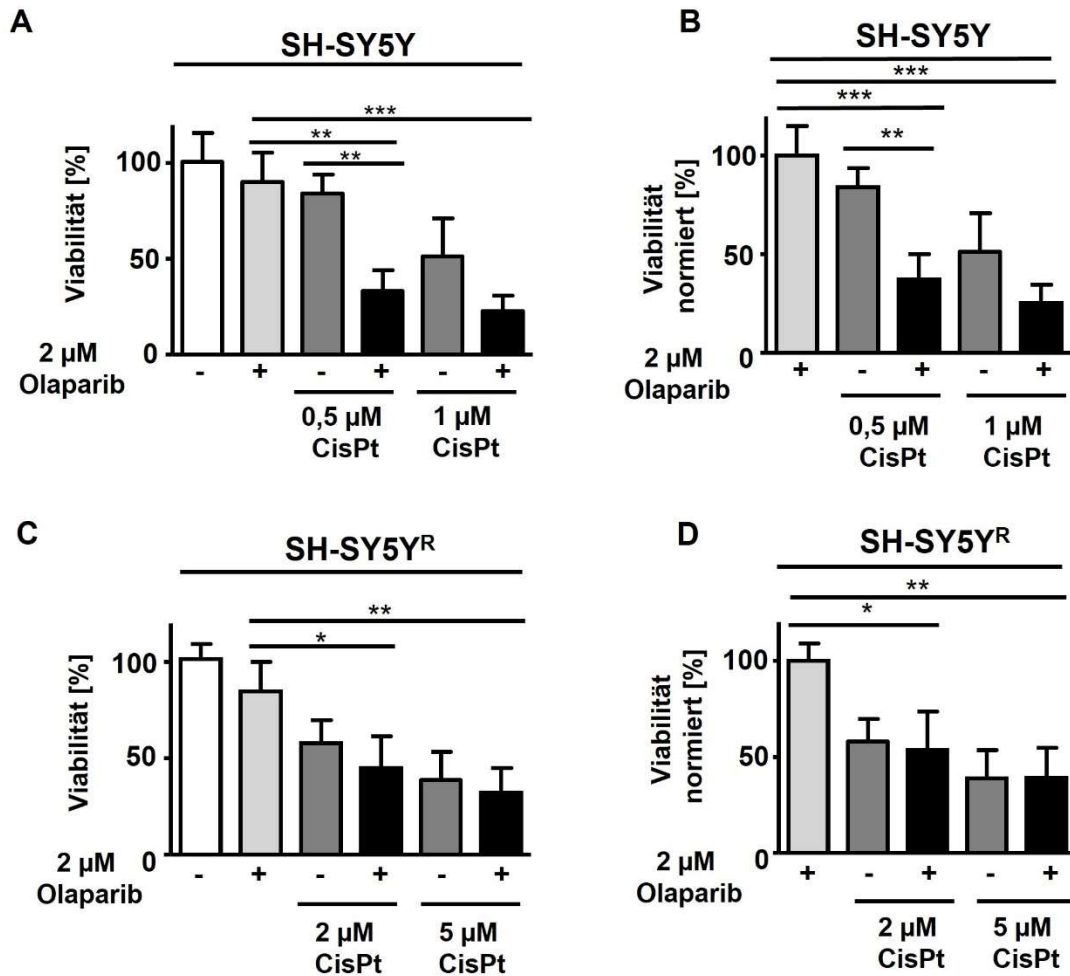


Abbildung 6.3: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Cisplatin (CisPt) und/oder Olaparib behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von Olaparib und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CisPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit Olaparib alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CisPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

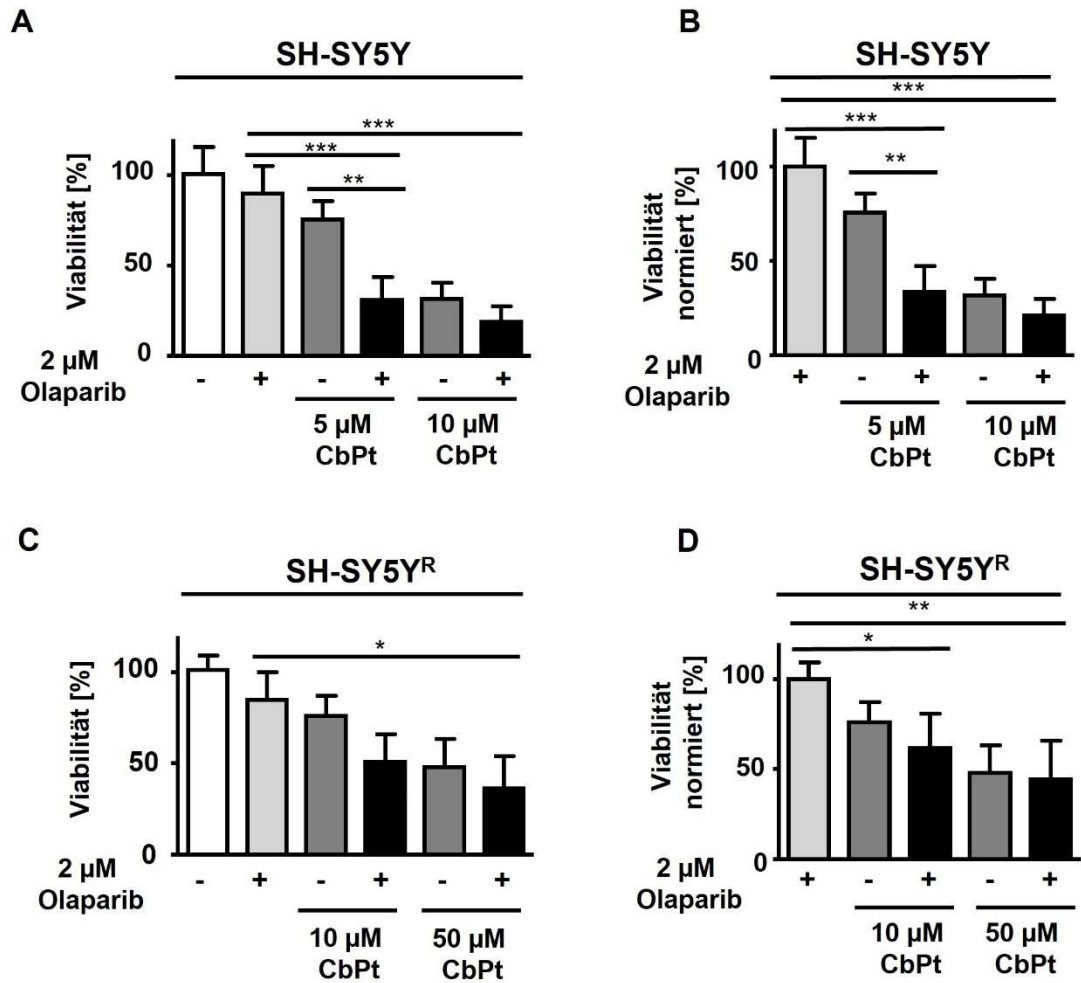


Abbildung 6.4: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Carboplatin (CbPt) und/oder Olaparib behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₂₀ von Olaparib und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CbPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit Olaparib alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CbPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

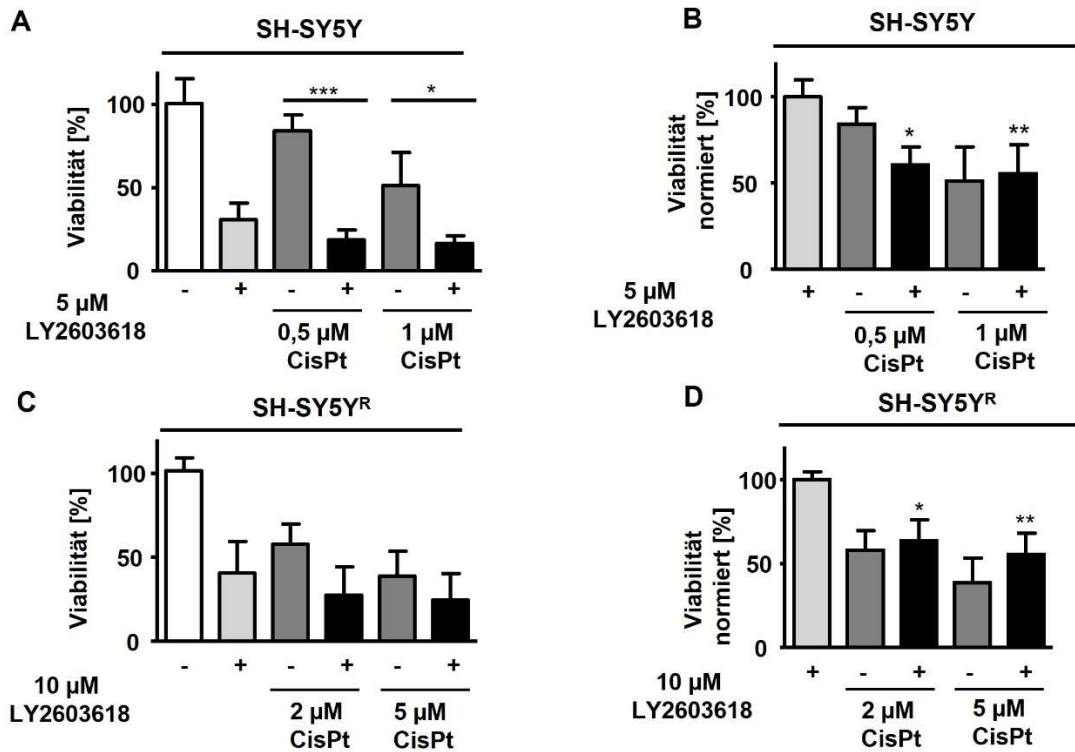


Abbildung 6.5: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Cisplatin (CisPt) und/oder LY2603618 behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₅₀ von LY2603618 und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CisPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit LY2603618 alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CisPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

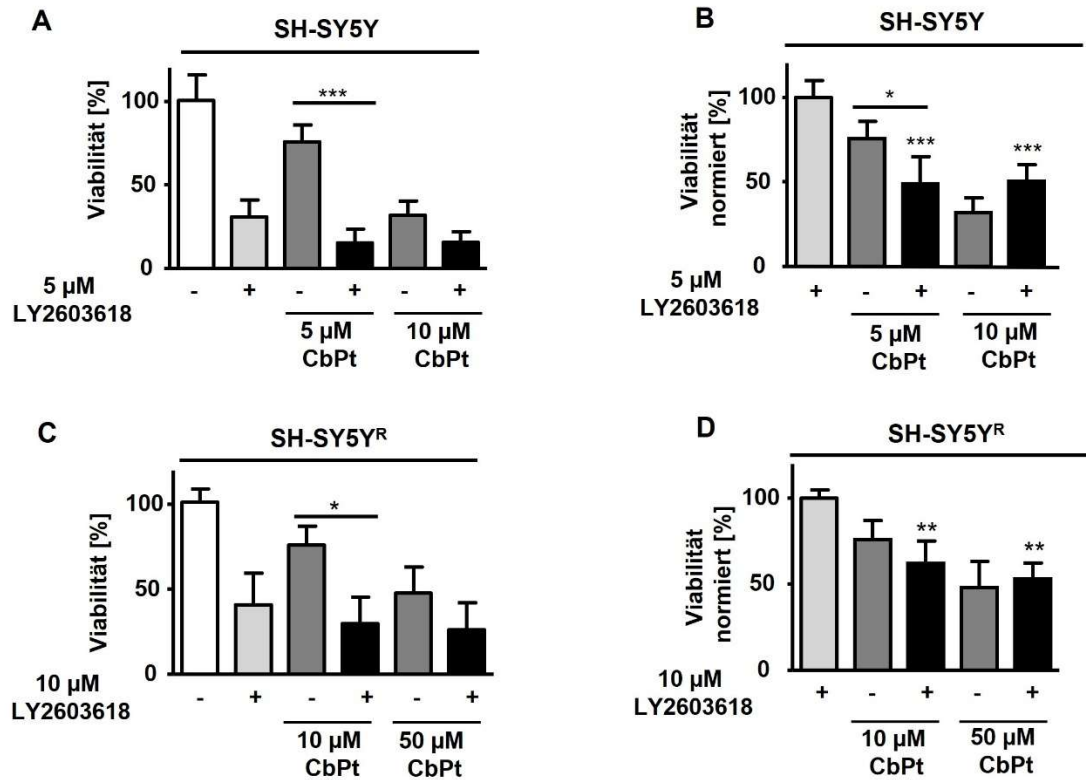


Abbildung 6.6: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und LY2603618 auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₅₀ von LY2603618 und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CbPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit LY2603618 alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CbPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

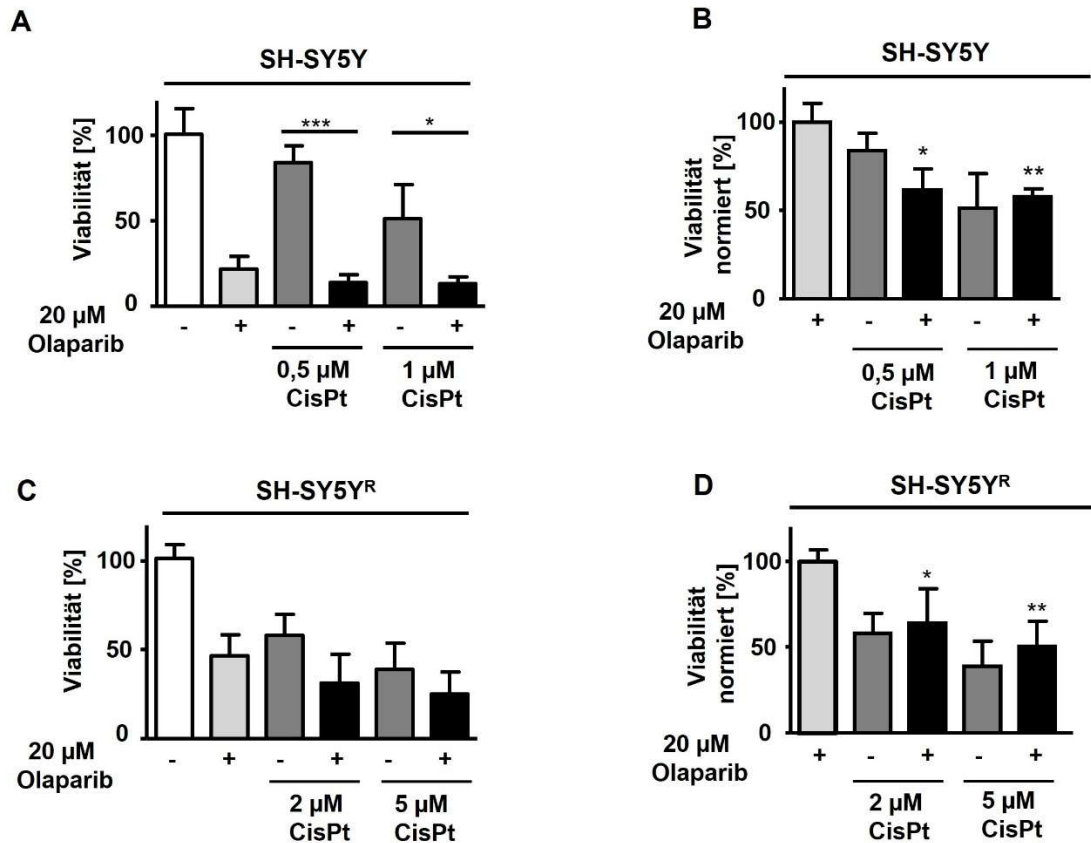


Abbildung 6.7: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Cisplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Cisplatin (CisPt) und/oder Olaparib behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₅₀ von Olaparib und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CisPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit Olaparib alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CisPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

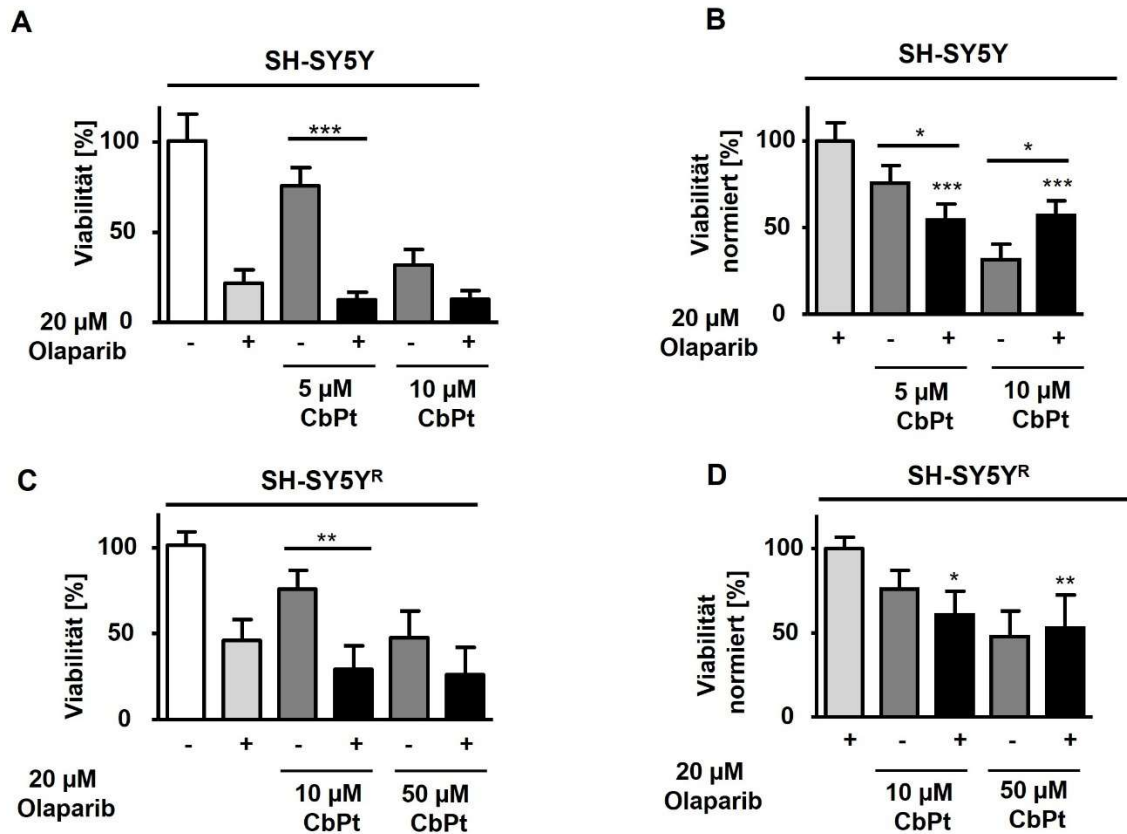


Abbildung 6.8: Einfluss der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und Olaparib auf die Viabilität von Neuroblastomzellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Carboplatin (CbPt) und/oder Olaparib behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₅₀ von Olaparib und aus dem Bereich der IC₂₀ und IC₅₀ von CbPt (Tab. 3.1) jeweils miteinander kombiniert. Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (= 100 %) (A, C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei in Quadruplikaten durchgeführten unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 4). Zusätzliche Darstellungen zeigen die Viabilität nach Kombinationsbehandlung normiert auf die Viabilität nach Behandlung mit Olaparib alleine (= 100 %) (B, D). Die Viabilität nach Behandlung mit CbPt alleine wurde dabei nicht auf letztere normiert. One-way ANOVA mit Tukey/Bonferroni multiple comparison test: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001

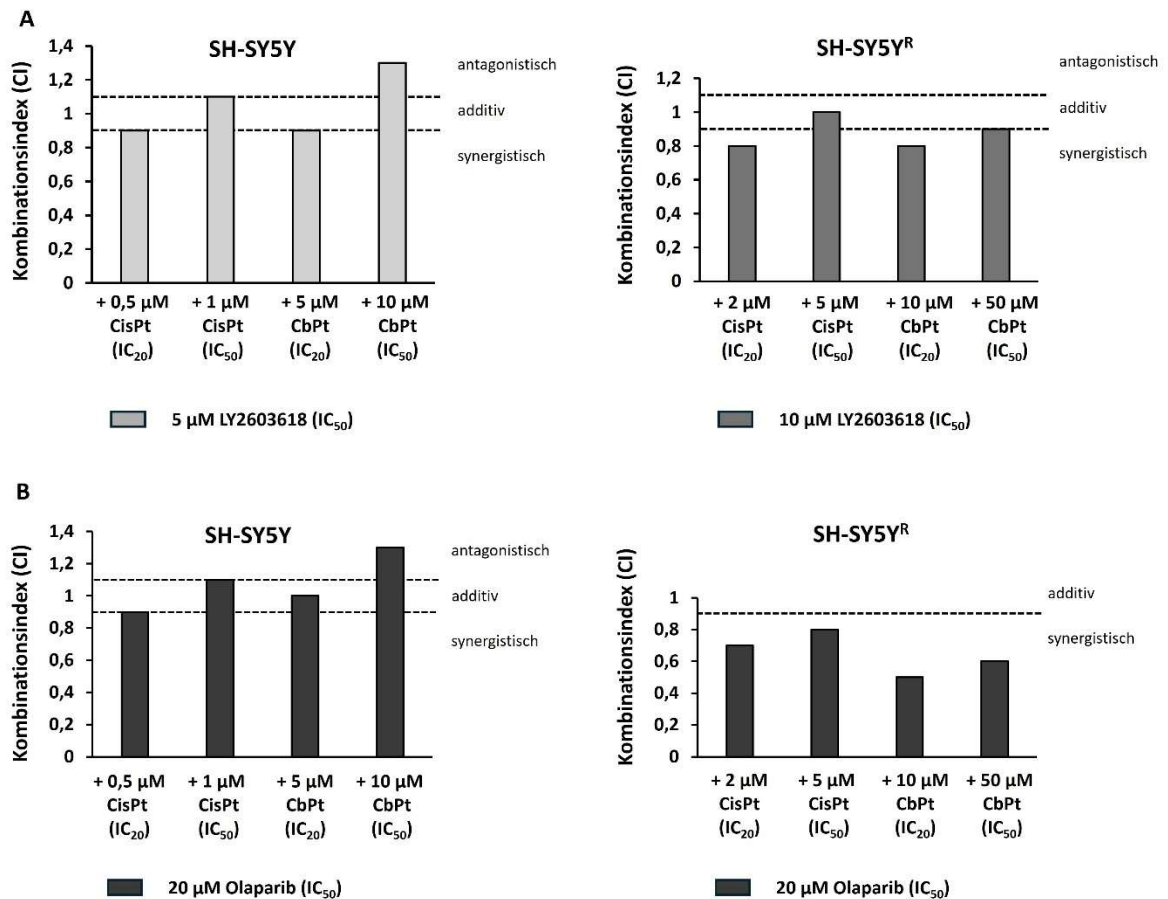
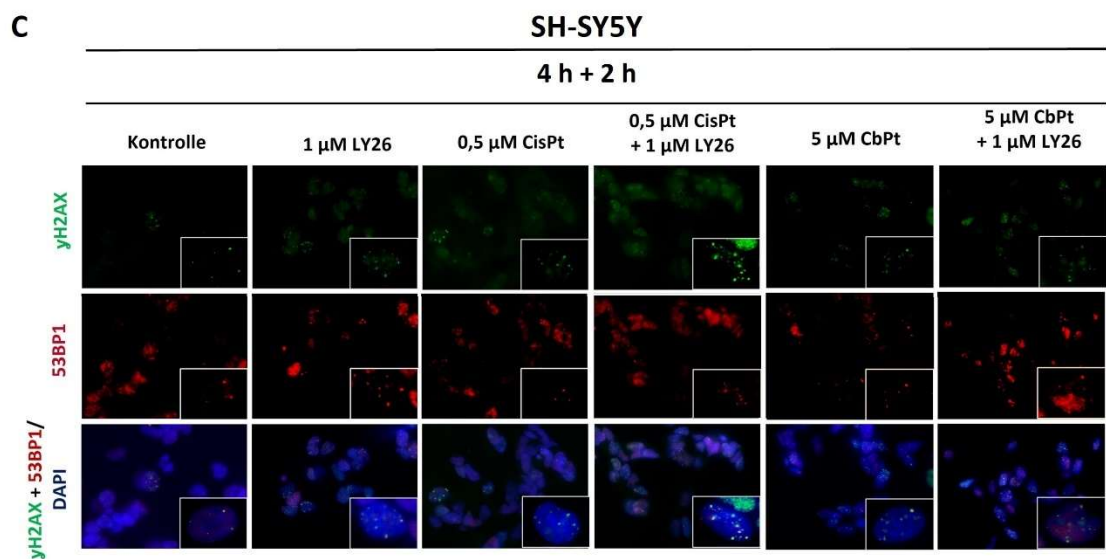
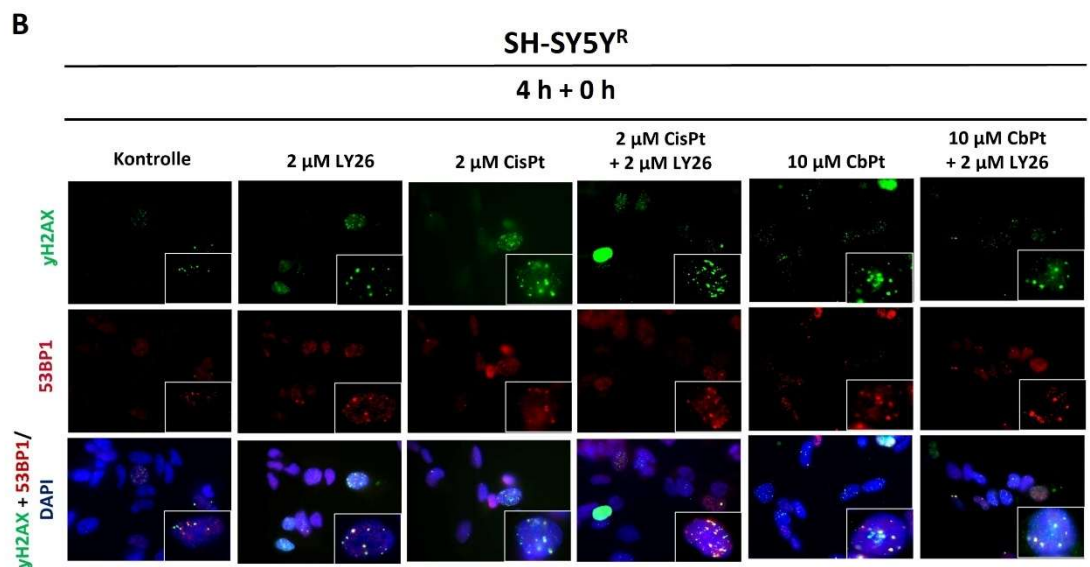
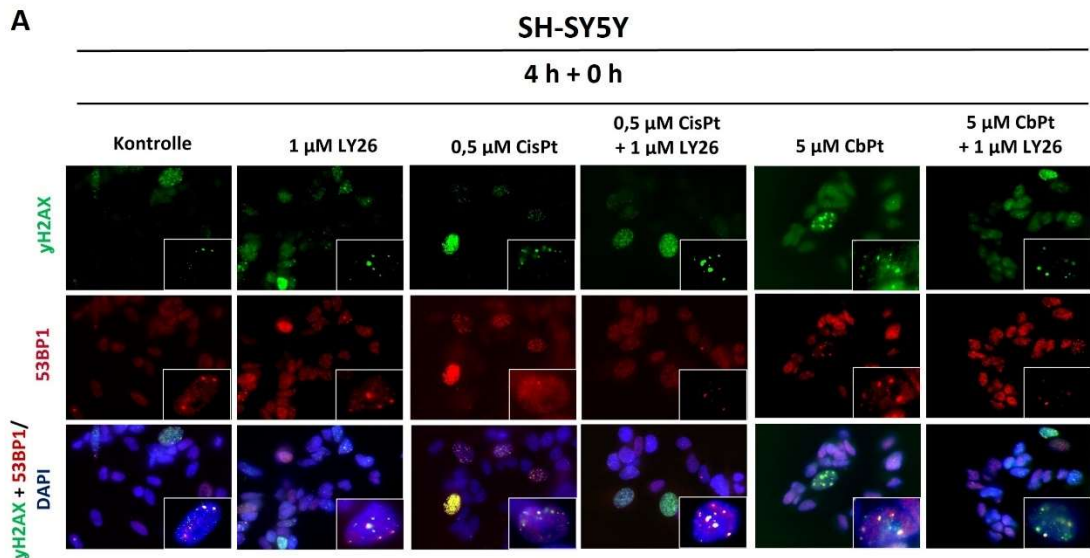


Abbildung 6.9: Kombinationsindizes (CI) der Kombinationsbehandlung von Cis- oder Carboplatin mit LY2603618 oder Olaparib auf SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 72 h mit Cis- (CisPt) oder Carboplatin (CbPt) und LY2603618 (A) oder Olaparib (B) behandelt. Es wurden Konzentrationen aus dem Bereich der IC₅₀ von LY2603618 bzw. Olaparib und aus den Bereichen der IC₂₀ und IC₅₀ von CisPt und CbPt kombiniert (Tab. 3.1). Die Zellviabilität wurde mittels Alamar Blue Assay untersucht und auf die Viabilität unbehandelter Kontrollzellen normiert (=100 %). Um die verschiedenen Kombinationen hinsichtlich des Vorliegens synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte zu überprüfen, wurde der Kombinationsindex (*combination index*, CI) mithilfe der Software DDCV ermittelt. Dargestellt sind die Kombinationsindizes der Kombinationsbehandlungen mit LY2603618 (A) bzw. Olaparib (B). Bei einem Kombinationsindex zwischen 0,9 – 1,1 wird der Effekt als additiv, bei < 0,9 als synergistisch und bei > 1,1 als antagonistisch bewertet.



D

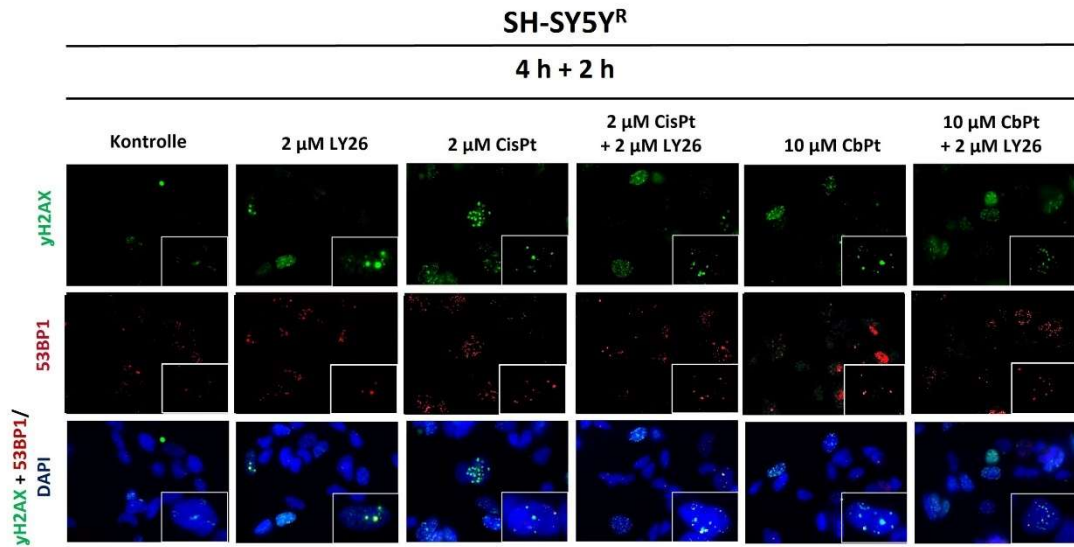


Abbildung 6.10: Einfluss einer Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und/oder dem CHK1-Inhibitor LY2603618 auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach 0 h und 2 h Postinkubation

SH-SY5Y- und SH-SY5Y^R-Zellen wurden für jeweils 4 h mit Cisplatin (CisPt), Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 (LY26) behandelt. Dabei wurden Konzentrationen im Bereich der zuvor ermittelten IC₂₀ verwendet (siehe Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Unmittelbar nach der Behandlung (0 h), nach 2 h und nach 24 h wurden yH2AX und 53BP1 immunzytochemisch markiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Pro Bedingung wurden jeweils mindestens 50 Zellkerne ausgewertet. Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der yH2AX-, 53BP1- und kolokalisierten Foci unmittelbar nach der Behandlung (A -B) sowie nach 2 h Postinkubation (C – D). Gezeigt sind jeweils eine Übersichtsaufnahme sowie eine repräsentative Einzelzelle.

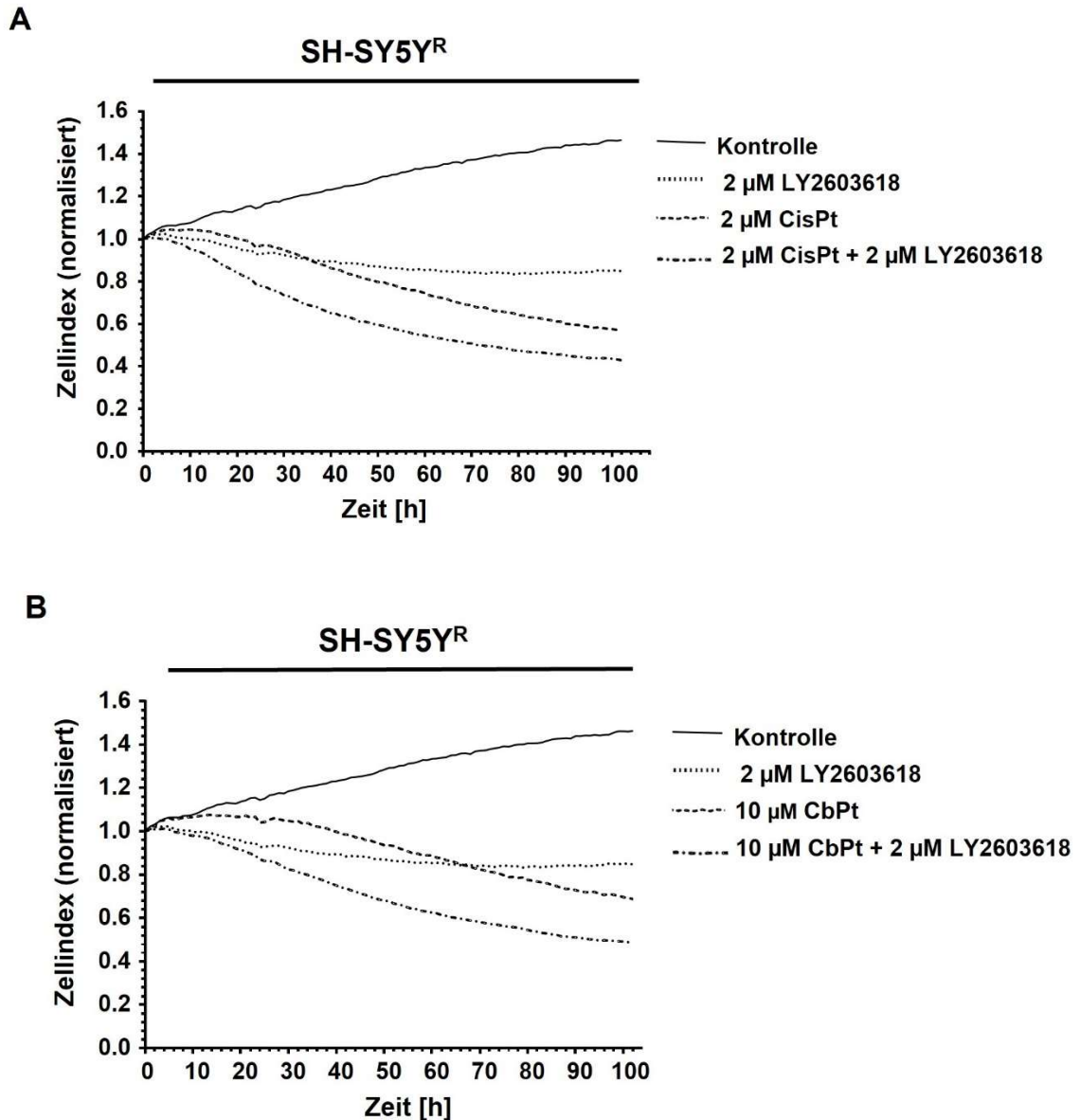


Abbildung 6.11: Zeitlicher Verlauf der zytotoxischen Wirkung von Cis- und Carboplatin sowie LY2603618

SH-SY5Y^R-Zellen wurden für 100 h mit Cisplatin (CisPt), Carboplatin (CbPt) und/oder LY2603618 behandelt. Verwendet wurden Konzentrationen aus den Bereichen der IC₂₀ von SH-SY5Y und SH-SY5Y^R. Mittels des iCELLigence Systems wurde kontinuierlich die elektrische Impedanz als ein Maß für Zelldichte, -adhäsion und -haftung gemessen. Der aus der gemessenen Impedanz ermittelte Zellindex wurde normiert auf den der unbehandelten Kontrollzellen zu Beginn der Behandlung (= 1,0). Dargestellt ist der Zellindex in Abhängigkeit zur Zeit (n = 1, N = 1)

Mit diesen Bedingungen wurden exemplarisch Messungen mittels des iCELLigence Systems durchgeführt. Im Gegensatz zu den Alamar Blue Assay-Analysen, die die Zellviabilität nur zu spezifischen zeitlichen Endpunkten (hier 72 h) erfassen, erlaubt diese Methode eine Abschätzung des zeitlichen Verlaufs der zytotoxischen Wirkung. Bei dieser Methode wird durchgehend die elektrische Impedanz gemessen und in Form eines Zellindex dargestellt. Die Höhe der Impedanz ist unter

anderem abhängig von der Zelladhärenz. Je mehr Zellen adhären, desto höher fällt diese aus (Hamidi et al., 2017). Da die Anzahl lebender, adhärenter Zellen sich im Rahmen zytotoxischer Wirkungen verändern kann, werden so über die Impedanzveränderungen und somit Veränderungen des Zellindex Rückschlüsse auf die Zytotoxizität gezogen. In Abbildung 6.11 ist der Zellindex in Abhängigkeit zur Zeit für verschiedenen Substanzen und Konzentrationen dargestellt. Da sich die Zellen der Linie SH-SY5Y nicht in den iCELLigence-Kulturschalen kultivieren ließen, wurde dieses ergänzende Experiment nur mit der Cisplatin-resistenten Linie SH-SY5Y^R durchgeführt. Aus den in Abbildung 6.11 gezeigten Zeitverlaufskurven der Zellindices geht hervor, dass der Zellindex nach Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und LY2603618 abnimmt (Abbildung 6.11). Nach Behandlung mit LY2603618 alleine zeigte sich eine stetige kontinuierliche, aber langsamere Indexabnahme, wohingegen sich nach Cisplatin-Behandlung über die ersten 24 h eine leichte Zunahme zeigte, bevor danach ein steilerer Abfall erfolgte (Abbildung 6.11 A). Vereinbar mit der langsameren Wirkungskinetik verglichen mit Cisplatin dauerte die initiale Zunahme des Zellindex bei Carboplatinbehandlung etwas länger, bevor der Zellindex nach ca. 40 h unter den Ausgangswert sank (Abbildung 6.11 B). Beide Platinverbindungen bewirkten vor allem bei über die 72 h aus dem Alamar Blue Assay hinausgehender Inkubationszeit einen deutlich stärkeren Abfall des Zellindex als LY2603618. Bei beiden Platinverbindungen wurde durch die Kombination mit LY2603618 nach 100 h ein um 0,2 Einheiten bzw. knapp 30 % geringerer Zellindex erzielt als nach Monobehandlung mit Cis- oder Carboplatin. Insgesamt stützt die Zellindexanalyse die auf den Viabilitätsassays basierende Annahme einer deutlich gesteigerten Zytotoxizität unter Kombinationsbehandlung und deutet auf eine rascher einsetzende, aber langsamer fortschreitende und nach langer Inkubationsdauer stagnierende zytotoxische Wirkung von LY2603618 hin.

6.2 Vergleichende Umrechnung klinisch applizierter Dosierungen von Cis- und Carboplatin in Stoffkonzentrationen (µM)

Cisplatin-Dosierung: 80 mg/m²/24 h (SIOP Europe, High-risk Neuroblastoma Standard Clinical Practice Recommendations, 2020)

Carboplatin-Dosierung: 750 mg/m² in 60 min (SIOP Europe, High-risk Neuroblastoma Standard Clinical Practice Recommendations, 2020)

Größe und Gewicht Kind im durchschnittlichen Erkrankungsalter von 19 Monaten: 83,0 cm, 10,8 kg ≈ 11,0 kg (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), WHO Growth Charts, 2006)

Blutvolumen Kind im durchschnittlichen Erkrankungsalter von 19 Monaten: 825 ml (Koperska, 2024)

Körperoberfläche Kind im durchschnittlichen Erkrankungsalter von 19 Monate nach Haycock-Formel: 0,5079 m² (Cancer-Therapy-Advisor, 2011; Wu *et al.*, 2022)

Haycock-Formel: KOF (m²) = 0.024265 × Gewicht (kg)^{0.5378} × Größe (cm)^{0.3964} (Wu *et al.*, 2022)

Molare Masse Cisplatin: 301,1 g/mol = 301.100 mg/mol

Molare Masse Carboplatin: 371,249 g/mol = 371.249 mg/mol

Berechnung für Cisplatin:

Applizierte Menge Cisplatin: 80 mg/m² × 0,5079 m² = 40,63 mg (in 24 h)

Applizierte Menge Cisplatin/Stunde: 40,63 mg/24 = 1,69 mg (0,028 mg/min)

Blutkonzentration Cisplatin bei 1,69 mg/h in mg/l: $\frac{1,69 \text{ mg}}{0,825 \text{ l}} = 2,048 \text{ mg/l}$

Blutkonzentration Cisplatin bei 1,69 mg/h in mol/l: $\frac{2,048 \text{ mg/l}}{301.100 \text{ mg/mol}} = 6,8 \times 10^{-4} \text{ mol/l} = \mathbf{6,8 \mu M}$

Berechnung für Carboplatin:

Applizierte Menge Carboplatin: 750 mg/m² × 0,5079 m² = 380,93 mg (in 60 min)

Blutkonzentration Carboplatin in mg/l: $\frac{380,93 \text{ mg}}{0,825 \text{ l}} = 461,73 \text{ mg/l}$

Blutkonzentration Carboplatin in mol/l: $\frac{461,73 \text{ mg/l}}{371.249 \text{ mg/mol}} = 0,00124 \text{ mol/l} = 1,24 \text{ mM} = \mathbf{1240 \mu M}$

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Toxikologie anzufertigen sowie für die Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Anfertigung dieser Arbeit hinweg und für die immer konstruktiven und inspirierenden Rückmeldungen und Gespräche. Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und für den Austausch.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Katharina Roquette für die Einarbeitung, Betreuung und die gesamte Unterstützung bedanken. Und natürlich auch für die zahlreichen Labortipps im Umgang mit den nicht immer ganz einfachen SH-SY5Y.

Auch bei den übrigen Arbeitsgruppen- und Institutsmitarbeitern, Doktoranden und MTAs möchte ich mich recht herzlich für den wissenschaftlichen Austausch, die kleinen und großen Tipps und Hilfestellungen im Labor und das freundliche, angenehme und lockere Arbeitsklima bedanken.

Meinen Freunden und vor allem meinem Freund Marvin danke ich von Herzen dafür, mich unermüdlich immer wieder motiviert und ermutigt zu haben – sei es in schwierigen Phasen während der Experimente, vor allem aber gegen Ende während der berufsbegleitenden Fertigstellung der Dissertation.