

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

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

**Bedeutung von SAMHD1 als Resistenzfaktor im humanen
Neuroblastom**

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

vorgelegt von
Lukas Engl

aus Aichach

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Jindrich Cinatl
Korreferent/in:	Prof. Dr. Joachim Steinbach
ggf. 2. Korreferent/in:	
Tag der mündlichen Prüfung:	12.09.2022

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	12
1.1 Das Neuroblastom	12
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	12
1.1.2 Risikostratifizierung und Einteilung nach INSS und INRGS	12
1.1.3 Therapieoptionen des Neuroblastoms	14
1.2 Multidrug Resistance in Neuroblastomen	16
1.2.1 Resistenzentwicklung durch ABC-Transporter	16
1.2.2 Einfluss von p53 als Resistenzfaktor im Neuroblastom	18
1.3 Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) Inhibitoren als Therapieoption	19
1.3.1 DNA-Reparatur und Wirkmechanismen von PARP-Inhibitoren	19
1.3.2 Anwendung von PARP-Inhibitoren in der Chemotherapie	21
1.4 SAMHD1 und VLPs	23
1.5 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Verbrauchsmaterialien	27
2.2 Geräte und Software	28
2.3 Chemikalien und Substanzen	29
2.4 Cytostatika und Inhibitoren	31
2.5 Antikörper	32
2.6 Puffer, Lösungen	34
2.6.1 Zellkultur	34

2.6.2	Immunhistochemischer Proteinnachweis	35
2.6.3	MTT-Viabilitätsassays	38
2.6.4	Durchflusszytometrie.....	39
2.7	Zellbiologische Methoden.....	39
2.7.1	Verwendete Zelllinien	39
2.7.2	Zellkultivierung und Passagieren	40
2.7.3	Etablierung der Olaparib-resistenten Zelle IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰	41
2.7.4	Bestimmung der Zellzahl.....	41
2.8	Immunhistochemischer Proteinnachweis	41
2.8.1	Proteinextraktion und Einstellung der Gesamtkonzentration.....	41
2.8.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.8.3	Protein Transfer (Western Blot)	43
2.8.4	Nachweis von Proteinen	44
2.9	MTT-Zellviabilitätsassays.....	44
2.10	VLP Arbeiten.....	47
2.11	MDR1-Nachweis mit Durchflusszytometrie	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Charakterisierung IMR5 und resistenter Sublinien	49
3.1.1	Adaptierte Cytostatika und Kreuzresistenzen	49
3.1.2	Proteinexpression der IMR5-Sublinien	51
3.1.3	Untersuchung von p53 in MTT-Tests mit Nutlin-3 und Ergebnisse der <i>TP53</i> -Gensequenzierung	52
3.2	Einfluss von MDR1 an der Entstehung von Chemoresistenz in IMR5.....	55
3.2.1	Nachweis von MDR1 mit Durchflusszytometrie	55
3.2.2	Beurteilung der Funktionalität von MDR1 im MTT Assay	56
3.3	Einfluss von SAMHD1 auf Resistenz	61
3.4	PARP1-Inhibitoren und Anwendung in IMR5.....	65
3.4.1	Einfluss von ABC-Transportern auf PARP-Inhibitoren.....	65
3.4.2	Einfluss von Verapamil und VLPs in IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰	71

4	Diskussion	81
4.1	Entwicklung von Kreuzresistenzen in IMR5 durch MDR1	81
4.2	Keine Beteiligung von p53 an der Entstehung von Chemoresistenz in IMR5.	84
4.3	SAMHD1 als Resistenzfaktor in IMR5.....	85
4.4	Anwendung von PARP-Inhibitoren in IMR5.....	87
4.5	Etablierung und Charakterisierung von IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰	90
	Zusammenfassung	95
	Summary.....	97
	Literatur	99
	Anhang	108
	Danksagung	109
	Lebenslauf	110
	Schriftliche Erklärung.....	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Struktur von MDR1 und MRP1 (Abbildung modifiziert nach Gottesmann ¹³).	17
Abbildung 2: Einfluss von PARP-Inhibitoren auf DNA-Reparaturmechanismen (Abbildung modifiziert nach Cortesi ³⁸).	20
Abbildung 3: Darstellung eines aktiven SAMHD1-Tetramers (Abbildung modifiziert nach Ji ⁶⁹).	24
Abbildung 4: Beteiligung von SAMHD1 an der DNA-Reparatur (Abbildung modifiziert nach Caballo-Lobato ⁷³).	25
Abbildung 5: Darstellung des Proteintransfers von einem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Abbildung modifiziert nach Novusbio Anleitung ⁸³).	43
Abbildung 6: Reduktion von MTT zu Formazan (Abbildung aus Gstraunthaler ⁸⁶).	45
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer 96-Well Platte für den MTT-Test (eigene Abbildung).	46
Abbildung 8: Überprüfung der Chemoresistenz in IMR5 im MTT-Assay (Daten siehe Tabelle 5).	50
Abbildung 9: Proteinexpression in IMR5 PAR und resistenten Sublinien.	52
Abbildung 10: Graphische Auswertung der MDR1 Durchflusszytometrie in IMR5 (Daten siehe Anhang Tabelle 1).	55
Abbildung 11: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Cisplatin und Gemcitabin mit Verapamil oder Zosuquidar (Daten siehe Tabelle 8).	57
Abbildung 12: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Vincristin und Doxorubicin unter Zusatz von Verapamil oder Zosuquidar (Daten siehe Tabelle 9).	60
Abbildung 13: Proteinexpression der IMR5-Sublinien nach VLP-Behandlung.	61

Abbildung 14: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Olaparib (A) und Rucaparib (B). Daten siehe Tabelle 13.	67
Abbildung 15: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Niraparib (A) und Talazoparib (B). Daten siehe Tabelle 14.	70
Abbildung 16: MTT-Tests der Sublinie IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰ im Vergleich mit IMR5 PAR und den PARP-Inhibitoren Olaparib, Rucaparib, Niraparib und Talazoparib. Daten siehe Tabelle 15.	73
Abbildung 17: Proteinexpression von IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰ und IMR5 PAR nach VLP- Behandlung.	74
Abbildung 18: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Cytarabin (Ara-C) und Olaparib in IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰ . Daten siehe Tabelle 16A und B.	78
Abbildung 19: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Rucaparib und Niraparib in IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰ . Daten siehe Tabelle 16C und D.	79
Abbildung 20: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Talazoparib in IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰ . Daten siehe Tabelle 16E.	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach der INSS-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach Brodeur ⁵)	13
Tabelle 2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INRG-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach Monclair ⁶).....	14
Tabelle 3: Übersicht über die zugelassenen PARP-Inhibitoren und ausgewählte klinische Anwendungsmöglichkeiten. Strukturformeln entnommen aus Jain ⁴⁶	21
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien und Adaption an jeweiliges Cytostatikum.....	40
Tabelle 5: Überprüfung der Chemoresistenz in IMR5 im MTT-Assay (siehe Abbildung 8).	49
Tabelle 6: IC ₅₀ Werte der IMR5-Sublinien im MTT-Test mit Nutlin-3.....	53
Tabelle 7: Ergebnis der TP53-Gensequenzierung in den IMR5-Sublinien durch Multiplex-PCR.	54
Tabelle 8: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Cisplatin und Gemcitabin mit Verapamil oder Zosuquidar (siehe Abbildung 11).....	56
Tabelle 9: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Vincristin und Doxorubicin unter Zusatz von Verapamil oder Zosuquidar (siehe Abbildung 12).	59
Tabelle 10: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Cytarabin in IMR5.....	62
Tabelle 11: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Gemcitabin in IMR5.....	63
Tabelle 12: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Topotecan in IMR5.....	64
Tabelle 13: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Olaparib und Rucaparib (siehe Abbildung 14).....	66
Tabelle 14: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Talazoparib und Niraparib (siehe Abbildung 15).....	69

Tabelle 15: MTT-Tests der Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ im Vergleich mit IMR5 PAR und den PARP-Inhibitoren Olaparib, Rucaparib, Niraparib und Talazoparib (siehe Abbildung 16)..... 72

Tabelle 16: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren in IMR5^rOLAPARIB²⁰ (siehe Abbildung 18 - Abbildung 20)..... 76

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding Casette
AGS	Aicardi-Goutieres Syndrom
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
AML	Akute Myeloische Leukämie
Ara-C	Cytarabin
ara-CTP	Cytarabintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
BRCA	Breast Cancer
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CtIP	CtBP-Interacting Protein
dCK	Deoxycytidin Kinase
dNTPase	Desoxynukleotidtriphosphatreduktase
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HD	Histidin Aspartat Domäne
HR	Homologe Rekombination
IDRF	Image Defined Risk Factors
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
MDM2	mouse double minute homologe 2
MDR	Multidrug Resistance
MDR1	Multidrug Resistance Protein 1
MMR	Mismatch Reparatur
MRP1	Multidrug Resistance-Associated Protein 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
NAD ⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	nicht homologe Endverknüpfung
NLS	Nuclear Localization Signal
PARP	Poly ADP-Ribose Polymerasen

RFU Relative Fluorescence Units

SAMHD1 sterile alpha motif and HD domain containing protein 1

SDS-PAGE Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

VLP Virus-like particles

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Das Neuroblastom ist der am häufigsten vorkommende extrakranielle solide Tumor im Kindesalter. Neuroblastome entstehen im Embryo aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems während der Entwicklung der Neuralleiste und finden sich meistens im Bereich der Nebennieren und den paravertebralen sympathischen Ganglien.¹ Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ungefähr 18 Monaten, bis zum Fünften Lebensjahr sind über 90% der Erkrankungen diagnostiziert.² Das Neuroblastom ist für 15% aller pädiatrisch onkologischen Todesfälle verantwortlich.³

Die Ätiologie des Neuroblastoms ist nicht abschließend geklärt, wobei Umwelteinflüsse als nicht relevant angesehen werden.² Grundlegend ist das Neuroblastom eine sporadische Erkrankung mit äußerst heterogenem klinischem Verlauf. Nur zwei Prozent aller Neuroblastome sind erblich autosomal dominant bedingt. Bei dem Großteil dieser erblichen Neuroblastome treten Mutationen des Gens ALK (Anaplastische Lymphomkinase) auf.⁴

1.1.2 Risikostratifizierung und Einteilung nach INSS und INRGs

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist sehr variabel. Die Prognose variiert je nach Risikoprofil von spontaner Regression der Erkrankung bis zum Tod trotz intensiver multimodaler Therapie.³ Anhand von Risikofaktoren und Einteilung der Erkrankung in verschiedene Gruppen können sinnvolle Entscheidungen für die Therapie getroffen werden.

Das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) wird seit 1988 zur Risikoklassifizierung verwendet (siehe Tabelle 1). Es klassifiziert die Patient*innen nach initialer chirurgischer Resektion und Ausmaß des Primärtumors.⁵

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach der INSS-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach Brodeur⁵)

Stadium	Befund
1	Lokaler Tumor nach kompletter Resektion
2A	Lokaler Tumor nach unkompletter Resektion
2B	Lok. Tumor nach kompletter oder unkompletter Resektion, Nachweis von ipsilateraler Lymphknoten Infiltration, kontralaterale Lymphknoten frei von Infiltration
3	Nicht resektabler unilateraler Tumor; Ausdehnung über die Mittellinie und lokaler Tumor mit Infiltration der kontralateralen Lymphknoten oder Mittellinientumor mit bilateraler infiltrativer Ausdehnung
4	Metastasierter Tumor in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark und Leber
4S	Lokalisierter Tumor (1 – 2B) mit Metastasierung in Leber, Haut, Knochenmark (nicht detektierbar in MIBG Szintigraphie) bei Säuglingen unter 12 Monaten (günstigere Prognose als Stadium 4)

Um eine bessere Vergleichbarkeit von klinischen Studien zu ermöglichen und Patient*innen vor Beginn der Therapie zu klassifizieren, wird seit 2009 das *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) System verwendet (siehe Tabelle 2). Das INRG-System beruht auf radiologischen Kriterien, den sogenannten *Image Defined Risk Factors* (IDRF). Dazu zählen Infiltration, Kompression und Umwachsen von benachbarten Organen und Strukturen.⁶

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INRG-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach Monclair⁶)

Stadium	Befund
L1	Lokalisierter Tumor ohne Nachweis von IDRF und begrenzt auf eine Körperhöhle
L2	Lok. Tumor mit Nachweis von einem oder mehreren IDRF
M	Nachweis von Fernmetastasen (außer Stadium MS)
MS	Metastasiertes Neuroblastom bei Kindern unter 18 Monaten; Metastasen begrenzt auf Haut, Leber und Knochenmark

Die Systeme können jedoch nicht identisch ineinander überführt werden, sodass in klinischen Studien meist beide Systeme erhoben werden.

In der INRG-Klassifikation werden neben histologischer Einstufung und Alter der Patient*innen auch molekulare Merkmale wie MYCN-Amplifikation, Chromosomen-Aberration an 11q und Chromosomen-Ploidie berücksichtigt. Anhand aller Kriterien werden die Patient*innen in Risikogruppen eingeteilt: Sehr niedriges (28,2% aller Patient*innen), niedriges (26,8%), mittleres (9%) und hohes Risiko (36,1%). Das 5-Jahres-Überleben ohne Rückfall beträgt in der niedrigsten Risikogruppe über 85%, während in der Gruppe mit dem höchsten Risiko nur die Hälfte der Patient*innen überleben.⁷

1.1.3 Therapieoptionen des Neuroblastoms

Die Therapie des Neuroblastoms ist individuell und richtet sich nach der jeweiligen Risikogruppe. Die Konzepte reichen von engmaschiger Kontrolle bis hin zu multimodaler Radiochemotherapie mit Stammzelltransplantation. Gerade im Hochrisiko-Bereich werden die meisten Patient*innen in klinischen Studien mit individuell abweichenden Konzepten behandelt.⁸ Die hier beschriebenen Therapieoptionen sind aus der Leitlinie

der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) von 2017 entnommen.

Sofern keine MYCN-Amplifikation oder Chromosom-1p-Aberration vorliegt, zählen folgende Patient*innen zur Gruppe der Niedrig-Risiko Neuroblastome: INSS Stadium 1, INSS Stadium 2, INSS Stadium 3 im Alter unter 2 Jahren, INSS Stadium 4S und INRG Stadium MS.⁹ Diese Patient*innen werden primär chirurgisch versorgt. Zur Diagnosestellung ist ein Eingriff für die Gewinnung von Tumorgewebe nötig. Beim Fehlen vom IDRF kann dieser Eingriff zur kompletten Tumoresektion genutzt werden. Bei einer günstigen Prognose kann auf extensives chirurgisches Vorgehen verzichtet werden. Auch bei makroskopischen Resttumoren kann wegen der häufigen Spontanremission auf extensive Therapie verzichtet werden.

Die mittlere Risikogruppe umfasst Patient*innen ohne MYCN-Amplifikation der Stadien INSS 2 mit Chromosom-1p-Deletion, INSS 3 mit Chromosom-1p-Deletion im Alter unter 2 Jahren, INSS 3 im Alter über 2 Jahren und INRG M unter 18 Monaten zum Diagnosezeitpunkt.⁹ Zur Klassifizierung der Patient*innen der mittleren Risikogruppe erfolgt zu Beginn eine chirurgische Tumorentnahme. Eine komplette Resektion soll nur erfolgen, wenn sich die Situation risikoarm darstellt. Die Induktionstherapie besteht aus mehreren Zyklen. Hierbei werden Cytostatika wie Doxorubicin, Platinverbindungen, Vincristin und Etoposid verwendet. In der Erhaltungstherapie kommt Cyclophosphamid zum Einsatz.⁹

Zur Hochrisikogruppe zählen alle Patient*innen im Stadium M über 18 Monate und alle Patient*innen mit MYCN-Amplifikation. Eine Biopsie des Primärtumors ist auch hier zwingend notwendig. Die intensive multimodale Therapie besteht aus multipler Chemotherapie, Konsolidationstherapie und anschließender Erhaltungstherapie. Nach der Induktionstherapie wird eine *total gross resection* des Primärtumors angestrebt (>95% des Primärtumors). Im Rahmen der hochdosierten Chemotherapie werden Cytostatika wie Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin in mehreren Zyklen verwendet. Die myeloablative Konsolidationstherapie mit Busulfan und Melphalan erfordert zudem eine autologe Stammzelltransplantation. Der anti-GD1-Antikörper Dinutuximab wird in Kombination mit GM-CSF und Interleukin-2 zur Postkonsolidationstherapie verwendet.^{9,10}

1.2 Multidrug Resistance in Neuroblastomen

1.2.1 Resistenzentwicklung durch ABC-Transporter

Chemotherapie ist neben Chirurgie und Bestrahlung eine zentrale Säule in der Behandlung von Tumoren. Zu unterscheiden ist die intrinsische Chemoresistenz, die vor Beginn der Therapie bereits besteht, von einer erworbenen Resistenz. Eine im Verlauf der Chemotherapie erworbene *Multidrug Resistance* (MDR) stellt ein schwerwiegendes Problem dar, da dabei eine Kreuzresistenz gegenüber anderen Wirkstoffen entwickelt wird.¹¹ Eine MDR ist bei bis zu 90% aller metastasierten Tumore für ein Therapieversagen verantwortlich.¹²

Eine MDR wird häufig durch Proteine der *ATP binding Casette* (ABC)-Transporter vermittelt. ABC-Transporter sind Effluxpumpen mit einer breiten Spezifität für hydrophobe Stoffe und vermitteln physiologisch den Transport von Komponenten aus dem Cytosol in den Extrazellularraum. Sie finden sich vor allem in Darm, Leber, Nieren und der Blut-Hirn-Schranke.¹³ Im humanen Genom codieren 48 Gene für ABC-Transporter, die in sieben Familien von A bis G eingeteilt werden.¹⁴ MDR wird vor allem durch zwei ABC-Transporter vermittelt: Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1, ABCB1, P-Glycoprotein) und Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP1, ABCC1). MDR1 besteht aus zwölf Transmembrandomänen und zwei ATP-Bindungsstellen. MDR1 wurde 1973 im Zusammenhang mit dem Transport von Daunomycin aus Zellen beschrieben.¹⁵ MRP1 unterscheidet sich von MDR1 durch eine Erweiterung um fünf transmembrane Domänen am aminoterminalen Ende (siehe Abbildung 1).¹³

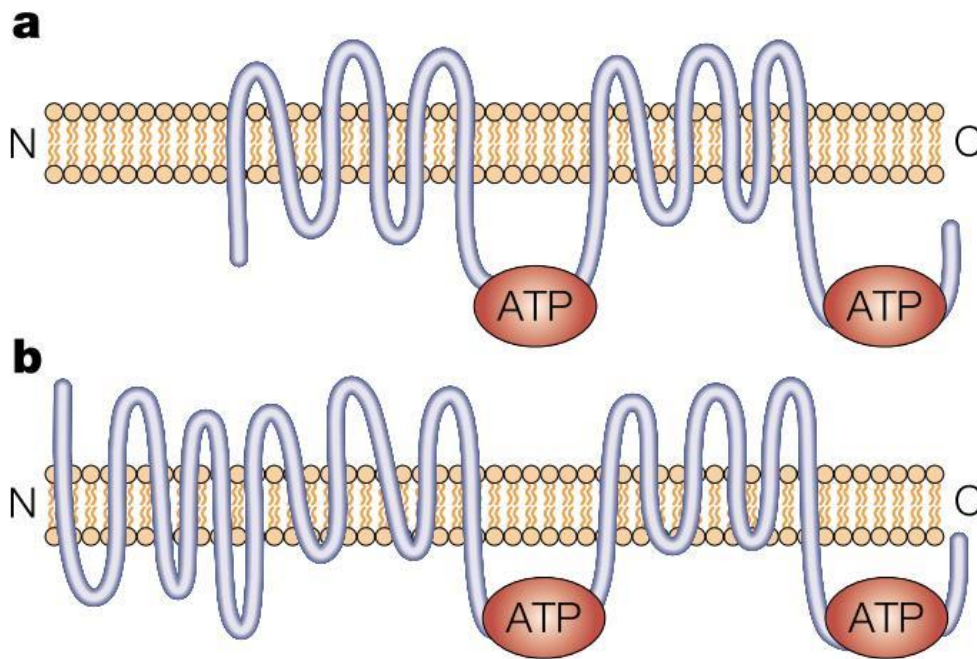


Abbildung 1: Darstellung der Struktur von MDR1 und MRP1 (Abbildung modifiziert nach Gottesmann¹³). Dargestellt ist eine Lipidmembran Doppelschicht, die von den transmembranären Domänen von MDR1 (a) und MRP1 (b) durchzogen wird. Es sind zwei Nukleotidbindungsstellen unter der Bindung von ATP dargestellt.

Zu den Substraten von MDR1 und MRP1 zählen Chemotherapeutika wie Vincristin, Doxorubicin und Paclitaxel.¹⁶ Nach einer Chemotherapie wird häufig eine erhöhte MDR1 und MRP1 Expression Tumoren beobachtet. Mechanismen dafür sind eine Hochregulation entsprechender Gene oder klonaler Selektionsdruck.¹⁷ Während eine hohe MRP1-Expression in Neuroblastomen einen prognostisch ungünstigen Faktor darstellt, spielt die MDR1-Expression keine Rolle für die Prognose.^{18,19} In Neuroblastomen korreliert eine hohe MRP1-Expression direkt mit einer MYCN-Amplifikation. MYCN reguliert die Expression von MRP1 über Bindung an den Promotor und ist somit direkt an der Entstehung von Chemoresistenz in Hochrisiko Neuroblastomen beteiligt.^{20,21}

Seit den 1980er Jahren sind viele potentielle Inhibitoren von ABC-Transportern identifiziert worden. Der Calciumkanalblocker Verapamil zählt zur ersten Generation der MDR-Modulatoren. Verapamil stellt ein Substrat von MDR1 und MRP1 dar und hemmt

somit den Efflux von Cytostatika aus der Zelle.^{22,23} Zosuquidar (LY335979) zählt zu den stärksten Inhibitoren und hemmt spezifisch MDR1.²⁴

1.2.2 Einfluss von p53 als Resistenzfaktor im Neuroblastom

Der Tumorsuppressor p53 ist an der DNA-Reparatur, der Induktion von Apoptose und der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt.²⁵ *TP53* ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren: 50% aller Tumore exprimieren kein p53-Protein oder eine inaktive Form.²⁶ Primäre Neuroblastome weisen jedoch eine äußerst geringe Mutationsrate des *TP53*-Gens auf.²⁷ Die Behandlung mit Cytostatika kann solche Mutationen auslösen. Tweddle et al. zeigten dies durch ein Analyse von Tumorproben vor und nach einer Chemotherapie.²⁸ Die Mutation und der Funktionsverlust von p53 ist damit ein möglicher Mechanismus, der in Neuroblastomen zu Chemoresistenz und Rezidiven der Krankheit führt.^{29,30} Im physiologischen Zustand wird die Konzentration von p53 auf niedrigem Niveau gehalten: Die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 (*Mouse double minute homologe 2*) markiert p53 für den proteosomalen Abbau. MDM2 stellt damit einen wichtigen inhibitorischen Regulator dar.²⁵

Der MDM2-Antagonist Nutlin-3 (cis-Imidazol Analogon) verhindert die Interaktion von p53 und MDM2, indem es die p53-Bindetasche von MDM2 besetzt.³¹ In Neuroblastomzellen mit Wildtyp-p53 kommt es dadurch nach Behandlung mit Nutlin-3 zur Aktivierung des p53-Signalweges, Zellzyklusarrest und Apoptose. Nutlin-3 wirkt in Neuroblastomen mit Wildtyp-p53 antiproliferativ ohne generalisierten genotoxischen Schaden und Nebenwirkungen wie klassische Cytostatika.³²

1.3 Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) Inhibitoren als Therapieoption

1.3.1 DNA-Reparatur und Wirkmechanismen von PARP-Inhibitoren

Eine fehlerhafte DNA-Reparatur ist ein zentraler Mechanismus in der Entstehung von Tumoren. Im Laufe der Zeit haben sich komplexe Reparaturmechanismen entwickelt: Für DNA-Einzelstrangbrüche werden Mismatch-Reparatur (MMR), Basenexzision- (BER) und Nukleotidexzisionsreparatur (NER) verwendet. Homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) werden zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen genutzt.³³

Die homologe Rekombination (HR) ist ein exakter Mechanismus, bei dem über den homologen Bereich des Schwesterchromatids die DNA repariert wird. Die homologe Vorlage ist jedoch nur nach der Replikation in der S-Phase vorhanden, weshalb die HR auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus limitiert ist.^{34,35} Die NHEJ ist ein fehlerbehafteter Mechanismus: Die freien Enden des DNA-Doppelstrangbruches werden modifiziert und anschließend durch eine DNA-Ligase verbunden, was häufiger zu Deletionen führt.³⁶ Poly ADP-Ribose Polymerasen (PARP) katalysieren Nicotinamid Adenin Dinucleotid (NAD⁺) abhängig die Übertragung von Poly ADP-Ribose auf DNA, Histonproteine und PARP selbst. An den negativ geladenen Poly-ADP Ketten lagern sich weitere Enzyme und Proteine an, die für die DNA-Reparatur nötig sind. PARP1, ein Enzym der PARP-Familie, ist an der BER bei DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt (siehe Abbildung 2). Wird PARP gehemmt, entstehen aus Einzelstrangbrüchen Doppelstrangbrüche, die über homologe Rekombination repariert werden müssen. PARP-Inhibitoren sind daher besonders wirksam in Tumoren mit fehlerhafter homologer Rekombination, da Doppelstrangbrüche entweder akkumulieren oder über fehlerbehaftete Mechanismen wie die NHEJ repariert werden müssen. Vor allem Tumore mit Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *Breast Cancer* (BRCA) weisen Defekte der homologen Rekombination auf.³⁷

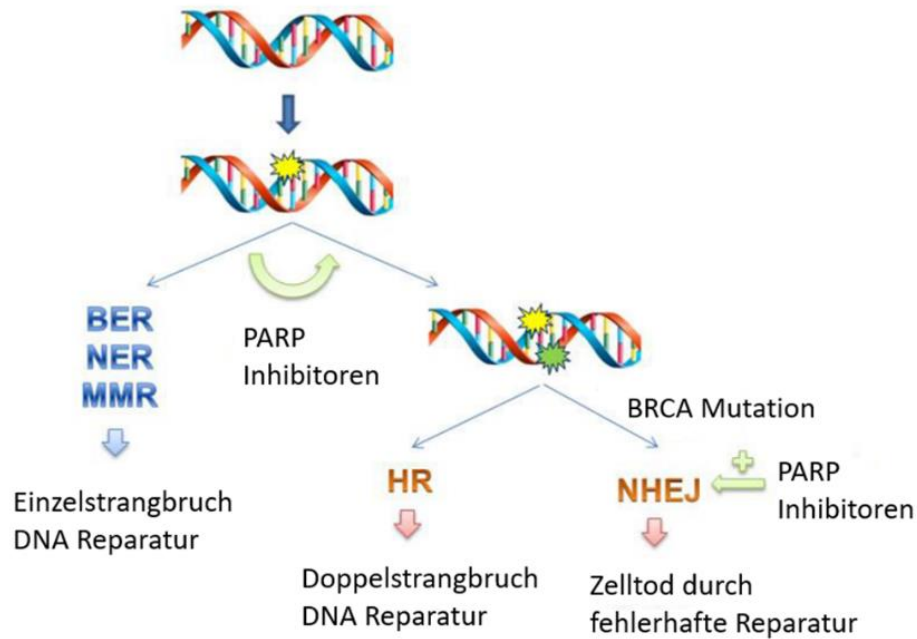


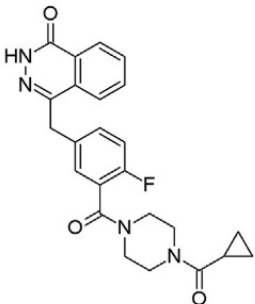
Abbildung 2: Einfluss von PARP-Inhibitoren auf DNA-Reparaturmechanismen (Abbildung modifiziert nach Cortesi³⁸). Besonders wirksam sind PARP-Inhibitoren bei Zellen mit defekter homologer Rekombination (vor allem in BRCA mutierten Zellen), da Doppelstrangbrüche über die fehlerbehaftete NHEJ repariert werden und so zum Zelltod führen. Einzelstrangbrüche akkumulieren zu Doppelstrangbrüchen durch Hemmung der BER durch PARP-Inhibitoren.

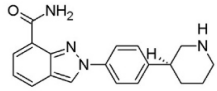
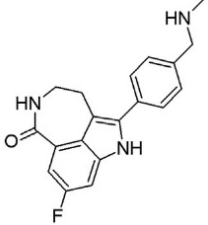
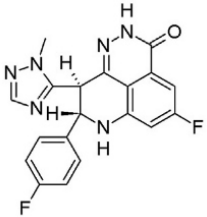
Der zweite Wirkmechanismus von PARP-Inhibitoren wird als *PARP-Trapping* bezeichnet: Durch allosterische Effekte binden die Inhibitoren PARP1 und PARP2 an geschädigte DNA-Stellen. Durch diese PARP-DNA Komplexe wird die DNA-Replikation gestört. Diese *PARP-Trapping* Aktivität wirkt toxischer als die katalytische Inhibition der PARP-Inhibitoren.^{39,40} Die Fähigkeit PARP-DNA Komplexe zu bilden variiert innerhalb der PARP-Inhibitoren: Talazoparib ist 100-fach effektiver im *PARP-Trapping* als Olaparib, Rucaparib und Niraparib.⁴¹

1.3.2 Anwendung von PARP-Inhibitoren in der Chemotherapie

Anwendung in der Klinik finden PARP-Inhibitoren vor allem bei der Behandlung von BRCA-mutierten Brust- und Ovarialkarzinom (siehe Tabelle 3). *In vitro* zeigen PARP-Inhibitoren Wirksamkeit bei einer Reihe von Tumoren mit fehlerhafter DNA-Reparatur³⁸. In mehreren Studien werden PARP-Inhibitoren als Kombinations- oder Monotherapie bei Pankreas- und Prostatakarzinomen eingesetzt.⁴² Die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren in Neuroblastomen und kindlichen soliden Tumoren ist derzeit Gegenstand von Studien. *In vitro* zeigen vor allem Olaparib und Rucaparib Wirksamkeit als Radiosensitizer vor Bestrahlung in Neuroblastomen und synergistische Effekte in Kombination mit Cytostatika.^{43,44} Der PARP-Inhibitor Olaparib befindet sich in einer klinischen Phase-1-Studie zu rezidivierenden pädiatrischen soliden Tumoren in Japan.⁴⁵

Tabelle 3: Übersicht über die zugelassenen PARP-Inhibitoren und ausgewählte klinische Anwendungsmöglichkeiten. Strukturformeln entnommen aus Jain⁴⁶

PARP-Inhibitor	Anwendung in der Klinik
<p>Olaparib, LYNPARZA®, AstraZeneca</p> 	<p>Die Erstzulassung erfolgte 2014 für die Anwendung bei fortgeschrittenem BRCA-mutiertem Eierstockkrebs, fortgeschrittenem BRCA-mutiertem, HER2-negativem Brustkrebs und als Erhaltungstherapie in platinsensitivem Eierstockkrebs (unabhängig vom BRCA-Status). Olaparib ist zugelassen für die Erhaltungstherapie in BRCA-mutiertem, metastasiertem Pankreaskarzinom.⁴⁷</p>

<p>Niraparib, ZEJULA®, TesaroInc.</p> 	<p>Erstzulassung 2017 für die Erhaltungstherapie des rezidivierenden, platinsensitiven Ovar-, Eileiter- oder Peritonealkarzinoms.⁴⁸</p>
<p>Rucaparib, RUBRACA®, Clovis Oncology</p> 	<p>Rucaparib wurde 2016 zugelassen für die Erhaltungstherapie des rezidivierenden platinsensitiven Eierstockkarzinoms (unabhängig des BRCA-Status) und des platinsensitiven rezidivierenden Ovar-, Eileiter- und Peritonealkarzinoms.^{47,48}</p>
<p>Talazoparib, TALZENNA®, Pfizer</p> 	<p>Die Erstzulassung von Talazoparib erfolgte 2018 für BRCA-mutierte, HER2-negative lokal fortgeschrittene oder metastasierte Brustkarzinome.⁴⁸</p>

1.4 SAMHD1 und VLPs

Das Protein *sterile alpha motif and HD domain containing protein 1* (SAMHD1) ist in der Virologie als Restriktionsfaktor gegenüber HIV-1 beschrieben. SAMHD1 wirkt als Desoxynukleotidtriphosphatreduktase (dNTPase) und verringert das Level an Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) für die virale Replikation in myeloischen Zellen und CD4+ T-Helferzellen.⁴⁹ Neben der antiviralen Funktion als dNTPase ist SAMHD1 bei weiteren Prozessen beteiligt. Mutationen im Gen für SAMHD1 können zur erblichen Enzephalopathie des Aicardi-Goutieres-Syndrom (AGS) führen.⁵⁰ Ein Verlust der dNTPase-Aktivität durch erworbene Mutationen steht in Verbindung mit der Entstehung chronischer lymphatischer Leukämie (CLL).⁵¹

In der AG Cinatl wurde SAMHD1 als Resistenzfaktor gegenüber Cytarabin und als möglicher Biomarker bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) identifiziert. Cytarabin (Ara-C) ist ein wesentlicher Bestandteil der AML-Therapie und wird von der zelleigenen Deoxycytidin Kinase (dCK) zum Nucleosidanalogen Cytarabintriphosphat (ara-CTP) aktiviert, das zum Abbruch der DNA-Synthese führt.⁵² SAMHD1 ist in der Lage ara-CTP zu hydrolysieren und stellt damit einen limitierenden Faktor der Therapie der AML mit Ara-C dar.^{53,54}

Das akzessorische lentivirale Protein Vpx aus HIV-2 ist in der Lage das SAMHD1-Level einer Zelle für mehrere Tage effektiv zu verringern. Vpx bindet an eine C-terminale Domäne und rekrutiert SAMHD1 an den Ubiquitin-E3-Ligase Komplex CRL4, der SAMHD1 ubiquitinyliert und für den proteosomalen Abbau markiert.⁵⁵ Schneider et al. nutzen *Virus-like particles* (VLPs) mit dem lentiviralen Protein Vpx (VPX-VLPs) für den Abbau von SAMHD1 um Cytarabin resistente AML-Zellen für Ara-C zu sensitivieren und zeigten die mögliche Anwendung in der Klinik.⁵³ Das akzessorisch lentivirale Protein Vpr aus HIV-1 ist im Unterschied zu Vpx nicht in der Lage SAMHD1 abzubauen. In der Arbeit werden daher VLPs mit Vpr (VPR-VLPs) als Kontrolle genutzt.⁵⁶ Für Vpr ist eine Funktion im Zellzyklus beschrieben: Die Expression von Vpr durch HIV-1 in einer infizierten Zelle führt zu einem G2 Zyklusarrest und vereinfacht die Replikation des Virus.^{57,58} Vpr wirkt proapoptotisch und kann DNA-Doppelstrangbrüche induzieren.^{59,60} Mehrere Arbeitsgruppen zeigten eine Anwendung von Vpr als potentiell wirksames Cytostatikum.^{61,62}

Ein SAMHD1-Monomer besteht aus einer *sterile alpha motif*-Domäne (SAM) und einer Histidin-Aspartat-Domäne (HD). Eine N-terminale Domäne enthält ein *Nuclear Localization Signal* (NLS), das den Transport von SAMHD1 in den Zellkern vermittelt. Physiologisch kommt SAMHD1 nur im Zellkern vor, bei Patient*innen mit AGS ist auch eine Akkumulation im Cytoplasma beschrieben.⁶³ Die SAM-Domäne vermittelt Protein-Protein Interaktionen und ist in der Lage RNA zu binden.⁶⁴ Die HD-Domäne vermittelt die Tetramerisierung: Durch das Binden von dGTP oder GTP in einer allosterischen Bindungsstelle entsteht ein Homodimer. Die Bindung eines weiteren dNTPs in der zweiten allosterischen Bindungstasche führt zur Tetramerisierung, wobei dATP als Cofaktor am effektivsten die Tetramerisierung einleitet.⁶⁵ In einem SAMHD1 Tetramer finden sich zwei katalytische Zentren mit dNTPase Aktivität (siehe Abbildung 3). Als Substrate von SAMHD1 sind alle dNTPs und weitere Nukleosidanaloga bekannt.^{66,67} Knecht et al. identifizierten neben Cytarabin auch Clofarabin, Cladribin, Fludarabin und Gemcitabin als Substrate mit unterschiedlicher Affinität zu SAMHD1.⁶⁸

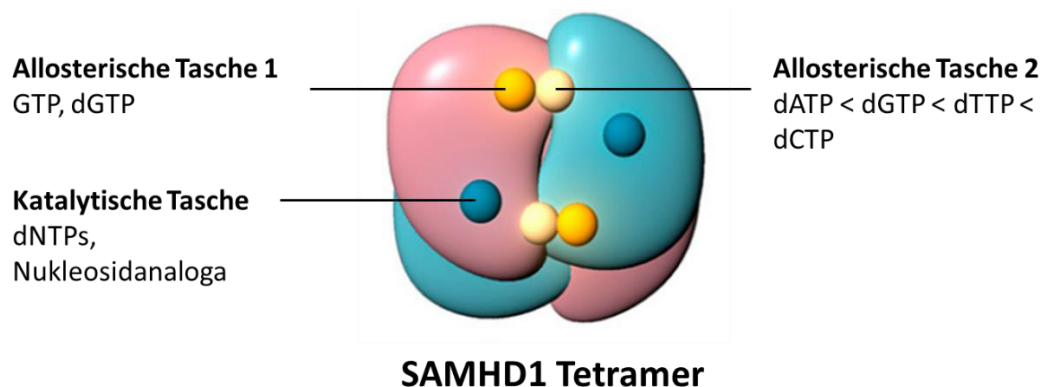


Abbildung 3: Darstellung eines aktiven SAMHD1-Tetramers (Abbildung modifiziert nach Ji⁶⁹). Die Bindung von (d)GTP in der allosterischen Bindungstasche 1 vermittelt die Homodimerisierung, das Binden eines weiteren dNTPs in der allosterischen Tasche 2 vermittelt die Tetramerisierung. In der katalytischen Tasche können alle dNTPs, ara-CTP und weitere Nukleosidanaloga hydrolysiert werden.

Die dNTPase Aktivität von SAMHD1 spielt eine wichtige Rolle während des Zellzyklus und der Zellproliferation.⁷⁰ Die katalytische Aktivität von SAMHD1 kann über Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Thr592 reguliert werden. Während der S-Phase wird SAMHD1 über den CDK1/2-cyclinA-Komplex phosphoryliert, um die dNTP

Hydrolyse zu verringern und die Menge an verfügbaren dNTPs für die DNA Replikation zu erhöhen.⁷¹ Am Ende der M-Phase wird SAMHD1 über den PP2A-B55 α -Komplex dephosphoryliert und die Menge der verfügbaren dNTPs sinkt.⁶⁷

Neben der Funktion als dNTPase wird eine Beteiligung von SAMHD1 an der DNA-Schadensantwort und Reparatur von Doppelstrangbrüchen diskutiert.⁵¹ SAMHD1 rekrutiert und komplexiert das *CtBP-Interacting Protein* (CtIP) an Stellen mit DNA-Doppelstrangbrüchen und ermöglicht die DNA-Endresektion, einem wichtigen Schritt der homologen Rekombination. Das Fehlen von SAMHD1 verhindert demnach eine effiziente homologe Rekombination und sensitiviert Zellen gegenüber Doppelstrangbrüche-induzierenden Stoffen, unter anderem PARP-Inhibitoren und weiteren Nukleosidanaloga.⁷²

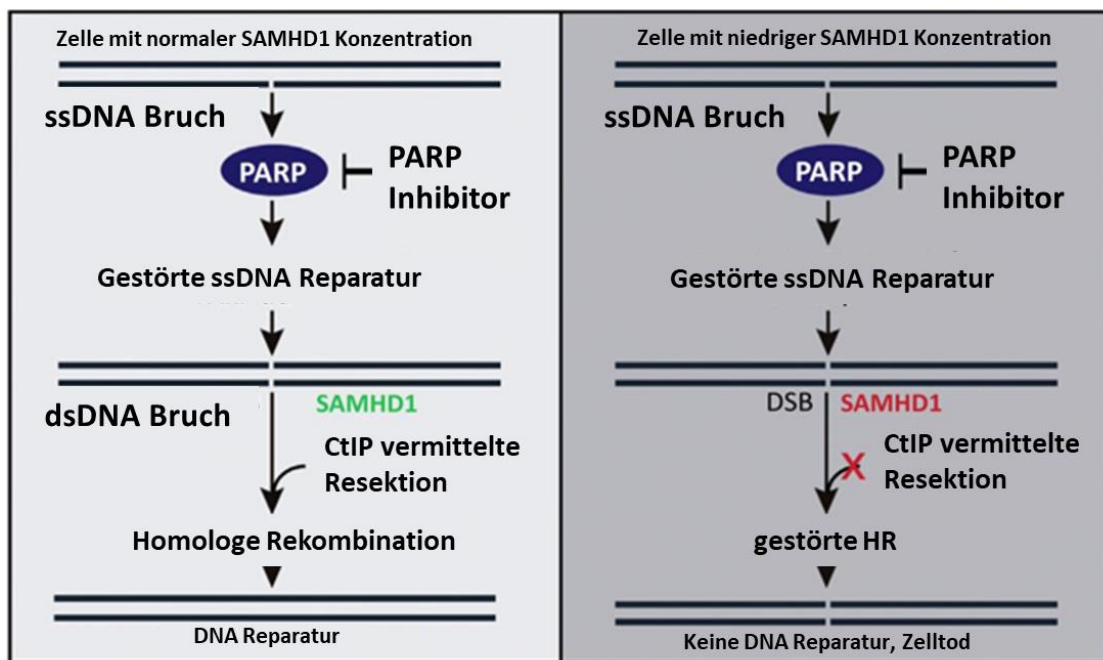


Abbildung 4: Beteiligung von SAMHD1 an der DNA-Reparatur (Abbildung modifiziert nach Caballo-Lobato⁷³). SAMHD1 vermittelt einen Schritt der homologen Rekombination (HR) in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (dsDNA-Brüche). Fehlt SAMHD1 wird eine effiziente HR verhindert, dsDNA-Brüche akkumulieren und es kommt zum Zelltod.

1.5 Zielsetzung

In der geplanten Arbeit soll untersucht werden, ob SAMHD1 zur Resistenzentwicklung gegenüber Nukleosidanaloga und DNA-schädigenden Cytostatika im Neuroblastom beiträgt. Die an verschiedene Cytostatika adaptierten Sublinien der humanen Neuroblastomzelllinie IMR5 sollen hinsichtlich Proteinexpression, Kreuzresistenzentwicklung und bereits bekannter Resistenzfaktoren wie *TP53*-Mutation und MDR1-Expression charakterisiert werden. Des Weiteren soll die Interaktion von PARP-Inhibitoren mit SAMHD1 und MDR1 untersucht werden, um festzustellen, ob PARP-Inhibitoren einen möglichen Therapieansatz im High-Risk Neuroblastom darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96 Well Platten	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Blotting Papier Western Blot	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Combitips Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cryo-Tubes	Thermo Fisher Dreiech, Deutschland
Einmalpipetten (Stripetten)	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Glasflaschen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Handschuhe Kimtech Sterling Nitrile Gloves Größe M	Kimberley Clark Professional, Irving USA
Nitrocellulosemembran 0,45 µm Porengröße	ThermoFisher, Dreiech, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab GmbH, Arensburg, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe Lock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen Falcon™ 25 cm ²	Corning Inc, Amsterdam, Niederlande
Zentrifugenröhrchen Falcon™ 15 ml und 50 ml	Corning Inc, Amsterdam, Niederlande

2.2 Geräte und Software

Bezeichnung und Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	Systec, Wetzlar, Deutschland
Brutschrank, inCu saFe MCO-20AIC	Sanyo, Tokyo, Japan
CO2 Inkubator, C Modell	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Durchflusszytometer, FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einkanalpipetten, Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Elektrophorese Kammern, Mini- PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Elektrophorese Power Pack, PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gefrierschränke (-80°C), MESM Global (-20°C), Economic Super	Arctiko, Esbjerg, Dänemark Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland
Heizblock Thermomix comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Infrarotscanner, Odyssey	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Kühlschrank	Liebherr Premium, Kirchdorf, Deutschland
Lichtmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipetten, Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	VelpScientifica, Usmate, Italien
Photometer Tecan SparkR 20M	Tecan Life Sciences, Männedorf, Schweiz
Pipettierhilfe Pipetboy / Pipetgirl acu	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland

Proteintransfer System, Mini-PROTEAN Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Wasserfilteranlage Millipore	Millipore, Eschborn, Deutschland
Rollmischer, RM5-30V, RS-TR10	Ingenieurbüro Cat, Ballrechten-Dottingen, Deutschland Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexmischer	Velp scientifica, Usmate, Italien
Zentrifugen, mikro200, Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vakuumpumpe	HLC Biotech, Pforzheim, Deutschland

Software	Hersteller
BD FACSDiva™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Graphpad Prism 5.1 und 8.2.1	GraphPad Software, La Jolla, USA
Image Studio 2.1.10	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Tecan SparkControl V2.1 Method Editor	Tecan Life Sciences, Männedorf, Schweiz

2.3 Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland

Benzympenicillin	Grünenthal, Aachen, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DC Protein Assay Kit	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Titriplex ^R III	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd 30% ohne Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laemmli Puffer, 2x	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MTT - 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5- Diphenyl-Tetrazolium-Bromid	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat wasserfrei	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Natriumfluorid	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumpyrophosphat (NaPPi)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Honeywell Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Protease Inhibitor Tabletten (cOmplete™ Mini)	Roche, Penzberg, Deutschland
Rotiphorese ^R Gel 30 (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIS Base	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TRIS Hydrochlorid (TRIS/HCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer, 10x	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Triton X-100	Fluka, Buchs, Schweiz
Trypsin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween ^R 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.4 Cytostatika und Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller
Cisplatin (CDDP)	Teva, Ulm, Deutschland
Cytarabin (Ara-C)	Tocris, Minneapolis, USA
Doxorubicin	Cell pharm, Bad Vilbel, Deutschland
Gemcitabin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Niraparib	Hycultec, Beutelsbach, Deutschland
Nutlin-3	AbMole Bioscience Inc., Houston, USA
Olaparib	Hycultec, Beutelsbach, Deutschland
Rucaparib	Hycultec, Beutelsbach, Deutschland
Talazoparib	Hycultec, Beutelsbach, Deutschland
Topotecan	GSK, München, Deutschland
Verapamil	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Vincristin	Teva, Ulm, Deutschland
Zosuquidar	Selleck Chemicals, Houston, Texas, USA

2.5 Antikörper

Immunhistochemischer Proteinnachweis

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
dCK	Maus, monoklonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
MDR1	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
GAPDH	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Trevigen, Gaithersburg, USA
pSAMHD1	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
P53	Maus, monoklonal	1:5000	Enzo Life Science, Ann Arbor, USA
SAMHD1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Proteintech, Rose Mont, USA

PARP	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
β -Aktin	Maus, monoklonal	1:5000	BioVision, Milpitas, USA
Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor™ 488 (H+L) IgG	Ziege; anti-Maus	1:20000	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Alexa Fluor™ 568 (H+L) IgG	Ziege; anti- Kaninchen	1:20000	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Charakterisierung	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper MDR1 monoklonal (Klon MRK16)	Maus IgG _{2a} , anti- Mensch	10 μ l/10 ⁶ Zellen	Enzo Life Sciences, Ann Arbor, USA
Sekundärantikörper anti-mouse IgG Phycoerythin konjugiert	Ratte, anti-Maus	10 μ l/10 ⁶ Zellen	R&D Systems, Minneapolis, USA
Isotypenkontrolle mouse IgG _{2A} Phycoerythin- konjugiert	Maus, anti-Mensch	10 μ l/10 ⁶ Zellen	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.6 Puffer, Lösungen

2.6.1 Zellkultur

Material	Chemikalien	Menge
Kulturmedium (supplementiertes IMDM)	Pen/Strep-Lösung 1%	10 ml
	L-Glutamin 4 mM/l	20 ml
	FCS 10%	100 ml
	Unsupplementiertes IMDM (enthält 15 mg/l Phenolrot und 3,024 g/l NaHCO ₃ ⁻) Unter Sterilwerkbank mischen und Lagerung bei +4°C maximal eine Woche.	ad 1000 ml
L-Glutamin Lösung	L-Glutamin	29,2 g
	Milli-Q-Wasser	ad 1000 ml
	Lösen, Sterilfiltrieren und Lagerung bei -20°C.	
PBS-Lösung, 1x	PBS	9,55 g
	Milli-Q-Wasser	ad 1000 ml
	Lösen, Autoklavieren und Lagerung bei Raumtemperatur.	
PBS-Lösung, 10x	PBS	95,5 g
	Milli-Q-Wasser	ad 1000 ml
	Lösen, Autoklavieren und Lagerung bei Raumtemperatur.	

Penicillin–Streptomycin (Pen/Strep) Lösung	Benzylpenicillin	10*7 IU
	Streptomycinsulfat	10 g
	Milli-Q-Wasser	ad 1000 ml
	Lösen, Sterifiltrieren und Lagerung bei -20°C.	
Trypsin Lösung	Trypsin	2 g
	Titriplex III	0,6 g
	1x PBS ad	ad 1000 ml
	Lösen, sterifiltrieren und Lagerung bei -20°C.	

2.6.2 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Material	Chemikalien	Menge
Acrylamid Sammelgel 5% (6 Gele)	Milli-Q-Wasser	7,44 ml
	Rotiphorese ^f Gel 30	1,65 ml
	TRIS/HCl pH 6,8	1,32 ml
	SDS 10%	105 µl
	APS 10%	72 µl
	TEMED	13,5 µl
	Flüssigkeiten mit Magnetrührer mischen, in Gelvorrichtung über Trenngel füllen, Trennkämme eindrücken und 30 Minuten polymerisieren lassen.	

<p>Acrylamid Trenngel 12% (8%) (6 Gele)</p>	<p>Milli-Q-Wasser Rotiphorese^R Gel 30 TRIS/HCl pH 8,8 SDS 10% APS 10% TEMED Flüssigkeiten mit Magnetrührer vermischen, in Gelvorrichtung füllen, mit Isopropanol überschichten und 30 Minuten polymerisieren lassen.</p>	<p>8,1 ml 9,6 ml 2,96 ml 240 µl 180 µl 30 µl</p>
<p>APS 10%</p>	<p>APS Aqua dest. Lagerung bei -20°C, vor Gebrauch Auftauen.</p>	<p>0,05 g ad 500 µl</p>
<p>Blockingpuffer</p>	<p>TRIS/HCl pH 7,5 (1M) Natriumchlorid (200 mM) Tween^R 20 (0,05%) BSA (3%) Aqua dest. Lagerung bei -20°C.</p>	<p>50 ml 11,68 g 0,5 ml 30 g ad 1000 ml</p>
<p>Laufpuffer, 10x</p>	<p>TRIS Base (250 mM) SDS 1% Glycin (1,9 M) Aqua dest. Lagerung bei +4°C</p>	<p>30 g 10 g 143 g ad 1000 ml</p>

Laufpuffer, 1x	Laufpuffer, 10x Aqua dest. Lagerung bei +4°C.	100 ml ad 1000 ml
Probenpuffer	Laemmli-Puffer, 2x β-Mercaptoethanol Vor Gebrauch unter Abzug mischen.	95 Teile 5 Teile
SDS 10%	SDS Milli-Q-Wasser Lagerung bei Raumtemperatur.	10 g ad 100 ml
Transferpuffer, 10x	TRIS (250mM) Glycin (1,9mM) Aqua dest Lagerung bei +4°C	30 g 143 g ad 1000ml
Transferpuffer, 1x	Transferpuffer, 10x Methanol Aqua dest Mit HCl auf pH 8,3 Einstellen, Lagerung bei +4°C.	100 ml 200 ml ad 1000 ml
Triton X-100 Lysepuffer	TRIS/HCl, pH 7,5 Natriumchlorid Natriumfluorid Natriumpyrophosphat	20 mM 150 mM 20 mM 10 mM

	<p>Triton X-100</p> <p>Aqua dest.</p> <p>Lagerung bei +4°C.</p>	<p>1% vol.</p> <p>ad 1000 ml</p>
<p>Triton-X-100 Lysepuffer für Proteingewinnung</p>	<p>Triton X-100 Lysepuffer</p> <p>cOmplete Mini Roche</p> <p>Proteasehemmer</p> <p>Lagerung bei +4°C für maximal eine Woche.</p>	<p>10 ml</p> <p>1 Tbl.</p>
<p>Waschpuffer</p>	<p>PBS, 10x</p> <p>Tween^R 20 0,3%</p> <p>Aqua dest.</p> <p>Lagerung bei +4°C.</p>	<p>100 ml</p> <p>0,3 ml</p> <p>ad 1000 ml</p>

2.6.3 MTT-Viabilitätsassays

Material	Chemikalien	Menge
20% SDS Lösung	<p>SDS</p> <p>Dimethylformamid</p> <p>Aqua dest.</p> <p>Mit HCl auf auf pH=4,7 Einstellen, Lagern bei Raumtemperatur.</p>	<p>200 g</p> <p>500 ml</p> <p>500 ml</p>
MTT Lösung	<p>MTT</p> <p>PBS 1x</p> <p>Lösen, Sterifiltrieren und Lagern bei +4°C.</p>	<p>2 g</p> <p>ad 1000 ml</p>

2.6.4 Durchflusszytometrie

Material	Chemikalien	Menge
90% PBS/10% FCS – Lösung	PBS 1x FCS Lagern bei +4°C.	9 Teile 1 Teil
4% Paraformaldehydlösung in PBS	Paraformaldehyd-Pulver PBS 1x Unter konstantem Rühren Erhitzen auf 60°C, bis das Paraformaldehyd gelöst ist. Zutropfen von 1 M NaOH, bis die Lösung aufklart. Lagern bei Raumtemperatur.	40 g 1000 ml

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Verwendete Zelllinien

Die humane Neuroblastomzelllinie IMR5 wurde 1985 von Bukovsky et al. aus der humanen Neuroblastomzelllinie IMR32 mithilfe eines PI 153/3 Antikörper selektioniert. PI 153/3 wird als Glycoprotein unter anderem auf Glioblastomen und Retinoblastomen exprimiert.⁷⁴ Die Zelllinie IMR32 wurde 1967 am Institute of Medical Research, Camden, New Jersey von Tumilowicz et al. aus einem 13 Monate alten Jungen isoliert und kultiviert.⁷⁵ Sowohl IMR32 als auch IMR5 sind MYCN-amplifizierte Zelllinien und sind daher geeignet um das Verhalten von Hochrisiko Neuroblastomen *in vitro* zu simulieren.^{76,77} Verschiedene resistente Sublinien der kommerziellen Neuroblastom-Zelllinie IMR5 wurden in der AG Cinatl am Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikum Frankfurt durch steigende Zugabe des entsprechenden Cytostatikums adaptiert und gegen entsprechende Cytostatika resistent gemacht. Dabei wurden die Zellen zu Beginn mit doppelt so hohen Konzentrationen an Cytostatikum behandelt als der zu erwartende IC₅₀-Wert. Die jeweils überlebenden Zellen wurden mit

schrittweise höheren Konzentrationen an Cytostatikum behandelt. Die Zellen wurden so lange adaptiert, bis Konzentrationen des Cytostatikum erreicht wurden, die auch in der klinischen Anwendung an Plasmakonzentration erreicht werden. Je nach Zelle und Cytostatikum dauert die Adaptierung ein bis zwei Jahre.^{78,79}

Die adaptierten resistenten Sublinien wurden entsprechend Tabelle 4 an folgende Konzentrationen des jeweiligen Cytostatikums adaptiert. Die Zelllinien (außer IMR5^rOLAPARIB²⁰) waren zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden und sind Teil der *Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection* (<https://research.kent.ac.uk/industrial-biotechnology-centre/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection>). Die IMR5-Zelllinie wurde in der AG Cinatl bereits beschrieben und die Resistenz überprüft.^{80,81} Bei allen Versuchen wird IMR5 PAR als chemosensitive Ausgangszelle als Vergleich und Referenz für die adaptierten Sublinien mit verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien und Adaption an jeweiliges Cytostatikum.

Zelllinie	Adaptiert an	Splittingrate
IMR5 PAR	-	1/20
IMR5 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	1000 ng/ml Cisplatin	1/20
IMR5 ^r GEMCI ²⁰	20 ng/ml Gemcitabin	1/20
IMR5 ^r VCR ¹⁰	10 ng/ml Vincristin	1/10
IMR5 ^r DOXO ²⁰	20 ng/ml Doxorubicin	1/20
IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰	20 µM/ml Olaparib	1/20

2.7.2 Zellkultivierung und Passagieren

Alle in der Arbeit verwendeten Zellen zeigen adhärentes Wachstum. Sie haften an der Oberfläche der Kulturflasche an und bilden einen konfluenten Zellrasen. Die Zellen wurden in einer 25 cm² Kulturflasche in supplementiertem IMDM bei 37°C mit folgenden Zusätzen kultiviert (siehe Abschnitt 2.6.1). Bei allen Versuchen wurde auf steriles Arbeiten geachtet. Es wurden autoklavierte Glaswaren und Lösungen verwendet, Verbrauchsmaterialien wurden erst unter der Sterilwerkbank geöffnet.

Die Zellen wurden regelmäßig alle sieben Tagen oder bei Erreichen der Konfluenz umgesetzt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgossen und der adhärenzte Zellrasen vorsichtig zweimal mit 1xPBS gewaschen, um FCS Rückstände und Zelldebridement zu entfernen. Um die Zellen zu vereinzeln und von der Oberfläche der Kulturflasche abzulösen wurden 0,4 ml Trypsinlösung hinzugegeben. Um den proteolytischen Abbau durch Trypsin abzustoppen wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufsuspendiert und anschließend entsprechend der Splittingrate und Menge des adaptierten Cytostatikums (Tabelle 4) in ein neues Kulturgefäß überführt.

2.7.3 Etablierung der Olaparib-resistenten Zelle IMR5^rOLAPARIB²⁰

Im Verlauf der Arbeit wurde die Olaparib resistente Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ nach zuvor beschriebenen Methoden etabliert (siehe 2.7.1). Die parentale Zelllinie IMR5 PAR wurde beim Umsetzen mit schrittweise höheren Konzentrationen an Olaparib versetzt, bis eine stabile Konzentration von 20 µM Olaparib erreicht war. Die Sublinie wurde anschließend für 6 Monate bei einer festen Konzentration von 20 µM Olaparib in Kultur gehalten.

2.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Um eine konstante Zellzahl bei der Durchführung der Versuche zu gewährleisten, wurden die Zellen mittels *Neubauer improved Zählkammer* bestimmt. Es wurden 10 µl der Zellsuspension auf die Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop mit 10x Vergrößerung gezählt. Es wurden zwei gegenüberliegende Großquadrate ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

2.8 Immunhistochemischer Proteinnachweis

2.8.1 Proteinextraktion und Einstellung der Gesamtkonzentration

Proteine wurden jeweils aus 25 cm² Flaschen mit konfluentem Zellrasen gewonnen. Nach Abgießen des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS-Lösung wurden die Zellen mit 200 µl Triton X-100-Lysepuffer lysiert und anschließend für eine Stunde bei 4°C

inkubiert. Die Suspension wurde in ein *Safe-Lock-Tube* überführt und anschließend eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues *Safe-Lock Tube* überführt und zur Proteinbestimmung verwendet.

Die Einstellung der Proteine erfolgte mit dem *DCTM Protein Assay Kit* der Firma BioRad. Pro Proteinisolat wurde ein Dreifachansatz von je 5 µl Probenmenge in einer 96-Well Platte aufgetragen. Zur Erstellung der Standardkurve dienten BSA-Lösungen mit bereits bekannten Proteinkonzentrationen von 0,5; 1; 1,5; 2 und 2,5 mg/ml, ebenfalls 5 µl im Triplikat. Anschließend wurden pro Well 25 µl der Lösung A-Mix hinzugegeben. A-Mix besteht aus 1 ml Reagenz A (Kupfertartrat-Lösung) und 20 µl Reagenz S (Surfactant-Lösung). Danach wurden 200 µl Reagenz B (Folin-Ciocalteu Reagenz) pro Well hinzugegeben und die Platte für 15 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung (Tecan Spark^R) der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Nach Erstellung der Standardkurve wurden die photometrischen Werte der Proben in Proteinkonzentrationen (mg/ml) umgerechnet. Anschließend wurden die Proben mit Triton-X-Lysepuffer auf 1 mg/ml Protein verdünnt und mit Laemmli Probenpuffer 1:1 versetzt. Die Proben wurden anschließend für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und bei -20°C gelagert.

2.8.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden die Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.⁸² Durch das Erhitzen der Proteine mit SDS- und β-mercaptoethanolhaltigem Probenpuffer wurden die Proteine denaturiert, die Tertiärstruktur aufgelöst und die Proteine linearisiert. Das β-Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken, während das anionische Detergens SDS sich den Proteinen anlagert und deren Eigenladung überdeckt. So entstehen negativ geladene SDS-Protein Komplexe, die sich entsprechend ihrer Molekülmasse auftrennen lassen. Die negativ geladenen Proteine werden auf ein Acrylamidgel geladen und durch das Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode gezogen. Kleinere Proteine wandern dabei schneller durch die Poren des Acrylamidgels als große Proteine. Die Porengröße der dabei verwendeten Gele hängt von Konzentration an Acrylamid ab. Für Proteine mit hohem Molekulargewicht wurde ein Gel mit 8% Acrylamid für größere Poren verwendet,

während für Proteine mit niedrigem Molekulargewicht ein Gel mit 12% Acrylamid für kleinere Poren verwendet wurde. Zuerst wurden 10 µl einer Probe in die Tasche eines Sammelgels (5% Acrylamid) aufgetragen, um die Proteine zu konzentrieren. Anschließend wurden die Proteine durch das Trenngel aufgetrennt. Zur Identifikation wurden neben den Proben 5 µl eines Standard Protein Markers (New England BioLabs) mit bekannten Molekulargewichten (in kilo Dalton) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei konstant 100 V in einer Kammer mit Laufpuffer. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele und Puffer kann Kapitel 2.6.2 entnommen werden.

2.8.3 Protein Transfer (Western Blot)

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran *geblottet*. Dazu wurde wie in Abbildung 5 gezeigt das SDS-Gel mit der Nitrocellulose Membran zwischen zwei Whatman-Filterpapiere und Schwämme in eine Blotkassette eingelegt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luft einschließt zwischen SDS-Gel und Membran befinden.

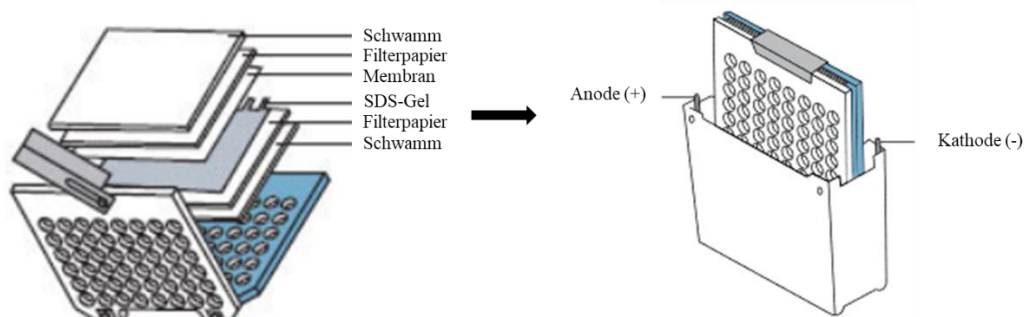


Abbildung 5: Darstellung des Proteintransfers von einem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Abbildung modifiziert nach Novusbio Anleitung⁸³). Gel und Membran werden von Whatman-Filterpapier und Schwämmen geschützt in eine Kunststoffkassette eingelegt. Durch Anlegen einer Spannung bei konstanter Stromstärke werden die negativ geladenen Proteine auf die Membran transferiert.

Die Blotkassette wurde zusammen mit Blottingpuffer und Kühlelementen so in die Blotkammer eingehängt, dass die Membran auf der Seite der Anode liegt. Durch das Anlegen einer konstanten Stromstärke von 0,25 A pro Blotkassette für eine Stunde

bewegen sich die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode und werden so auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

2.8.4 Nachweis von Proteinen

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler mit 5 ml Blockingpuffer inkubiert und dadurch unspezifische Bindungsstellen geblockt. Danach folgten drei Waschschriffe für je zehn Minuten mit 2%-haltigem Tween Waschpuffer. Die Primärantikörper wurden entsprechend Abschnitt 2.5 mit Blockingpuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Bindung des Primärantikörpers erfolgten drei Waschschriffe für je zehn Minuten. Die Nitrocellulosemembranen wurden anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (siehe Abschnitt 2.5) inkubiert. Nach erneut drei Waschschriffen für je zehn Minuten wurde das Fluoreszenzsignal mit dem *Odyssey CLx Imaging System* (LiCor Biosciences, Lincoln, Nebraska USA) detektiert.

2.9 MTT-Zellviabilitätsassays

Der Anteil lebender Zellen in einer Zellkultur kann mit Hilfe des MTT-Viabilitätsassays bestimmt werden. Der Test beruht auf der kolorimetrischen Reduktion des gelblichen, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT) zu violetter, wasserunlöslichem (E,Z)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan (Formazan) mittels mitochondrialer Dehydrogenasen unter dem Verbrauch von NADH. Anhand der vorhandenen Formazan Kristalle kann proportional auf den Anteil an lebenden Zellen in einer Kultur geschlossen und somit die Wirksamkeit eines Cytostatikums auf die Vitalität der Zellen ermittelt werden.^{84,85}

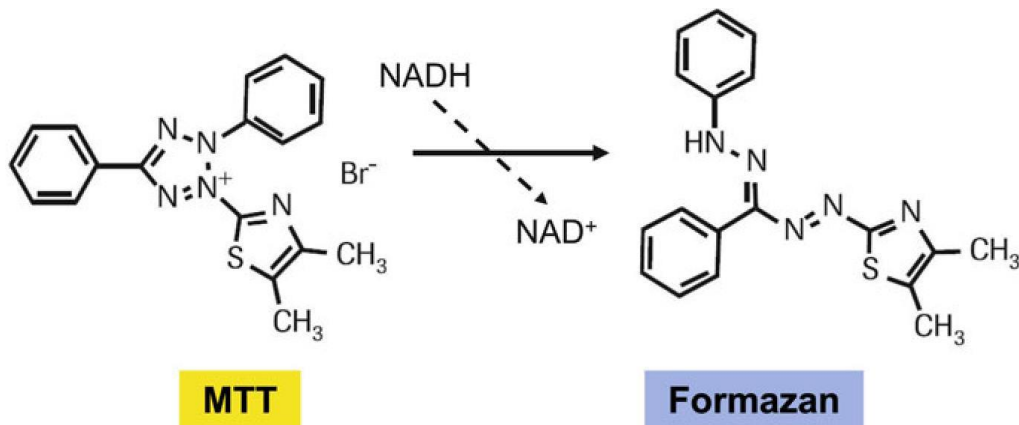


Abbildung 6: Reduktion von MTT zu Formazan (Abbildung aus Gstraunthaler⁸⁶). Reduktion des wasserlöslichen, gelblichen MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid) zu wasserunlöslichen violetterem Formazan ((E,Z)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-Diphenylformazan).

In jedes Well der Spalten eins bis zehn einer 96-Lochplatte wurden 50 µl einer Zellsuspension mit circa 1×10^4 Zellen ausgebracht. Die Spalten eins und zwei dienten der Zellkontrolle ohne Cytostatika. Die Cytostatika wurden in acht Verdünnungsschritten in den Spalten drei bis zehn getestet, jeweils 1:4 oder 1:2 pro Schritt verdünnt (pro Well 50 µl). In den Spalten elf und zwölf befindet sich zur Kontrolle 100 µl reines Medium (detaillierter Aufbau siehe Abbildung 7).

Bei Versuchen mit Inhibitoren und *Virus-like particles* (VLPs) wurden jeweils 25 µl in die untere Hälfte der Platte (Reihen E bis H) in den Spalten eins bis zehn pipettiert. Inhibitoren und VLPs wurden also auch in die Zellkontrolle eingebracht um festzustellen, ob alleine Toxizität besteht. Die Platten wurden für 120 Stunden bei 37° und 5% CO₂ inkubiert, anschließend wurde pro Well 25 µl MTT-Lösung hinzugegeben. Nach weiteren 5 Stunden Inkubation wurde jedes Well mit 100 µl einer 20% SDS-Lösung versetzt, um die sich gebildeten violetten Formazan Kristalle aufzulösen. Die 96-Lochplatten wurden über Nacht bei 37° und 5% CO₂ inkubiert und anschließend die optische Dichte mit einem Plattenphotometer (Tecan Spark) bei einer Wellenlänge von 560 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt. Alle Ansätze wurden zunächst in sich gemittelt. Die Mediumkontrolle wurde von allen Werten subtrahiert, der Wert der Zellkontrolle auf 100% Viabilität gesetzt und die Werte der Verdünnungsreihe prozentual im Vergleich zur Zellkontrolle berechnet. Anschließend wurde der Wert der mittleren

inhibitorischen Konzentration (IC_{50} -Wert) berechnet. Dieser Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors oder Zytostatikums an, bei der das Zellwachstum zu 50% inhibiert ist. Überlebenskurven, IC_{50} -Werte und Signifikanztests wurden mit GraphPad Prism (Version 5.01 und Version 8.2.1 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) erstellt. Als Signifikanztest wurden zweiseitige-ungepaarte t-Tests der IC_{50} -Werte von mindestens 3 biologischen Triplikaten durchgeführt (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

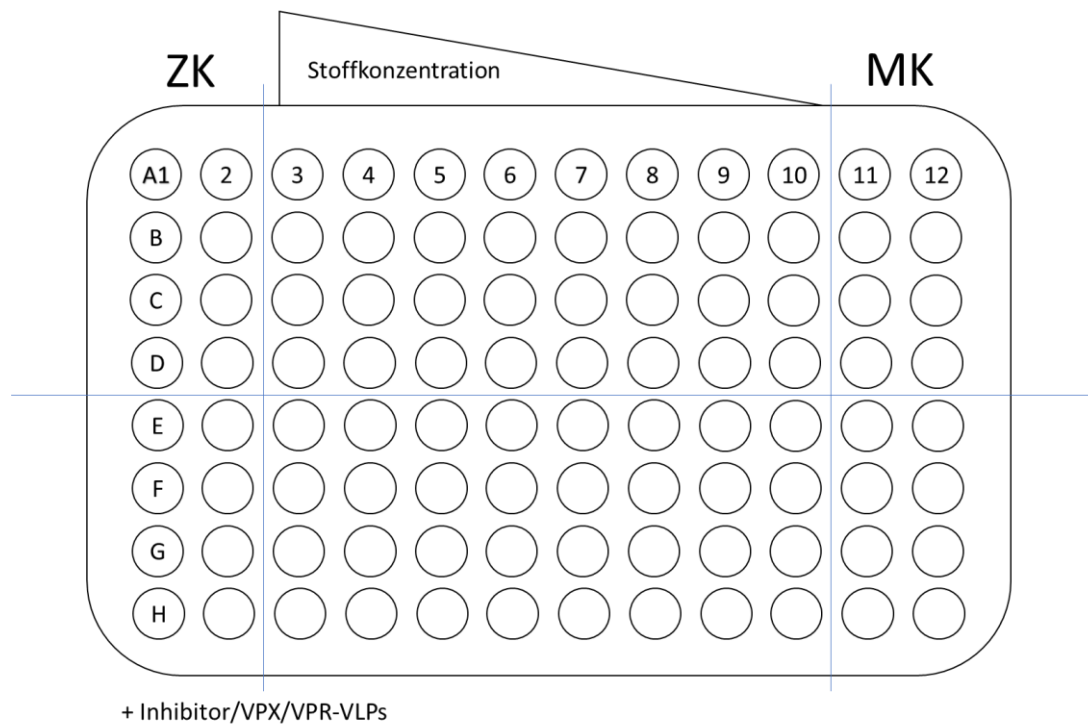


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer 96-Well Platte für den MTT-Test (eigene Abbildung). Die beiden ersten Spalten dienen als Zellkontrolle (ZK), die letzten beiden als Mediumkontrolle (MK). Die Cytostatika wurden in acht Verdünnungsschritten in den Spalten drei bis zehn in absteigender Konzentration aufgetragen. Inhibitoren und VLPs wurden in die untere Hälfte (E-H) zur Verdünnungsreihe der Cytostatika hinzugegeben.

2.10 VLP Arbeiten

Alle Arbeiten mit VLPs (*Virus-like particles*) wurden am Institut für Medizinische Virologie durchgeführt. Die VLPs mit Vpx und Vpr wurden mit 293T Zellen hergestellt. Dazu wurde das Expressionsplasmid pcDNA-4 VpxSIVmac251 transfiziert. Um die Wirksamkeit der VPX-VLPs zu überprüfen, wurden die THP-1 Zellen mit einer intrazellulären SAMHD1-Färbung überprüft. VPR-VLPs dienten als Negativkontrolle. Der Einfluss der VLPs (2,5 µl/ml) auf die Wirksamkeit von Cytarabin, Gemcitabin, Topotecan und PARP-Inhibitoren wurde auch im MTT-Test überprüft. Dazu wurden die Zellen in 96-Lochplatten für 24h mit VLPs vorinkubiert und anschließend mit den entsprechenden Cytostatika versetzt. Die Auswertung erfolgte mit dem MTT-Reagenz wie unter 2.9 beschrieben.

2.11 MDR1-Nachweis mit Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie oder *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) werden Zellcharakteristika wie Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität (*relative fluorescence units*, RFU) gemessen. Die Zellen werden nacheinander durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt und je nach Beschaffenheit der Zelle wird das optische Signal unterschiedlich gestreut. Ein Detektor wertet das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal aus. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) ist ein Maß für das Zellvolumen, während das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) Aussage über die Größe und Granularität der Zelle gibt.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben in der Kulturflasche mit PBS gewaschen, trypsinisiert und anschließend in eine 90% PBS/10% FCS – Lösung aufgenommen und pro Zelle jeweils 2 ml der Zellsuspension in sechs Rundbodenröhrchen aufgeteilt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1700 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 2 ml 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden per Vortex gemischt, anschließend durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Der Primärantikörper gegen MDR1 (siehe Abschnitt 2.5) wurde auf drei entsprechende Zellpellets gegeben, gemischt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang wurde der primäre Antikörper mit einem Phycoerythin (PE) gekoppelten sekundären Antikörper gegen Maus IgGs angefärbt. Nach

Zugabe des sekundären Antikörpers wurde der Ansatz gemischt und für 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. In den drei anderen Röhrchen wurden die Zellen mit einem Phycoerythin (PE) gekoppelten Isotypen behandelt. Der Isotyp entspricht der gleichen Immunglobulinklasse wie der primäre Antikörper (Maus IgG_{2a}) und stellt die unspezifische Bindung des primären Antikörpers nach. Der Isootyp inkubierte ebenfalls für 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank. Anschließend wurden die Proben gewaschen und mit 4% Paraformaldehydlösung in PBS für 20 Minuten bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend gewaschen, in PBS resuspendiert und mit dem BDScience FACS Canto II analysiert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FACSDiva Version 6.1.3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Um die *Relative Fluorescent Unit* (RFU) für die spezifische MDR1-Färbung zu berechnen wurden die Werte der Isotypenkontrolle von den Werten der MDR1-gefärbten Proben subtrahiert und für jede Zelle der Mittelwert und die Standardabweichung mit GraphPad Prism gebildet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung IMR5 und resistenter Sublinien

3.1.1 Adaptierte Cytostatika und Kreuzresistenzen

Um die humane Neuroblastomzelllinie IMR5 PAR und ihre adaptierten resistenten Sublinien zu charakterisieren und die erworbene Chemoresistenz zu überprüfen, wurden MTT-Tests mit den entsprechenden Cytostatika durchgeführt. Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit der Werte werden im folgenden Ergebnisteil Abbildungen und Tabellen gezeigt.

Tabelle 5: Überprüfung der Chemoresistenz in IMR5 im MTT-Assay (siehe Abbildung 8). IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Cisplatin, Gemcitabin, Vincristin und Doxorubicin. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

IC ₅₀	IMR5 PAR	rCDDP ¹⁰⁰⁰	rGEMCI ²⁰	rVCR ¹⁰	rDOXO ²⁰
Cisplatin [µg/ml]	0,451 ± 0,144	2,039 ± 0,967	0,463 ± 0,091	0,304 ± 0,059	0,241 ± 0,031
Gemcita- bin [ng/ml]	1,101 ± 0,670	1,257 ± 0,923	21,897 ± 9,980	2,194 ± 0,768	1,252 ± 0,680
Vincristin [ng/ml]	0,315 ± 0,082	0,868 ± 0,137	0,334 ± 0,069	31,023 ± 2,646	19,273 ± 3,091
Doxorubi- cin [ng/ml]	1,524 ± 0,450	2,134 ± 1,034	1,208 ± 0,300	11,140 ± 2,710	26,550 ± 2,224

Tabelle 5 zeigt, dass der IC_{50} -Wert von $IMR5^{rCDDP^{1000}}$ mit 2 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zu $IMR5$ PAR mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ etwa 5-fach erhöht ist. Die anderen adaptierten Sublinien zeigen gegen Cisplatin ähnliche IC_{50} -Werte wie $IMR5$ PAR.

Die an Gemcitabin adaptierte $IMR5^{rGEMCI^{20}}$ zeigt eine 20-fach höhere Verträglichkeit im MTT-Assay gegenüber Gemcitabin mit IC_{50} -Werten bei 20 ng/ml als $IMR5$ PAR mit IC_{50} -Werten bei 1 ng/ml (Tabelle 5). Die anderen adaptierten Sublinien zeigen gegen Gemcitabin ähnliche IC_{50} -Werte wie $IMR5$ PAR.

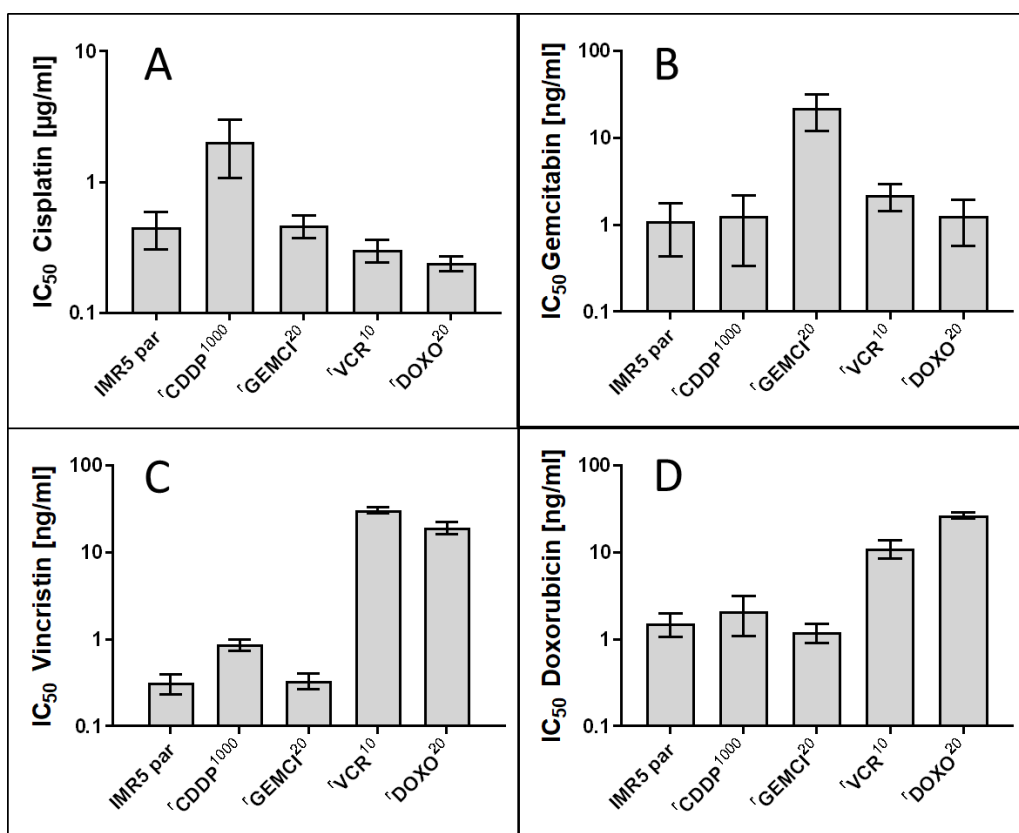


Abbildung 8: Überprüfung der Chemoresistenz in $IMR5$ im MTT-Assay (Daten siehe Tabelle 5). IC_{50} -Werte der $IMR5$ -Sublinien nach 120 h Behandlung mit (A) Cisplatin, (B) Gemcitabin), (C) Vincristin und (D) Doxorubicin. Die dargestellten Balken zeigen den IC_{50} -Mittelwert und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Im MTT-Assay mit Vincristin zeigen zwei Sublinien erhöhte Werte: $IMR5^{rVCR^{10}}$ zeigt mit 31 ng/ml eine 10-fach höhere Verträglichkeit, $IMR5^{rDOXO^{20}}$ mit 19 ng/ml eine 6-fach höhere Verträglichkeit im Vergleich zu $IMR5$ PAR mit 0,3 ng/ml (Tabelle 5). Die

anderen adaptierten Sublinien zeigen gegen Vincristin ähnliche IC₅₀-Werte wie IMR5 PAR.

Der gleiche Effekt lässt sich im MTT-Test mit Doxorubicin beobachten: Sowohl IMR5^rDOXO²⁰ mit 27 ng/ml als auch IMR5^rVCR¹⁰ mit 11 ng/ml zeigen erhöhte IC₅₀-Werte. Die an Doxorubicin adaptierte Zelle zeigt eine 20-fach höhere Verträglichkeit als IMR5 PAR mit 1,5 ng/ml, die an Vincristin adaptierte Zelle zeigt eine 8-fach höhere Verträglichkeit auch gegenüber Doxorubicin im Vergleich zu IMR5 PAR. Die anderen adaptierten Sublinien zeigen gegen Doxorubicin ähnliche IC₅₀-Werte wie IMR5 PAR.

3.1.2 Proteinexpression der IMR5-Sublinien

Neben den MTT-Tests gegen die adaptierten Cytostatika wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Proteinexpression im Western Blot charakterisiert (siehe Abbildung 9). Die resistenten Sublinien zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der dCK, p53, PARP, SAMHD1 und pSAMHD1 Expression im Vergleich mit IMR5 PAR. Unterschiede sind in der MDR1-Expression zu erkennen. Es zeigt sich die stärkste Expression von MDR1 für IMR5^rDOXO²⁰. IMR5^rVCR¹⁰ zeigt im Vergleich zu IMR5 PAR ebenfalls eine deutliche Expression. Für die Zelle IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ lässt sich eine Bande im Western Blot erahnen. Bei IMR5^rGEMCI²⁰ ist wie bei IMR5 PAR keine MDR1 Bande zu erkennen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (siehe Abbildung 9).

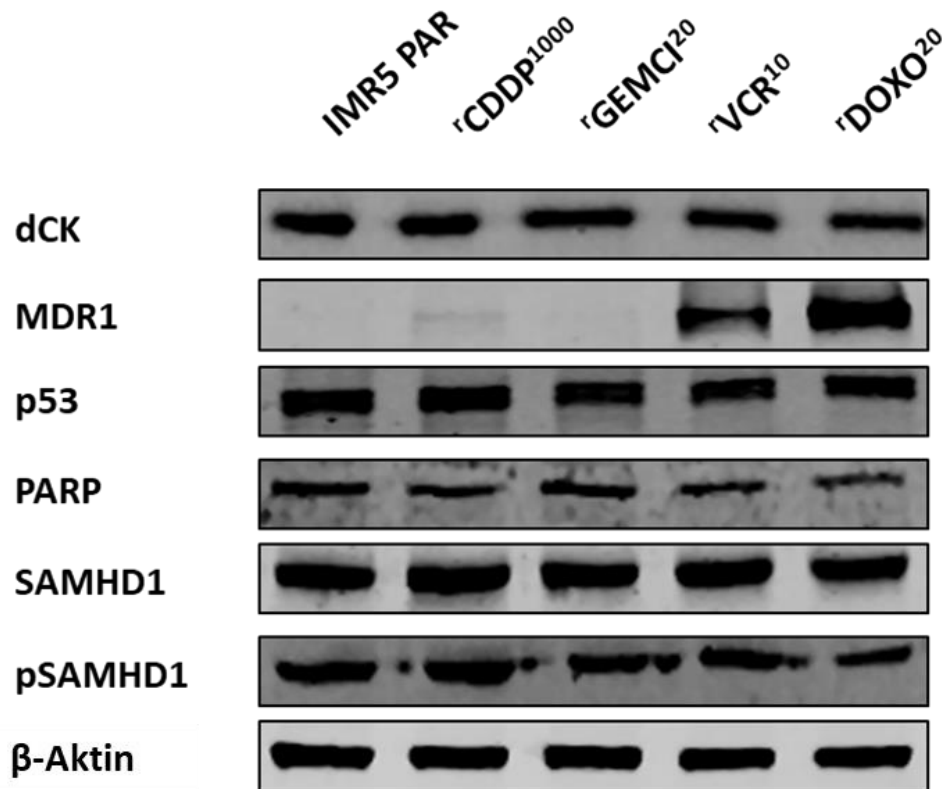


Abbildung 9: Proteinexpression in IMR5 PAR und resistenten Sublinien. Western Blot zur Grundcharakterisierung auf dCK, MDR1, p53, PARP, SAMHD1 und phospho-SAMHD1. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die gezeigte Darstellung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. DCK ist repräsentativ gezeigt für zwei unabhängige Experimente.

3.1.3 Untersuchung von p53 in MTT-Tests mit Nutlin-3 und Ergebnisse der TP53-Gensequenzierung

Da eine TP53-Mutation durch Adaptierung an Cytostatika ein möglicher Chemoresistenzmechanismus in Neuroblastomen ist, wurden MTT-Tests mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3 durchgeführt. Neuroblastomzellen mit mutiertem, funktionslosem p53-Protein sind resistent gegenüber Nutlin-3 und weisen höhere IC_{50} -Werte im MTT auf. Besitzen die Zellen dagegen funktionelles Wildtyp-p53-Protein, sind die Zellen sensitiv gegenüber Nutlin-3. Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob in den adaptierten IMR5-Sublinien nach der Adaptierung an die 4 verwendeten

Cytostatika eine *TP53*-Mutation vorliegt. In diesem Falle müssten die resistenten Sublinien deutlich höhere IC_{50} -Werte aufweisen als IMR5 PAR.

Im MTT Versuch mit Nutlin-3 weisen alle IMR5 Sublinien IC_{50} -Werte unter 3 $\mu\text{M/ml}$ auf. Im Vergleich zur parenteralen Zelle gibt es geringe signifikante Unterschiede. IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰, IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ zeigen einen 2-fach höheren IC_{50} -Wert um 2 $\mu\text{M/ml}$ im Vergleich zu IMR5 PAR und IMR5^rGEMCI²⁰ mit einem IC_{50} -Wert um 1 $\mu\text{M/ml}$.

Tabelle 6: IC_{50} Werte der IMR5-Sublinien im MTT-Test mit Nutlin-3. Die Tabelle zeigt die IC_{50} -Werte nach 120 h Behandlung. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Als Signifikanztests wurden zweiseitige Students T-Tests angewandt (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Zelllinie	IC_{50} Nutlin-3 [$\mu\text{M/ml}$]
IMR5 PAR	0,958 \pm 0,066
IMR5 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	2,017 \pm 0,163 ***
IMR5 ^r GEMCI ²⁰	1,087 \pm 0,179
IMR5 ^r VCR ¹⁰	2,127 \pm 0,264 **
IMR5 ^r DOXO ²⁰	2,301 \pm 0,385 **

Zusätzlich zu den MTT-Versuchen mit Nutlin-3 wurde eine Sequenzierung des *TP53*-Gens zum Ausschluss von Mutationen veranlasst. Die Multiplex-PCR wurde als Auftragsarbeit am Institut für Molekulare Onkologie in der Arbeitsgruppe Stiewe der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

Tabelle 7: Ergebnis der TP53-Gensequenzierung in den IMR5-Sublinien durch Multiplex-PCR. Durchführung der Auftragsarbeit am Institut für Molekulare Onkologie (AG Stiewe), Philipps Universität Marburg.

Zelllinie	Ergebnis TP53-Multiplex-PCR
IMR5 PAR	P72 R
IMR5 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	P72 R
IMR5 ^r GEMCI ²⁰	P72 R
IMR5 ^r VCR ¹⁰	P72 R
IMR5 ^r DOXO ²⁰	P72 R
IMR5 ^r OLAPARIB ²⁰	P72 R

Für IMR5 PAR und alle chemoresistenten Sublinien zeigt sich keine Mutation für das TP53-Gen in der Multiplex-PCR. Alle IMR5-Sublinien gelten damit als Wildtyp-p53. IMR5 PAR und alle chemoresistenten Sublinien weisen jedoch den gleichen Polymorphismus für die Aminosäure Arginin statt Prolin am Codon 72 des TP53-Gens auf (p53-P72 R).

3.2 Einfluss von MDR1 an der Entstehung von Chemoresistenz in IMR5

3.2.1 Nachweis von MDR1 mit Durchflusszytometrie

Die MDR1-Expression wurde unter 3.1.2 bereits im Western Blot untersucht und hier nun zusätzlich in der Durchflusszytometrie. Dabei zeigte IMR5^rDOXO²⁰ analog zum Western Blot eine stärkere Expression von MDR1 als IMR5^rVCR¹⁰. IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ zeigt die geringste Expression von MDR1, während sich bei der chemosensitiven IMR5 PAR und IMR5^rGEMCI²⁰ keine MDR1-Expression nachweisen lässt. (Abbildung 10).

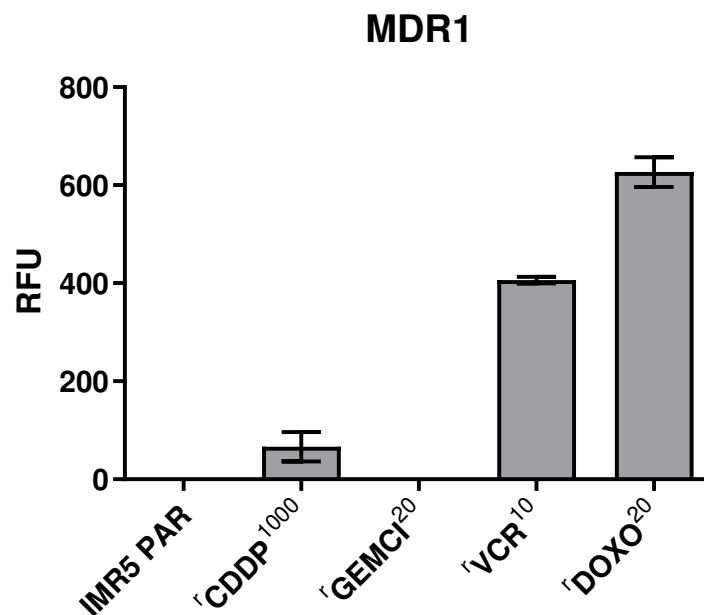


Abbildung 10: Graphische Auswertung der MDR1 Durchflusszytometrie in IMR5 (Daten siehe Anhang Tabelle 1). Darstellung der relativen fluoreszierenden Einheiten (RFU) der IMR5-Sublinien. Negative Werte bei IMR5 PAR und IMR5^rGEMCI²⁰ wurden auf null gesetzt. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem technischen Triplikat.

3.2.2 Beurteilung der Funktionalität von MDR1 im MTT Assay

Um die Funktionalität und die Beteiligung von MDR1 an der Entstehung von Chemoresistenzen in IMR5 zu beurteilen, wurden MTT-Tests mit dem ABC-Transporter Inhibitor Verapamil und dem spezifischen MDR1-Inhibitor Zosuquidar durchgeführt.

Tabelle 8: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Cisplatin und Gemcitabin mit Verapamil oder Zosuquidar (siehe Abbildung 11). IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Cisplatin und Gemcitabin mit Zugabe von 10 µM Verapamil oder 2,5 µM Zosuquidar. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

IC ₅₀	Cisplatin [µg/ml]			Gemcitabin [ng/ml]		
	Ohne Zusatz	+Verapamil (10 µM)	+Zosuquidar (2,5 µM)	Ohne Zusatz	+Verapamil (10 µM)	+Zosuquidar (2,5 µM)
IMR5 PAR	0,219 ± 0,082	0,262 ± 0,067	0,308 ± 0,198	1,210 ± 0,400	2,243 ± 1,145	1,826 ± 1,170
r¹CDDP¹⁰⁰⁰	1,478 ± 0,823	1,171 ± 0,923	2,395 ± 1,025	2,997 ± 1,671	3,281 ± 1,150	3,408 ± 0,790
r¹GEMCI²⁰	0,201 ± 0,036	0,170 ± 0,003	0,293 ± 0,071	30,563 ± 14,949	29,577 ± 7,118	37,250 ± 13,459
r¹VCR¹⁰	0,130 ± 0,033	0,105 ± 0,025	0,136 ± 0,035	3,188 ± 0,191	3,863 ± 0,063	4,286 ± 1,342
r¹DOXO²⁰	0,288 ± 0,025	0,266 ± 0,069	0,228 ± 0,144	2,062 ± 0,732	2,476 ± 0,524	2,189 ± 0,875

Bei den ermittelten IC_{50} -Werten für Cisplatin und Gemcitabin lassen sich weder bei IMR5 PAR, noch bei den resistenten Sublinien signifikante Unterschiede durch den Zusatz von Verapamil oder Zosuquidar feststellen. (Abbildung 11 A und B).

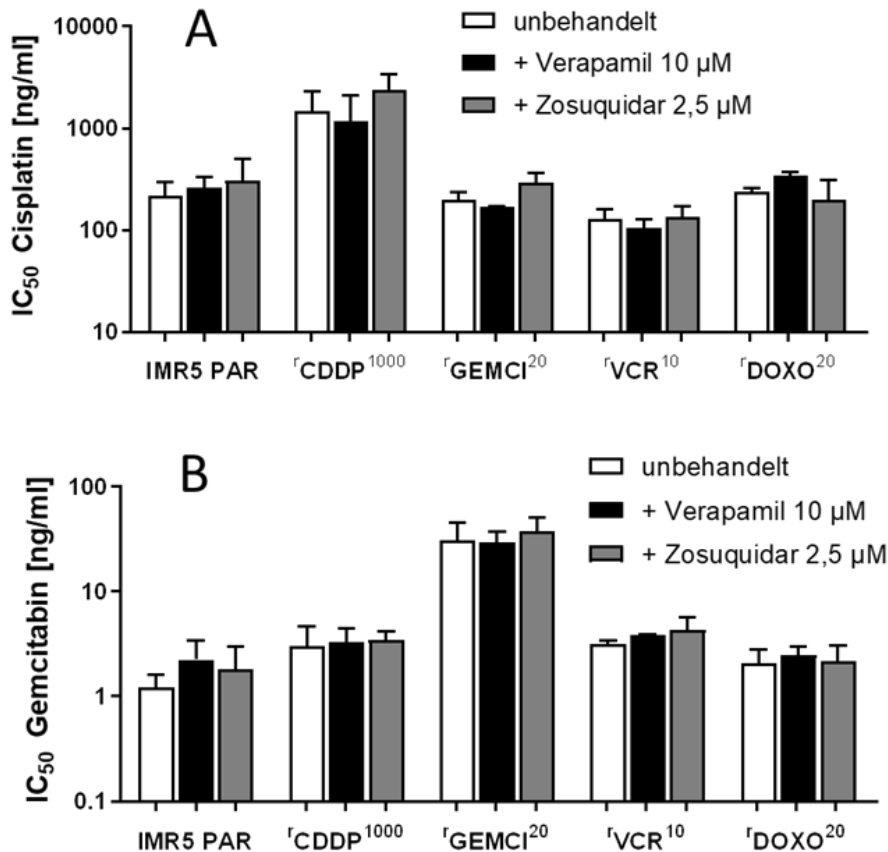


Abbildung 11: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Cisplatin und Gemcitabin mit Verapamil oder Zosuquidar (Daten siehe Tabelle 8). IC_{50} -Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit (A) Cisplatin und (B) Gemcitabin mit Zugabe von 10 μ M Verapamil oder 2,5 μ M Zosuquidar. Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

In den MTT-Tests mit dem ABC-Transporter abhängigen Stoff Vincristin (siehe Tabelle 9; Abbildung 12A) lassen sich vor allem bei IMR5^{rVCR}¹⁰ und IMR5^{rDOXO}²⁰ deutliche signifikante Unterschiede feststellen: Unter Verapamil lässt sich der IC_{50} -Wert gegen

Vincristin bei IMR5^rVCR¹⁰ um das 50-fache von 31 ng/ml auf 0,6 ng/ml reduzieren und bei IMR5^rDOXO²⁰ um das 70-fache von 19 ng/ml auf 0,3 ng/ml. Ähnliche Effekte zeigen sich mit dem spezifischen MDR1-Inhibitor Zosuquidar (Tabelle 9). Auffällig ist, dass sich mit Verapamil auch die IC₅₀-Werte von IMR5 PAR (0,3 auf 0,1 ng/ml), IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ (0,9 auf 0,3 ng/ml) und IMR5^rGEMCI²⁰ (0,3 auf 0,1 ng/ml) bei Vincristin signifikant reduzieren lassen. Der Effekt ist hierbei jedoch deutlich geringer und zeigt sich nicht unter der Zugabe von Zosuquidar.

Die MTT-Tests mit Doxorubicin (Tabelle 9; Abbildung 12B) zeigen ähnliche Effekte wie mit Vincristin: Bei IMR5^rVCR¹⁰ lässt sich der IC₅₀-Wert gegen Doxorubicin mit Verapamil um das 7-fache von 11,4 ng/ml auf 1,7 ng/ml signifikant reduzieren. Bei IMR5^rDOXO²⁰ lässt sich der IC₅₀-Wert gegen Doxorubicin mit Verapamil um das 11-fache von 28,2 ng/ml auf 2,6 ng/ml signifikant reduzieren. Mit Zosuquidar lassen sich für beide Zelllinien ähnliche Effekte auf den IC₅₀-Wert zeigen (Tabelle 9). Verapamil reduziert auch den IC₅₀-Wert bei IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ signifikant von 1,8 ng/ml auf 0,7 ng/ml. Bei IMR5 PAR und IMR5^rGEMCI²⁰ senkt Verapamil ebenfalls den IC₅₀-Wert gegen Doxorubicin, allerdings nicht statistisch signifikant. Unter dem spezifischen MDR1-Inhibitor Zosuquidar sind in IMR5 PAR, IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ und IMR5^rGEMCI²⁰ keine Effekte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle feststellbar (siehe Abbildung 12B).

Tabelle 9: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Vincristin und Doxorubicin unter Zusatz von Verapamil oder Zosuquidar (siehe Abbildung 12). IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Vincristin und Doxorubicin und Zugabe von 10 µM Verapamil oder 2,5 µM Zosuquidar. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$).**

IC ₅₀	Vincristin [ng/ml]			Doxorubicin [ng/ml]		
	Ohne Zusatz	+Verapamil (10 µM)	+Zosuquidar (2,5 µM)	Ohne Zusatz	+Verapamil (10 µM)	+Zosuquidar (2,5 µM)
IMR5 PAR	0,315 ± 0,082	0,116 ± 0,026*	0,214 ± 0,067	0,707 ± 0,169	0,366 ± 0,267	0,748 ± 0,274
rCDDP¹⁰⁰⁰	0,868 ± 0,137	0,253 ± 0,055**	0,574 ± 0,205	1,787 ± 0,458	0,730 ± 0,554*	1,863 ± 0,840
rGEMCI²⁰	0,334 ± 0,069	0,123 ± 0,049*	0,204 ± 0,096	0,573 ± 0,247	0,188 ± 0,156	0,509 ± 0,216
rVCR¹⁰	31,023 ± 2,646	0,622 ± 0,211***	0,792 ± 0,170***	11,378 ± 1,484	1,748 ± 0,413***	2,285 ± 0,945***
rDOXO²⁰	19,273 ± 3,091	0,278 ± 0,065***	0,441 ± 0,145***	28,230 ± 14,635	2,559 ± 1,112*	1,956 ± 0,424*

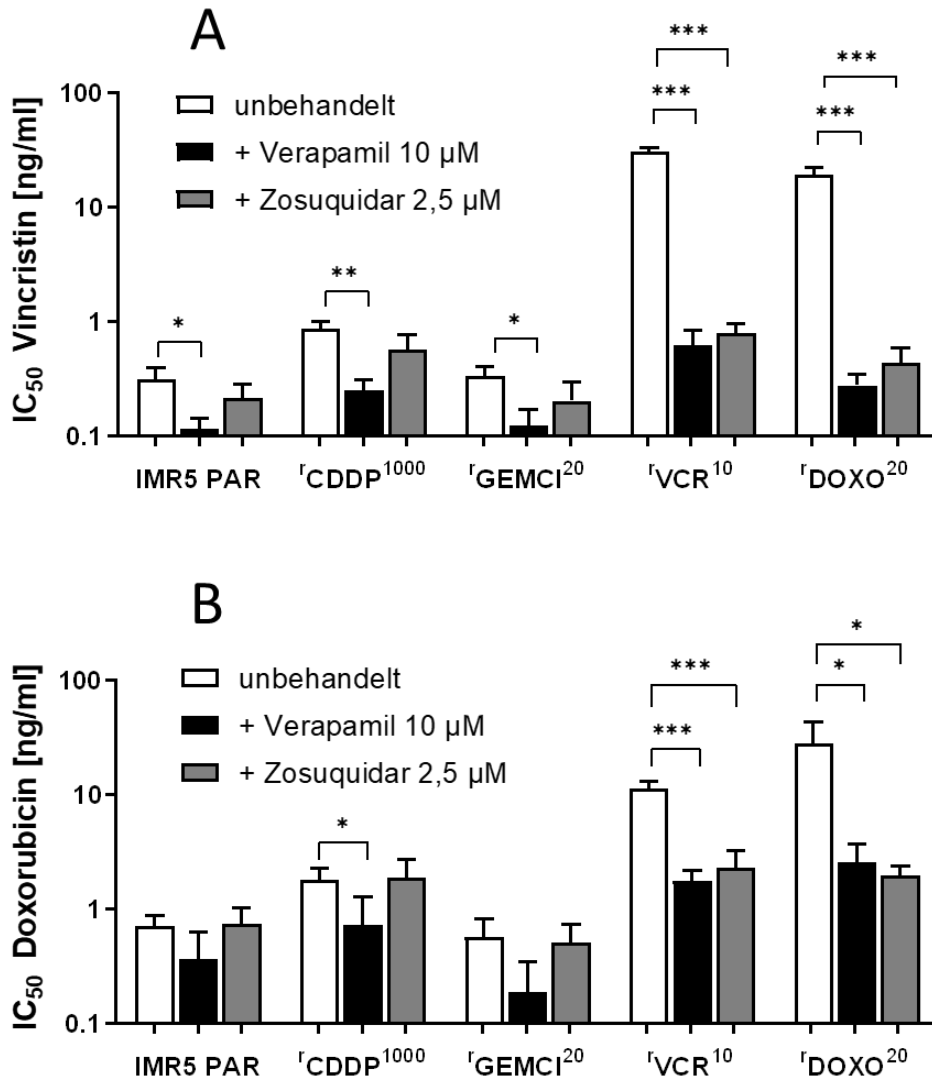


Abbildung 12: MTT-Tests der IMR5-Sublinien gegen Vincristin und Doxorubicin unter Zusatz von Verapamil oder Zosuquidar (Daten siehe Tabelle 9). IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit (A) Vincristin und (B) Doxorubicin und Zugabe von 10 µM Verapamil oder 2,5 µM Zosuquidar. Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$).**

3.3 Einfluss von SAMHD1 auf Resistenz

Um zu beurteilen, ob SAMHD1 in den resistenten IMR5-Sublinien eine Rolle bei der Resistenz und/oder bei der Vermittlung der DNA-Schadensantwort spielt, wurde zunächst im Western Blot die Expression von SAMHD1 in den Sublinien überprüft. Im gleichen Ansatz wurde überprüft, ob eine 24h-Inkubation der Zellen mit VPX-VLPs zur Expressionsabnahme von SAMHD1 führt. VPR-VLPs dienten hier als Negativkontrolle. Sowohl IMR5 PAR als auch die resistenten Sublinien zeigen eine starke SAMHD1-Expression im Western Blot (Abbildung 13). Nach Behandlung der Zellen mit VPX-VLPs für 24 Stunden sinkt in allen Zellen das SAMHD1-Expressionslevel im Western Blot drastisch. Bei IMR5^{rCDDP¹⁰⁰⁰} und IMR5^{rVCR¹⁰} können noch schwache Banden für SAMHD1 detektiert werden, bei den anderen Sublinien ist kein SAMHD1 im Western Blot mehr detektierbar. Das Expressionslevel von pSAMHD1 sinkt unter der Behandlung mit VPX-VLPs ebenfalls. Die Behandlung mit VPR-VLPs zeigt hingegen keine relevanten Unterschiede in der Proteinexpression von SAMHD1 und pSAMHD1. Die Expression von dCK ist in allen Sublinien ähnlich stark und zeigt keine Veränderung unter Behandlung mit VLPs (Abbildung 13).

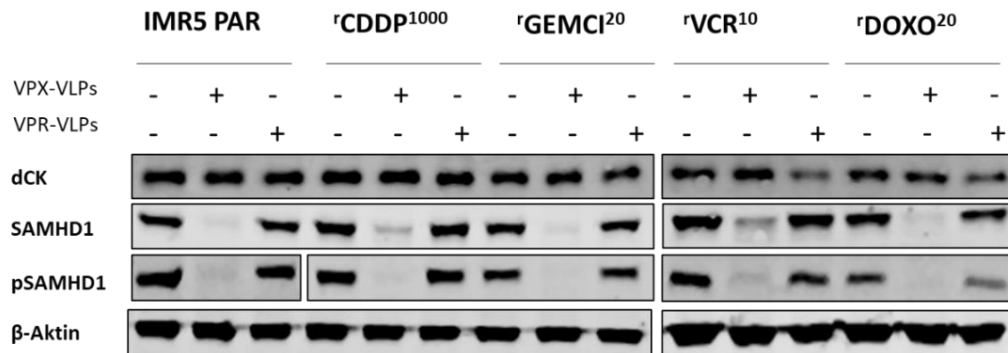


Abbildung 13: Proteinexpression der IMR5-Sublinien nach VLP-Behandlung. Western Blot nach 24h Behandlung mit VPX- und VPR-VLPs. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

In MTT-Tests an den IMR5-Sublinien mit VLPs und dem Nukleosidanalogen Cytarabin zeigen alle Sublinien einen ungefähr 10 bis 20-fach signifikant niedrigeren IC₅₀-Wert gegen Cytarabin unter der Behandlung mit VPX-VLPs im Vergleich zum reinen Cytarabin-Ansatz ohne VLPs. Die Behandlung mit VPR-VLPs zeigt keinen Einfluss auf

den IC₅₀-Wert gegen Cytarabin und dient damit als Negativkontrolle. Zusätzliche zeigen alle chemoresistenten Sublinien signifikant höhere IC₅₀-Werte gegenüber Cytarabin als die chemosensitiven IMR5 PAR: IMR5 ^rCDDP¹⁰⁰⁰ liegt mit einem IC₅₀-Wert von 81,7 ng/ml 2 bis 3-fach über dem IC₅₀-Wert vom IMR5 PAR mit 28,8 ng/ml; IMR5 ^rDOXO²⁰ zeigt mit 126,3 ng/ml einen 5-fach höheren Wert. IMR5 ^rGEMCI²⁰ zeigt mit 198,7 ng/ml einen 7-fach höheren Wert als IMR5 PAR. Am stärksten unterscheidet sich IMR5 ^rVCR¹⁰ von der parentalen Zelle: Der IC₅₀-Wert liegt mit 964,4 ng/ml etwa 30-fach höher als der IC₅₀-Wert von IMR5 PAR (Tabelle 10).

Tabelle 10: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Cytarabin in IMR5. Zellviabilität der Zelllinien im MTT-Test nach 24 h Behandlung mit VLPs und anschließender 96 h Behandlung mit Cytarabin. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

IC ₅₀	Cytarabin [ng/ml]		
	Ohne Zusatz	+VPX	+VPR
IMR5 PAR	28,793 ± 2,156	3,618 ± 0,611 ***	20,873 ± 5,190
^rCDDP¹⁰⁰⁰	81,710 ± 21,234 *	4,844 ± 0,140 **	61,127 ± 11,145
^rGEMCI²⁰	198,700 ± 66,308 *	14,853 ± 3,596 **	156,733 ± 67,318
^rVCR¹⁰	964,400 ± 496,356 *	43,393 ± 10,213 *	636,767 ± 304,450
^rDOXO²⁰	126,300 ± 11,412 ***	11,737 ± 1,072 ***	117,723 ± 40,524

Das Cytostatikum Gemcitabin ist ein Nukleosid auf Cytosin-Basis und dem Wirkmechanismus von Cytarabin ähnlich. Um festzustellen, ob VPX-VLPs die resistenten IMR5-Sublinien gegenüber Gemcitabin ähnlich wie gegenüber Cytarabin

sensitivieren können, wurden MTT-Tests durchgeführt. Im Gegensatz zu Cytarabin zeigt im MTT-Test mit Gemcitabin die Behandlung mit VPX-VLPs nur in einer Sublinie einen signifikanten Effekt: In IMR5^rGEMCI²⁰ wird der IC₅₀-Wert gegen Gemcitabin mit VPX-VLPs von 63 ng/ml auf 33 ng/ml halbiert. In IMR5 PAR und den restlichen Sublinien zeigt die Behandlung mit VLPs keinen Einfluss auf den IC₅₀-Wert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Gemcitabin in IMR5. Zellviabilität der Zelllinien im MTT-Test nach 24 h Behandlung mit VLPs und anschließender 96 h Behandlung mit Gemcitabin. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

	Gemcitabin [ng/ml]		
IC₅₀	Ohne Zusatz	+ VPX	+ VPR
IMR5 PAR	2,847 ± 1,188	2,006 ± 0,370	1,880 ± 0,550
rCDDP¹⁰⁰⁰	3,224 ± 0,232	2,236 ± 0,339	2,834 ± 0,323
rGEMCI²⁰	63,457 ± 6,316	32,633 ± 6,673 *	59,077 ± 7,967
rVCR¹⁰	6,622 ± 0,965	4,790 ± 1,538	5,828 ± 1,423
rDOXO²⁰	3,694 ± 0,619	2,949 ± 1,174	3,169 ± 0,105

Das Cytostatikum Topotecan ist als Topoisomerase-Hemmer in der Lage DNA-Doppelstrangbrüche zu verursachen. Um die Beteiligung von SAMHD1 an der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur zu untersuchen, wurden MTT-Tests mit Topotecan und VPX-VLPs durchgeführt. In keiner Sublinie lässt sich durch die SAMHD1-Depletion mit VPX-VLPs der IC₅₀-Wert gegen Topotecan signifikant reduzieren. Die IC₅₀-Werte sind unter Zugabe von VPR-VLPs zwar geringfügig niedriger, jedoch nur für IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰

und IMR5^rGEMCI²⁰ statistisch signifikant (Tabelle 12). Allerdings stellen die VPR-VLPs die Negativkontrolle dar.

Tabelle 12: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Topotecan in IMR5. Zellviabilität der Zelllinien im MTT-Test nach 24 h Behandlung mit VLPs und anschließender 96 h Behandlung mit Topotecan. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

IC ₅₀	Topotecan [ng/ml]		
	Ohne Zusatz	+VPX	+VPR
IMR5 PAR	2,174 ± 0,555	2,012 ± 0,583	1,273 ± 0,176
rCDDP¹⁰⁰⁰	3,895 ± 0,549	3,436 ± 0,909	1,983 ± 0,152 **
rGEMCI²⁰	1,984 ± 0,157	1,706 ± 0,250	0,947 ± 0,179 **
rVCR¹⁰	4,845 ± 1,043	4,450 ± 0,137	3,525 ± 0,799
rDOXO²⁰	4,203 ± 0,549	4,550 ± 1,277	2,708 ± 0,865

3.4 PARP1-Inhibitoren und Anwendung in IMR5

3.4.1 Einfluss von ABC-Transportern auf PARP-Inhibitoren

Derzeit finden PARP-Inhibitoren vermehrt Anwendung in Neuroblastomzellmodellen. Um die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren in Hochrisiko-Neuroblastomzellen zu untersuchen und um mögliche Kreuzresistenzen darzustellen wurden MTT-Tests mit vier PARP-Inhibitoren durchgeführt, die derzeit Anwendung in der Klinik finden: Olaparib, Rucaparib (beide Tabelle 13), Talazoparib, Niraparib (beide Tabelle 14). Um die Abhängigkeit der PARP-Inhibitoren von ABC-Transportern zu untersuchen, wurden die MTT-Tests mit dem ABC-Transporter-Inhibitor Verapamil (10 μM) angesetzt.

Generell befinden sich die IC_{50} -Werte für Olaparib, Rucaparib und Niraparib im niedrigen μM -Bereich. Auffällig für Olaparib (Tabelle 13; Abbildung 14A) sind die Unterschiede der IC_{50} -Werte zwischen IMR5 PAR und den MDR1-exprimierenden Zellen: In IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ (5,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$), IMR5^rVCR¹⁰ (6,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$) und IMR5^rDOXO²⁰ (8,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$) ist der IC_{50} -Wert mindestens 3-fach höher als in IMR5 PAR (1,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Die IC_{50} -Werte von IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ sind dabei signifikant höher als in IMR5 PAR. IMR5^rGEMCI²⁰ zeigt von allen Sublinien den niedrigsten IC_{50} -Wert gegen Olaparib mit 0,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$ und liegt damit signifikant niedriger als der IC_{50} -Wert von IMR5 PAR. IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ lassen sich im MTT-Test mit Verapamil sensibilisieren und zeigen eine signifikante Abnahme des IC_{50} -Werts. Der IC_{50} -Wert von IMR5^rVCR¹⁰ gegen Olaparib lässt sich mit Verapamil (von 6,2 auf 2,9 $\mu\text{M}/\text{ml}$) halbieren. Der IC_{50} -Wert von IMR5^rDOXO²⁰ lässt sich um das knapp 5-fache von 8,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ auf 1,7 $\mu\text{M}/\text{ml}$ reduzieren. Die IC_{50} -Werte von IMR5 PAR, IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ und IMR5^rGEMCI²⁰ gegen Olaparib lassen sich mit Verapamil nicht beeinflussen.

In den MTT-Tests mit Rucaparib (Tabelle 13; Abbildung 14B) zeigt sich ein ähnlicher Effekt. Die MDR1-exprimierenden Zellen haben signifikant höhere IC_{50} -Werte für Rucaparib als IMR5 PAR: IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ (4 $\mu\text{M}/\text{ml}$), IMR5^rVCR¹⁰ (5 $\mu\text{M}/\text{ml}$) und IMR5^rDOXO²⁰ (1,7 $\mu\text{M}/\text{ml}$) weisen 3-fach bis 10-fach erhöhte IC_{50} -Werte gegenüber IMR5 PAR (0,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$) auf. Der IC_{50} -Wert gegen Rucaparib für IMR5^rGEMCI²⁰ liegt mit 0,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$ im Bereich von IMR5 PAR. Mit Verapamil lassen sich die IC_{50} -Werte von IMR5^rVCR¹⁰ (5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ auf 2,4 $\mu\text{M}/\text{ml}$) und IMR5^rDOXO²⁰ (1,7 $\mu\text{M}/\text{ml}$ auf 0,7 $\mu\text{M}/\text{ml}$)

signifikant halbieren. Die IC₅₀-Werte von IMR5 PAR, IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ und IMR5^rGEMCI²⁰ gegen Rucaparib lassen sich mit Verapamil nicht beeinflussen.

Tabelle 13: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Olaparib und Rucaparib (siehe Abbildung 14). IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Olaparib und Rucaparib mit zusätzlicher Zugabe von 10 µM Verapamil. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

IC ₅₀	Olaparib [µM/ml]		Rucaparib [µM/ml]	
	Ohne Zusatz	+ Verapamil (10 µM)	Ohne Zusatz	+ Verapamil (10 µM)
IMR5 PAR	1,822 ± 0,121	1,478 ± 0,077*	0,496 ± 0,337	0,298 ± 0,139
r^{CDDP}1000	5,787 ± 3,643	4,880 ± 1,728	3,992 ± 1,297*	2,353 ± 1,066
r^{GEMCI}20	0,840 ± 0,213**	0,621 ± 0,234	0,786 ± 0,440	0,455 ± 0,260
r^{VCR}10	6,190 ± 1,784*	2,946 ± 0,750*	5,018 ± 0,809***	2,421 ± 0,324**
r^{DOXO}20	8,212 ± 3,137*	1,740 ± 0,504*	1,701 ± 0,048**	0,697 ± 0,243**

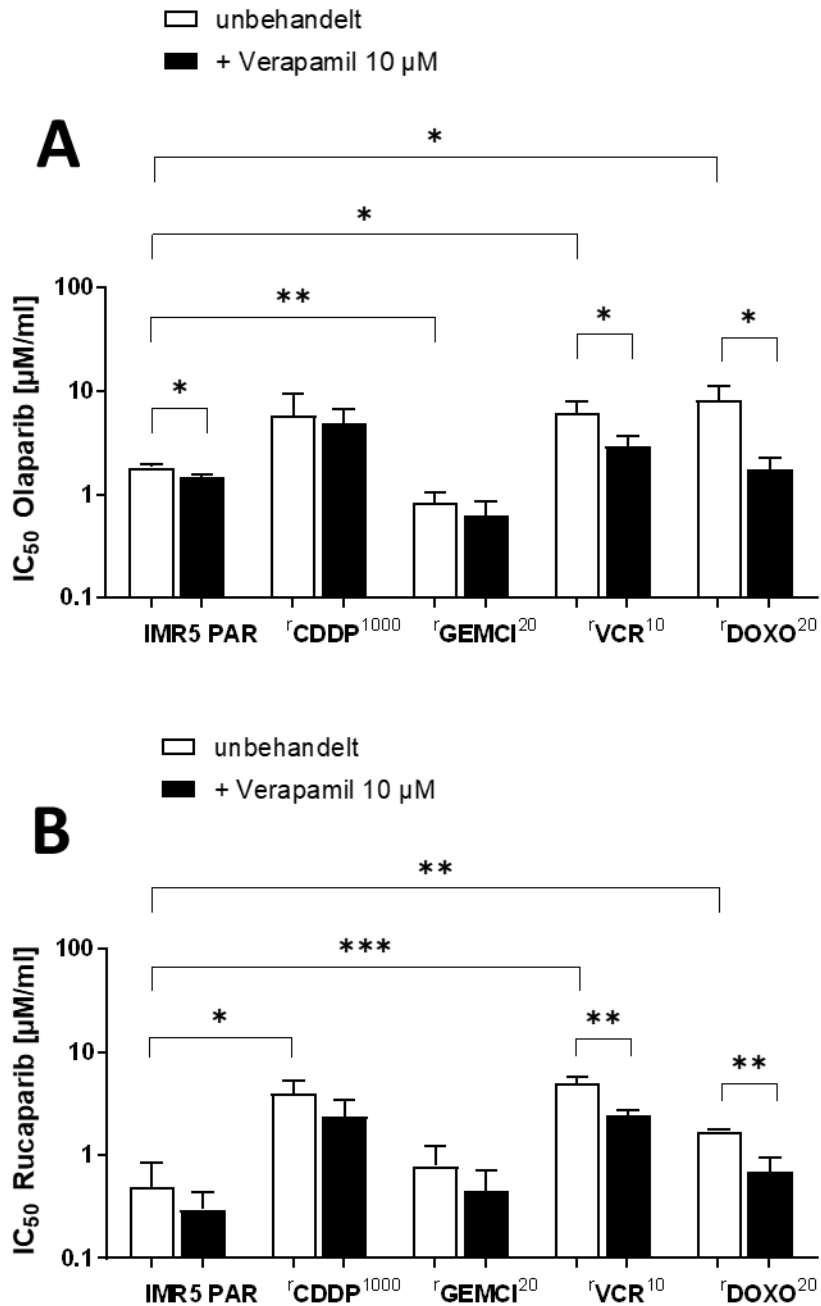


Abbildung 14: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Olaparib (A) und Rucaparib (B). Daten siehe Tabelle 13. IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Olaparib und Rucaparib mit zusätzlicher Zugabe von 10 µM Verapamil. Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Die IC₅₀-Werte für Niraparib liegen für alle IMR5-Sublinien um 1 µM/ml und zeigen keine Abnahme unter Verapamil (Tabelle 14; Abbildung 15A). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Talazoparib hemmt das Wachstum in allen IMR5-Sublinien am effektivsten unter den PARP-Inhibitoren: Die IC₅₀-Werte befinden sich im nM-Bereich und nicht wie bei den anderen 3 PARP-Inhibitoren im µM-Bereich (Tabelle 14; Abbildung 15B). Der IC₅₀-Wert für IMR5^rGEMCI²⁰ liegt mit 6,6 nM/ml im ähnlichen Bereich wie der Wert für IMR5 PAR (5 nM/ml). Auffallend ist der signifikant 10-fach höhere IC₅₀-Wert für IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ (44,3 nM/ml) gegenüber IMR5 PAR. Die IC₅₀-Werte für IMR5^rVCR¹⁰ (15,6 nM/ml) und IMR5^rDOXO²⁰ (12,3 nM/ml) sind ebenfalls signifikant höher gegenüber IMR5 PAR, liegen jedoch unter dem IC₅₀-Wert von IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰. Zusätzlich lassen sich IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ mit Verapamil signifikant gegen Talazoparib sensitivieren: Die IC₅₀-Werte lassen sich unter Verapamil halbieren.

Tabelle 14: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Talazoparib und Niraparib (siehe Abbildung 15). IC_{50} -Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Talazoparib und Niraparib mit zusätzlicher Zugabe von 10 μM Verapamil. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

IC ₅₀	Niraparib [$\mu M/ml$]		Talizoparib [nM/ml]	
	Ohne Zusatz	+ Verapamil (10 μM)	Ohne Zusatz	+ Verapamil (10 μM)
IMR5 PAR	0,651 \pm 0,249	0,501 \pm 0,199	4,991 \pm 0,884	4,526 \pm 0,557
rCDDP¹⁰⁰⁰	1,772 \pm 0,671	1,628 \pm 0,541	44,330 \pm 16,417*	37,157 \pm 11,279
rGEMCI²⁰	0,564 \pm 0,214	0,399 \pm 0,189	6,563 \pm 1,486	4,008 \pm 0,167
rVCR¹⁰	1,162 \pm 0,340	0,987 \pm 0,159	15,567 \pm 2,806**	8,577 \pm 0,335*
rDOXO²⁰	0,917 \pm 0,245	0,634 \pm 0,230	12,307 \pm 2,577**	6,009 \pm 0,809*

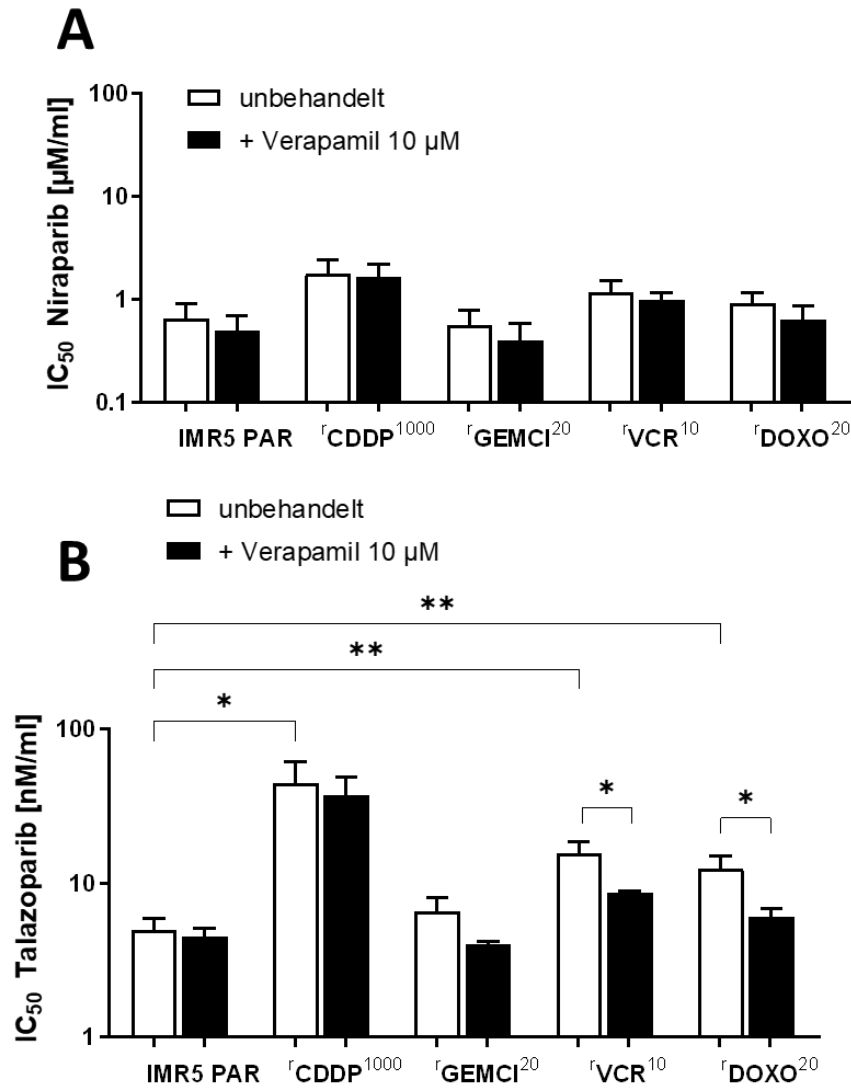


Abbildung 15: MTT-Tests der IMR5-Sublinien mit Niraparib (A) und Talazoparib (B). Daten siehe Tabelle 14. IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Niraparib und Talazoparib mit zusätzlicher Zugabe von 10 µM Verapamil. Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

3.4.2 Einfluss von Verapamil und VLPs in IMR5^rOLAPARIB²⁰

Da die Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ erst im Laufe der Arbeit adaptiert wurde, wurden die Experimente zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Um den Einfluss von ABC-Transportern in der an Olaparib adaptierten Zelle IMR5^rOLAPARIB²⁰ zu untersuchen, wurden Versuche mit den vier PARP Inhibitoren analog zu Kapitel 3.4.1 durchgeführt.

Zuerst konnte die erworbene Resistenz von IMR5^rOLAPARIB²⁰ durch die Adaptierung an Olaparib bestätigt werden (Tabelle 15, Abbildung 16). Der IC₅₀-Wert von IMR5^rOLAPARIB²⁰ gegen Olaparib liegt im Bereich um 40 µM/ml und damit signifikant um das 25-fache höher als die parentale Zelle IMR5 PAR. Mit Verapamil lassen sich weder IMR5 PAR noch IMR5^rOLAPARIB²⁰ gegen Olaparib sensitivieren. Für die anderen PARP-Inhibitoren zeigt sich ein ähnliches Bild. IMR5^rOLAPARIB²⁰ weist im MTT-Test gegen Rucaparib mit 6,7 µM/ml einen 5-fach signifikant höheren IC₅₀-Wert gegenüber IMR5 PAR mit ungefähr 1,2 µM/ml auf. Der IC₅₀-Wert von IMR5^rOLAPARIB²⁰ gegen Niraparib liegt mit 3,8 µM/ml um das 10-fache signifikant höher als der IC₅₀-Wert von IMR5 PAR mit 0,3 µM/ml. Am stärksten sind die Unterschiede für Talazoparib: IMR5^rOLAPARIB²⁰ zeigt einen 30000-fach höheren IC₅₀-Wert mit 16 µM/ml gegenüber IMR5 PAR mit IC₅₀-Werten um 5 nM/ml. Wegen hoher Standardabweichung ist der Wert statistisch nicht signifikant höher. IMR5 PAR lässt sich wie in 3.4.1 bereits gezeigt bei keinem der getesteten PARP-Inhibitoren mit Verapamil sensibilisieren, ebenso konnte für IMR5^rOLAPARIB²⁰ keine Sensibilisierung unter Verapamil gezeigt werden (siehe Tabelle 15). Da dieses Experiment zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde, treten geringe Unterschiede der IC₅₀-Werte von IMR5 PAR im Vergleich zu Experiment 3.4.1 auf.

Tabelle 15: MTT-Tests der Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ im Vergleich mit IMR5 PAR und den PARP-Inhibitoren Olaparib, Rucaparib, Niraparib und Talazoparib (siehe Abbildung 16). IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien ^rOLAPARIB²⁰ und IMR5 PAR nach 120 h Behandlung mit Olaparib, Rucaparib, Niraparib und Talazoparib mit zusätzlicher Zugabe von 10 µM Verapamil. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$).**

	Olaparib [µM/ml]		Rucaparib [µM/ml]	
IC ₅₀	Ohne Zusatz	+ Verapamil	Ohne Zusatz	+ Verapamil
IMR5 PAR	1,542 ± 0,411	1,170 ± 0,255	1,240 ± 0,278	0,953 ± 0,323
IMR5 ^rOLA²⁰	40,760 ± 8,594 ***	32,300 ± 6,697	6,728 ± 1,314 ***	5,332 ± 1,254
	Niraparib [µM/ml]		Talazoparib [µM/ml]	
IC ₅₀	Ohne Zusatz	+ Verapamil	Ohne Zusatz	+ Verapamil
IMR5 PAR	0,332 ± 0,181	0,401 ± 0,077	0,005550 ± 0,000843	0,005725 ± 0,001007
IMR5 ^rOLA²⁰	3,828 ± 0,386 ***	4,036 ± 1,238	16,040 ± 14,250	15,500 ± 10,620

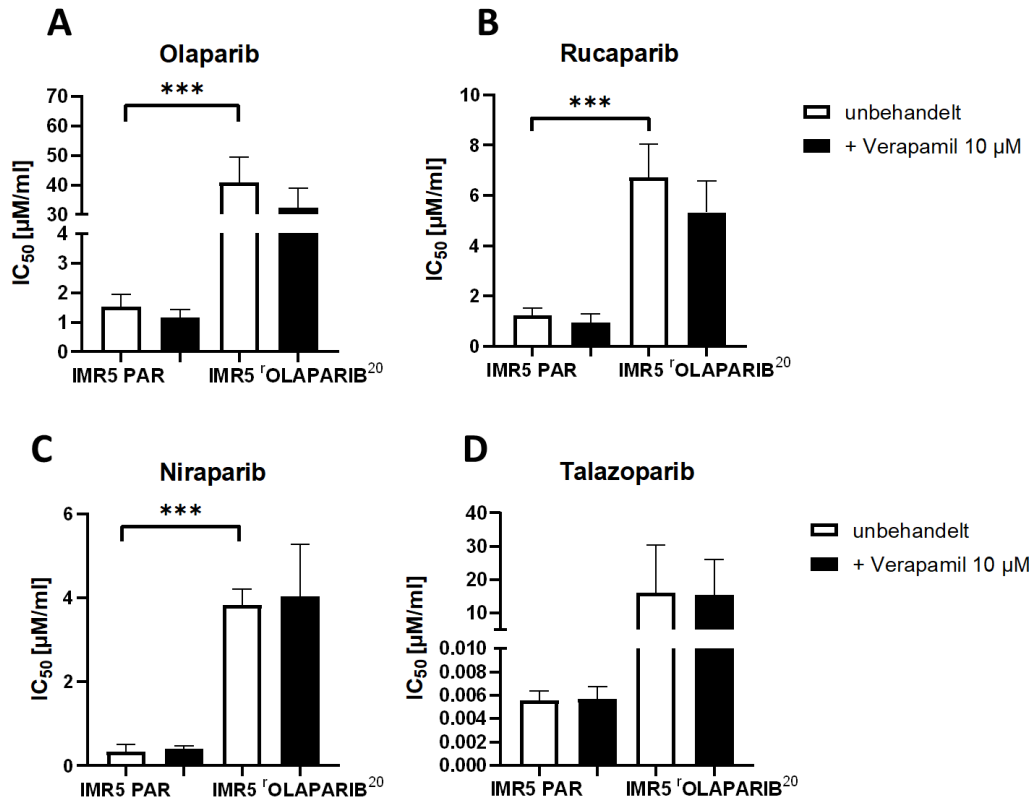


Abbildung 16: MTT-Tests der Sublinie IMR5'OLAPARIB²⁰ im Vergleich mit IMR5 PAR und den PARP-Inhibitoren Olaparib, Rucaparib, Niraparib und Talazoparib. Daten siehe Tabelle 15. IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien nach 120 h Behandlung mit Olaparib (A), Rucaparib (B), Niraparib (C) und Talazoparib (D) mit zusätzlicher Zugabe von 10 µM Verapamil. Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Um festzustellen, ob SAMHD1 in den IMR5-Sublinien an DNA-Reparaturprozessen möglicherweise eine Rolle spielt, wurden MTT-Tests mit PARP-Inhibitoren und VLPs analog zu Kapitel 3.3 durchgeführt. Hierfür wurden die chemosensitiven IMR5 PAR mit der chemoresistenten IMR5'OLAPARIB²⁰ verglichen, die an das DNA-schädigende Cytostatikum Olaparib adaptiert wurde. Analog zu den Versuchen in Kapitel 3.3 wurde zuerst in Western Blots der Einfluss von VLPs auf die Proteinexpression untersucht (siehe Abbildung 17).

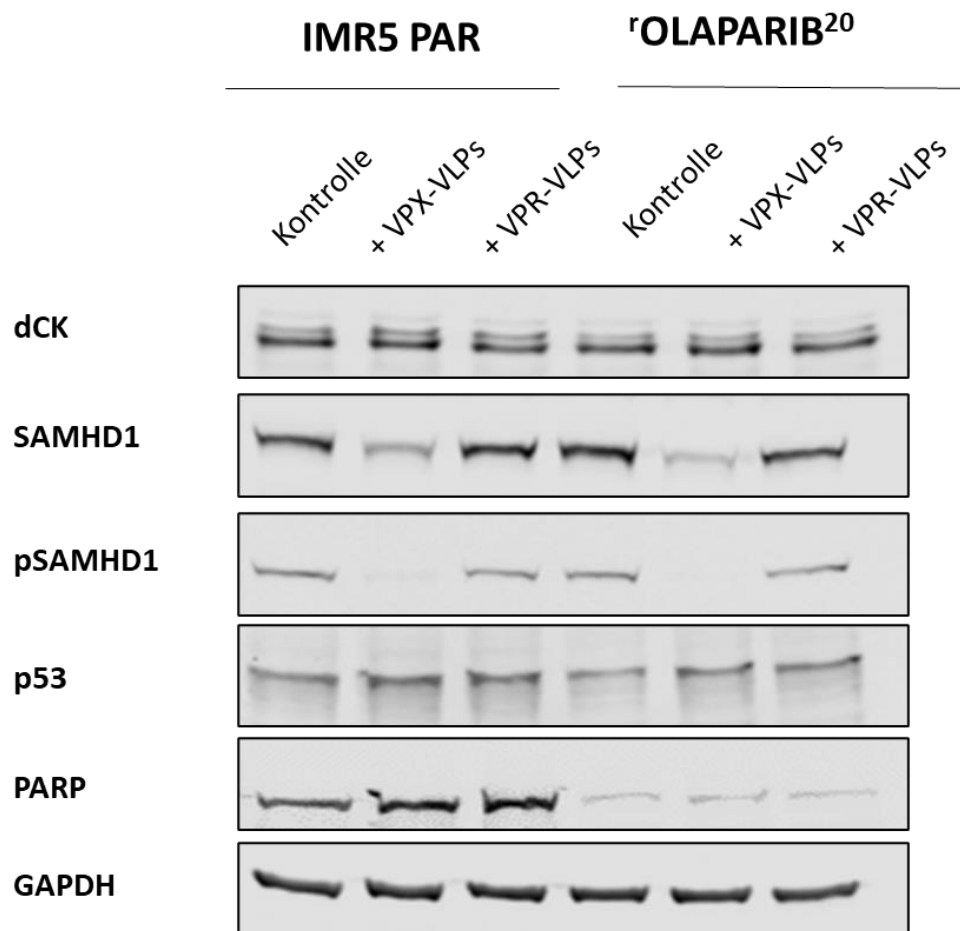


Abbildung 17: Proteinexpression von IMR5^{rOLAPARIB}²⁰ und IMR5 PAR nach VLP-Behandlung. Western Blot nach 24h Behandlung mit VPX- und VPR-VLPs und Grundcharakterisierung auf dCK, SAMHD1, pSAMHD1, p53 und PARP. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die resistente Sublinie IMR5^{rOLAPARIB}²⁰ zeigt keine Unterschiede in der dCK, SAMHD1 und pSAMHD1 Expression im Vergleich mit IMR5 PAR und den anderen chemoresistenten Sublinien (siehe 3.1.2). In der TP53-Gensequenzierung (Tabelle 7) konnte für IMR5^{rOLAPARIB}²⁰ keine TP53-Mutationen gefunden werden; entsprechend zeigt auch die Expression von p53 im Western Blot keinen Unterschied zur parentalen Zelle. Unterschiede sind in der PARP-Expression zu erkennen: IMR5^{rOLAPARIB}²⁰ zeigt im Vergleich zu IMR5 PAR und den anderen chemoresistenten Sublinien kaum PARP-Expression. Nach Behandlung mit VPX-VLPs für 24 Stunden sinkt in IMR5^{rOLAPARIB}²⁰ wie in den anderen IMR5-Sublinien das SAMHD1- und das

pSAMHD1-Expressionslevel im Western Blot deutlich: Für SAMHD1 ist nach Behandlung mit VPX-VLPs noch eine schwache Bande detektierbar, während für pSAMDH1 keine Bande mehr detektierbar ist. Die Behandlung mit VPX-VLPs zeigt in IMR5^rOLAPARIB²⁰ und IMR5 PAR keinen Einfluss auf dCK, p53 und PARP Expression. Die Kontrollbehandlung mit VPR-VLPs zeigt in IMR5^rOLAPARIB²⁰ und IMR5 PAR ebenfalls keinen Einfluss auf die dCK, SAMHD1, pSAMHD1, p53 und PARP Expression. GAPDH wurde als Ladekontrolle benutzt.

Die MTT-Tests mit VLPs und dem Nukleosidanalogen Cytarabin wurden analog zu den Versuchen in Kapitel 3.3 als Kontrolle durchgeführt. Die Sublinien IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ zeigen einen ungefähr 10-fach signifikant niedrigeren IC₅₀-Wert gegen Cytarabin unter der Behandlung mit VPX-VLPs im Vergleich zum reinen Cytarabin-Ansatz ohne VLPs (Tabelle 16A, Abbildung 18A). In IMR5 PAR reduzieren VPX-VLPs den IC₅₀-Wert signifikant von 20,8 ng/ml auf 2,4 ng/ml; in IMR5^rOLAPARIB²⁰ reduzieren VPX-VLPs den IC₅₀-Wert signifikant von 45,6 ng/ml auf 4 ng/ml. Die Behandlung mit der VPR-VLPs zeigt in IMR5 PAR keinen signifikanten Einfluss auf den IC₅₀-Wert gegen Cytarabin und dient damit wie in Versuch 3.3 als Negativkontrolle. In IMR5^rOLAPARIB²⁰ zeigt sich durch die Behandlung eine geringe Reduzierung des IC₅₀-Wertes von 45 ng/ml auf 37 ng/ml, die jedoch statistisch signifikant ist. Auffällig ist die 1,5-fach signifikant höhere Resistenz gegenüber Cytarabin der IMR5^rOLAPARIB²⁰ gegenüber IMR5 PAR. Da dieses Experiment zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde, zeigen sich geringe Abweichungen der IC₅₀-Werte von IMR5 PAR im Vergleich zu Experiment 3.3.

Tabelle 16: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren in IMR5^rOLAPARIB²⁰ (siehe Abbildung 18 - Abbildung 20). Zellviabilität der Zelllinien IMR5^rOLAPARIB²⁰ und IMR5 PAR im MTT-Test nach 24 h Behandlung mit VLPs und anschließender 96 h Behandlung mit Cytarabin (A) und den PARP-Inhibitoren Olaparib (B), Rucaparib (C), Niraparib (D) und Talazoparib (E). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A	Cytarabin[ng/ml]		
IC₅₀	Ohne Zusatz	+VPX	+VPR
IMR5 PAR	20,80 \pm 9,288	2,377 \pm 1,423 ***	11,89 \pm 2,813
IMR5 rOLA²⁰	45,61 \pm 1,861 ***	3,994 \pm 0,4806 ***	37,03 \pm 4,868 **

B	Olaparib[μM/ml]		
IC₅₀	Ohne Zusatz	+VPX	+VPR
IMR5 PAR	0,5149 \pm 0,2960	0,6159 \pm 0,3452	0,1023 \pm 0,05410 *
IMR5 rOLA²⁰	44,42 \pm 9,731 ***	33,29 \pm 11,77	19,17 \pm 7,243 **

C	Rucaparib [$\mu\text{M}/\text{ml}$]		
IC₅₀	Ohne	+ VPX	+ VPR
IMR5 PAR	0,5141 \pm 0,2795	0,6715 \pm 0,2186	0,07390 \pm 0,06142 *
IMR5 rOLA²⁰	11,75 \pm 0,7259 ***	10,91 \pm 1,522	6,756 \pm 0,6318 ***

D	Niraparib [$\mu\text{M}/\text{ml}$]		
IC₅₀	Ohne	+ VPX	+VPR
IMR5 PAR	0,2621 \pm 0,06977	0,2098 \pm 0,08345	0,03590 \pm 0,05041 ***
IMR5 rOLA²⁰	6,221 \pm 2,086 ***	3,800 \pm 1,019	2,180 \pm 0,6791 **

E	Talazoparib [$\mu\text{M}/\text{ml}$]		
IC₅₀	Ohne	+ VPX	+VPR
IMR5 PAR	0,002072 \pm 0,0003593	0,001394 \pm 0,0008603	0,0009005 \pm 0,0006298 **
IMR5 rOLA²⁰	29,83 \pm 10,83 ***	21,68 \pm 14,65	1,657 \pm 0,6038 ***

In den MTT-Test mit dem PARP-Inhibitor Olaparib zeigte die Behandlung mit VPX-VLPs bei IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ keinen Einfluss auf den IC₅₀-Wert (Tabelle 16B, Abbildung 18B). In der Behandlung mit VPR-VLPs zeigen sich für beide Zelllinien signifikante Unterschiede: Der IC₅₀-Wert von IMR5 PAR wird um das 5-fache von 0,5 µM/ml auf 0,1 µM/ml reduziert; der IC₅₀-Werte der chemoresistenten IMR5^rOLAPARIB²⁰ wird um die Hälfte von 44,4 µM/ml auf 19,2 µM/ml reduziert. Analog zu den Ergebnissen in Tabelle 15 zeigt IMR5^rOLAPARIB²⁰ in MTT-Tests mit Olaparib einen IC₅₀-Wert um 40 µM/ml und liegt damit signifikant um ein Vielfaches höher als die chemosensitive IMR5 PAR.

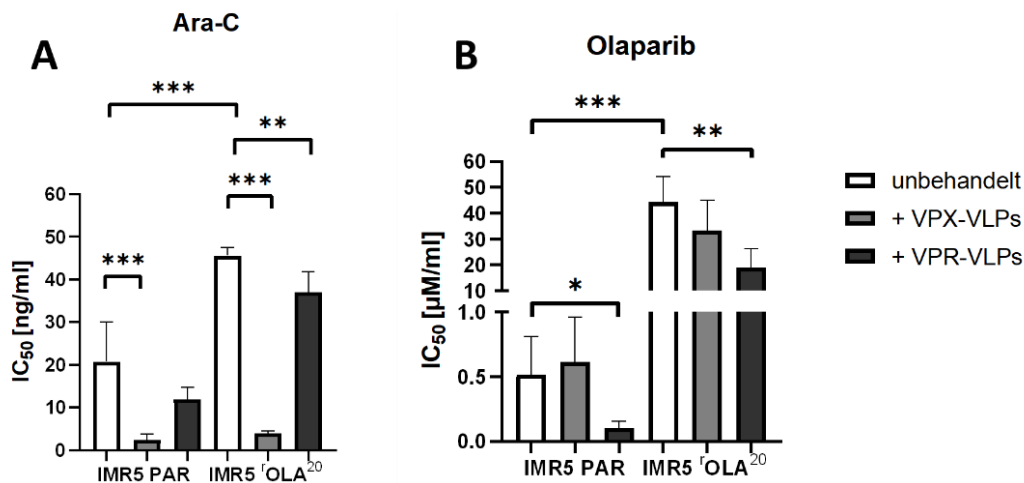


Abbildung 18: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Cytarabin (Ara-C) und Olaparib in IMR5^rOLAPARIB²⁰. Daten siehe Tabelle 16A und B. Zellviabilität der Zelllinien IMR5^rOLAPARIB²⁰ und IMR5 PAR im MTT-Test nach 24 h Behandlung mit VLPs und anschließender 96 h Behandlung mit Cytarabin (A) und Olaparib (B). Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

In MTT-Tests mit dem PARP Inhibitor Rucaparib (Tabelle 16C, Abbildung 19A) zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der Behandlung mit Olaparib: Die Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ zeigt für Rucaparib mit 11,8 µM/ml einen signifikant 20-fach

höheren IC₅₀-Wert im Vergleich zu IMR5 PAR mit 0,5 µM/ml. Die Behandlung mit VPX-VLPs zeigt bei beiden Sublinien keinen signifikanten Unterschied. In der Behandlung mit VPR-VLPs zeigen sich signifikante Unterschiede: Der IC₅₀-Wert von IMR5 PAR wird um das 6-fache von 0,5 µM/ml auf 0,074 µM/ml reduziert; der IC₅₀-Werte der chemoresistenten Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ wird von 11,8 µM/ml auf 6,8 µM/ml reduziert.

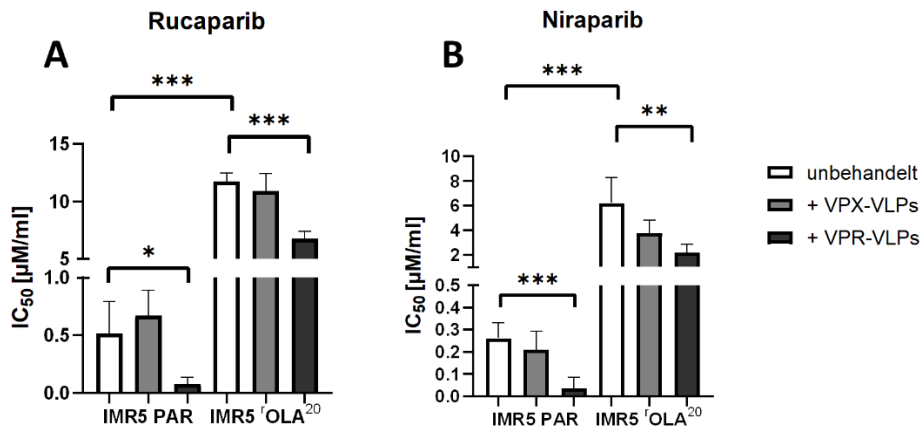


Abbildung 19: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Rucaparib und Niraparib in IMR5^rOLAPARIB²⁰. Daten siehe Tabelle 16C und D. Zellviabilität der Zelllinien IMR5^rOLAPARIB²⁰ und IMR5 PAR im MTT-Test nach 24 h Behandlung mit VLPs und anschließender 96 h Behandlung mit Rucaparib (A) und Niraparib (B). Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

In MTT-Tests mit dem PARP-Inhibitor Niraparib (Tabelle 16D, Abbildung 19B) zeigt sich ebenfalls ein um 20-fach signifikant höherer IC₅₀-Wert der Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ gegenüber der chemosensitiven IMR5 PAR Zelle. Die Behandlung mit VPX-VLPs zeigt bei beiden Sublinien keinen signifikanten Unterschied. Auch hier zeigen sich in der Behandlung mit VPR-VLPs signifikante Unterschiede: Der IC₅₀-Wert von IMR5^rOLAPARIB²⁰ wird von 6,2 µM/ml auf 2,2 µM/ml reduziert. Bei der chemosensitiven IMR5 PAR wird der IC₅₀-Wert von 0,26 µM/ml auf 0,036 µM/ml reduziert.

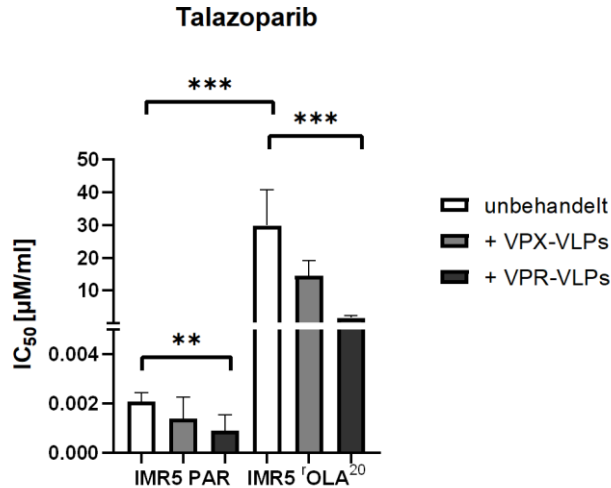


Abbildung 20: Einfluss von VLPs auf die Wirksamkeit von Talazoparib in IMR5^rOLAPARIB²⁰. Daten siehe Tabelle 16E. Zellviabilität der Zelllinien IMR5^rOLAPARIB²⁰ und IMR5 PAR im MTT-Test nach 24 h Behandlung mit VLPs und anschließender 96 h Behandlung mit Talazoparib. Die Balken zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Anwendung von Students T-Tests als Signifikanztest (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

In MTT-Tests mit dem PARP-Inhibitor Talazoparib (Tabelle 16E, Abbildung 20) zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der Behandlung mit den anderen PARP-Inhibitoren: Die Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ zeigt für Talazoparib mit 29,8 µM/ml einen signifikant 20000-fach höheren IC₅₀-Wert im Vergleich zu IMR5 PAR mit 2 nM/ml. Die Behandlung mit VPX-VLPs zeigt bei beiden Sublinien keinen signifikanten Unterschied. In der Behandlung mit VPR-VLPs zeigen sich für beide Zelllinien wieder signifikante Unterschiede: In IMR5^rOLAPARIB²⁰ reduziert sich der IC₅₀-Wert durch die Zugabe von VPR-VLPs von 29,8 µM/ml um das 18-fache auf 1,66 µM/ml. Für die chemosensitive IMR5 PAR reduziert sich der IC₅₀-Wert von 2 nM/ml auf 0,9 nM/ml.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung von Kreuzresistenzen in IMR5 durch MDR1

Cytostatika-resistente Tumorzellen sind eine große Herausforderung bei Therapien in der Onkologie. An Cytostatika adaptierte Tumorzellen können ausgeprägte Kreuzresistenzen gegenüber anderen Cytostatika aufweisen und sind daher ein wichtiges Modell in der präklinischen Forschung bei der Entwicklung neuer Therapien.

In dieser Arbeit wurde mit der humanen Neuroblastomzelle IMR5 gearbeitet, die in verschiedenen Sublinien gegen unterschiedliche Cytostatika adaptiert vorliegt (erworbene oder extrinsische Resistenz). Zunächst wurde überprüft, ob die IMR5-Sublinien jeweils gegen das adaptierte Cytostatikum resistent sind. So zeigt die an 1000 ng/ml Cisplatin (CDDP) adaptierte Sublinie IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ den höchsten IC₅₀-Wert aller Zellen gegen Cisplatin. Die an 20 ng/ml Gemcitabin (GEMCI) adaptierte Sublinie IMR5^rGEMCI²⁰ zeigt den höchsten IC₅₀-Wert gegen Gemcitabin, die an 10 ng/ml Vincristin (VCR) adaptierte Sublinie IMR5^rVCR¹⁰ zeigt den höchsten IC₅₀-Wert gegen Vincristin und die an 20 ng/ml Doxorubicin (DOXO) adaptierte Sublinie IMR5^rDOXO²⁰ zeigt den höchsten IC₅₀-Wert gegen Doxorubicin. Die IC₅₀-Werte (Tabelle 5) zeigen auch, dass die adaptierte Sublinie jeweils eine deutlich höhere Konzentration des Cytostatikums verträgt als die chemosensitive IMR5 PAR. Diese sogenannte extrinsische Resistenz wurde im Verlauf der Adaptierung erworben und in dieser Arbeit bestätigt.

Die an Cisplatin adaptierte Zelle IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ und die an Gemcitabin adaptierte Zelle IMR5^rGEMCI²⁰ zeigen keine Kreuzresistenz zu den jeweils anderen getesteten Cytostatika der IMR5 Zellreihe. Im MTT-Ansatz mit Vincristin und Doxorubicin fällt auf, dass IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ jeweils höhere Werte gegen die beiden Substanzen aufweisen als die restlichen Zelllinien (Abbildung 8C+D). Somit ist IMR5^rVCR¹⁰ kreuzresistent gegen Doxorubicin und IMR5^rDOXO²⁰ kreuzresistent gegen Vincristin. Frühere Arbeiten an Neuroblastomzellen der *RCCL Collection* belegen, dass es durch die Adaptierung an Vincristin und Doxorubicin zu einer erhöhten Expression des ABC-Transporters MDR1 kommt.^{87,88} Dies konnte für die IMR5-Sublinien bestätigt werden: IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ zeigen im Western Blot eine deutliche

Expression des ABC-Transporters MDR1 (Abbildung 9), die in der Durchflusszytometrie bestätigt werden konnte (Abbildung 10), während die Ausgangszelle IMR5 PAR keine MDR1-Expression aufweist. Die erhöhte MDR1-Expression in IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ könnte durch die Adaption erworben sein, da Vincristin und Doxorubicin als MDR1-Substrate bekannt sind.¹⁶ Die chemoresistente Sublinie IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ zeigt im Western Blot und im Durchflusszytometer eine vergleichsweise geringe Expression von MDR1, während IMR5^rGEMCI²⁰ genau wie IMR5 PAR keinerlei MDR1-Expression zeigt.

Um die Funktionalität von MDR1 zu überprüfen, wurden MTTs mit den MDR1-Inhibitoren Verapamil und Zosuquidar durchgeführt. Verapamil ist ein Calciumkanalblocker und ein Substrat für MDR1. Verapamil wirkt dabei als kompetitiver Inhibitor.^{23,89} Zusätzlich kann Verapamil auch die Funktion von MRP1 und anderen ABC-Transportern beeinflussen.²² Im Unterschied dazu ist Zosuquidar ein spezifisch entwickelter MDR1-Inhibitor.²⁴

Verapamil zeigt signifikante Effekte auf den IC₅₀-Wert bei Vincristin in allen IMR5-Sublinien (Tabelle 9, Abbildung 12). In allen Zellen zeigt der Ansatz mit Verapamil einen deutlich verringerten IC₅₀-Wert gegen Vincristin. In IMR5^rDOXO²⁰ und IMR5^rVCR¹⁰ war dieser Effekt zu erwarten, da diese Zellen eine deutliche MDR1-Überexpression aufweisen. Auch für IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ wurde eine leichte MDR1-Expression nachgewiesen. Für IMR5 PAR und IMR5^rGEMCI²⁰ ist allerdings keine MDR1-Expression zu sehen (siehe 2.6.4). Der Effekt von Verapamil beruht in diesen Zellen sehr wahrscheinlich darauf, dass Verapamil neben MDR1 noch weitere ABC-Transporter beeinflusst. Ein potentieller Kandidat ist MRP1, da MRP1 auch Vincristin transportieren kann und in Neuroblastomen vermehrt exprimiert wird.^{16,18,22} Der MDR1-Inhibitor Zosuquidar verringert den IC₅₀-Wert für Vincristin nur in den viel MDR1-exprimierenden Zellen IMR5^rDOXO²⁰ und IMR5^rVCR¹⁰ signifikant.

In MTT-Tests mit Doxorubicin (Tabelle 9, Abbildung 12) verringert Verapamil den IC₅₀-Wert nur in den MDR1-exprimierenden Zellen IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰, IMR5^rDOXO²⁰ und IMR5^rVCR¹⁰ signifikant. Zosuquidar verringert den IC₅₀-Wert nur in den viel MDR1-exprimierenden Zellen IMR5^rDOXO²⁰ und IMR5^rVCR¹⁰, nicht jedoch in der nur gering MDR1-exprimierenden Zelle IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰. Somit zeigt sich für Zosuquidar die eindeutige MDR1-Spezifität.

Die erworbene Resistenz in IMR5^{VCR}¹⁰ und IMR5^{DOXO}²⁰ gegenüber Vincristin und Doxorubicin lässt sich somit auf die Expression von MDR1 zurückführen. Vincristin und Doxorubicin sind derzeit wesentlicher Bestandteil einzelner Chemotherapie-Zyklen in der Mittel- und Hochrisiko-Neuroblastom-Therapie.⁹

In MTT-Tests mit Cisplatin und Gemcitabin zeigte erwartungsgemäß keine der IMR5-Sublinien eine Veränderung des IC₅₀-Wertes gegen Cisplatin oder Gemcitabin unter der Zugabe von Verapamil oder Zosuquidar, da beide Cytostatika nicht als Substrat von ABC-Transportern beschrieben sind (Tabelle 8, Abbildung 11).

Zusammenfassend verdeutlichen die Experimente die Bedeutung von MDR1 in der humanen Neuroblastomzelllinie IMR5 bei der Vermittlung von Chemoresistenz und der Bildung von Kreuzresistenzen. Die prognostische Relevanz der MDR1-Expression im Neuroblastom ist jedoch unklar. Haber et al. konnten zeigen, dass eine hohe Expression von MDR1 bei älteren Neuroblastompatient*innen (bei Diagnose über 12 Monate) unabhängig vom MYCN-Status mit einer schlechteren Prognose einhergeht, während dieser Zusammenhang bei Patient*innen unter 12 Monaten nicht zutrifft.⁹⁰ In früheren Studien hingegen konnte kein Zusammenhang zwischen MDR1-Expression und Prognose gezeigt werden.⁹¹ Nur wenige Neuroblastome exprimieren MDR1 bereits bei der Diagnose, eine erhöhte MDR1-Expression konnte jedoch in rezidierten Neuroblastomen nach Chemotherapie und Neuroblastomen des Stadiums 4S nachgewiesen werden.^{92,93} Auch wenn die prognostische Relevanz von MDR1 in Neuroblastomen unklar ist, zeigen die Experimente, dass sich weitere Untersuchungen der Interaktion von MDR1 mit potentiell neuen Substanzen lohnen. Durch die korrekte Wahl eines MDR1-unabhängigen Medikamentes kann eine Unwirksamkeit aufgrund einer MDR1-Expression vermieden werden.

4.2 Keine Beteiligung von p53 an der Entstehung von Chemoresistenz in IMR5

TP53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren. In primären Neuroblastomen treten *TP53*-Mutationen jedoch selten auf. Tweedle et al. zeigten, dass im Verlauf einer Therapie von Neuroblastomen mit Cytostatika *TP53*-Mutationen induziert werden können.²⁸ Da zur Adaptierung die IMR5-Sublinien längere Zeit mit Cytostatika behandelt worden sind, könnten *TP53*-Mutationen auch hier einen Mechanismus der Chemoresistenz darstellen. Im Western Blot zeigen alle Sublinien eine ähnlich starke Expression des p53-Proteins wie IMR5 PAR (Abbildung 9). Um die Funktionalität des p53-Proteins zu überprüfen, wurden MTT-Tests mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3 durchgeführt. Hier zeigen sich 2-fach bis 3-fach erhöhte IC_{50} -Werte für die Sublinien IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰, IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ im Vergleich zu IMR5 PAR (siehe Tabelle 6). IMR5^rGEMCI²⁰ zeigt im Vergleich zu IMR5 PAR keinen erhöhten IC_{50} -Wert gegen Nutlin-3. Alle Werte liegen im Bereich bis 2,3 μ M Nutlin-3. *TP53*-mutierte Zellen zeigen jedoch IC_{50} -Werte im Bereich über 20 μ M und liegen damit um das 20-fache höher als IMR5 PAR.⁸⁸ Die erhöhten Werte in den resistenten IMR5-Sublinien sind zwar signifikant, könnten aber dadurch erklärt werden, dass Nutlin-3 selbst ein Substrat und Inhibitor von MDR1 darstellt. Für Nutlin-3 ist auch eine Interaktion mit dem ABC-Transporter MRP1 beschrieben.^{88,94}

Um eine *TP53*-Mutation als Resistenzmechanismus auszuschließen, wurde eine Sequenzierung des *TP53*-Gens als Auftragsarbeit am Institut für Molekulare Onkologie (AG Stiewe) der Philipps Universität Marburg durchgeführt. IMR5 PAR und die chemoresistenten Sublinien zeigen in den Sequenzierungsdaten keine *TP53*-Mutation und gelten somit als Zellen mit funktionellem Wildtyp-p53 (Tabelle 7). Da alle chemoresistenten Sublinien von IMR5 PAR abstammen, zeigen alle IMR5-Sublinien den gleichen Polymorphismus an Codon 72 für die Aminosäure Arginin (p53-P72 R) anstatt Prolin. Der Polymorphismus an Codon 72 ist der am häufigsten beschriebene Polymorphismus des *TP53*-Gens.⁹⁵ Es ist jedoch unklar, welche Auswirkungen der Polymorphismus für das Risiko von Krebserkrankungen und das Ansprechen auf Therapien hat.^{96,97} Am Beispiel von *TP53*-Mutationen lässt sich die hohe Heterogenität in Neuroblastomen verdeutlichen: In der chemoresistenten Neuroblastomzelllinie UKF-NB3 entwickelte sich während der Adaptierung an Vincristin eine *TP53*-Mutation.⁷⁸

4.3 SAMHD1 als Resistenzfaktor in IMR5

Neben der Funktion als dNTPase und viraler Restriktionsfaktor in HIV wurde SAMHD1 als Resistenz- und Biomarker in der AML für Cytarabin (Ara-C) beschrieben.⁵³ Zunächst wurde gezeigt, dass die verschiedenen IMR5-Sublinien gleiche Mengen an SAMHD1 und pSAMHD1 exprimieren. Da auch die Deoxycytidin-Kinase dCK einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Cytarabin hat, wurde im Western Blot die Expression überprüft. Auch hier zeigt sich, dass sich die IMR5-Sublinien in der dCK-Expression nicht unterscheiden (Abbildung 13). Die Adaptierung hatte somit weder auf die Expression von SAMHD1 und pSAMHD1 noch auf die Expression von dCK einen Einfluss.

Die Funktionalität von SAMHD1 wurde überprüft, um anschließend zu untersuchen, ob SAMHD1 einen Einfluss auf die Resistenz gegen die adaptierten Cytostatika hat. Für die Wirksamkeit von Ara-C ist der Einfluss von SAMHD1 mehrfach beschrieben worden (siehe 1.4). Daher wurde zunächst der ebenfalls beschriebene Abbau von SAMHD1 durch Behandlung mit VPX- *Virus-like particles* (VLPs) überprüft und anschließend im MTT der IC₅₀-Wert gegen Ara-C bestimmt. Als Kontrolle dienten VPR-VLPs, die nicht zum Abbau von SAMHD1 führen.

Mit Western Blots konnte gezeigt werden, dass VPX-VLP in der Lage ist, das SAMHD1-Level in allen IMR5-Sublinien effektiv zu verringern (Abbildung 13). Durch den Abbau von SAMHD1 sinkt auch das Level von phosphoryliertem SAMHD1 (pSAMHD1). Die Behandlung mit VPR-VLPs zeigt keinen Einfluss auf die SAMHD1- und pSAMHD1-Expression. Auch die Expression von dCK wird durch die Behandlung mit VLPs nicht beeinflusst. Zwischen den Zellen zeigen sich zunächst deutliche Unterschiede im IC₅₀-Wert gegen Ara-C. So zeigt IMR5^rVCR¹⁰ auch unter Einbeziehung der hohen Standardabweichung einen 30-fach signifikant höheren IC₅₀-Wert gegen Ara-C als IMR5 PAR, obwohl beide Zellen sehr ähnliche SAMHD1- und dCK-Expressionen aufweisen. Die anderen chemoresistenten Sublinien zeigen ebenfalls signifikant höhere IC₅₀-Werte gegen Ara-C (siehe Tabelle 10). Hier sind wahrscheinlich noch andere Resistenzmechanismen beteiligt, die auf die spezifische Adaptierung zurückzuführen sind.

Nach 24-stündiger Behandlung mit VPX-VLPs und Abbau von SAMHD1 konnte der IC₅₀-Wert für Cytarabin in allen IMR5 Sublinien signifikant gesenkt werden (siehe Tabelle 10). Die Spanne liegt dabei zwischen 9,3-fach in IMR5 PAR und 22-fach in

IMR5^rVCR¹⁰. Interessanterweise ist die Revertierung der Resistenz gegen Ara-C in allen resistenten Sublinien stärker als in IMR5 PAR. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass in den adaptierten Sublinien noch weitere, spezifisch durch die Adaptierung entstandene Mechanismen eine Rolle spielen können. Die Behandlung mit der Negativkontrolle VPR-VLP hat dagegen keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von Ara-C. Die Funktionalität von SAMHD1 konnte also in den IMR5 Sublinien bestätigt werden.

Es wurden bereits mehrere Nukleosidanaloga als Substrate von SAMHD1 identifiziert, unter anderem Fludarabin, Clofarabin und Nelarabin.^{98,99} SAMHD1 baut die Triphosphate dieser Nukleosidanaloga ab und führt somit zu einer Unwirksamkeit der Medikamente und einer Resistenz in den entsprechenden Tumorzellen.¹⁰⁰ Knecht et al. beschrieben *in vivo* die Hydrolyse von Gemcitabintriphosphat durch SAMHD1, allerdings mit geringerer Affinität als zu Cytarabintriphosphat. Im *in vivo* AML-Zellmodell ist hingegen keine Hydrolyse vom Gemcitabin durch SAMHD1 zu beobachten.⁶⁸

Mit MTT-Tests wurde überprüft, ob SAMHD1 in den resistenten IMR5-Sublinien neben der Hydrolyse von Ara-C auch an der Hydrolyse von Gemcitabin beteiligt ist. Zunächst wurde die erworbene Resistenz gegen Gemcitabin in IMR5^rGEMCI²⁰ bestätigt. Die anderen adaptierten resistenten Sublinien zeigen keine Kreuzresistenz gegen Gemcitabin. Insofern ist es nicht überraschend, dass nach der Behandlung mit VPX-VLPs nur in IMR5^rGEMCI²⁰ eine signifikante Abnahme des IC₅₀-Wertes um das 2-fache zu beobachten ist (siehe Tabelle 11). In den anderen Zellen ist keine Abnahme des IC₅₀-Wertes gegen Gemcitabin nach VPX-VLP Behandlung zu beobachten. Nach Behandlung mit der Negativkontrolle VPR-VLP verändern sich die Werte nicht.

Dass SAMHD1 Gemcitabin *in vitro* hydrolysiert, jedoch nicht *in vivo* könnte an der Tatsache liegen, dass an der Regulation von Gemcitabin mehrere Enzyme beteiligt sind, während SAMHD1 als der Hauptregulator von Cytarabin gilt.^{68,101} Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass es für die Funktion von SAMHD1 einen Unterschied macht, ob keine Resistenz oder bereits eine erworbene Resistenz gegen Gemcitabin (wie bei IMR5^rGEMCI²⁰) oder gegen ein anderes Cytostatikum vorliegt.

Neben der Funktion als dNTPase wird eine Beteiligung von SAMHD1 an der DNA-Schadensantwort und Reparatur von Doppelstrangbrüchen diskutiert.^{51,72}

Dafür wurden für die resistenten IMR5-Sublinien MTT-Tests mit dem DNA-schädigenden Cytostatikum Topotecan durchgeführt. Topotecan verursacht als Hemmstoff der Topoisomerase-1 DNA-Einzelstrangbrüche. Während einer erneuten Replikation entstehen daraus DNA-Doppelstrangbrüche, die über die homologe Rekombination repariert werden. SAMHD1 ist über das *CtBP-Interacting Protein* (CtIP) an der DNA-Endresektion beteiligt, einem wichtigen Schritt der homologen Rekombination.^{51,72}

Nach einer Behandlung mit VPX-VLPs und der damit verbundenen Degradation von SAMHD1 könnte eine Sensitivierung der IMR5-Sublinien gegenüber Topotecan stattfinden. Dieser Effekt konnte allerdings in keiner Sublinie beobachtet werden (Tabelle 12): Alle Sublinien sind nach VPX-VLPs Behandlung genauso sensitiv wie die Kontrollen nach VPR-VLP Behandlung. Die Degradierung von SAMHD1 zeigt also keinen Effekt auf die Toxizität von Topotecan. Ausnahmen zeigen sich in der Kontrollbehandlung mit VPR-VLPs: IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ und IMR5^rGEMCI²⁰ zeigen eine statistisch signifikante Reduzierung des IC₅₀-Wertes um die Hälfte im Vergleich zu Topotecan alleine. Da VPR-VLPs – wie in 3.3 dargestellt – keinen Einfluss auf die SAMHD1-Expression haben, können diese signifikanten Werte als synergistischer Effekt von VPR-VLPs und DNA-schädigenden Cytostatika gesehen werden (siehe 4.5). Interessant ist auch, dass die IC₅₀-Werte für Topotecan alleine bei allen Zellen in einem Bereich unter 5 ng/ml liegen, unabhängig an welchen Stoff die Sublinien adaptiert wurden. Eine Kreuzresistenz gegen Topotecan ist also nach der Adaptierung nicht aufgetreten. Eine Beteiligung von SAMHD1 an der Regulation der DNA-Schadensantwort konnte hier nicht gezeigt werden.

4.4 Anwendung von PARP-Inhibitoren in IMR5

PARP-Inhibitoren sind besonders wirksam in Tumoren mit fehlerhafter homologer Rekombination wie *Breast Cancer* (BRCA) – mutierten Brust- und Ovarialkarzinomen. Die Expression und Inhibierung von PARP-Enzymen im humanen Neuroblastom ist derzeit Gegenstand der Forschung. Colicchia et al. zeigten, dass MYCN-amplifizierte Neuroblastomzellen viel PARP1 und PARP2 exprimieren und eine hohe PARP-Expression einen negativen prognostischen Faktor in Neuroblastomen darstellt.¹⁰²

Als MYCN-amplifizierte Neuroblastomzellen mit hoher PARP-Expression (siehe Abbildung 9) eignen sich die IMR5-Sublinien als Zellmodell zur Testung von PARP-Inhibitoren. Im Western Blot zeigen die IMR5-Sublinien alle ein ähnliches Expressionsmuster für PARP. Um die Abhängigkeit der PARP-Inhibitoren von MDR1 zu überprüfen, wurden die MTTs auch in Kombination mit Verapamil angesetzt.

Für Olaparib und Rucaparib ergibt sich ein ähnliches Bild. Alle IC₅₀-Werte bewegen sich unter 10 µM, IMR5^rGEMCI²⁰ zeigt für beide Substanzen ähnliche Werte wie IMR5 PAR. Bei Olaparib liegt der IC₅₀-Wert von IMR5^rGEMCI²⁰ sogar signifikant unter dem von IMR5 PAR. Hier führt die Resistenz gegen Gemcitabin zu einer Hypersensitivität gegen Olaparib. Die Kombination mit Verapamil führt in IMR5 PAR und IMR5^rGEMCI²⁰ nicht zur Verringerung der IC₅₀-Werte. IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ zeigt deutlich höhere IC₅₀-Werte gegen Olaparib und signifikant höhere gegenüber Rucaparib als IMR5 PAR, die Werte sind aber durch Verapamil nicht beeinflussbar. Durch die Adaptierung an Cisplatin ist eine Kreuzresistenz gegen diese beiden PARP-Inhibitoren entstanden, die unabhängig von MDR1 ist. Die MDR1-exprimierenden Sublinien IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ zeigen gegen Olaparib und Rucaparib signifikant höhere IC₅₀-Werte als IMR5 PAR, hier lässt sich auch eine signifikante Absenkung der Werte bei Kombination mit Verapamil erkennen (Tabelle 13, Abbildung 14). Olaparib und Rucaparib zeigen hier eine klare MDR1-Abhängigkeit.

Niraparib zeigt zwischen den Zellen die geringsten Unterschiede. Die IC₅₀-Werte liegen generell niedriger als bei Olaparib und Rucaparib (unter 2 µM). In keiner der chemoresistenten IMR5-Sublinien wird ein signifikanter Unterschied zur chemosensitiven IMR5 PAR deutlich. Die Kombination mit Verapamil zeigt bei keiner Sublinie eine signifikante Wirkung (Tabelle 14, Abbildung 15A). Niraparib wirkt also unabhängig der erworbenen Resistenz und des MDR1-Status in allen Sublinien gleich stark.

Talazoparib wurde in der Literatur aufgrund der starken *PARP-Trapping* Aktivität als wirksamster PARP-Inhibitor beschrieben und wirkt in den IMR5-Sublinien bereits im niedrigen nM-Bereich (alle Werte unter 50 nM). Talazoparib ist hier mit Abstand der wirksamste PARP-Inhibitor und wirkt 500 bis 1000-fach stärker als die drei anderen Inhibitoren. Wie bei Olaparib und Rucaparib zeigt IMR5^rGEMCI²⁰ einen ähnlichen Wert gegen Talazoparib wie IMR5 PAR. IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ zeigt einen signifikant höheren IC₅₀-Wert gegen Talazoparib als IMR5 PAR, der Wert lässt sich aber durch Verapamil nicht

beeinflussen. Die MDR1-exprimierenden Sublinien IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ weisen gegen Talazoparib ebenfalls deutlich höhere IC₅₀-Werte als IMR5 PAR auf, bei der Kombination mit Verapamil ist in IMR5^rVCR¹⁰ und IMR5^rDOXO²⁰ auch für Talazoparib eine signifikante Abnahme des IC₅₀-Wertes zu beobachten (Tabelle 14, Abbildung 15B).

Die PARP-Inhibitoren Olaparib, Rucaparib und Talazoparib sind als Substrate von MDR1 bekannt.^{103,104,105} Eine Kreuzresistenz von MDR1-exprimierenden Prostatakrebszellen gegenüber Olaparib wurde durch Lombard et al. beschrieben.¹⁰⁶

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der PARP-Inhibitoren Olaparib, Rucaparib und Talazoparib von MDR1 im Neuroblastommodell bestätigt. IMR5^rDOXO²⁰ und IMR5^rVCR¹⁰ zeigen als Sublinien mit hoher MDR1-Expression jeweils signifikant höhere Werte gegenüber den MDR1-abhängigen PARP-Inhibitoren.

Der Einfluss von MDR1 auf die Wirksamkeit einzelner PARP-Inhibitoren macht deutlich, dass durch die optimale Wahl des PARP-Inhibitors eine Kreuzresistenz umgangen werden kann. In MDR1-exprimierenden Tumoren könnte ein PARP-Inhibitor gewählt werden, der unabhängig von MDR1 wirksam wird. Niraparib zeigt keine Abhängigkeit von MDR1 und wirkt auch unabhängig der zuvor erworbenen Resistenz in allen Sublinien im gleichen Wirkungsbereich. Somit ist Niraparib ein besonders interessanter Kandidat für die klinische Anwendung, da es unabhängig einer zuvor verabreichten Therapie seine Wirksamkeit behält.

Ein interessantes Bild ergibt sich für IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰: Gegen alle vier getesteten PARP-Inhibitoren zeigt diese Zelle höhere IC₅₀-Werte als IMR5 PAR, signifikant höher waren die Werte bei Rucaparib und Talazoparib (Tabelle 13, Tabelle 14). IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ exprimiert im Westen Blot und im Durchflusszytometer durchaus MDR1, aber Verapamil hat keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der PARP-Inhibitoren. Die entstandenen Kreuzresistenzen gegen die PARP-Inhibitoren sind in IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ demnach unabhängig von MDR1.

Platinverbindungen führen zu *DNA-Crosslinks*, die im Verlauf zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen. Ähnlich wie PARP-Inhibitoren sind Platinverbindungen deshalb besonders in Tumoren mit fehlerhafter homologer Rekombination, wie BRCA-mutierten Tumoren, wirksam. Da Platinverbindungen und PARP-Inhibitoren direkt an

der DNA wirken, überschneiden sich auch die Resistenzmechanismen: Die gemeinsamen Resistenzmechanismen beruhen zum großen Teil auf der Wiederherstellung einer funktionierenden DNA-Doppelstrangreparatur über die homologe Rekombination. Beispiele hierfür sind Zweitmutationen im BRCA-Gen, die die Funktionalität des BRCA-Proteins wiederherstellen, oder eine Aktivierung der homologen Rekombination unabhängig von BRCA.^{107,108}

Die in IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ entstandenen Kreuzresistenzen gegenüber anderen PARP-Inhibitoren beruhen demnach wahrscheinlich auf Mechanismen der DNA-Reparatur. Da in klinischen Studien Patient*innen mit platinsensitiven Tumoren besser auf PARP-Inhibitoren ansprechen, wurden PARP-Inhibitoren zu Beginn vor allem zur Erhaltungstherapie von platinsensitiven Tumoren zugelassen.¹⁰⁹ Die hier erhobenen Daten bestätigen, dass nach einer Therapie mit Cisplatin eine weitere Therapie mit PARP-Inhibitoren klinisch nicht sinnvoll ist.

4.5 Etablierung und Charakterisierung von IMR5^rOLAPARIB²⁰

Im Verlauf der Arbeit wurde durch konstante Adaptierung der chemosensitiven Zelle IMR5 PAR an 20 µM Olaparib die neue chemoresistente Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ etabliert. Im letzten Abschnitt der Arbeit wurden einige Versuche an dieser neuen Sublinie wiederholt. Dabei wurde stets auch IMR5 PAR verwendet, um die Daten von IMR5^rOLAPARIB²⁰ mit den zuvor erhobenen Daten in Bezug setzen zu können.

Die erworbene Resistenz von IMR5^rOLAPARIB²⁰ wurde im MTT-Test bestätigt: Der IC₅₀-Wert liegt für Olaparib im Bereich um 40 µM und damit 25-fach höher als IMR5 PAR (Tabelle 15, Abbildung 16). Auch für die anderen PARP-Inhibitoren weist IMR5^rOLAPARIB²⁰ die höchsten IC₅₀-Werte der IMR5-Sublinien auf. Für Rucaparib liegt der IC₅₀-Wert mit 6,7 µM etwa 5-fach höher als der IC₅₀-Wert für IMR5 PAR. Für Niraparib liegt der IC₅₀-Wert mit 3,8 µM etwa 10-fach über dem IC₅₀-Wert von IMR5 PAR. Die stärkste Resistenzentwicklung zeigt sich gegenüber Talazoparib: Der IC₅₀-Wert liegt mit 16 µM/ml etwa 30000-fach über dem IC₅₀-Wert von IMR5 PAR. In IMR5^rOLAPARIB²⁰ ist damit Niraparib der wirksamste PARP-Inhibitor.

Bei den durchgeführten MTTs ist auffällig, dass die an Olaparib-adaptierte Zelle IMR5^rOLAPARIB²⁰ gegen alle vier getesteten PARP-Inhibitoren signifikant höhere IC₅₀-

Werte als IMR5 PAR aufweist, Verapamil aber keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der PARP-Inhibitoren hat. Da somit kein Hinweis auf eine MDR1-Expression in IMR5^rOLAPARIB²⁰ vorlag, wurde diese nicht mehr speziell untersucht.

Wie in 4.4 beschrieben, ist MDR1 in der Lage, Olaparib zu transportieren. Eine MDR1-Expression durch Adaption an Olaparib wurde als möglicher Resistenzmechanismus in Ovarkrebszellen von Vaidyanathan et al. beschrieben.¹¹⁰

In IMR5^rOLAPARIB²⁰ scheint es durch die Adaption an Olaparib jedoch nicht zu einer MDR1-Expression zu kommen. In IMR5^rOLAPARIB²⁰ ist also eine Kreuzresistenz zu den anderen PARP-Inhibitoren entstanden, die sehr wahrscheinlich unabhängig von MDR1 ist.

In Western Blots zeigt IMR5^rOLAPARIB²⁰ keine wesentlichen Unterschiede in der Expression von dCK, SAMHD1, pSAMHD1 und p53 im Vergleich zu IMR5 PAR. Eine p53-Mutation als Chemoresistenzmechanismus konnte in allen IMR5-Sublinien durch eine TP53-Gensequenzierung ausgeschlossen werden (Tabelle 7). Auffällig im Western Blot ist die geringere PARP-Expression von IMR5^rOLAPARIB²⁰ im Vergleich mit IMR5 PAR (siehe Abbildung 17).

Eine verringerte Expression von PARP1 ist als möglicher Resistenzmechanismus gegenüber PARP-Inhibitoren in der Literatur beschrieben. In Abwesenheit von PARP entstehen weniger PARP-DNA Komplexe, die die DNA-Replikation stören.^{111,112}

Der Resistenzmechanismus in der hier vorgestellten Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ scheint also eine stark verminderte PARP-Expression zu sein. Insofern ist es passend, dass IMR5^rOLAPARIB²⁰ eine hohe Resistenz gegenüber Talazoparib, dem PARP-Inhibitor mit der stärksten PARP-Trapping Aktivität, aufweist (siehe Tabelle 15).

Für SAMHD1 wird eine Beteiligung an der DNA-Reparatur im Rahmen der homologen Rekombination diskutiert.⁷² PARP-Inhibitoren sind wie Topotecan (siehe 4.3) eine weitere Stoffklasse, die DNA-Doppelstrangbrüche induzieren. Durch die Degradation von SAMHD1 mit VPX-VLPs sollte bei der Beteiligung von SAMHD1 an der DNA-Reparatur die Toxizität der PARP-Inhibitoren erhöht werden und der IC₅₀-Wert entsprechend sinken. Zur Kontrolle wurden zusätzlich MTTs mit VPR-VLPs angesetzt. Die Degradierung von SAMHD1 durch Vorbehandlung mit VPX-VLPs wurde zunächst im Western Blot bestätigt (Abbildung 17).

Nach der Behandlung mit VPX-VLPs zeigt sich eine deutliche Abnahme des IC₅₀-Wertes für Ara-C in IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ (Tabelle 16A). IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ exprimieren also beide funktionales SAMHD1, die Degradierung von SAMHD1 durch VPX-VLPs zeigt sich bei der erhöhten Sensitivität gegen Cytarabin.

Durch die SAMHD1-Degradation mit VPX-VLPs lässt sich (wie bei Topotecan unter 3.3) jedoch kein Einfluss auf die Toxizität der PARP-Inhibitoren Olaparib, Niraparib, Rucaparib und Talazoparib in IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ feststellen. Die umgekehrte Schlussfolgerung, dass SAMHD1 nicht an der DNA-Reparatur beteiligt ist, kann jedoch nicht gezogen werden. An der homologen Rekombination sind viele andere Enzyme beteiligt, die möglicherweise die Funktion von SAMHD1 übernehmen.¹¹³ Um die Beteiligung von SAMHD1 an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen genauer zu untersuchen, müssten weitere spezifischere Assays durchgeführt werden.

In diesem Experiment konnte nochmal bestätigt werden, dass Talazoparib der wirksamste der vier getesteten PARP-Inhibitoren in der chemosensitiven Zelle IMR5 PAR ist. In IMR5^rOLAPARIB²⁰ liegt durch die Adaption an Olaparib der IC₅₀-Wert gegen Talazoparib um das 10000-fache höher im µM-Bereich (siehe Tabelle 16E). Da diese Versuche separat von den Versuchen unter 3.4.1 angesetzt wurden, unterscheiden sich die ermittelten IC₅₀-Werte etwas zwischen den einzelnen Ansätzen, die Tendenz der Wirksamkeit der PARP-Inhibitoren bleibt aber bestehen.

Auffällig ist die höhere Resistenz von IMR5^rOLAPARIB²⁰ gegenüber Cytarabin: Die an Olaparib-adaptierte Zelle zeigt einen signifikant doppelt so hohen IC₅₀-Wert gegenüber Ara-C wie IMR5 PAR.

Wang et al. beschrieben eine erhöhte SAMHD1-Expression in an PARP-Inhibitoren adaptierte Glioblastomzellen, wodurch eine Resistenz gegenüber Cytarabin (Ara-C) entsteht. Ein Knockout von SAMHD1 in den adaptierten Zellen stellt die Sensitivität gegenüber Ara-C wieder her, während der SAMHD1 Knock-Out keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren zeigt.¹¹⁴

In den erhobenen Daten für IMR5^rOLAPARIB²⁰ sind also vergleichbare Effekte festzustellen: Durch die Adaption an Olaparib zeigt sich in IMR5^rOLAPARIB²⁰ eine erhöhte Resistenz gegenüber Ara-C. Die Depletion von SAMHD1 mit VPX-VLPs sensitiviert IMR5^rOLAPARIB²⁰ wieder für Ara-C, hat jedoch keinen Einfluss auf die

Toxizität von PARP-Inhibitoren. Im Western Blot lässt sich zudem eine gering erhöhte SAMHD1-Expression für IMR5^rOLAPARIB²⁰ erkennen (Abbildung 17). Die beobachteten Effekte auf die Wirksamkeit von Ara-C in IMR5^rOLAPARIB²⁰ sind signifikant, aber vergleichsweise gering ausgeprägt: IMR5^rOLAPARIB²⁰ zeigt einen doppelt so hohen Wert gegen Ara-C, während die anderen IMR5-Sublinien nach Adaption an das jeweilige Cytostatikum einen 3- bis 20-fach erhöhten IC₅₀-Wert gegen Ara-C zeigen (Tabelle 10). Die verstärkte Expression von SAMHD1 durch Adaption an PARP-Inhibitoren könnte einen möglichen Resistenzmechanismus in Neuroblastomzellen gegenüber Cytarabin darstellen, der mit weiteren Studien untersucht werden sollte.

Interessanterweise zeigt sich in der Kombination von PARP-Inhibitoren und VPR-VLPs eine erhöhte Toxizität: In IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ reduziert sich durch die Zugabe von VPR-VLPs der IC₅₀-Wert gegenüber jedem PARP-Inhibitor (auch trotz teils hoher Standardabweichungen) signifikant. Am stärksten zeigt sich der Effekt für IMR5^rOLAPARIB²⁰ und Talazoparib: Hier sinkt der IC₅₀-Wert durch VPR-VLPs um das 20-fache. Für Olaparib, Niraparib und Rucaparib zeigt sich in IMR5^rOLAPARIB²⁰ eine Reduktion des IC₅₀-Wertes um ungefähr die Hälfte. In IMR5 PAR zeigt sich durch VPR-VLPs gegen Niraparib und Rucaparib eine 7-fache Reduktion des IC₅₀-Wertes, gegen Olaparib eine etwa 5-fache Reduktion und gegenüber Talazoparib eine Reduktion um etwa die Hälfte (siehe Tabelle 16).

In den IMR5-Sublinien zeigt sich unter Zugabe von VPR-VLPs in Kombination mit Ara-C und Gemcitabin weder für IMR5 PAR noch für die chemoresistenten Sublinien ein starker Effekt auf den IC₅₀-Wert (Tabelle 10, Tabelle 11). Für Topotecan zeigt sich jedoch in IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ und IMR5^rGEMCI²⁰ in Kombination mit VPR-VLPs eine signifikante Abnahme des IC₅₀-Wertes um die Hälfte. Da VPR-VLPs auch in Kombination mit allen vier PARP-Inhibitoren eine signifikante Reduktion des IC₅₀-Wertes in IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ bewirken, kann hier von einem synergistischen Effekt von direkt DNA-schädigenden Cytostatika und VPR-VLPs ausgegangen werden.

VPR-VLPs wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen aufgrund der proapoptotischen Wirkung und des G2-Zellzyklusarrest als potentiell wirksames Cytostatikum identifiziert.^{61,62} Zhao et al. beschrieben unter anderen eine Wirksamkeit von VPR-VLPs in Doxorubicin-resistenten und chemosensitiven Neuroblastomzellen.¹¹⁵

Muthumani et al. konnten zeigen, dass VPR-VLPs in Verbindung mit dem Glucocorticoid-Rezeptor PARP1 komplexieren. Durch diesen Komplex wird PARP1 am Transport in den Zellkern gehindert.¹¹⁶ Da PARP1 an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist, könnten so DNA-Schäden akkumulieren und die Toxizität von PARP-Inhibitoren und Topotecan durch VPR-VLPs zusätzlich erhöht werden.¹¹⁷ Zusätzlich können VPR-VLPs direkt DNA-Doppelstrangbrüche induzieren, die in Kombination mit PARP-Inhibitoren nicht mehr repariert werden können.⁶⁰

Die Kombination mit VPR-VLPs zeigt sowohl in IMR5 PAR (starke PARP-Expression) als auch in IMR5^rOLAPARIB²⁰ (geringe PARP-Expression) deutliche Wirkung. Die hier festgestellte Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren und VPR-VLPs unabhängig von der PARP-Expression ist ein interessanter Aspekt, dessen klinischer Nutzen und Einsatzmöglichkeiten in weiteren Arbeiten näher untersucht werden sollte. Hier könnten sich neue Therapiemöglichkeiten bei Therapie-resistenten Neuroblastomen ergeben.

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der am häufigsten vorkommende extrakranielle solide Tumor im Kindesalter. Der klinische Verlauf ist sehr heterogen und reicht von spontaner Regression der Erkrankung bis zum Tod trotz intensiver multimodaler Therapie. Vor allem die Prognose des Hochrisiko-Neuroblastoms hat sich in den letzten 20 Jahren kaum verbessert. Nach wie vor versterben 50% der Patient*innen mit Hochrisiko-Neuroblastom trotz intensiver Therapie. Chemoresistenz zählt zu den größten Problemen der heutigen Krebstherapie. In der AG Cinatl am Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikum Frankfurt existiert eine Sammlung von adaptierten chemoresistenten Tumorzelllinien (*Resistant Cancer Cell Line Collection*).

Die humane Neuroblastomzelllinie IMR5 und ihre chemoresistenten Sublinien (adaptiert gegen Cisplatin, Gemcitabin, Vincristin und Doxorubicin) wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst hinsichtlich der Resistenzmechanismen charakterisiert. In IMR5 wurde durch die Adaption an Vincristin und Doxorubicin eine MDR1-Expression induziert, nicht jedoch durch Adaption an Gemcitabin und Cisplatin. MDR1 vermittelt in IMR5 die Kreuzresistenz zwischen Vincristin und Doxorubicin. Anhand der Daten kann von einer Kreuzresistenz der Vincristin und Doxorubicin adaptierten Sublinien zu anderen MDR1-abhängigen Substraten ausgegangen werden. Verapamil wurde zur Revertierung der MDR1-vermittelten Resistenz verwendet. In der Sequenzierung des *TP53*-Gens konnte bei allen IMR5-Sublinien Wildtyp-*TP53* mit dem Polymorphismus P72R bestätigt und somit *TP53*-Mutationen als Resistenzmechanismus ausgeschlossen werden. Auch gegen den MDM2-Inhibitor und p53-Aktivator Nutlin-3 zeigen die resistenten Sublinien keine signifikanten Unterschiede. Die Adaptierung hat in keiner Sublinie zu *TP53*-Mutationen geführt.

Des Weiteren wurde die Wirksamkeit von vier PARP-Inhibitoren (Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Talazoparib) in den resistenten IMR5-Sublinien getestet. Talazoparib zeigt sich dabei als der wirksamste PARP-Inhibitor mit IC_{50} -Werten im nM-Bereich. Eine Kreuzresistenz der MDR1-exprimierenden Sublinien IMR5^{VCR}¹⁰ und IMR5^{DOXO}²⁰ zu den als MDR1-Substraten bekannten PARP-Inhibitoren Olaparib, Rucaparib und Talazoparib konnte ebenfalls nachgewiesen und auf die MDR1-Expression zurückgeführt werden. Auffällig ist die gleich starke Wirksamkeit von Niraparib in allen Sublinien,

unabhängig von der Adaption und des MDR1-Status der jeweiligen IMR5-Sublinie. Niraparib ist somit sehr interessant für die klinische Anwendung.

IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ zeigt trotz nur geringer MDR1-Expression eine signifikante Kreuzresistenz gegen Rucaparib und Talazoparib. Verapamil zeigt an IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ keine Veränderung der Wirksamkeit der PARP-Inhibitoren. In IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ ist die Kreuzresistenz gegen PARP-Inhibitoren also MDR1-unabhängig. IMR5^rGEMCI²⁰ zeigt dagegen gegen alle PARP-Inhibitoren die gleiche Sensitivität wie IMR5 PAR, gegen Olaparib sogar eine Hypersensitivität.

Die Trinukleotidreduktase SAMHD1 ist als Resistenzmechanismus gegenüber Cytarabin und möglicher Biomarker der AML bekannt. Auch in der Neuroblastomzelllinie IMR5 konnte durch den Abbau von SAMHD1 mit VPX-VLPs die Wirksamkeit des Nukleosidanalogs Cytarabin erhöht werden. Die Wirksamkeit des Nukleosidanalogs Gemcitabin konnte durch den Abbau von SAMHD1 in den IMR5-Sublinien nicht erhöht werden. Eine Beteiligung von SAMHD1 an der Hydrolyse von Gemcitabin konnte somit nicht nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine Beteiligung von SAMHD1 an der DNA-Reparatur nicht bestätigt werden: Durch den Abbau von SAMHD1 wurde die Wirksamkeit von DNA-schädigenden Cytostatika wie Topotecan und PARP-Inhibitoren nicht erhöht.

Im Verlauf der Arbeit wurde zusätzlich die Olaparib-resistente Sublinie IMR5^rOLAPARIB²⁰ etabliert. Die erworbene Resistenz gegen Olaparib wurde bestätigt, die Zelle zeigt zusätzlich eine MDR1-unabhängige Kreuzresistenz zu Niraparib, Rucaparib und Talazoparib. Die Resistenz beruht wahrscheinlich auf der verminderten Expression von PARP. In IMR5^rOLAPARIB²⁰ erhöht der Abbau von SAMHD1 mit VPX-VLPs wie erwartet die Wirksamkeit von Cytarabin, zeigt aber keinen Einfluss auf die Toxizität von PARP-Inhibitoren. Erstaunlicherweise konnte eine erhöhte Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren in Kombination mit VPR-VLPs in IMR5 PAR und IMR5^rOLAPARIB²⁰ gezeigt werden. PARP-Inhibitoren werden bereits bei soliden Tumoren wie Eierstock- und Brustkrebs eingesetzt und könnten in Kombination mit VPR-VLPs eine weitere Therapiemöglichkeit des Neuroblastoms sein.

Summary

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumour in childhood. The clinical course is very heterogeneous and ranges from spontaneous regression of the disease to death despite intensive multimodal therapy. Above all, the prognosis of high-risk neuroblastoma has hardly improved in the last 20 years. As before, 50% of the patients with high-risk neuroblastoma die despite intensive therapy. Chemoresistance is one of the most serious problems in cancer therapy today. A collection of adapted chemoresistant tumour cell lines (Resistant Cancer Cell Line Collection) exists in the AG Cinatl at the Institute of Medical Virology at the University Hospital Frankfurt.

The human neuroblastoma cell line IMR5 and its chemoresistant sublines (adapted against cisplatin, gemcitabine, vincristine and doxorubicin) were characterised in the present work with regard to the resistance mechanisms. In IMR5, MDR1 expression was induced by adaptation to vincristine and doxorubicin, but not by adaptation to gemcitabine and cisplatin. MDR1 mediates cross-resistance between vincristine and doxorubicin. Based on the data, cross-resistance of vincristine and doxorubicin adapted sublines to other MDR1-dependent substrates can be assumed. Verapamil was used to revert MDR1-mediated resistance. Sequencing of the TP53 gene confirmed wild-type TP53 with the P72R polymorphism in all IMR5 sublines, thus excluding TP53 mutations as a resistance mechanism. The resistant sublines also show no significant differences against the MDM2 inhibitor and p53 activator Nutlin-3. Adaptation did not lead to TP53 mutations in any subline.

Furthermore, the efficacy of four PARP inhibitors (olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib) was tested in the resistant IMR5 sublines. Talazoparib is the most effective PARP inhibitor with IC_{50} values in the nM range. Cross-resistance of the MDR1-expressing sublines IMR5^{VCR}¹⁰ and IMR5^{DOXO}²⁰ to the PARP inhibitors olaparib, rucaparib and talazoparib, which are known to be MDR1 substrates, was also shown and could be attributed to MDR1 expression. The equally strong efficacy of niraparib in all sublines was striking, regardless of the adaptation and MDR1 status of the respective IMR5 subline. Niraparib is therefore very interesting for clinical application. IMR5^{rCDDP}¹⁰⁰⁰ shows significant cross-resistance to rucaparib and talazoparib despite low MDR1 expression. Verapamil shows no change for PARP inhibitor efficacy in

IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰. Therefore, IMR5^rCDDP¹⁰⁰⁰ shows MDR1 independent cross-resistance to PARP inhibitors. In contrast, IMR5^rGEMCI²⁰ shows the same sensitivity to all PARP inhibitors as IMR5 PAR, and even hypersensitivity to olaparib.

The trinucleotide reductase SAMHD1 is known as a resistance mechanism to cytarabine and a possible biomarker of AML. In the neuroblastoma cell line IMR5 the efficacy of the nucleoside analogue cytarabine was increased through the degradation of SAMHD1 with VPX-VLPs. The efficacy of the nucleoside analogue gemcitabine could not be increased by SAMHD1 degradation in the IMR5 sublines. An involvement of SAMHD1 in the hydrolysis of gemcitabine could not be shown. Furthermore, an involvement of SAMHD1 in DNA repair could not be confirmed: The degradation of SAMHD1 did not increase the efficacy of DNA-damaging cytostatic drugs such as topotecan and PARP inhibitors.

During this thesis, the olaparib-resistant subline IMR5^rOLAPARIB²⁰ was established. The acquired resistance to olaparib was confirmed, the adapted cell line additionally shows MDR1-independent cross-resistance to niraparib, rucaparib and talazoparib. The resistance is most probably due to the reduced expression of PARP. In IMR5^rOLAPARIB²⁰, degradation of SAMHD1 with VPX-VLPs increases the efficacy of cytarabine as expected but shows no effect on the toxicity of PARP inhibitors. Surprisingly, increased efficacy of PARP inhibitors has been shown in combination with VPR-VLPs in IMR5 PAR and IMR5^rOLAPARIB²⁰. PARP inhibitors are already used in solid tumours such as ovarian and breast cancer and could in combination with VPR-VLPs be another therapeutic option for neuroblastoma.

Literatur

1. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res.* 2018;372(2):195-209.
2. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(3):203-216.
3. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet.* 2007;369(9579):2106-2120.
4. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature.* 2008;455(7215):930-935.
5. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 1993;11(8):1466-1477.
6. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):298-303.
7. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):289-297.
8. Simon Thorsten. S1-Leitlinie 025-008 Neuroblastom.
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-008l_S1_Neuroblastom_2019-07_01.pdf.
9. Simon T, Hero B, Schulte JH, et al. 2017 GPOH Empfehlungen für Diagnostik und Therapie von Patienten mit neuroblastischen Tumoren. *Klin Padiatr.* 2017;229(3):147-167.
10. Keyel ME, Reynolds CP. Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: development and place in therapy. *Biologics.* 2019;13:1-12.
11. Wilson TR, Longley DB, Johnston PG. Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol.* 2006;17 Suppl 10:x315-24.
12. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005;205(2):275-292.
13. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):48-58.
14. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):219-234.

15. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta*. 1973;323(3):466-483.
16. Alisi A, Cho WC, Locatelli F, Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *Int J Mol Sci*. 2013;14(12):24706-24725.
17. Oue T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies. *J Pediatr Surg*. 2009;44(2):377-380.
18. Haber M, Smith J, Bordow SB, et al. Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(10):1546-1553.
19. Norris MD, Bordow SB, Marshall GM, Haber PS, Cohn SL, Haber M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996;334(4):231-238.
20. Pajic M, Norris MD, Cohn SL, Haber M. The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome. *Cancer Letters*. 2005;228(1-2):241-246.
21. Manohar CF, Bray JA, Salwen HR, et al. MYCN-mediated regulation of the MRP1 promoter in human neuroblastoma. *Oncogene*. 2004;23(3):753-762.
22. Cole SPC. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:95-117.
23. Ledwitch KV, Gibbs ME, Barnes RW, Roberts AG. Cooperativity between verapamil and ATP bound to the efflux transporter P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*. 2016;118:96-108.
24. Dantzig AH, Law KL, Cao J, Starling JJ. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem*. 2001;8(1):39-50.
25. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):714-723.
26. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 2007;6(9):1006-1010.
27. Hosoi G, Hara J, Okamura T, et al. Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer*. 1994;73(12):3087-3093.
28. Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J. Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res*. 2001;61(1):8-13.

29. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 2001;61(16):6185-6193.
30. Xue C, Haber M, Flemming C, et al. p53 determines multidrug sensitivity of childhood neuroblastoma. *Cancer Res.* 2007;67(21):10351-10360.
31. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004;303(5659):844-848.
32. van Maerken T, Ferdinande L, Taideman J, et al. Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(22):1562-1574.
33. O'Sullivan CC, Moon DH, Kohn EC, Lee J-M. Beyond Breast and Ovarian Cancers: PARP Inhibitors for BRCA Mutation-Associated and BRCA-Like Solid Tumors. *Front Oncol.* 2014;4:42.
34. Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res.* 2013;2(3):130-143.
35. Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature.* 2004;431(7011):1011-1017.
36. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(10):1765-1771.
37. Javle M, Curtin NJ. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer.* 2011;105(8):1114-1122.
38. Cortesi L TA. Molecular Mechanisms of PARP Inhibitors in BRCA-related Ovarian Cancer. *J Cancer Sci Ther.* 2013;05(11).
39. Murai J, Huang S-yN, Das BB, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 2012;72(21):5588-5599.
40. Shen Y, Aoyagi-Scharber M, Wang B. Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;353(3):446-457.
41. Murai J, Huang S-yN, Renaud A, et al. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(2):433-443.
42. Kamel D, Gray C, Walia JS, Kumar V. PARP Inhibitor Drugs in the Treatment of Breast, Ovarian, Prostate and Pancreatic Cancers: An Update of Clinical Trials. *Curr Drug Targets.* 2018;19(1):21-37.
43. Nile DL, Rae C, Hyndman IJ, Gaze MN, Mairs RJ. An evaluation in vitro of PARP-1 inhibitors, rucaparib and olaparib, as radiosensitisers for the treatment of neuroblastoma. *BMC Cancer.* 2016;16:621.

44. Norris RE, Adamson PC, Nguyen VT, Fox E. Preclinical evaluation of the PARP inhibitor, olaparib, in combination with cytotoxic chemotherapy in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(1):145-150.
45. Takagi M, Ogawa C, Aoki-Nogami Y, et al. Phase I clinical study of oral olaparib in pediatric patients with refractory solid tumors: study protocol. *BMC Pediatr*. 2019;19(1):31.
46. Jain PG, Patel BD. Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents - A recent update. *Eur J Med Chem*. 2019;165:198-215.
47. Sachdev E, Tabatabai R, Roy V, Rimel BJ, Mita MM. PARP Inhibition in Cancer: An Update on Clinical Development. *Target Oncol*. 2019;14(6):657-679.
48. Zhou P, Wang J, Mishail D, Wang C-Y. Recent advancements in PARP inhibitors-based targeted cancer therapy. *Precis Clin Med*. 2020;3(3):187-201.
49. Majer C, Schüssler JM, König R. Intertwined: SAMHD1 cellular functions, restriction, and viral evasion strategies. *Med Microbiol Immunol*. 2019;208(3-4):513-529.
50. Rice GI, Bond J, Asipu A, et al. Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat Genet*. 2009;41(7):829-832.
51. Clifford R, Louis T, Robbe P, et al. SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood*. 2014;123(7):1021-1031.
52. van Ruiz Haperen VW, Peters GJ. New targets for pyrimidine antimetabolites for the treatment of solid tumours. 2: Deoxycytidine kinase. *Pharm World Sci*. 1994;16(2):104-112.
53. Schneider C, Oellerich T, Baldauf H-M, et al. SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2017;23(2):250-255.
54. Herold N, Rudd SG, Ljungblad L, et al. Targeting SAMHD1 with the Vpx protein to improve cytarabine therapy for hematological malignancies. *Nat Med*. 2017;23(2):256-263.
55. Ahn J, Hao C, Yan J, et al. HIV/simian immunodeficiency virus (SIV) accessory virulence factor Vpx loads the host cell restriction factor SAMHD1 onto the E3 ubiquitin ligase complex CRL4DCAF1. *J Biol Chem*. 2012;287(15):12550-12558.
56. Lim ES, Fregoso OI, McCoy CO, Matsen FA, Malik HS, Emerman M. The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx. *Cell Host Microbe*. 2012;11(2):194-204.

57. Zhao RY, Li G, Bukrinsky MI. Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2011;6(2):216-229.
58. Andersen JL, Le Rouzic E, Planelles V. HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol.* 2008;85(1):2-10.
59. Poon B, Jowett JB, Stewart SA, Armstrong RW, Rishton GM, Chen IS. Human immunodeficiency virus type 1 vpr gene induces phenotypic effects similar to those of the DNA alkylating agent, nitrogen mustard. *J Virol.* 1997;71(5):3961-3971.
60. Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, et al. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 2006;66(2):627-631.
61. Kübler J, Kirschner S, Hartmann L, et al. The HIV-derived protein Vpr52-96 has anti-glioma activity in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2016;7(29):45500-45512.
62. Muthumani K, Lambert VM, Sardesai NY, et al. Analysis of the potential for HIV-1 Vpr as an anti-cancer agent. *Curr HIV Res.* 2009;7(2):144-152.
63. Schaller T, Pollpeter D, Apolonia L, Goujon C, Malim MH. Nuclear import of SAMHD1 is mediated by a classical karyopherin α/β 1 dependent pathway and confers sensitivity to VpxMAC induced ubiquitination and proteasomal degradation. *Retrovirology.* 2014;11:29.
64. Qiao F, Bowie JU. The many faces of SAM. *Sci STKE.* 2005;2005(286):re7.
65. Koharudin LMI, Wu Y, DeLucia M, Mehrens J, Gronenborn AM, Ahn J. Structural basis of allosteric activation of sterile α motif and histidine-aspartate domain-containing protein 1 (SAMHD1) by nucleoside triphosphates. *J Biol Chem.* 2014;289(47):32617-32627.
66. Zhu C, Gao W, Zhao K, et al. Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nat Commun.* 2013;4:2722.
67. Morris ER, Taylor IA. The missing link: allostery and catalysis in the anti-viral protein SAMHD1. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(4):1013-1027.
68. Knecht KM, Buzovetsky O, Schneider C, et al. The structural basis for cancer drug interactions with the catalytic and allosteric sites of SAMHD1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(43):E10022-E10031.
69. Ji X, Tang C, Zhao Q, Wang W, Xiong Y. Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(41):E4305-14.
70. Franzolin E, Pontarin G, Rampazzo C, et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(35):14272-14277.

71. Arnold LH, Groom HCT, Kunzelmann S, et al. Phospho-dependent Regulation of SAMHD1 Oligomerisation Couples Catalysis and Restriction. *PLoS Pathog.* 2015;11(10):e1005194.
72. Daddacha W, Koyen AE, Bastien AJ, et al. SAMHD1 Promotes DNA End Resection to Facilitate DNA Repair by Homologous Recombination. *Cell Rep.* 2017;20(8):1921-1935.
73. Cabello-Lobato MJ, Wang S, Schmidt CK. SAMHD1 Sheds Moonlight on DNA Double-Strand Break Repair. *Trends Genet.* 2017;33(12):895-897.
74. Bukovsky J, Evans A, Tartaglione M, Kennett RH. Selection of variant neuroblastoma cell line which has lost cell surface expression of antigen detected by monoclonal antibody PI153/3. *Somat Cell Mol Genet.* 1985;11(5):517-522.
75. Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res.* 1970;30(8):2110-2118.
76. Manohar CF, Salwen HR, Brodeur GM, Cohn SL. Co-amplification and concomitant high levels of expression of a DEAD box gene with MYCN in human neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995;14(3):196-203.
77. Fischer M, Berthold F. Characterization of the gene expression profile of neuroblastoma cell line IMR-5 using serial analysis of gene expression. *Cancer Letters.* 2003;190(1):79-87.
78. Michaelis M, Rothweiler F, Barth S, et al. Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells. *Cell Death Dis.* 2011;2:e243.
79. Vallo S, Michaelis M, Rothweiler F, et al. Drug-Resistant Urothelial Cancer Cell Lines Display Diverse Sensitivity Profiles to Potential Second-Line Therapeutics. *Transl Oncol.* 2015;8(3):210-216.
80. Michaelis M, Agha B, Rothweiler F, et al. Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. *Sci Rep.* 2015;5:8202.
81. Michaelis M, Voges Y, Rothweiler F, et al. Testing of the Survivin Suppressant YM155 in a Large Panel of Drug-Resistant Neuroblastoma Cell Lines. *Cancers (Basel).* 2020;12(3).
82. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
83. Novus bio. Novus Biologicals Western Blot Handbook.
84. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.

85. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988;48(17):4827-4833.
86. Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen.* 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-35997-2>.
87. Kotchetkov R, Driever P, Cinatl J, et al. Increased malignant behavior in neuroblastoma cells with acquired multi-drug resistance does not depend on P-gp expression. *Int J Oncol.* 2005.
88. Michaelis M, Rothweiler F, Klassert D, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3. *Cancer Res.* 2009;69(2):416-421.
89. Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2015;149:1-123.
90. Haber M, Bordow SB, Haber PS, Marshall GM, Stewart BW, Norris MD. The prognostic value of MDR1 gene expression in primary untreated neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1997;33(12):2031-2036.
91. Favrot M, Combaret V, Goillot E, et al. Expression of P-glycoprotein restricted to normal cells in neuroblastoma biopsies. *Br J Cancer.* 1991;64(2):233-238.
92. Dhooge CRM, Moerloose BMJD, Benoit YCM, van Roy N, Philipp J, Laureys GGM. Expression of the MDR1 gene product P-glycoprotein in childhood neuroblastoma. *Cancer.* 1997;80(7):1250-1257.
93. Bourhis J, Bénard J, Hartmann O, Boccon-Gibod L, Lemerle J, Riou G. Correlation of MDR1 gene expression with chemotherapy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81(18):1401-1405.
94. Chen L, Zhao Y, Halliday GC, et al. Structurally diverse MDM2-p53 antagonists act as modulators of MDR-1 function in neuroblastoma. *Br J Cancer.* 2014;111(4):716-725.
95. Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(2):95-107.
96. Barnoud T, Parris JLD, Murphy ME. Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(7):578-585.
97. Khan MH, Khalil A, Rashid H. Evaluation of the p53 Arg72Pro polymorphism and its association with cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Genet Res (Camb).* 2015;97:e7.
98. Hollenbaugh JA, Shelton J, Tao S, et al. Substrates and Inhibitors of SAMHD1. *PLoS ONE.* 2017;12(1):e0169052.

99. Rothenburger T, McLaughlin K-M, Herold T, et al. SAMHD1 is a key regulator of the lineage-specific response of acute lymphoblastic leukaemias to nelarabine. *Commun Biol.* 2020;3(1):324.
100. Herold N, Rudd SG, Sanjiv K, et al. SAMHD1 protects cancer cells from various nucleoside-based antimetabolites. *Cell Cycle.* 2017;16(11):1029-1038.
101. Ogawa M, Hori H, Ohta T, Onozato K, Miyahara M, Komada Y. Sensitivity to gemcitabine and its metabolizing enzymes in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3485-3493.
102. Colicchia V, Petroni M, Guarguaglini G, et al. PARP inhibitors enhance replication stress and cause mitotic catastrophe in MYCN-dependent neuroblastoma. *Oncogene.* 2017;36(33):4682-4691.
103. Durmus S, Sparidans RW, van Esch A, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1) restrict oral availability and brain accumulation of the PARP inhibitor rucaparib (AG-014699). *Pharm Res.* 2015;32(1):37-46.
104. McCormick A, Swaisland H. In vitro assessment of the roles of drug transporters in the disposition and drug-drug interaction potential of olaparib. *Xenobiotica.* 2017:903-915.
105. Elmeliegy M, Láng I, Smolyarchuk EA, et al. Evaluation of the effect of P-glycoprotein inhibition and induction on talazoparib disposition in patients with advanced solid tumours. *Br J Clin Pharmacol.* 2020;86(4):771-778.
106. Lombard AP, Liu C, Armstrong CM, et al. Overexpressed ABCB1 Induces Olaparib-Taxane Cross-Resistance in Advanced Prostate Cancer. *Transl Oncol.* 2019;12(7):871-878.
107. Lin KK, Harrell MI, Oza AM, et al. BRCA Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(2):210-219.
108. McMullen M, Karakasis K, Madariaga A, Oza AM. Overcoming Platinum and PARP-Inhibitor Resistance in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(6).
109. Fong PC, Yap TA, Boss DS, et al. Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2512-2519.
110. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon A-L, et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer.* 2016;115(4):431-441.
111. Pettitt SJ, Rehman FL, Bajrami I, et al. A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e61520.

112. Li H, Liu Z-Y, Wu N, Chen Y-C, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer*. 2020;19(1):107.
113. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27(3):247-254.
114. Wang Y-T, Yuan B, Chen H-D, et al. Acquired resistance of phosphatase and tensin homolog-deficient cells to poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor and Ara-C mediated by 53BP1 loss and SAMHD1 overexpression. *Cancer Sci*. 2018;109(3):821-831.
115. Zhao RY, Liang D, Li G, Larrimore CW, Mirkin BL. Anti-cancer effect of HIV-1 viral protein R on doxorubicin resistant neuroblastoma. *PLoS ONE*. 2010;5(7):e11466.
116. Muthumani K, Choo AY, Zong W-X, et al. The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1. *Nat Cell Biol*. 2006;8(2):170-179.
117. Mei C, Lei L, Tan L-M, et al. The role of single strand break repair pathways in cellular responses to camptothecin induced DNA damage. *Biomed Pharmacother*. 2020;125:109875.

Anhang

Tabelle 1: Durchflusszytometrischer MDR1 Nachweis in IMR5-Sublinien. Angabe der Werte in Relative Fluorescent Units [RFU]. Siehe Abbildung 10. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Zelllinie	MDR1 Expression [RFU]
IMR5 PAR	0 ± 0
IMR5 ^r CDDP ¹⁰⁰⁰	$66,3 \pm 42,7$
IMR5 ^r GEMCI ²⁰	0 ± 0
IMR5 ^r VCR ¹⁰	$406,3 \pm 9,7$
IMR5 ^r DOXO ²⁰	$626,7 \pm 43,1$

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jindrich Cinatl für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas. Mein besonderer Dank gilt Dr. Florian Rothweiler für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für interdisziplinäre Tumor- und Virusforschung für die schöne und lehrreiche Zeit im Labor. Danke an Marco Bechtel für die geduldige Einarbeitung in die Methoden; Danke an Tamara Rothenburger, Sebastian Grothe, Eva Wagner und Anja Hüttinger für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich bei allen Freunden und Freundinnen, mit denen ich so viel Zeit während des Studiums verbringen konnte. Danke an Franziska Hemler für die Korrektur und Hilfe bei der Zeichensetzung der Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Familie. Danke für die Unterstützung über all die Jahre des Studiums. Danke für euer Vertrauen.

Lebenslauf

Schriftliche Erklärung

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

„Bedeutung von SAMHD1 als Resistenzfaktor im humanen Neuroblastom“

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

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

(Ort, Datum)

(Lukas Engl)