

AUS DER KINDER- UND JUGENDKLINIK ROSTOCK, PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE
DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTORIN: PROF. DR. MED. ALMUT MEYER-BAHLBURG

ZIELGERICHTETE THERAPIE MIT
CYCLIN-ABHÄNGIGEN KINASE-INHIBITOREN IN
KOMBINATION MIT 13-CIS-RETINSÄURE
AM *IN VITRO* NEUROBLASTOM-ZELLMODELL

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

LARISSA CHARLOTTE LECHERMEIER | GEB. AM 21.12.1998 IN BERLIN

AUS LEIPZIG

ROSTOCK | MÄRZ 2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005678

GUTACHTER

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. CARL FRIEDRICH CLASSEN

EINRICHTUNG: KINDER UND JUGENDKLINIK UND POLIKLINIK, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PD DR. RER. NAT. HABIL. CLAUDIA MALETZKI

EINRICHTUNG: INNERE MEDIZIN KLINIK III - HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE, PALLIATIVMEDIZIN,
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. HOLGER LODE

EINRICHTUNG: KLINIK UND POLIKLINIK FÜR KINDER UND JUGENDMEDIZIN, UNIVERSITÄTSMEDIZIN
GREIFSWALD

JAHR DER EINREICHUNG: 2025

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2025

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
I. EINLEITUNG	1
1.1 Neuroblastom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Genetik und Molekularbiologie.....	2
1.1.4 Klinik.....	3
1.1.5 Therapie	4
1.2 Therapieansatz	6
1.2.1 Zielgerichtete Therapie mit CDK-Inhibitoren (CDKi).....	6
1.2.2 Therapie mit 13-cis-Retinsäure (13-cis-RA)	9
1.2.3 Differenzierung als Therapiemechanismus	9
1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zum Einsatz von CDKis bei NB-Zelllinien	10
II. ZIELSETZUNG.....	12
III. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 Material	13
3.1.1 Zelllinien	13
3.1.2 Laborgeräte	14
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.4 Chemikalien.....	16
3.1.5 Medien, Puffer und Lösungen.....	17
3.1.6 Therapeutika.....	18
3.1.7 Antikörper	18
3.1.8 Primer.....	19
3.1.9 Software	19

3.2	Methoden	21
3.2.1	Zellbiologische Methoden	21
3.2.1.1	Zellkultivierung.....	21
3.2.1.2	Ernten und Passagieren der Zellen.....	21
3.2.1.3	Zellzahlbestimmung	21
3.2.1.4	Zellaussaat	22
3.2.1.5	Behandlung der Zellen.....	23
3.2.1.6	Kryokonservierung und Rekultivierung.....	23
3.2.2	Viabilitätsbestimmung	24
3.2.2.1	Konzentrationsreihen mit Fadraciclib	24
3.2.2.2	Kombinationstherapie	24
3.2.3	Immunfluoreszenz	25
3.2.3.1	Differenzierungs- und Stammzellmarker	25
3.2.3.2	Zellzyklusarrest.....	27
3.2.3.3	Zellstress	28
3.2.4	Durchflusszytometrie	28
3.2.4.1	Multidrug-Resistance Proteine	28
3.2.4.2	Apoptose- und Nekrose-Assay	30
3.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	30
3.2.5.1	RNA-Isolation	31
3.2.5.2	Umschreibung in cDNA (Reverse Transkription).....	32
3.2.5.3	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	32
3.3	Statistik	34
IV.	ERGEBNISSE	35
4.1	Wirkung der Monotherapie mit Fadraciclib auf die Zellviabilität.....	35
4.2	Synergistischer Effekt der Kombinationstherapie mit CDKis und 13-cis-RA.....	36
4.3	Untersuchung der Differenzierung auf Proteinebene	38
4.4	Einfluss der Behandlung auf Zellzyklusarrest	42
4.5	Einfluss der Behandlung auf Zellstress.....	45
4.6	Einfluss der Behandlung auf Medikamentenresistenz	48
4.7	Nachweis von apoptotischem und nekrotischem Zelltod.....	49

4.8	Untersuchung der Differenzierung auf Transkriptionsebene	51
V.	DISKUSSION.....	55
5.1	Zytotoxizität der CDKi Mono- und Kombinationstherapie bei NB-Zellen	55
5.2	Differenzierung von NB-Zellen durch CDKi Mono- und Kombinationstherapie.....	59
5.3	CDKis in der klinischen Anwendung	61
5.4	Ausblick.....	63
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	65
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	67
VIII.	ANHANG	79
8.1	Cytochrom C, Calnexin-Immunfluoreszenzfärbung.....	79
8.2	Calreticulinfärbung in der Durchflusszytometrie.....	80
8.3	Präsentationen	81
8.4	Lebenslauf	82
8.5	Danksagung	83
IX.	THESEN	84
X.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	85

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: ZELLZYKLUS UND VERWENDETE CDKis	7
ABBILDUNG 2: LAN-1 ZELLINIE NACH BEHANDLUNG MIT ABEMACICLIB UND DINACICLIB.....	11
ABBILDUNG 3: DIFFERENZIERUNGSMARKER <i>ROBO2</i> UND <i>STMN4</i> NACH CDKI BEHANDLUNG	11
ABBILDUNG 4: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VERWENDETER NB-ZELLINIEN	13
ABBILDUNG 5: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	26
ABBILDUNG 6: ABLAUF TAQMAN qPCR	33
ABBILDUNG 7: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER LAN-1 NACH BEHANDLUNG MIT FADRACICLIB	35
ABBILDUNG 8: DOSIS-WIRKUNGS-KURVEN BEI MONOTHERAPIE MIT FADRACICLIB	36
ABBILDUNG 9: VIABILITÄTSMESSUNG NACH SEQUENTIELLER KOMBINATIONSTHERAPIE DER CDKIS MIT 13-CIS-RA	37
ABBILDUNG 10: KOMBINATIONSINDEX NACH <i>BLISS INDEPENDENCE MODELL</i>	38
ABBILDUNG 11: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ROBO2, STMN4 UND KLF4 AN LAN-1	40
ABBILDUNG 12: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ROBO2, STMN4 UND KLF4 AN CHLA-90.	41
ABBILDUNG 13: QUANTIFIZIERUNG DER ROBO2, STMN4 UND KLF4 FÄRBUNG	42
ABBILDUNG 14: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON P27 NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG	44
ABBILDUNG 15: QUANTIFIZIERUNG DER P27-FÄRBUNG	45
ABBILDUNG 16: EINZELKANÄLE DER CYTOCHROM C, CALNEXIN FÄRBUNG	46
ABBILDUNG 17: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT CYTOCHROM C UND CALNEXIN NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG.....	47
ABBILDUNG 18: QUANTIFIZIERUNG DER CYTOCHROM C, CALNEXIN FÄRBUNG	48
ABBILDUNG 19: MEDIKAMENTENRESISTENZ ASSOZIIERTE PROTEINE	49
ABBILDUNG 20: UNTERSUCHUNG DER APOPTOSE UND NEKROSE	51
ABBILDUNG 21: EXPRESSION VON <i>ROBO2</i> , <i>STMN4</i> UND <i>KLF4</i> NACH BEHANDLUNG.....	53
ABBILDUNG 22: EXPRESSION VON <i>RBFOX3</i> , <i>MAP2</i> , <i>ENO2</i> UND <i>TUBB3</i> NACH BEHANDLUNG...	54
ABBILDUNG 23: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT CYTOCHROM C UND CALNEXIN NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG.....	79
ABBILDUNG 24: CALRETICULIN-TRANSLOKATION NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG.....	80

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: LABORGERÄTE	14
TABELLE 2: VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	15
TABELLE 3: CHEMIKALIEN	16
TABELLE 4: MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	17
TABELLE 5: THERAPEUTIKA.....	18
TABELLE 6: ANTIKÖRPER	18
TABELLE 7: PRIMER.....	19
TABELLE 8: ZELLZAHL UND VERWENDETE PLATTENFORMATE	22
TABELLE 9: KONZENTRATIONEN DER TESTSUBSTANZEN	23
TABELLE 10: ANTIKÖRPER UND GETESTETE VERDÜNNUNGEN	26

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

13-cis-RA	<i>13-cis retinoic acid</i> , 13-cis-Retinsäure
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
APL	Akute Promyelozytenleukämie
BSA	bovines Serumalbumin
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CDK	<i>cyclin-dependant kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
CDKi	<i>cyclin-dependant kinase inhibitor</i> , Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS
CI	<i>combination index</i> , Kombinationsindex
Ct	<i>cycle treshhold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FKS	fetales Kälberserum
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Gy	Gray
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MAF	<i>multidrug resistance activity factor</i> , <i>MDR activity factor</i>
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
NB	Neuroblastom
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung

PI	Propidiumiodid
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RB	Retinoblastom
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
VIP	vasoaktives intestinales Peptid

I. EINLEITUNG

1.1 NEUROBLASTOM

Das Neuroblastom (NB) ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindes- und Jugendalter. Es handelt sich um eine sehr heterogene Erkrankung, sowohl biologisch als auch in Bezug auf den klinischen Verlauf. Junge Patient:innen in niedrigen Risikostadien haben eine Überlebensrate von über 90 % mit häufiger spontaner Regression oder Heilung durch minimale Therapie, während bei älteren Patient:innen und in Hochrisikostadien die Prognose trotz Behandlung deutlich schlechter ist (1,2).

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Das NB macht in Deutschland etwa 5,5 % der Krebserkrankungen bis zum 18. Lebensjahr aus und tritt mit einer Inzidenz von 1,1 pro 100 000 auf. Jungen sind 1,4-fach häufiger betroffen als Mädchen. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 14 Monate und das Risiko zu erkranken nimmt mit zunehmendem Alter ab. So erkranken die meisten Patient:innen innerhalb der ersten sechs Lebensjahre. Das NB ist für 10 % der Krebstode im Kindesalter verantwortlich (3).

Bei etwa 50 % der Patient:innen liegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen vor (1,2). Die Erkrankung wird insgesamt von etwa 77 % der Patient:innen überlebt (3), allerdings besteht bei fortgeschrittener Erkrankung weiterhin eine schlechte Prognose. In diesen Hochrisikostadien liegt die Mortalität auch heute trotz intensiver multimodaler Therapie bei über 50 % (4). Die Prognose ist altersabhängig mit einer geringeren Mortalität bei jüngeren Kindern (5).

1.1.2 ÄTIOLOGIE

Beim NB handelt es sich um einen embryonalen Tumor, der durch die maligne Entartung von Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems entsteht (6). Physiologisch migrieren diese der Neuralleiste entstammenden Vorläuferzellen und differenzieren an ihrem Zielort (2). Durch eine fehlgeleitete Entwicklung kann dabei das NB entstehen. Der Tumor kann sich an allen Stellen ausbilden, an denen Ansammlungen sympathischer Nervenzellen bestehen, das bedeutet entlang des Grenzstrangs und im Bereich des Nebennierenmarks (7).

Es handelt sich um eine sporadische Erkrankung, eindeutige Risikofaktoren konnten bisher nicht ausgemacht werden (6,8). In 1-2 % der Fälle tritt das Neuroblastom familiär mit genetischer Prädisposition auf (9). Diese Tumoren treten früher auf und können multifokal sein, sind jedoch sehr heterogen (1). Es gibt darüber hinaus Erkrankungen, die mit einer höheren NB-Inzidenz assoziiert sind. Das betrifft Erkrankungen des autonomen Nervensystems wie der Morbus Hirschsprung und das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom (Undine-Syndrom) (10) sowie Makrosomiesyndrome wie das Beckwith-Wiedemann Syndrom (11).

1.1.3 GENETIK UND MOLEKULARBIOLOGIE

In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte zur Aufklärung der molekularen Pathogenese des NB gemacht (7,12). Das NB ist eine Erkrankung, bei der die numerische Abweichung ganzer Chromosomen oder Teile von Chromosomen eine wichtigere Rolle spielt als einzelne Mutationen (6,13). Die chromosomalen Aberrationen kommen bei etwa 90% der Patient:innen vor (7). Die maligne Entartung der sympathischen Vorläuferzellen kann durch die Amplifikation des Onkogens *MYCN* und die Mutation der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) gemeinsam mit Transkriptionsfaktoren der embryonalen Entwicklung des Nervensystems wie Sox11, Nhlh2, Twist1, Ascl1, Insm2 und Tcf3 entstehen (14).

In ihrer Biologie ähneln die NB-Zellen den verschiedenen Entwicklungsstufen sympathoadrenerger Zellen. Dabei können besonders zwei verschiedene Zell- und Differenzierungszustände ausgemacht werden: der wenig differenzierte mesenchymale NB-Zelltyp und der weiter entwickelte adrenerge NB-Zelltyp. Mesenchymale Zellen sind aggressiver und häufig chemoresistent, während die adrenergen weniger aggressiven Zellen unter anderem Zielstrukturen für die zielgerichtete Therapie ausbilden. Dazu gehört das GD2-Gangliosid und der Noradrenalintransporter, über den Metaiodbenzylguanidin (MIBG) aufgenommen werden kann (15–18). Die mesenchymalen NB-Zellen sind außerdem vermehrt nach Chemotherapie und bei Rezidiven zu finden, zu Letzteren tragen sie möglicherweise bei (17). Beide Zelltypen sind gemeinsam in Tumoren zu finden und können auch ineinander übergehen (16,17).

Zu den wichtigsten Mutationen gehört die *MYCN*-Amplifikation, welche in ungefähr 20 % der Tumoren vorkommt (6). *MYCN* kodiert für N-myc, welches die Transkription für Wachstum, Metabolismus und Differenzierung reguliert und die NB-Zellen im undifferenzierten Zustand hält (7). *MYCN* wird auch in der physiologischen Entwicklung benötigt, dann aber für die finale Differenzierung der Nervenzellen herunterreguliert. Bei konstant hoher Expression kann es zur Tumorbildung kommen (19–21). Die Amplifikation gilt als Treiber des Tumorwachstums und zählt in allen NB-Stadien als Risikofaktor (7). Sie korreliert mit fortgeschrittener Erkrankung

und Therapieversagen sowie einer schlechten Prognose in allen Tumorstadien (22,23). Sie ist außerdem assoziiert mit der Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 (1p) (24).

Bei den familiären NBs konnte die Mutation im ALK-Gen als prädisponierend gefunden werden (25). *ALK*-Mutationen und -Amplifikationen finden sich außerdem bei 14 % der sporadischen NB-Erkrankungen. Sie kommen häufig gemeinsam mit einer *MYCN*-Amplifikation vor und sind Treiber der Erkrankung. Sie sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (26,27). Erwähnenswert ist außerdem der Transkriptionsfaktor PHOX2B. Dieser spielt eine Rolle bei der Assoziation der Erkrankungen des autonomen Nervensystems, Morbus Hirschsprung und kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom, mit einer erhöhten NB-Inzidenz (28). *PHOX2B*-Mutationen kommen ebenfalls bei sporadischen NBs vor (29).

Die häufigsten chromosomalen Aberrationen, die im Zusammenhang mit dem NB stehen, sind die 1p-Deletion (30), die 11q-Deletion, welche häufig bei Hochrisikotumoren vorkommt, die keine *MYCN*-Amplifikation haben (31,32) sowie die Amplifikation von Chromosom 17 (33). Sie sind alle mit einer schlechten Prognose assoziiert (33,34).

Ein weiterer Mechanismus, der zum Erhalt des NB beiträgt, ist die Stabilisierung der Telomere. Hierfür kommt es entweder zu einer erhöhten Aktivität der Telomerase durch die Überexpression des *telomerase reverse transcriptase (TERT)*-Gens (35,36) oder zu alternativen Telomer Verlängerungen unter anderem durch die *ATRX*-Mutation (37,38). Beide Mechanismen wurden bei jeweils einem Viertel der Patient:innen gefunden (35,37) und sind mit Hochrisikotumoren und einer schlechten Prognose assoziiert (35–38). Die *ATRX*-Mutation ist außerdem mit dem Alter der Patient:innen assoziiert, so kommt sie häufiger vor, je älter die Patient:innen sind und ist bei Patient:innen, die jünger als 18 Monate sind, nicht zu finden (39,40).

1.1.4 KLINIK

Die Klinik des NB ist abhängig von der Lage des Primärtumors und der Metastasierung. Die Mehrheit der Primärtumoren befindet sich im Abdomen im Nebennierenmark (50 %) und entlang des Grenzstrangs (30 %). Metastasen betreffen bevorzugt das Knochenmark (80 %), den Knochen (48 %), die Lymphknoten (16 %) und die Leber (16 %). In seltenen Fällen kann es zu intrakraniellen (8 %) und Hautmetastasen (6 %) kommen (41).

Abdominelle Tumoren können bei zunehmender Größe zur Beeinträchtigung des Darms und der Harnorgane führen. Bei Tumoren des thorakalen Grenzstrangs stehen Husten, Dyspnoe und Pneumonien im Vordergrund. Seltene hochthorakale Tumoren können durch Infiltration

des Ganglion stellatum zu einem Horner-Syndrom mit Miosis, Ptosis und Enopthalmus führen. Durch intraspinales Wachstum paravertebraler NBs kann es zu neurologischen Ausfällen bis hin zum kompletten Querschnittssyndrom kommen. Im MRT sieht man dabei charakteristische „Sanduhr-tumoren“. Weitere seltene Symptome sind Brillenhämatome bei Infiltration der Orbitae, Bluthochdruck durch sezernierte Katecholamine, therapieresistente Durchfälle durch vermehrte Sekretion von vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP) und das paraneoplastische Opsoklonus-Myoklonus-Ataxie-Syndrom. Besonders die fortgeschrittene und metastasierte Erkrankung kann zu Allgemeinsymptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit, Schmerzen und Gewichtsverlust führen. Bei Knochenmarkbefall können die Patient:innen mit Blässe und Blutungen infolge von Anämie und Thrombozytopenie auffällig werden. In niedrigen Erkrankungsstadien bleiben 20 % der Patient:innen asymptomatisch (6,41).

Die Einteilung erfolgt nach dem INSS (International Neuroblastoma Staging System), welches die Tumorausdehnung und die initiale chirurgische Resektion berücksichtigt (42). Im Stadium 1 bleibt der Tumor auf das Ursprungsorgan begrenzt, im Stadium 2 kommt es zu einer Infiltration der Umgebung, die im Stadium 3 zu einer Überschreitung der Körpermittellinie führt. Im Stadium 4 bestehen Fernmetastasen. Es gibt ein weiteres Stadium 4S, welches nur für Säuglinge im ersten Lebensjahr mit Fernmetastasen in Knochenmark, Leber und Haut gilt. Patient:innen im Stadium 4S haben eine bessere Prognose als Patient:innen im Stadium 4 und eine spontane Regression trotz ausgeweiteter Metastasierung ist nicht selten (43,44). Die Säuglinge können allerdings infolge der Größe des Primärtumors und der Metastasen trotzdem schwer erkrankt sein (1,41). Mit der INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System) Einteilung kann das NB seit 2009 nach radiologisch definierten Kriterien beschrieben werden (45). Somit können die Tumoren vor dem initialen operativen Eingriff eingeteilt werden. Das Stadium des Säuglingsneuroblastoms (MS) gilt in dieser Einteilung bis zum Alter von 18 Monaten.

Die Diagnose wird durch den histologischen Nachweis aus einer Tumorbiopsie oder den zytologischen Nachweis des Knochenmarkbefalls mit gleichzeitig erhöhten Katecholaminmetaboliten im Blut oder Urin gesichert (42).

1.1.5 THERAPIE

Die gegenwärtige Therapie des NB beinhaltet die Operation der Tumorherde, die Chemotherapie und die Bestrahlung. Sie erfolgt an das Risikoprofil der Patient:innen angepasst nach Einteilung in eine niedrige-, mittlere- und Hochrisikogruppe. Für die Einteilung zählen neben dem NB-Stadium das Alter, der *MYCN*-Amplifikationsstatus und Aberrationen im Chromosom

1p. Bei Amplifikation von *MYCN* erfolgt die Einteilung stets in die Hochrisikogruppe (46,47). Dies führt zum Einsatz einer multimodalen intensiven Therapie in der Hochrisikogruppe, während in der niedrigen und mittleren Risikogruppe die Therapieintensität und damit die Toxizität reduziert werden kann (6,48,49). Die Behandlung sollte im Rahmen von klinischen Studien erfolgen (47).

In der niedrigen Risikogruppe erfolgt die chirurgische Resektion der Tumorherde mit engmaschiger Nachbeobachtung. Aufgrund der Spontanregression von Tumorresten kommt es selbst bei inkompletter Resektion in den meisten Fällen zur Langzeitremission. Eine adjuvante Chemotherapie ist deshalb nur bei Progression des residualen Lokalbefundes oder bei bedrohlichen tumorassoziierten Symptomen indiziert. Sie erfolgt mit bis zu vier Zyklen N4 (Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid, Mesna) oder Carboplatin in Kombination mit Etoposid (47,50,51).

In der mittleren Risikogruppe erfolgt zunächst eine operative Gewebeentnahme und, falls ohne große Risiken und Verstümmelung möglich, die Tumorentfernung in dieser ersten Operation. Postoperativ wird eine Induktionschemotherapie mit sechs alternierenden Chemotherapiezyklen N5c (Carboplatin, Etoposid, Vindesin, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)) und N6 (Vincristin, Dacarbacin, Ifosfamid, Doxorubicin, Mesna, G-CSF) gegeben. Nach zwei bis vier Zyklen Chemotherapie kann, wenn nicht bereits in der ersten Operation erfolgt, die chirurgische Resektion des Primärtumors erfolgen. Es schließt sich eine Erhaltungstherapie mit vier Zyklen N7 mit oralem Cyclophosphamid und Mesna an. Bei fortbestehenden inoperativen vitalen Tumorresiduen ist die Strahlentherapie mit 36 bis 40 Gy indiziert (47,50,51).

In der Hochrisikogruppe erfolgt zunächst die operative Gewebeentnahme aus dem Primärtumor oder aus einer gut zugänglichen Metastase, es sei denn die Diagnose konnte bereits durch den Knochenmarkbefall gestellt werden. Eine Resektion des Primärtumors in der initialen Operation ist nur bei vertretbarem Eingriffsrisiko möglich. Es folgt eine präoperative Induktionschemotherapie mit sechs alternierenden Chemotherapiezyklen N5 (Cisplatin, Etoposid, Vindesin, G-CSF) und N6 (Vincristin, Dacarbacin, Ifosfamid, Doxorubicin, Mesna, G-CSF). Während der Induktionschemotherapie erfolgt die chirurgische Resektion des Primärtumors. Dabei wird die komplette Resektion angestrebt (47,50,51). Diese ist aber nicht gerechtfertigt, wenn sie sehr riskant oder verstümmelnd ist, da im metastasierten Stadium kein Vorteil der kompletten gegenüber der inkompletten Resektion gezeigt werden konnte (52).

Anschließend erfolgt die konsolidierende Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation (47,51). Hierfür werden die Chemotherapeutika Busulfan und Melphalan

bevorzugt verwendet (53). Bei MIBG-positiven Tumoren kann eine ^{123}I -MIBG Therapie die Hochdosischemotherapie intensivieren. Das Radionuklid akkumuliert in den Tumorzellen und schädigt diese selektiv (47). Die Gabe erfolgt vor der Hochdosischemotherapie (54).

Die Radiotherapie erfolgt zur verbesserten lokalen Kontrollrate nach der Hochdosischemotherapie bei allen Patient:innen in der Primärtumorregion mit 20 Gy. Bei vitalen Resttumoren wird eine Bestrahlung mit bis zu 36 Gy durchgeführt (47,51).

Die post-Konsolidierungstherapie besteht in der Immuntherapie mit dem anti-GD2-Antikörper Dinutuximab beta (47,51). Bei GD2 handelt es sich um ein Gangliosid, welches auf NB-Zellen exprimiert wird. Durch den Antikörper kommt es zu einer antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität, Aktivierung des Komplementsystems und Induktion der Apoptose, welche in einer Zerstörung der Tumorzellen resultiert (7,51).

In der Hochrisikogruppe kommt es bei etwa der Hälfte der Patient:innen zu fehlendem Therapieansprechen oder zu rezidivierender Erkrankung innerhalb der ersten zwei Jahre (12,55). Medikamentenresistenz und die Toxizität der Behandlung spielen eine Rolle (12), weshalb ein aktuelles Ziel ist, das Therapieansprechen von Patient:innen mit Hochrisiko-NB durch die Zugabe von Immuntherapien, zielgerichteten Therapien und Radiopharmaka zur Standardtherapie zu verbessern (7).

1.2 THERAPIEANSATZ

1.2.1 ZIELGERICHTETE THERAPIE MIT CDK-INHIBITOREN (CDKi)

Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) sind Proteinkinasen, genauer Serin/ Threoninkinasen, die zusammen mit den Cyclinen eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielen. Ihre Dysregulation kann zu abnormer Zellproliferation führen und zur Tumorgenese beitragen. Die CDKs regulieren die Übertritte aus der jeweiligen Zellzyklusphase in die nächste Phase und fördern damit den Zellzyklus (Abbildung 1). So wirken CDK4 und CDK6 zusammen mit Cyclin D und CDK2 mit Cyclin E auf das Retinoblastom (RB)-Protein und inaktivieren dieses durch Phosphorylierung. Im inaktiven Zustand kann das RB-Protein den Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr binden. Dieser wird aktiv und der Fortgang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase wird möglich (56,57). CDK-Inhibitoren (CDKi) können die Hemmung des RB-Proteins aufheben, welches erneut E2F binden kann und den Zellzyklus zum Stillstand bringt. Zusätzlich zu CDK2 und

CDK4/6 wird auch CDK1 mit Cyclin B im Zellzyklus aktiv, indem es den Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase fördert (57,58). Auch hier können CDKis hemmend eingreifen. Ein weiterer Wirkort der CDKis ist die Hemmung der RNA-Polymerase II über CDK9 mit Cyclin K/T1, wodurch die Transkription reguliert wird (58,59).

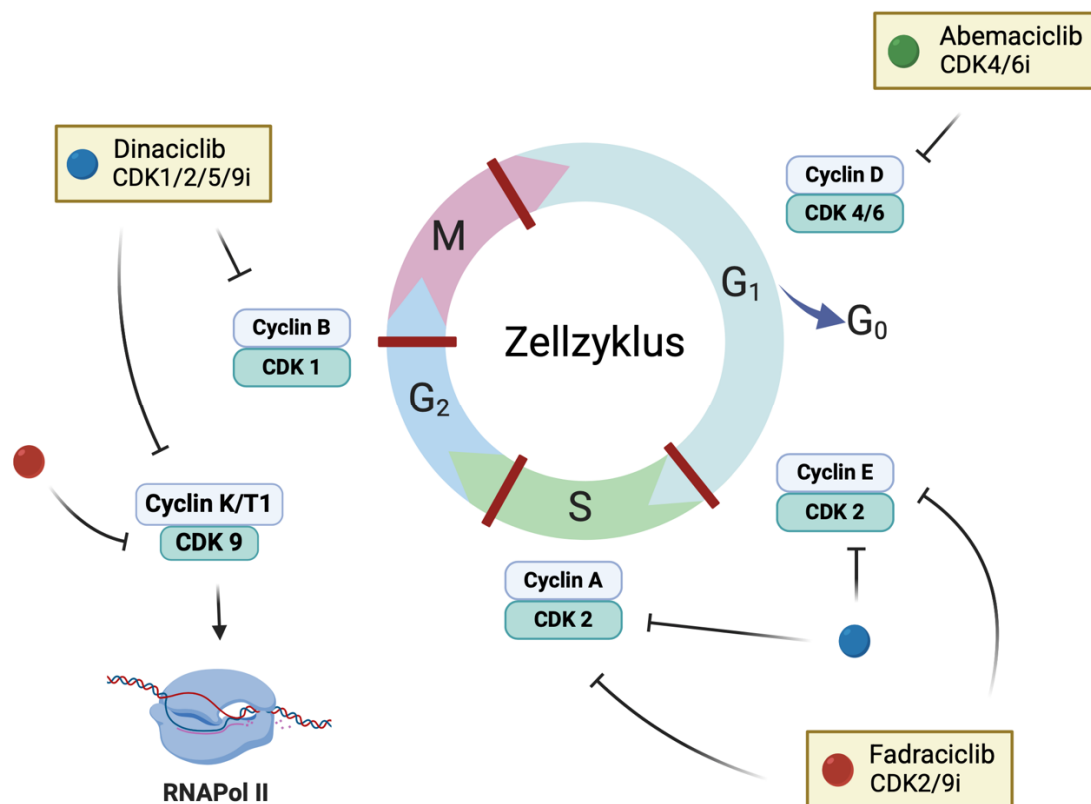


ABBILDUNG 1: ZELLZYKLUS UND VERWENDETE CDKIS

Vereinfachte Darstellung des Zellzyklus mit den molekularen Angriffspunkten der verwendeten CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadraciclib, nach Riess *et al.* (60)

Die Gruppe der CDKis zeigt sowohl experimentell *in vitro* und *in vivo* als auch in der klinischen Praxis antitumorale Aktivität. Beschriebene Wirkmechanismen sind hierbei die Induktion eines Zellzyklusarrests mit folgendem Zelltod und die Sensibilisierung gegenüber Chemo-, Radio- und Immuntherapie (60–63).

Ihr Einsatz beim NB erscheint sinnvoll, da chromosomale Amplifikationen beschrieben wurden, die zur verstärkten Expression von CCND1 (Cyclin D1), CDK4 und CDK6 führen. Diese korrelieren mit schlechtem Gesamtüberleben. Die chromosomalen Abberationen, welche den G₁-Kontrollpunkt betreffen, sind bei bis zu 30 % der Patient:innen zu finden (64,65). Auch die

verstärkte Expression von CDK2 und CDK9 ist mit schlechter Prognose assoziiert (61). Weiterhin wurde durch CDKis die Verringerung des Onkogens *MYCN*, welches eine wichtige und prognostisch ungünstige Rolle beim NB spielt, gezeigt (66,67). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass die *MYCN*-Amplifikation den Zellzyklus über die Aktivierung von E2F vorantreibt, und deshalb CDKis bei *MYCN*-amplifizierten NBs gut eingesetzt werden könnten (68).

Im NB wurden CDKis bisher in wenigen Studien untersucht. Im präklinischen Ansatz konnte *in vitro* und *in vivo* die Wirksamkeit verschiedener CDKis gezeigt werden (61,65,67,69). Der CDK4/6 Inhibitor Ribociclib wurde in einer klinischen Phase-I-Studie im pädiatrischen Patientenkollektiv evaluiert und konnte dort akzeptable Sicherheit und eine verlängerte stabile Erkrankung bewirken. Nebenwirkungen betrafen hierbei besonders das blutbildende System mit Neutropenie bei 72 %, Leukopenie bei 63 %, Anämie bei 44 %, Thrombozytopenie bei 44 % und Lymphopenie bei 38 % der Patient:innen. Weitere Nebenwirkungen waren Erbrechen (38 %), Fatigue (25 %), Übelkeit (25 %) und QTc-Verlängerung (22 %) (70).

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene CDKis verwendet. Bei Abemaciclib handelt es sich um einen Inhibitor von CDK4/6, der 2018 von der EMA zur Behandlung von hormonrezeptor-positivem, HER2-negativem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs zugelassen wurde. Im Jahr 2022 erweiterte sich die Zulassung auf die adjuvante Behandlung von hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen, nodal-positiven frühen Brustkrebsstadien mit hohem Rezidivrisiko (71,72). Abemaciclib zeigt eine gute Verträglichkeit (73). Aktuell wird eine klinische Phase-I-Studie bei pädiatrischen Patient:innen mit soliden Tumoren durchgeführt, in welche auch Patient:innen mit NB eingeschlossen sind (*ClinicalTrials.gov identifier* NCT02644460), sowie eine Phase-1b/II-Studie an NB-Patient:innen mit der Kombination von Abemaciclib mit Zytostatika und dem anti-GD2-Antikörper Dinutuximab (NCT04238819).

Bei Dinaciclib handelt es sich um einen globalen CDKi, welcher die CDKs 1, 2, 5 und 9 hemmt. Über die CDK2 Inhibition kommt es zur Hemmung des Zellzyklus und über die CDK9 Inhibition zur Hemmung der Transkription (61). Die Behandlung mit Dinaciclib zeigt mehr Nebenwirkungen als bei selektiven CDKis, diese können aber möglicherweise durch Kombinationstherapien mit reduzierten Dosierungen verringert werden (74,75). Zurzeit wird Dinaciclib in Phase-II- und Phase-III-Studien getestet, allerdings bisher ausschließlich im adulten Patientenkollektiv.

Bei Fadraciclib (CYC065) handelt es sich um ein CDKi der neuen Generation, welcher CDK2/9 hemmt. Er wird als spezifischer und wirkungsvoller als frühere CDKis beschrieben und hemmt wie der globale Inhibitor Dinaciclib den Zellzyklus über CDK2 Inhibition und die Transkription über CDK9 Inhibition (76). In präklinischen Studien zeigte sich eine gute Verträglichkeit (67),

die auch durch eine erste klinische Phase-I-Studie an Erwachsenen mit fortgeschrittenen Tumoren (NCT02552953) bestätigt werden konnte (77). In der europäischen ESMART-Studie zu fortgeschrittenen pädiatrischen Tumoren (NCT02813135) wird neben anderen zielgerichteten Therapeutika und dem CDK4/6 Inhibitor Ribociclib auch Fadraciclib untersucht.

1.2.2 THERAPIE MIT 13-CIS-RETINSÄURE (13-CIS-RA)

Bei der 13-cis-Retinsäure (13-cis-RA) handelt es sich ein Vitamin A-Derivat, das seine Wirkung durch Bindung an die Retinsäurerezeptoren RAR und RXR mit darauf folgender veränderter Genexpression entfaltet (78). Der Wirkstoff führt *in vitro* und *in vivo* zur Differenzierung von NB-Zellen und kann zytotoxische Effekte zeigen (79–81). Von den Retinsäureformen zeigt 13-cis-RA im Vergleich zu 9-cis-RA und all-trans-RA eine geringere Potenz in Bezug auf die Differenzierung. Aufgrund seiner besseren pharmakokinetischen Parameter und geringeren Toxizität wird es jedoch bevorzugt in der klinischen Anwendung eingesetzt (78). Durch die Bindung an die Retinsäurerezeptoren kommt es unter anderem zur Herunterregulation der Expression des Onkogens *MYCN* (82). Ein Wachstumsarrest in der G1-Phase durch Akkumulation des endogenen CDK-Inhibitors p27 wurde ebenfalls beschrieben (80).

Die 13-cis-RA wurde zur Konsolidierungstherapie bei Hochrisiko-NB verwendet, zeigte allerdings nur bei wenigen Patient:innen eine klinische Wirksamkeit (83–85). Es wurde beobachtet, dass *MYCN*-amplifizierte Tumoren besser ansprechen (78,86,87). *In vitro* konnten synergistische Effekte verschiedener Kombinationstherapien mit RA gezeigt werden (78,88–90).

1.2.3 DIFFERENZIERUNG ALS THERAPIEMECHANISMUS

Das NB wird auch beschrieben als ein Tumor, der in seiner Differenzierung angehalten wurde (91). Dabei behalten die Tumorzellen die Fähigkeit zu terminaler Differenzierung (80). Es wird vermutet, dass die spontane Regression des NB bei jüngeren Patient:innen unter anderem durch die Differenzierung der Tumoren bedingt ist (41,69,92). Als Mechanismus zur Tumorbekämpfung wird die Differenzierung beim NB angestrebt und stellt eine potenziell nebenwirkungsärmere Methode im Vergleich zur konventionellen Therapie dar (81). Mit der Zugabe von 13-cis-RA zur Standardtherapie sollte eine Differenzierung des Tumors erreicht werden, in der klinischen Praxis zeigte sich jedoch ein geringes Ansprechen. Ziel der Behandlung ist, dass die Tumorzellen zu benignen Zellen ausreifen, im differenzierten Zustand apoptotisch werden oder durch verminderte Chemoresistenz empfänglicher für andere Therapeutika werden (81,93,94).

Die Differenzierung der NB-Zellen zeigt sich anhand morphologischer Kriterien mit veränderter Zellform durch das Auswachsen von Neuriten und anhand bestimmter genetischer Marker wie *ENO2*, *MAPT*, *TAU*, *ROBO2* und *STMN4* (69,95,96).

Bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL), einer besonderen Form der Leukämie, kann die Behandlung mit all-trans-Retinsäure zur Ausdifferenzierung und damit kompletter Remission des Tumors führen (83). Möglicherweise ist die Therapie bei APL im Gegensatz zur Behandlung des NB mit RA so erfolgreich, weil nur eine Mutation besteht, ein Fusionsgen aus dem *promyelocytic leukemia (PML)*-Gen und dem Retinsäurerezeptor- α (RAR α)-Gen. Solide Tumoren wie das NB hingegen weisen häufig mehrere onkogene Veränderungen auf (93,97).

Für den Einsatz von CDKis für die Differenzierung des NB spricht die Tatsache, dass der Zellzyklusarrest als wichtige Bedingung für die Einleitung der Differenzierung beschrieben wurde (80,98–100). So wurde für die CDK3, CDK4 und CDK6 gezeigt, dass sie an der Regulation der Differenzierung beteiligt sind (98). In zwei Studien konnte durch CDK4/6 Inhibition mit Palbociclib die Differenzierung von NB-Zellen erreicht werden (69,101). Auch der Knockdown von Cyclin 1 und CDK4 in NB-Zellen führte zur Differenzierung (102).

Somit ist die Induktion der Differenzierung beim NB im Allgemeinen und durch CDKis im Besonderen mit möglicher Verstärkung durch die 13-cis-RA ein vielversprechender Ansatz der Therapie, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte.

1.3 VORARBEITEN DER ARBEITSGRUPPE ZUM EINSATZ VON CDKIS BEI NB-ZELLINIEN

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Wirkung der CDKis Abemaciclib und Dinaciclib auf vier verschiedene NB-Zelllinien untersucht. Dabei zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zytotoxizität in allen Zelllinien.

In den Experimenten zur Dosisfindung der CDKis konnte bei Gabe niedriger Konzentrationen von Abemaciclib eine morphologische Veränderung der Zellen gesehen werden. Es kam zum Auswachsen von Zellausläufern, die als Neuriten eine morphologische Differenzierung anzeigten (Abbildung 2). Dieser Effekt zeigte sich in mehreren Zelllinien. Bei Dinaciclib trat vordergründig ein zytotoxischer Effekt in allen Konzentrationen auf.

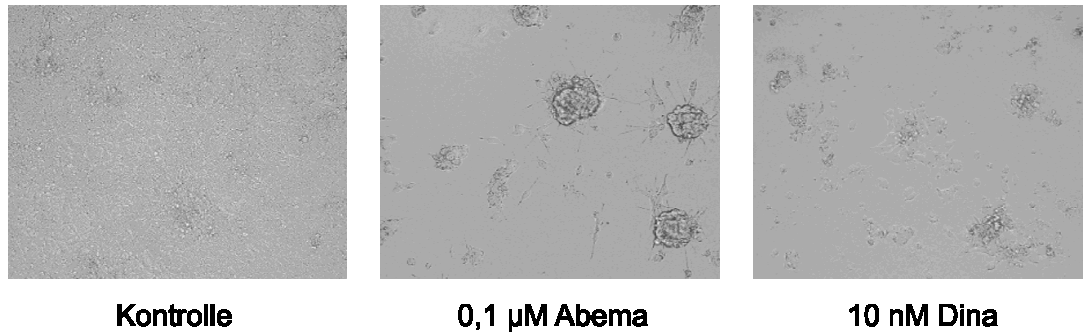


ABBILDUNG 2: LAN-1 ZELLINIE NACH BEHANDLUNG MIT ABEMACICLIB UND DINACICLIB

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie LAN-1 nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen der CDKis Abemaciclib und Dinaciclib für zweimal 72 Stunden, die Kontrolle erfolgte mit DMSO. Abemaciclib Behandlung führt zu einer Vergrößerung der Zellen sowie zur Bildung von Zellausläufern. Abema – Abemaciclib, Dina – Dinaciclib, 200-fache Vergrößerung.

Weitere Untersuchungen der Zellen zeigten Veränderungen der Differenzierungsmarker *ROBO2* und *STMN4* in der qPCR (Abbildung 3), die ebenfalls auf eine Differenzierung hindeuteten. Das sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

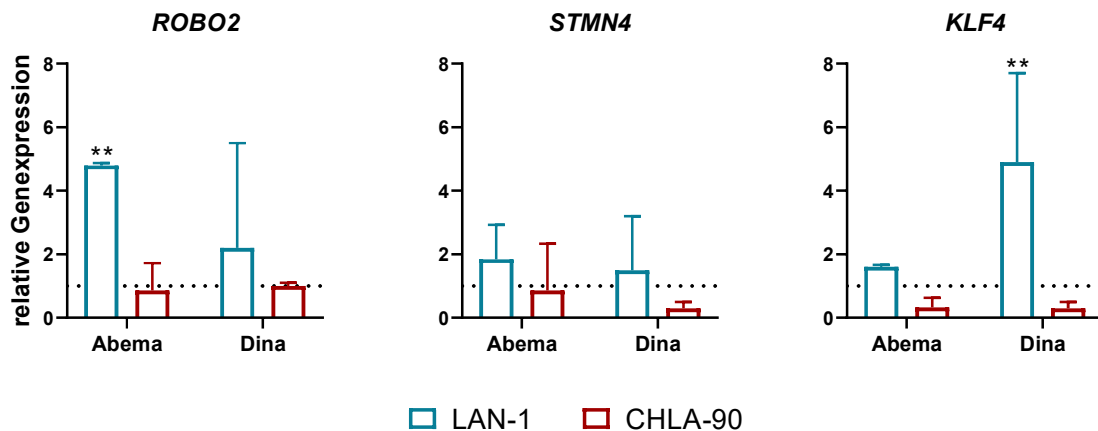


ABBILDUNG 3: DIFFERENZIERUNGSMARKER *ROBO2* UND *STMN4* NACH CDKi BEHANDLUNG

Expression der Differenzierungsmarker *ROBO2* und *STMN4* und des Stammzellmarkers *KLF4* nach Behandlung mit Abemaciclib und Dinaciclib. Darstellung der relativen Genexpression (Kontrolle = 1) als Mittelwerte und Standardabweichung nach Auswertung der qPCR nach $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Ergebnisse sind auf das Referenzgen *GAPDH* normiert. Die Untersuchung wurde in Triplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). Kennzeichnung der Signifikanz gegenüber der Kontrolle: ** $p \leq 0,01$.

II. ZIELSETZUNG

Das NB als häufigster extrakranieller solider Tumor im Kindesalter ist eine Erkrankung, die bisher in Hochrisikostadien nur unzufriedenstellend behandelt werden kann mit Überlebensraten von lediglich 50 % (4). Deshalb ist die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten unerlässlich. Die Wirkstoffgruppe der CDKis konnte bereits bei anderen Tumorerkrankungen ihr Potential unter Beweis stellen. Auch im NB zeigte sie präklinisch in mehreren Studien ihre Wirksamkeit (61,65,67,69) und wird aktuell in einigen wenigen klinischen Studien im pädiatrischen Patientenkollektiv evaluiert. Insgesamt wird jedoch weitere Forschung in Bezug auf CDKis und deren Einsatz beim NB benötigt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Wirksamkeit des neuen CDKi Fadracilib auf Zellviabilität und Zellproliferation bei NB-Zellen zu untersuchen.

Weiterhin sollte gezeigt werden, ob durch die Kombinationstherapie der CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadracilib mit 13-cis-RA eine Wirkungsverstärkung im Vergleich zur Monotherapie erreicht werden kann.

Es sollte der Wirkmechanismus der CDKis mit Beachtung der induzierten Zelltodform untersucht werden. Dabei sollte besonders die Differenzierung der Tumorzellen, welche in Vorarbeiten bereits bei Monotherapie mit Abemaciclib gezeigt werden konnte untersucht werden. Es sollte getestet werden, ob die Differenzierung der NB-Zellen auch durch Fadracilib induziert wird und ob die Zugabe von 13-cis-RA diese weiter verstärkt.

Die Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapien stellt ein Problem in der klinischen Behandlung dar. Deshalb sollte untersucht werden, inwiefern die CDKi Behandlung in den NB-Zellen zur Induktion von Proteinen, welche mit Multiresistenz assoziiert sind, führt.

III. MATERIAL UND METHODEN

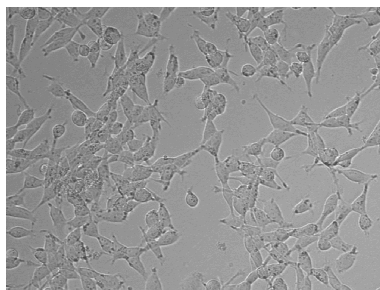
3.1 MATERIAL

3.1.1 ZELLINIEN

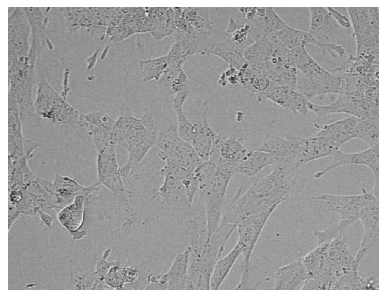
In dieser Arbeit wurden drei NB-Zelllinien verwendet, die Stadium IV-Tumoren entstammen. Alle drei Zelllinien wuchsen adhärent. Es handelte sich um etablierte, kommerziell erhältliche Zelllinien, die im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung Pädiatrische Onkologie und Hämatologie der Universitätsmedizin Greifswald zur Verfügung gestellt wurden. In Tabelle 1 finden sich Informationen zur Herkunft der Zelllinien, Abbildung 4 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Zellen.

TABELLE 1: NB-ZELLINIEN

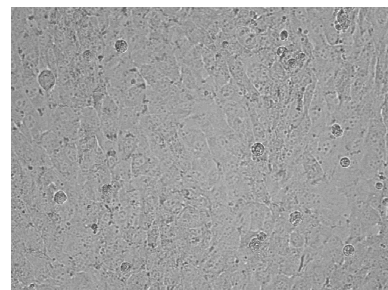
Zelllinie	Beschreibung
LAN-1	Isoliert aus einer Knochenmarkmetastase eines zweijährigen Jungen
CHLA-90	Isoliert post-Chemotherapie, post-Stammzelltransplantation, von einem achtjährigen Jungen
CHLA-172	Isoliert bei fortschreitender Erkrankung nach Stammzelltransplantation



LAN-1



CHLA-90



CHLA-172

ABBILDUNG 4: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VERWENDETER NB-ZELLINIEN

Aufnahmen unbehandelter NB-Zellen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop. Es handelt sich um Ausschnitte aus Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung.

3.1.2 LABORGERÄTE

TABELLE 1: LABORGERÄTE

Laborgerät	Hersteller	Hauptsitz
Brutschrank INCO 246	Memmert	Schwabach, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (2,5 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
FACSCalibur Durchflusszytometer	BD Biosciences	New Jersey, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Sanyo	Moriguchi, Japan
GloMax Plate Reader	Promega	Fitchburg, USA
Inverses Mikroskop Olympus CK40-F200	Olympus	Shinjuku, Japan
Kühlschrank 4°C	Bosch	Gerlingen, Deutschland
Mikroskop Axiovert A1	Carl Zeiss Microscopy	Jena, Deutschland
Multipipette	BRAND Scientific	Wertheim, Deutschland
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologies	Erlangen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences	Biebertal, Deutschland
Sterilbank SafeMate Vision	EuroClone	Mailand, Italien
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences	Biebertal, Deutschland
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Wasserbad WiseBath	WITEG Labortechnik	Wertheim, Deutschland
Zentrifuge ROTANTA 460R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge MIKRO 200	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
----------------------	---------	-------------------------

3.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

TABELLE 2: VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Hauptsitz
96-Well PCR-Platte (Halbrand)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
CellStar 6-Well Multiwell-Platten	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
CellStar 96-Well Multiwell-Platten, F-Boden	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Combitips (2,5 ml, 5 ml)	BRAND Scientific	Wertheim, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Kammerobjektträger, μ -Slide (8-Well, 18-Well)	Ibidi	Gräfeling, Deutschland
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PCR-8er-Kette	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen SafeSeal	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße SafeSeal (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Zellischaber	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

3.1.4 CHEMIKALIEN

TABELLE 3: CHEMIKALIEN

Chemikalien	Hersteller	Hauptsitz
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Biomol	Hamburg, Deutschland
5 x Reverse Transcriptase Buffer	Bioron	Römerberg, Deutschland
70 % Ethanol	Walter-CMP	Kiel, Deutschland
<i>Aqua dest.</i>	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Bacillol AF	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	MedChemExpress	Monmouth Junction, NJ, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
dNTP 10mM	Bioron	Römerberg, Deutschland
EFFLUX-ID Green Multidrug Resistance Assay Kit	Enzo Life Sciences	Farmingdale NY, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Gibco IMDM, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
IMDM	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Insulin-Transferrin-Selen (ITS-G) (100X)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
L-Glutamin 200 mM	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA) 16 %	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Penicillin/ Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Phalloidin Grün	BioLegend	San Diego, USA
Phosphate buffered saline (PBS; pH 7,4)	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland

Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Random Hexamer Primer	Bioron	Römerberg, Deutschland
Reverase™-200 units/μl	Bioron	Römerberg, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande
RPMI 1640	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
RPMI 1640, ohne Phenolrot	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
SensiFAST Probe Lo-ROX MIX	Meridian Bioscience	Memphis, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Trypsin 0,05 % / EDTA 0,02 % in PBS	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
YO-PRO™-1 Iodide	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

3.1.5 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

TABELLE 4: MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

Lösung	Zusammensetzung
0,5 % Triton-X-100	0,5 ml in 100 ml 1x PBS
2 % BSA in PBS	2 g BSA in 100 ml PBS
2 % PFA/PBS aus 16 %-igem PFA	1 ml in 7 ml 1x PBS
Antibody Blocking Solution / Antibody Dilution Buffer	1x PBS 1 % BSA 0,5 % Triton X-100
Blocking Buffer	1x PBS 5 % Ziegenserum 0,5 % Triton X-100
Freezing Medium	45 ml FKS 5 ml DMSO (10 %)

IMDM-Medium	400 ml IMDM 100 ml FKS (20 %) 1,5 ml Penicillin/ Streptomycin (0,3 %) 5 ml Insulin-Transferrin-Selen (1 %) 14 ml Glutamin (4 mM)
RPMI-Medium	500 ml RPMI 50 ml FKS (10 %) 5 ml Penicillin/ Streptomycin (1 %) 7 ml Glutamin (2 mM)

3.1.6 THERAPEUTIKA

TABELLE 5: THERAPEUTIKA

Therapeutikum	Stockkonzentration	Hersteller
13-cis-RA	16,64 mM	Tokyo Chemical Industry Co., Tokyo, Japan
Abemaciclib	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland
Dinaciclib	10 mM	Selleckchem, München, Deutschland
Fadraciclib	10 mM	MedChemExpress, New Jersey, USA

3.1.7 ANTIKÖRPER

TABELLE 6: ANTIKÖRPER

Antigen	Konjugat	Spezifität	Klon	Hersteller
KLF4	unkonjugiert	Mensch	1E6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ROBO2	unkonjugiert	Mensch	356001	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
STMN4	unkonjugiert	Mensch, Maus, Kaninchen	polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

DyLight™ anti-rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Kaninchen	polyklonal	BioLegend, San Diego, USA
anti-mouse IgG	Alexa Fluor 488	Maus	polyklonal	BioLegend, San Diego, USA
Calnexin	Alexa Fluor 594	Mensch	AF18	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Cytochrom C	Alexa Fluor 546	Mensch, Maus, Ratte	A-8	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
p27/Kip1	Alexa Fluor 488	Mensch, Maus, Ratte, Primat	SPM348	Novus Biologicals, Centennial, USA

3.1.8 PRIMER

Alle verwendeten Primer wurden als vorgefertigte Primer-/ Sondenkombination von Thermo Fischer Scientific erworben.

TABELLE 7: PRIMER

Gen	Artikelnummer	Farbstoffmarkierung	Produktgröße [BP]
<i>ENO2</i>	Hs00157360_m1	FAM-MBG	77
<i>GAPDH</i>	Hs00266705_g1	VIC-MBG	74
<i>KLF4</i>	Hs00358836_m1	FAM-MBG	110
<i>MAP2</i>	Hs00258900_m1	VIC-MBG	98
<i>RBFOX3</i>	Hs01370654_m1	FAM-MBG	72
<i>ROBO2</i>	Hs00326067_m1	FAM-MBG	92
<i>STMN4</i>	Hs00938818_m1	VIC-MBG	100
<i>TUBB3</i>	Hs00964962_g1	VIC-MBG	56

3.1.9 SOFTWARE

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurden Programme von Microsoft verwendet (Word, Excel, PowerPoint). Die grafische und statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms

GraphPad Prism 8. Die Auswertung der Durchflusszytometrie geschah mit den Programmen BD CellQuest™ Pro und FlowJo™. Für die Immunfluoreszenz wurden ZEN 3.7 (ZEN Pro) zur Anfertigung der Bilder und ImageJ zur Quantifizierung benutzt. Bei der qPCR fand das Programm QuantStudio™ Anwendung. Die Abbildung 1 wurde mithilfe des Programms BioRender.com angefertigt. Zur Erstellung des Literaturverzeichnisses wurde Zotero verwendet. Die Literaturrecherche erfolgte mit PubMed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.2 METHODEN

3.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1.1 ZELLKULTIVIERUNG

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C mit 5 % CO₂ unter sterilen Bedingungen im Brutschrank. Als Medium erhielt die Zelllinie LAN-1 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin. Die Zelllinien CHLA-90 und CHLA-172 wurden mit Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 20 % FKS, 4 mM Glutamin, 0,3 % Penicillin/ Streptomycin und 1 % Insulin-Transferrin-Selen kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

3.2.1.2 ERNTEN UND PASSAGIEREN DER ZELLEN

Die Kontrolle der Konfluenz der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch. Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturflasche wurde mit 5 ml PBS gespült. Zum Ablösen der Zellen wurden 1,5 ml Trypsin-/Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank für fünf (LAN-1) bzw. sieben (CHLA-90, CHLA172) Minuten. Mit der doppelten Menge FKS-haltigem Medium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nun erfolgte die weitere Verwendung für Experimente oder je nach gewünschtem Wachstum die Zugabe von 250 µl – 1 ml Zellsuspension zur Zellkulturflasche und das Auffüllen auf 10 ml mit Medium für die weitere Kultivierung im Brutschrank.

3.2.1.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Lichtmikroskop mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurde frische Zellsuspension im Verhältnis 1:1 (CHLA-90, CHLA-172) bzw. 1:5 (LAN-1) mit Trypanblau verdünnt. Dies diente der Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen, da Trypanblau nur in avitale Zellen mit defekter Zellmembran eindringen kann. Nach Zugabe von 10 µl der Lösung auf die Neubauer-Zählkammer erfolgte die Auszählung von zwei diagonal gegenüberliegenden oder allen vier Großquadranten. Anhand der folgenden Formel konnte die Zellzahl pro ml berechnet werden:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammerfaktor}(10^4)$$

3.2.1.4 ZELLAUSSAAT

Für die Zellaussaat wurde die benötigte Zellzahl pro ml berechnet und anschließend in einem geeigneten Röhrchen (Falcon-Röhrchen oder SafeSeal-Reaktionsgefäß) die entsprechende Zellsuspension angesetzt. Die Berechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl/ml}}{\text{errechnete Zellzahl/ml}} \times \text{Gesamtvolumen} = \text{einzusetzende Zellsuspensionsmenge}$$

$$\text{Gesamtvolumen} - \text{einzusetzende Zellsuspensionsmenge} = \text{Menge des Standardmediums}$$

In Tabelle 8 sind die eingesetzten Zellzahlen für die verschiedenen Versuche aufgeführt.

TABELLE 8: ZELLZAHL UND VERWENDETE PLATTENFORMATE

Versuch	Zellzahl [Zellen/ml]	Plattenformat
Konzentrationsreihe	5×10^4	96-Well
Kombinationstherapie	3×10^4 (CHLA-172)	96-Well
	5×10^4 (LAN-1, CHLA-90)	
Durchflusszytometrie	1×10^5	6-Well
Immunfluoreszenz (Cytochrom C, Calnexin, p27)	6×10^4 (CHLA-172)	18-Well μ -Slide
	1×10^5 (CHLA-90)	
	$1,3 \times 10^5$ (LAN-1)	
Immunfluoreszenz (ROBO2, STMN4, KLF4)	1×10^5	8-Well μ -Slide
RNA-Isolation	1×10^5	6-Well

3.2.1.5 BEHANDLUNG DER ZELLEN

Für die Behandlung der Zellen erfolgte nach der Aussaat eine 24-stündige Inkubationszeit im Brutschrank, um ein ausreichendes Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Darauf folgte die Behandlung mit einem Therapeutikum für eine Inkubationszeit von 72 Stunden. In einem ersten Ansatz schloss sich an die 72-stündige Inkubationszeit mit Therapeutikum die Messung an. In einem zweiten Ansatz folgte ein Mediumwechsel und anschließend eine weitere Behandlung mit Therapeutikum für erneut 72 Stunden. Die zweite Behandlung wurde entweder als Monotherapie mit dem gleichen Therapeutikum wie in der ersten Behandlung oder als sequentielle Kombinationstherapie mit einem anderen Therapeutikum durchgeführt. Nach zweimal 72-stündiger Inkubationszeit mit Therapeutikum erfolgte im zweiten Ansatz die Messung.

Verwendet wurden für Fadraciclib die anhand der Konzentrationsreihe ermittelten Konzentrationen (Abschnitt 3.2.2.1) und für alle weiteren Therapeutika die durch die Arbeitsgruppe zuvor getesteten Konzentrationen. Diese sind in Tabelle 9 aufgeführt.

TABELLE 9: KONZENTRATIONEN DER TESTSUBSTANZEN

Zelllinie	13-cis-RA	Abemaciclib	Dinaciclib	Fadraciclib
LAN-1	1,5 µM	0,2 µM	10 nM	0,4 µM
CHLA-90, CHLA-172	1,5 µM	1 µM	10 nM	1 µM

3.2.1.6 KRYOKONSERVIERUNG UND REKULTIVIERUNG

Für die Kryokonservierung wurden 1 Million Zellen pro Kryoröhrchen verwendet. Hierfür wurde die berechnete Menge an Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen gegeben und für fünf Minuten bei 300xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet im Einfriermedium (FKS + 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Mit einer Einfrierhilfe erfolgte die zellschonende Abkühlung, um die Zellen bei -80°C lagern zu können.

Für die Rekultivierung wurden die Kryoröhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut, die Zellsuspension in ein vorbereitetes Röhrchen mit 5 ml frischem Medium überführt und anschließend für acht Minuten bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet in 10 ml Medium erneut gelöst und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.2 VIABILITÄTSBESTIMMUNG

3.2.2.1 KONZENTRATIONSREIHEN MIT FADRACICLIB

Um für das neue Therapeutikum Fadracilib die Konzentration für weitere Versuche und Kombinationstherapien zu ermitteln, wurde zunächst eine Konzentrationsreihe durchgeführt. Hierfür erfolgte nach 24-stündigem Anwachsen in einem ersten Ansatz die Behandlung für 72 Stunden mit anschließender Messung der metabolischen Aktivität der Zellen. Daraus konnte auf die Zellviabilität geschlossen werden. In einem zweiten Ansatz wurde nach der ersten Behandlung für 72 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt und es erfolgte die erneute Behandlung für 72 Stunden. Die getesteten Konzentrationen waren hierbei für alle drei Zelllinien 0,2 μM , 1 μM , 2 μM und 6 μM Fadracilib. Die Kontrolle erfolgte jeweils mit DMSO-versetztem Medium in der höchsten entsprechenden Konzentration, hier 6 μM .

Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Viabilität anhand der metabolischen Aktivität mithilfe des Cell Counting Kit-8 (CCK8) Assays nach Angaben des Herstellers (103). Pro Well wurden jeweils 20 μl der CCK-8 Lösung zugegeben und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Vitale Zellen reduzierten das WST-8 (2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Mononatriumsalz) zu wasserlöslichem orangefarbenem WST-8 Formazan, dessen Absorption mit dem Photospektrometer bei 450 nm gemessen werden konnte. Die Menge an entstehendem Formazan war dabei proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Es wurden jeweils vier Versuche durchgeführt. Eine Reduktion der Zellviabilität um 50 % konnte bei einer Konzentration von 1 μM Fadracilib für alle Zelllinien gefunden werden, so dass diese Konzentration für die Kombinationsversuche genutzt wurde.

3.2.2.2 KOMBINATIONSTHERAPIE

Die Kombinationstherapie erfolgte in einem sequentiellen Ansatz mit den drei CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadracilib jeweils mit 13-cis-RA. Hierbei wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit zum Anwachsen für jeweils 72 Stunden pro Behandlung zunächst einer der CDKis und dann 13-cis-RA gegeben. Außerdem erfolgte die Behandlung ebenfalls in umgekehrter Reihenfolge mit der Gabe von zuerst 13-cis-RA und darauffolgend einem der drei CDKis. Die Monotherapie mit 13-cis-RA sowie eine Kontrolle mit DMSO wurden ebenfalls durchgeführt. Die Messung der Viabilität anhand der metabolischen Aktivität erfolgte mit dem CCK-8 Assay. Es wurden jeweils vier Versuche durchgeführt.

Anschließend konnte die Wirkung bei Kombination der Substanzen im Vergleich zur Monotherapie unter Zuhilfenahme des *Bliss Independence Modells* mit dem Kombinationsindex (CI) berechnet werden. Nach diesem Modell wirken die kombinierten Substanzen unabhängig voneinander und beeinträchtigen dabei nicht die Wirkung der anderen Substanz. Allerdings tragen beide Substanzen zu dem gemeinsamen Ergebnis bei. Für die Berechnung des CI wird die Wahrscheinlichkeit für den beobachteten Kombinationseffekt ($0 \leq E_{AB} \leq 1$) mit dem zu erwartenden additiven Effekt der Einzelsubstanzen $E_A + E_B (1 - E_A) = E_A + E_B - E_A E_B$ mit ($0 \leq E_A \leq 1$) und ($0 \leq E_B \leq 1$) ins Verhältnis gesetzt. Es ergibt sich die folgende Formel für den CI:

$$CI = \frac{E_A + E_B - E_A \times E_B}{E_{AB}}$$

CI = Kombinationsindex, E = Effekt-Wahrscheinlichkeit, A = Substanz 1, B = Substanz 2

Hierbei gelten CI-Werte < 1 als synergistische, CI-Werte = 1 als additive und CI-Werte > 1 als antagonistische Wirkung der Substanzen in Kombination (104).

Da sich bei der Zelllinie LAN-1 ein starker zytotoxischer Effekt unter Kombinationstherapie mit Fadraciclib zeigte, wurde die Fadraciclib-Konzentration für die weiteren Versuche auf 0,4 μ M reduziert.

3.2.3 IMMUNFLUORESCENZ

3.2.3.1 DIFFERENZIERUNGS- UND STAMMZELLMARKER

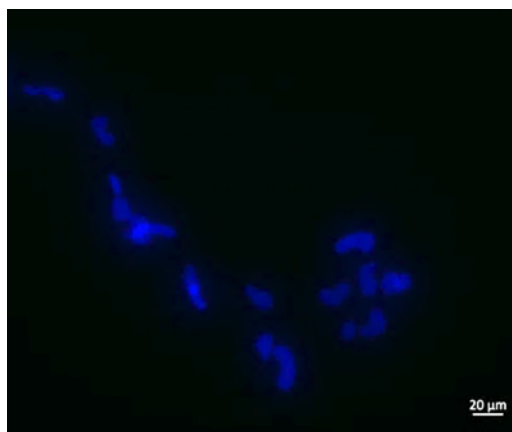
Zur Untersuchung, ob die Zellen unter Behandlung mit CDKis differenzieren und ob die Differenzierung durch die Kombinationstherapie mit 13-cis-RA gesteigert werden kann, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierfür wurde eine neue Färbung mit Antikörpern für die Differenzierungsmarker ROBO2 und STMN4 und den Stammzellmarker KLF4 etabliert. Bei ROBO2 handelt es sich um einen Transmembranrezeptor, welcher axonales Wachstum und Zellmigration fördert. STMN4 soll bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielen, beide Proteine kommen vor allem in neuronalem Gewebe vor (96,105,106).

Bei dem durchgeführten Versuch handelte es sich um eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit unkonjugierten primären Antikörpern, sodass passende fluoreszenzmarkierte sekundäre

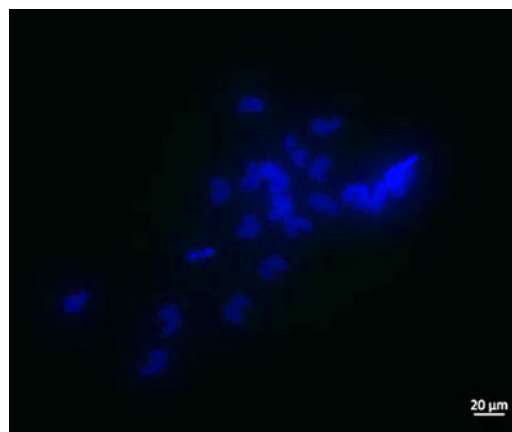
Antikörper zur Anwendung kamen. Zur Etablierung wurde zunächst eine unbehandelte Kontrolle der LAN-1 mit aufsteigenden Verdünnungen gefärbt (Tabelle 10), sowie einzeln der sekundäre Antikörper getestet. Hierbei zeigte sich eine spezifische auf die Zellen beschränkte Färbung bei gemeinsamem Einsatz des primären und sekundären Antikörpers. Bei Einsatz lediglich der sekundären Antikörper zeigte sich keine Färbung (Abbildung 5). Somit war die Spezifität der sekundären für die primären Antikörper gegeben. Die Verdünnung, bei der eine ausreichende Färbung beobachtet wurde, war bei allen drei Antikörpern 1:50. Diese wurde somit für die folgenden Versuche verwendet.

TABELLE 10: ANTIKÖRPER UND GETESTETE VERDÜNNUNGEN

Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
ROBO2	1:50, 1:100 (Stock 0,5 mg/ml)	anti-mouse IgG (Alexa Fluor 488)
STMN4	1:50, 1:100 (Stock 1 mg/ml)	DyLight™ Donkey anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488)
KLF4	1:50, 1:100, 1:200	anti-mouse IgG (Alexa Fluor 488)



anti-mouse IgG



anti-rabbit IgG

ABBILDUNG 5: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Immunfluoreszenzfärbung der sekundären Antikörper ohne primäre Antikörper. Die Abwesenheit grüner Fluoreszenz (Alexa Fluor 488) bestätigte die spezifische Bindung der sekundären Antikörper an die primären Antikörper. Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop, der Maßstab in der rechten unteren Ecke zeigt 20 Mikrometer (µm) an. blau: Kernfärbung mit DAPI.

Für die weiteren Versuche wurden die Zellen der Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 in 18-Well Kammerobjektträger ausgesät, für 24 Stunden zum Adhärenz inkubiert und anschließend mit

der Monotherapie mit 13-cis-RA, Abemaciclib und Fadraciclib und mit der Kombinationstherapie Abemaciclib/ 13-cis-RA und Fadraciclib/ 13-cis-RA für insgesamt zweimal 72 Stunden behandelt. Eine Kontrolle mit DMSO wurde mitgeführt.

Die Färbung erfolgte über zwei Tage. Am ersten Tag wurde zunächst das Medium vorsichtig aspiriert und die Zellen anschließend mit 4 % Formaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Dann erfolgten drei Waschungen mit PBS und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 %-igem Ziegen Serum sowie die Permeabilisierung der Zellwände mit 0,5 % Triton X-100 in PBS für eine Stunde. Anschließend wurde erneut die Flüssigkeit aspiriert und der primäre Antikörper in *Antibody Dilution Buffer* (1x PBS, 1 % BSA, 0,5 % Triton X-100) in der Verdünnung 1:50 hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am zweiten Tag wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und dann der sekundäre Antikörper in der Verdünnung 1:250 in *Antibody Dilution Buffer* zugegeben und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte erneutes Waschen und die Zugabe von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in PBS in der Verdünnung 1:1750 für zwei Minuten. DAPI färbt die Zellkerne, indem es in die DNA interkaliert. Die Kammerobjektträger wurden bei 4°C bis zur Messung gelagert. Die Erstellung der Bilder erfolgte am Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop. Hierbei wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, in dem Fall 488 nm, angeregt, sodass sie messbares Licht emittierten. Pro Zelllinie und Behandlung wurden mindestens drei Bilder aufgenommen.

3.2.3.2 ZELLYKLUSARREST

Der Zellzyklusarrest unter Behandlung mit CDKis und unter Kombinationstherapie von CDKis mit 13-cis-RA sollte mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung weiter untersucht werden. Hierfür wurde die Färbung des p27-Proteins als endogenem Zellzyklusinhibitor (107) durchgeführt. Die Färbung wurde an allen drei Zelllinien LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172 durchgeführt. Behandelt wurden die Zellen wie unter 3.2.3.1 beschrieben.

Für die Färbung wurden die Zellen am ersten Tag zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 % Formaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaliger Waschung wurden die Zellen für eine Stunde mit 1 %-igem bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS geblockt und mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Im Anschluss wurde zweifach gewaschen und der Antikörper anti-p27/ Kip1 in *Antibody Blocking Solution* (1x PBS, 1 % BSA, 0,5 % Triton X-100) in der Verdünnung 1:50 zugegeben und über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert.

Am nächsten Tag wurde erneut zweifach mit PBS gewaschen und schließlich wurden mit DAPI in PBS in der Verdünnung 1:1750 die Zellkerne gefärbt. Die Zellen wurden bis zum Mikroskopieren am Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop in PBS gelagert. Für jede Behandlung und Zelllinie wurden mindestens drei Bilder aufgenommen.

3.2.3.3 ZELLSTRESS

Zur Untersuchung von Zellstress als Reaktion auf die Behandlung mit CDKis wurde eine direkte Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Calnexin- und anti-Cytochrom C-Antikörpern an allen drei Zelllinien durchgeführt. Calnexin als Protein des endoplasmatischen Retikulums sowie Cytochrom C zeigen Zellstress an, welcher unter anderem in der Apoptose der Zellen münden kann (108,109). Behandelt wurde wie unter 3.2.3.1 beschrieben.

Am ersten Tag der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % Formaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaliger Waschung wurde für eine Stunde mit 1 %-igem BSA in PBS geblockt und mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Schließlich wurde zweifach gewaschen und die Antikörper anti-Cytochrom C in der Verdünnung 1:500 und anti-Calnexin in der Verdünnung 1:250 zugegeben und über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert.

Am zweiten Tag wurde zweimal gewaschen und anschließend mit Phalloidin Grün zur Färbung des Zytoskeletts in der Verdünnung 1:50 für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte Waschen mit PBS und die Färbung der Zellkerne mit DAPI in PBS in der Verdünnung 1:1750 und schließlich die Lagerung in PBS bei 4°C bis zum Mikroskopieren mittels des Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskops. Mindestens drei Bilder wurden pro Zelllinie und Behandlung aufgenommen.

3.2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

3.2.4.1 MULTIDRUG-RESISTANCE PROTEINE

Mit der Durchflusszytometrie können einzelne Zellen genauer charakterisiert werden. Die Markierung von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die spezifische Bindung an bestimmte oberflächliche sowie intrazelluläre Zielstrukturen und durch die Messung der Fluoreszenz einen Rückschluss auf deren Menge.

In dieser Arbeit sollten mit Resistenz assoziierte Proteine mithilfe des EFFLUX-ID® Green Multidrug Resistance Assay Kits untersucht werden. Dieses misst die Aktivität der Proteine MDR1 (P-Glykoprotein), MRP1/2 und BCRP (110). Der Versuch wurde an den Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 durchgeführt.

Nach Aussaat der Zellen und 24-stündiger Inkubationszeit erfolgte die Monotherapie mit 13-cis-RA und mit Fadraciclib, sowie die sequentielle Kombinationstherapie mit zuerst Abemaciclib und anschließend 13-cis-RA. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Nach zweimal 72-stündiger Behandlung erfolgte das Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA und das Erstellen einer Zellsuspension mit indikatorfreiem Medium. Die benötigte Zellmenge für den weiteren Versuch betrug 1 Million Zellen pro ml. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt, in jedes FACS-Röhrchen wurde verdünnter Inhibitor vorgelegt: Verapamil für MDR1, MK-571 für MRP und Novobiocin für BCRP. Die Kontrolle erfolgte mit 5 %-igem DMSO in indikatorfreiem Medium. Nach Zugabe der Zellsuspension und Inkubation im Brutschrank für fünf Minuten wurde die EFFLUX-ID® *Green Detection Reagent*-Lösung zugegeben und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Röhrchen für fünf Minuten bei 300xg zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das entstandene Pellet in kaltem indikatorfreiem Medium erneut gelöst.

Die Messung erfolgte innerhalb von drei Stunden am BD FACSCalibur, einem Durchflusszytometer, welches mit einem blauen (488 nm) und einem roten (633 nm) Laser ausgestattet ist. Kurz vor der Messung wurde Propidiumiodid (PI) zugegeben. Dabei handelt es sich um einen Nukleinsäureninterkalator, der dem Ausschluss avitaler Zellen dient, da er nur bei avitalen Zellen die Zellwand durchdringen kann. Es wurden ungefärbte Kontrollen mit 5 %-igem DMSO in indikatorfreiem Medium und gefärbte Kontrollen mit 5 %-igem DMSO in indikatorfreiem Medium und zusätzlich EFFLUX-ID® *Green Detection Reagent*-Lösung ohne Inhibitoren mitgeführt. Das EFFLUX-ID® *Green detection reagent* konnte nach Anregung mit dem blauen Laser im Fluoreszenzkanal FL1 bei einer Absorption/ Emission von 490 nm/ 514 nm gemessen werden. PI wurde über den Fluoreszenzkanal FL3 bei einer Extinktion/ Emission von 488 nm/ 615 nm gemessen. Im Live Gate wurden 20.000 Ereignisse pro Messung erfasst.

Für die Auswertung wurde der *multidrug resistance activity factor* (MDR activity factor, MAF) wie im Benutzerhandbuch angegeben berechnet. Dieser setzt die gemessene Fluoreszenz der behandelten Proben und der gefärbten Kontrolle wie folgt ins Verhältnis:

$$MAF = 100 \times \frac{Fluoreszenz_{Probe} - Fluoreszenz_{gefärbte\ Kontrolle}}{Fluoreszenz_{Probe}}$$

Bei Werten des MAF größer 25 kann von Multiresistenz ausgegangen werden.

3.2.4.2 APOPTOSE- UND NEKROSE-ASSAY

Der folgende Versuch wurde freundlicherweise von Dr. Fatemeh Shokraie und PD Dr. Claudia Maletzki durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Charakterisierung des Zelltodmechanismus unter CDKi Mono- und Kombinationsbehandlung mit 13-cis-RA erfolgte mittels YO-PRO-1/ PI Färbung, wobei YO-PRO-1 mit grüner Fluoreszenz die apoptotischen und PI mit roter Fluoreszenz die nekrotischen Zellen anzeigte. Bei der Apoptose werden die Zellen durchlässig für den Farbstoff YO-PRO-1, welcher an Nukleinsäuren bindet, allerdings bleiben sie aufgrund der weiterhin intakten Zellmembran nicht permeabel für PI. Dieser Nukleinsäureninterkalator kann nur bei spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen eindringen, wobei die spät-apoptotischen Zellen dann mit beiden Farbstoffen angefärbt werden, die nekrotischen dagegen nur mit PI. Die Untersuchung wurde an allen drei Zelllinien, LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172, durchgeführt.

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben ausgesät, für 24 Stunden inkubiert und anschließend für zweimal 72 Stunden behandelt. Es erfolgte die Monotherapie mit Abemaciclib, Fadraciclib und 13-cis-RA und die Kombination der beiden CDKis mit 13-cis-RA sowie die Kontrolle mit DMSO. Nach der Behandlung wurde der Überstand dekantiert und in ein FACS-Röhrchen aufgenommen. Die adhärennten Zellen wurden mit Trypsin/ EDTA gelöst und, nach Abstoppen der Reaktion mit PBS, ebenfalls in das Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 300xg für acht Minuten wurde der Überstand dekantiert, das entstandene Pellet in Färbelösung mit YO-PRO-1 resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich das erhaltene Pellet in PBS resuspendiert. Die Zugabe von PI erfolgte kurz vor der Messung am BD FACSCalibur. YO-PRO-1 wurde im Fluoreszenzkanal FL1 mit einer Extinktion/ Emission von 491 nm/ 509 nm und PI im Fluoreszenzkanal FL3 mit einer Extinktion/ Emission von 488 nm/ 615 nm gemessen. Es wurden 20.000 Ereignisse im Live Gate pro Messung erfasst. Für die Einstellung wurden die Fluoreszenzfarbstoffe jeweils einmal einzeln gemessen.

3.2.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die Differenzierung der NB-Zelllinien sollte weiter auf Genexpressionsniveau untersucht werden. Hierfür wurden folgende Gene untersucht: *ROBO2*, *STMN4*, *MAP2*, *RBFOX3*, *TUBB3*

und *ENO2* als Marker für zelluläre Differenzierung sowie *KLF4* als Stammzellmarker. Zusätzlich zu den in 3.2.3.1 beschriebenen Markern *ROBO2*, *STMN4* und *KLF4* (96) wurden in diesem Versuch weitere Gene untersucht. Bei *MAP2*, *RBFOX3*, *TUBB3* und *ENO2* handelt es sich um Gene, deren Produkte an unterschiedlichen Stellen der physiologischen neuronalen Entwicklung eine Rolle spielen und die als Marker für die Differenzierung der NB-Zellen genutzt werden können (111–113).

3.2.5.1 RNA-ISOLATION

Für die Isolation der RNA wurden die Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 entsprechend der vorherigen Versuche mit der Monotherapie der CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadraciclib behandelt. Weiterhin wurde die Monotherapie mit 13-cis-RA sowie die Kombinationstherapie der drei CDKis mit 13-cis-RA untersucht. Zur Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt.

Zur Bildung von Zellpellets für die RNA-Isolation wurden nach 24-stündiger Inkubation und anschließend zweimal 72-stündiger Behandlung die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und das ausreichende Ablösen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Um verbleibende Zellen abzulösen, wurde mit PBS gespült. Es wurde bei 300xg für acht Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet konnte in PBS gelöst in ein 1,5 ml Röhrchen überführt werden. Es folgte eine erneute Zentrifugation und schließlich die Abnahme der Flüssigkeit, um ein trockenes Pellet zu erhalten, welches bei -80°C gelagert wurde.

Die Isolierung der RNA aus den Zellen geschah mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen und die Durchführung erfolgte entsprechend der Angaben des Benutzerhandbuchs (114). Das Zellpellet wurde zunächst mittels Guanidiniumthiocyanat-haltigem RLT-Puffer lysiert und die RNasen mittels β -Mercaptoethanol inaktiviert. Es wurde 70 %-iges Ethanol zugegeben. Das Lysat wurde auf die RNeasy-Säulen gegeben und bei 8000xg für 30 Sekunden zentrifugiert. Die RNA war nun an der Säule gebunden und der Durchfluss wurde verworfen. Mit RW1-Puffer und erneutem Zentrifugieren wurden andere Zellbestandteile wie Kohlenhydrate, Proteine und Fettsäuren aus der Säule gewaschen. Anschließend wurde DNase zugegeben, inkubiert und zentrifugiert, um verbliebene DNA aus der Säule zu entfernen. Es folgten mehrere Waschschritte mit RPE-Puffer und Zentrifugation bei 8000xg für 30 Sekunden. Am Ende wurde die Säule bei 8000xg für eine Minute trocken zentrifugiert und es wurde RNase-freies Wasser zugegeben, in welchem die an der Säule gebundene RNA in Lösung geht. Nach erneuter Zentrifugation konnte der Durchfluss mit der RNA aufgefangen und direkt auf Eis gelegt werden.

Im Anschluss wurde die Konzentration der extrahierten RNA mittels photometrischer Messung am NanoDrop 1000 bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, gemessen. Die Reinheit der RNA konnte hier durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der Proteine, und dem Quotienten der beiden Werte bestimmt werden. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.2.5.2 UMSCHREIBUNG IN cDNA (REVERSE TRANSKRIPTION)

Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurde das cDNA-Synthese-Kit von Bioron verwendet. Zunächst wurde anhand der zuvor ermittelten RNA-Konzentrationen 1 µg RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf insgesamt 13 µl verdünnt. Nach Zugabe von 1 µl Random Hexamer Primer wurde der Versuchsansatz für zehn Minuten bei 70° C im Thermocycler von BioRad für die Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA inkubiert und danach sofort auf Eis gegeben. Anschließend wurde der Mastermix, bestehend aus einem fünffachem reverse-Transkriptase-Puffer, einem Desoxyribonukleotid-Mix und der Reversease, zugegeben. Die Proben wurden im Thermocycler für 120 Minuten auf 45° C erhitzt, sodass die reverse Transkription stattfinden konnte. Schließlich erfolgte das Erhitzen für zehn Minuten auf 70° C, um das Enzym zu inaktivieren und die Reaktion zu beenden.

Nach Ablauf der Synthese wurde die cDNA mit Nuklease-freiem Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt, sodass die finale cDNA-Konzentration etwa 12,5 ng/ml betrug. Die cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.5.3 QUANTITATIVE ECHTZEIT-POLYMERASEKETTENREAKTION (qPCR)

Abschließend sollte die Expression der untersuchten Gene mit der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) gemessen werden. Das Prinzip dieser Methode ist die exponentielle Vervielfältigung der gesuchten Genregionen. Währenddessen wird die Amplifikation gemessen, um daraus auf die ursprüngliche Menge des Gens zu schließen. Bei der Verwendung des TaqMan-Systems geschieht dies durch Hybridisierungssonden. Das sind fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die ergänzend zu den Primern an die cDNA binden und deren Fluoreszenz gemessen werden kann. Das Fluoreszenzsignal wird umso stärker, je mehr cDNA-Abschnitte der gesuchten Genregion amplifiziert werden. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet.

Für die Reaktion wurde ein Versuchsansatz erstellt, bestehend aus 2 µl angefertigter cDNA, den entsprechenden forward und reverse Primern und den Hybridisierungs sonden, dem Mastermix SensiFAST Probe Lo-ROX und Nuklease-freiem Wasser. Es erfolgte das Pipettieren in Triplikaten und die Durchführung der qPCR am ViiA™ 7 Cycler. Dabei kam es zu mehreren Reaktionsschritten: zunächst die Denaturierung der cDNA bei 95°C, um Einzelstränge zu erhalten, dann die Anlagerung der Primer an den cDNA-Abschnitt bei 60°C und schließlich die Strangsynthese ebenfalls bei 60°C. Diese drei Schritte wurden 40-mal wiederholt.

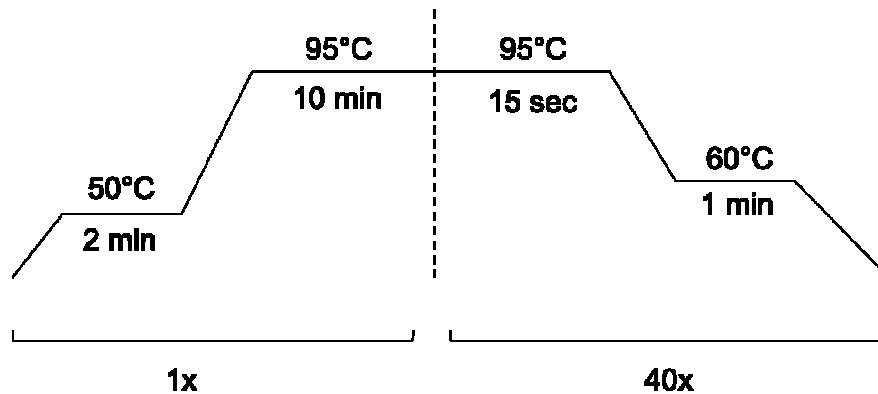


ABBILDUNG 6: ABLAUF TAQMAN qPCR

Die Auswertung erfolgte anhand der Delta-Delta-Ct-Methode. Dabei wurden die Cycle-Treshhold-Werte (Ct-Werte) verglichen. Diese Werte geben den Zyklus der qPCR an, oberhalb dessen das Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert überschreitet. Sie dienen als Maß für die unterschiedlichen DNA-Mengen der jeweiligen Proben. Bei der Delta-Delta-Ct-Methode wurde zunächst der Ct-Wert des Referenzgens *GAPDH* vom Ct-Wert des untersuchten Gens abgezogen, sowohl für die behandelten Proben als auch für die Kontrolle mit DMSO.

$$\Delta Ct_{Probe} = Ct_{Gen(Probe)} - Ct_{GAPDH}$$

und

$$\Delta Ct_{Kontrolle} = Ct_{Gen(Kontrolle)} - Ct_{GAPDH}$$

Anschließend wurde die jeweils erhaltene Differenz der Kontrolle von der Differenz der behandelten Probe abgezogen. Die somit erhaltenen Delta-Delta-Ct-Werte wurden ins Quadrat gesetzt um die relative Genexpression zu erhalten.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

$$Relative\ Genexpression = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Werte größer als eins zeigten dabei eine Hochregulation, Werte zwischen null und eins eine Herunterregulation des untersuchten Gens an.

3.3 STATISTIK

Die Darstellung der Daten als Mittelwerte und Standardabweichung erfolgte in Microsoft Excel. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Zur weiteren statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism8 genutzt. Es wurde mit dem Shapiro-Wilk und dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des one-way und des two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test) untersucht. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Die p-Werte wurden folgendermaßen gekennzeichnet: $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$ und $p \leq 0,0001 = ****$.

IV. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung des neuen CDKi Fadraciclub als Monotherapie und die Kombinationstherapie der CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadraciclub mit dem etablierten Wirkstoff 13-cis-RA auf NB-Zellen untersucht. In den Vorversuchen wurde zunächst die Viabilität der Zellen unter Therapie untersucht. Anschließend wurde in den weiterführenden Untersuchungen die Auswirkung der Behandlung auf die Zellen, insbesondere auf deren Differenzierung, charakterisiert.

4.1 WIRKUNG DER MONOTHERAPIE MIT FADRACICLIB AUF DIE ZELLVIABILITÄT

Zunächst sollte der antiproliferative Effekt der Monotherapie mit dem CDKi Fadraciclub in aufsteigender Konzentration untersucht werden. Die Behandlung zeigte sich in allen drei Zelllinien, LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172, wirksam. Sowohl bei einmal 72-stündiger Behandlung als auch bei zweimal 72-stündiger Behandlung kam es im Vergleich zur Kontrolle zu lichtmikroskopisch sichtbarer Reduktion des Wachstums (Abbildung 7), sowie zu signifikanter Verringerung der Zellviabilität, gemessen an der metabolischen Aktivität im CCK-8 Assay (Abbildung 8). Der zytotoxische Effekt war konzentrations- und zeitabhängig und zeigte außerdem einen Unterschied in Bezug auf die Zelllinien. So zeigte sich bei der Zelllinie LAN-1 die höchste Sensitivität für die Behandlung, während es bei CHLA-172 im Vergleich dazu zu geringerer Einschränkung von Wachstum und Viabilität kam. Die Wirksamkeit der Behandlung bei CHLA-90 lag zwischen der von LAN-1 und CHLA-172. Die zweimalige Behandlung zeigte in allen Zelllinien einen etwas stärkeren zytotoxischen Effekt als die einmalige Behandlung.

Insgesamt konnte die Konzentration, bei der 50 % der Zellen nicht mehr vital sind (IC_{50}), für alle drei Zelllinien näherungsweise bei 1 μ M bestimmt werden. Bei weiterer Steigerung der Dosis kam es lediglich zu einem geringen weiteren Abfall der Viabilität.

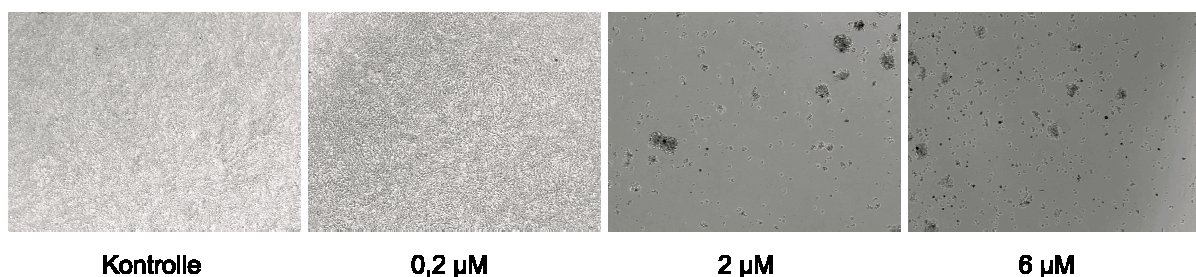


ABBILDUNG 7: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER LAN-1 NACH BEHANDLUNG MIT FADRACICLIB

Dargestellt ist die Zelllinie LAN-1 nach 72-stündiger Behandlung aufsteigender Konzentrationen Fadraciclub. Es zeigten sich zytotoxische Effekte bei den Konzentrationen 2 μ M und 6 μ M, bei 0,2 μ M war das Wachstum unbeeinträchtigt. Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1-Mikroskop, 200-fache Vergrößerung.

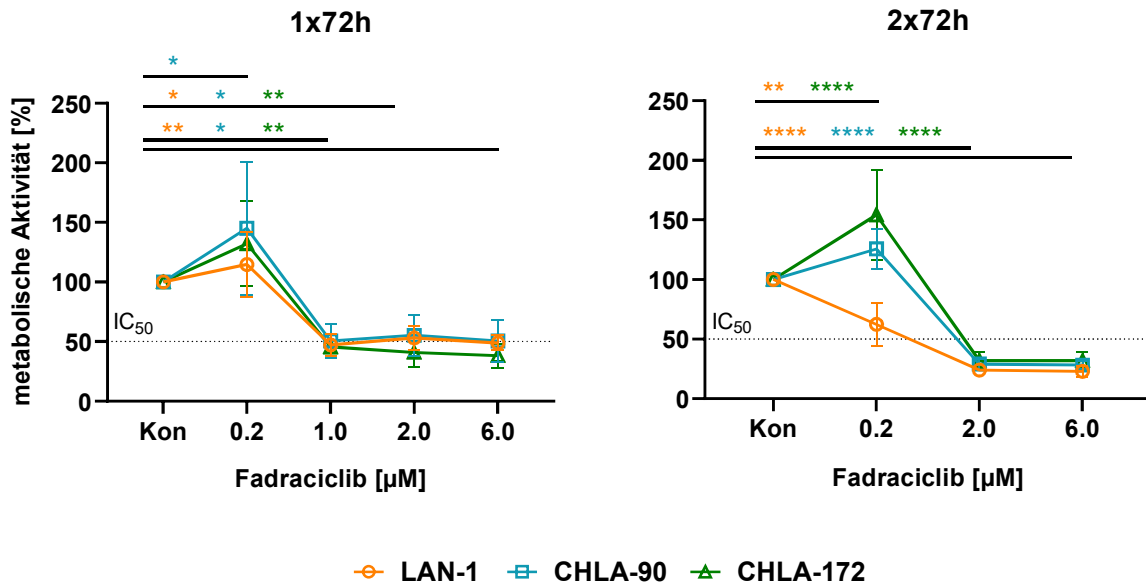


ABBILDUNG 8: DOSIS-WIRKUNGS-KURVEN BEI MONOTHERAPIE MIT FADRACICLIB

Quantitative Darstellung der Viabilität gemessen an der metabolischen Aktivität der Zellen als Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zur Kontrolle mit DMSO (= 100 %). Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung viermal wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und **** $p \leq 0,0001$. Kon - Kontrolle

4.2 SYNERGISTISCHER EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIE MIT CDKIS UND 13-CIS-RA

Als nächstes wurde die sequentielle Kombinationstherapie der CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadraciclub mit 13-cis-RA untersucht. Hierbei zeigte sich eine Verringerung der Zellviabilität gemessen an der metabolischen Aktivität im CCK-8 Assay im Vergleich zur Kontrolle in der Mehrheit der Behandlungskombinationen (Abbildung 9). Hervorzuheben ist die Kombinationstherapie mit Fadraciclub, die eine signifikante Beeinträchtigung der Zellviabilität in allen drei Zelllinien zur Folge hatte.

Die Kombinationstherapie mit Abemaciclib erreichte bei der Zelllinie LAN-1 eine signifikante Abnahme der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle um 60 % bei Abemaciclib/ 13-cis-RA und um 65 % bei 13-cis-RA/ Abemaciclib. Bei den Zelllinien CHLA-90 und CHLA-172 zeigte sie weniger Wirkung, es kam bei Gabe von Abemaciclib/ 13-cis-RA zu reduzierter Viabilität um 22 % bei der Verwendung von CHLA-90 und um 5 % bei CHLA-172. Die Behandlung mit 13-cis-RA/ Abemaciclib hatte bei CHLA-90 und CHLA-172 keine Reduktion der Viabilität zur Folge.

Bei der Kombinationstherapie mit Dinaciclib zeigte sich LAN-1 erneut sensitiv gegenüber der Behandlung mit einer signifikanten Reduktion der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle um 42 % bei Dinaciclib/ 13-cis-RA und um 53 % bei 13-cis-RA/ Dinaciclib. Bei CHLA-90 bewirkte die

Behandlung mit 13-cis-RA/ Dinaciclib eine Reduktion um 10 %, während bei CHLA-172 die Behandlung mit Dinaciclib/ 13-cis-RA zu einer Reduktion um 5 % führte.

Die Kombinationstherapie mit Fadracilib führte bei LAN-1 im Vergleich zur Kontrolle zur signifikanten Reduktion der Viabilität um 72 % bei der Gabe von Fadracilib/ 13-cis-RA und um 67 % bei 13-cis-RA/ Fadracilib. Bei CHLA-90 betrug die signifikante Reduktion 60 % bei Fadracilib/ 13-cis-RA und 53 % bei 13-cis-RA/ Fadracilib. Bei CHLA-172 kam es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität um 72% bei Fadracilib/ 13-cis-RA und um 27 % bei 13-cis-RA/ Fadracilib.

Die Monotherapie mit 13-cis-RA wurde ebenfalls untersucht, es ergab sich in keiner Zelllinie eine nennenswerte Verringerung der Zellviabilität.

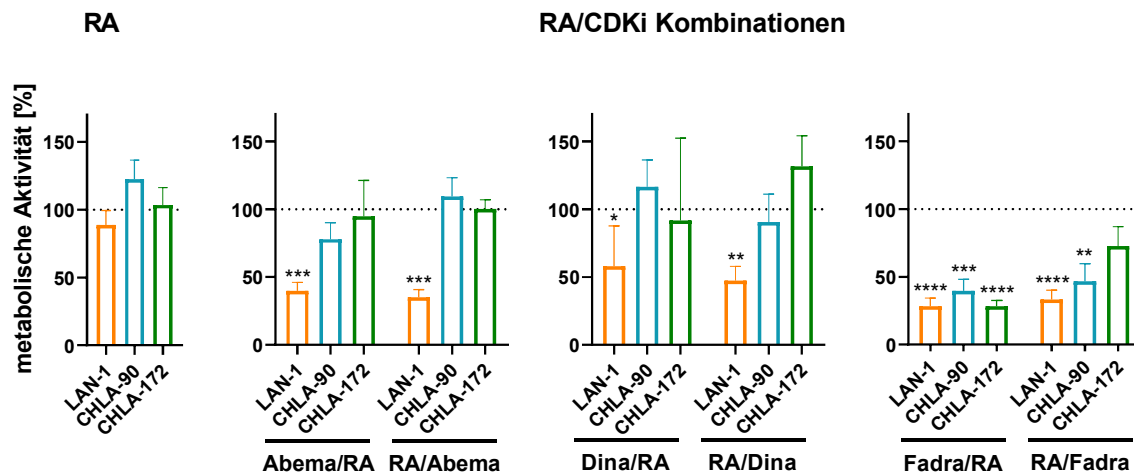


ABBILDUNG 9: VIABILITÄTSMESSUNG NACH SEQUENTIELLER KOMBINATIONSTHERAPIE DER CDKIS MIT 13-CIS-RA

Quantitative Darstellung der Viabilität gemessen an der metabolischen Aktivität der Zellen als Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zur Kontrolle mit DMSO (= 100 %). Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung viermal wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). Kennzeichnung der Signifikanz gegenüber der Kontrolle: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$. RA – 13-cis-Retinsäure, Abema – Abemaciclib, Dina – Dinaciclib, Fadra - Fadracilib

Anhand des *Bliss Independence Modells* konnte die Kombination der verschiedenen Therapeutika in Bezug auf ihre synergistische, additive oder antagonistische Wirkung untersucht werden. Dabei wurde die Wirkung der Kombinationstherapie mit der Wirkung der Monotherapie des jeweiligen CDKi und der 13-cis-RA verglichen.

Mit allen drei CDKis gelang es, durch sequentielle Kombination mit 13-cis-RA den Effekt der Monotherapie zu verstärken (Abbildung 10). So zeigte sich die Kombinationstherapie mit Abemaciclib synergistisch bei LAN-1 und bei CHLA-90. Die Kombination mit Dinaciclib konnte in der Zelllinie LAN-1 synergistischen Effekte hervorrufen. Die Kombinationstherapie mit Fadraciclib wirkte in allen drei untersuchten Zelllinien synergistisch.

Der Effekt der selektiven CDKis Abemaciclib und Fadraciclib mit synergistischer Wirkung in zwei bis drei Zelllinien war der des globalen CDKi Dinaciclib mit synergistischer Wirkung in einer Zelllinie überlegen. Für die weiteren Versuche wurde folglich der Fokus auf die CDKis Abemaciclib und Fadraciclib gelegt.

Behandlung	LAN-1	CHLA-90	CHLA-172
Abema/ RA	0.5	0.6	>1.0
RA/ Abema	0.4	>1.0	>1.0
Dina/ RA	0.9	>1.0	>1.0
RA/ Dina	0.8	>1.0	>1.0
Fadra/ RA	0.8	0.8	0.8
RA/ Fadra	0.9	0.9	>1.0

ABBILDUNG 10: KOMBINATIONSINDEX NACH *BLISS INDEPENDENCE MODELL*

Darstellung der Kombinationsindizes nach Kombinationstherapie mit CDKis und 13-cis-RA bei den drei NB-Zelllinien, CI < 1 synergistisch, CI = 1 additiv, CI > 1 antagonistisch.

4.3 UNTERSUCHUNG DER DIFFERENZIERUNG AUF PROTEINEBENE

Der Wirkmechanismus der CDKis und der Kombinationstherapie mit CDKis und 13-cis-RA sollte genauer betrachtet werden. Eine wichtige Frage dieser Arbeit war dabei die potentielle Differenzierung der Zellen unter Therapie. Dies wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung der Differenzierungsmarker ROBO2 und STMN4 und des Stammzellmarkers KLF4 an den Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 untersucht.

Es kam in beiden Zelllinien sowohl bei Monotherapie der CDKis Abemaciclib und Fadraciclib als auch in Kombination der beiden Therapeutika mit 13-cis-RA im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der Differenzierungsmarker ROBO2 und STMN4. Der Stammzellmarker KLF4

zeigte sich weitestgehend unverändert unter der Behandlung. Allerdings konnte kein Unterschied der Wirkung zwischen der Monotherapie und der Kombinationstherapie gesehen werden. Zusätzlich zur Erhöhung der Differenzierungsmarker konnten besonders bei CHLA-90 unter Mono- und Kombinationstherapie beider CDKis morphologische Veränderungen nachgewiesen werden, die einerseits auf die Differenzierung und andererseits auf Zellstress hinweisen können. Es kam zu einer Vergrößerung der Zellen und teilweise zur Ausbildung langer Zellausläufer. Die Monotherapie mit 13-cis-RA führte in beiden Zelllinien zu keiner oder nur zu geringer Veränderung der Marker. In Abbildung 11 und 12 sind exemplarische Aufnahmen der Färbungen an beiden Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 zu sehen. Die Darstellung erfolgt als zusammengefügte Bilder aus beiden Fluoreszenzkanälen.

Die anhand der Bilder abgelesenen Veränderungen der Differenzierungs- und Stammzellmarker ließen sich in der Quantifizierung bestätigen (Abbildung 13). Hierbei wird die *integrated density* bestimmt, um eine objektivere Aussage treffen zu können. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung von ROBO2 und STMN4 unter CDKi Monotherapie und Kombinationstherapie in beiden Zelllinien und eine gleichbleibende Menge KLF4 bei LAN-1. Bei CHLA-90 war auch bei KLF4 ein leichter Anstieg zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CDKi Behandlung zu einer Differenzierung der NB-Zellen anhand der untersuchten Differenzierungsmarker führte. Diese Wirkung zeigte keinen Unterschied zwischen der Mono- und Kombinationstherapie.

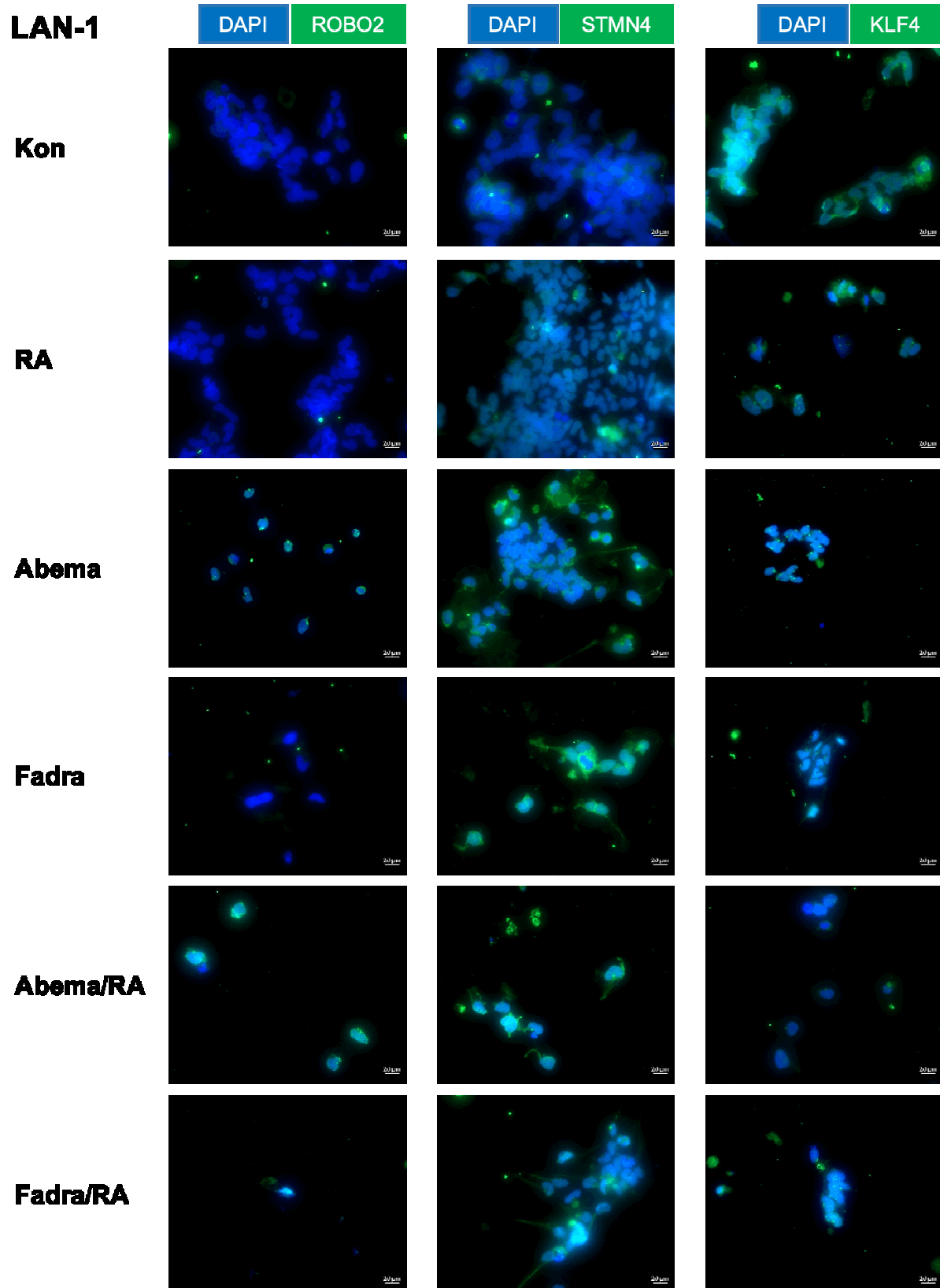


ABBILDUNG 11: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ROBO2, STMN4 UND KLF4 AN LAN-1

Darstellung repräsentativer Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie der LAN-1 nach Färbung mit ROBO2, STMN4 und KLF4, Kernfärbung mit DAPI. Grün = Alexa Fluor 488 für die Zielproteine, blau = DAPI für die Zellkerne. Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop, der Maßstab in der rechten unteren Ecke zeigt 20 µm an.

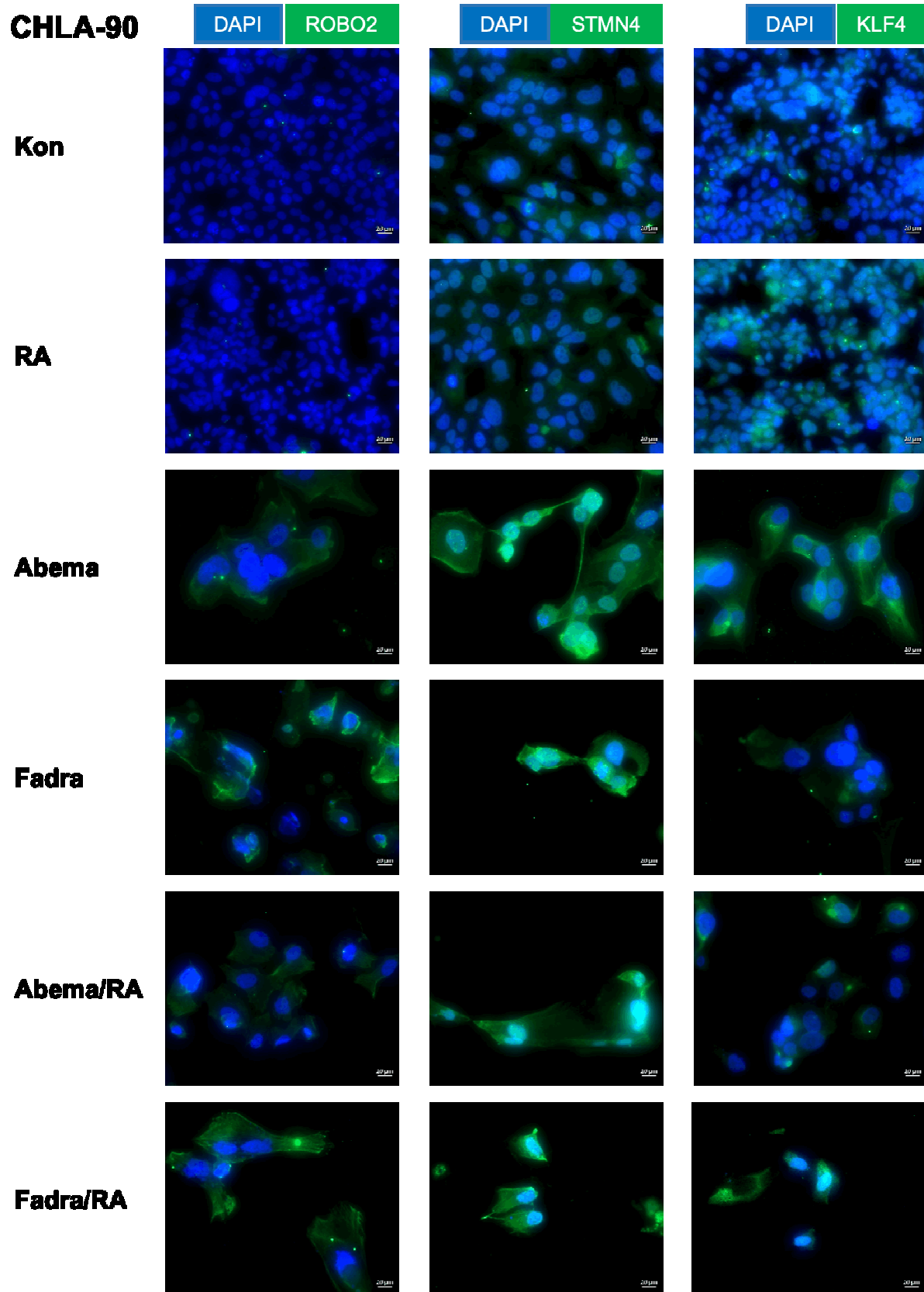


ABBILDUNG 12: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ROBO2, STMN4 UND KLF4 AN CHLA-90

Darstellung repräsentativer Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie der CHLA-90 nach Färbung mit ROBO2, STMN4 und KLF4, Kernfärbung mit DAPI. Grün = Alexa Fluor 488 für die Zielproteine, blau = DAPI für die Zellkerne. Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop, der Maßstab in der rechten unteren Ecke zeigt 20 µm an.

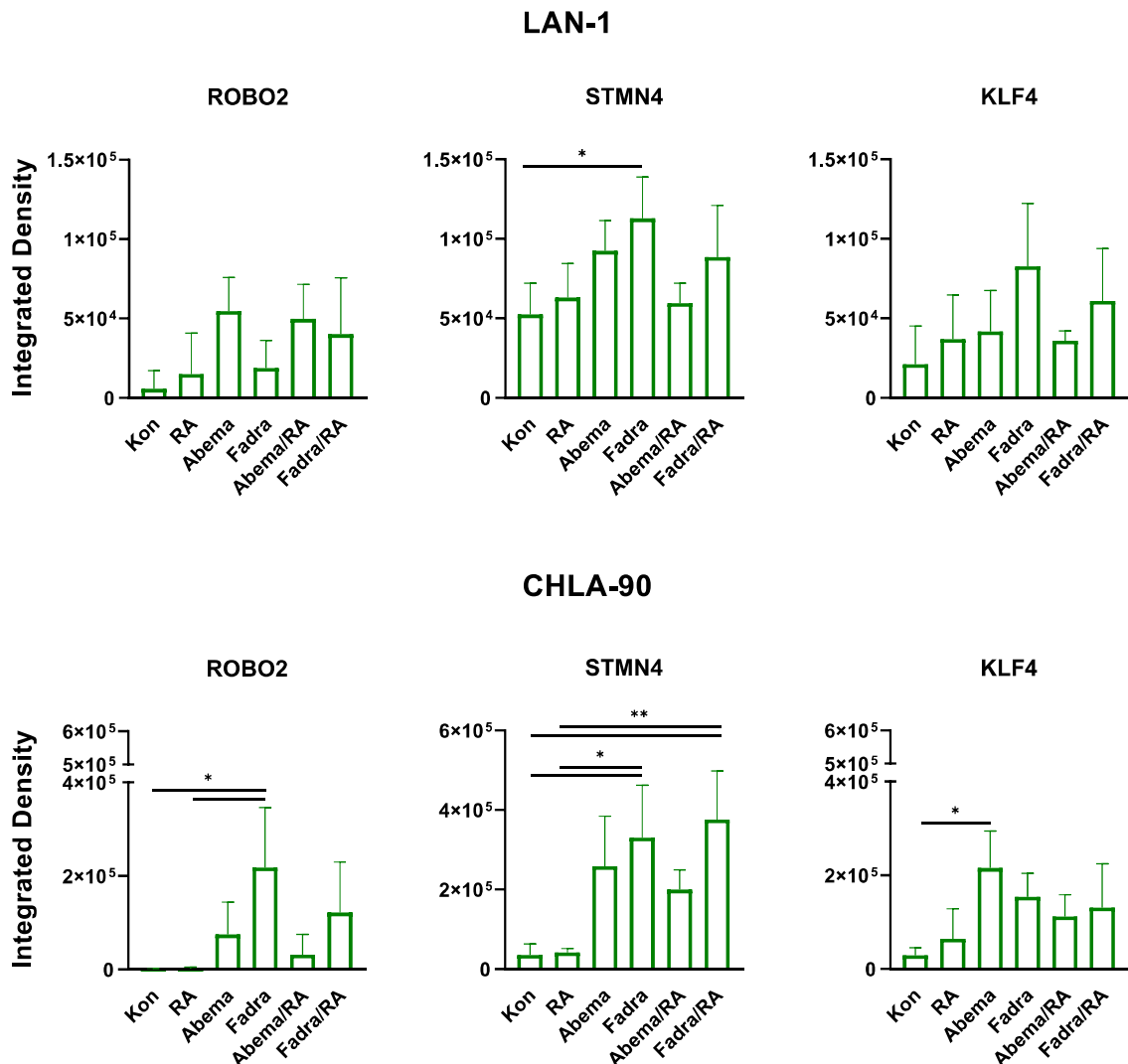


ABBILDUNG 13: QUANTIFIZIERUNG DER ROBO2, STMN4 UND KLF4 FÄRBUNG

Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ (Integrated Density Analyse). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung von mindestens drei Bildern aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit dem one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). Die Quantifizierung erfolgte freundlicherweise mit Unterstützung durch B.Sc. Sarah Bertels. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

4.4 EINFLUSS DER BEHANDLUNG AUF ZELLYKLUSARREST

Da CDKis durch ihren Wirkmechanismus einen Zellzyklusarrest induzieren können, sollte dies anhand der Veränderung des endogenen Zellzyklusinhibitors p27 in der Immunfluoreszenz untersucht werden. An den drei Zelllinien LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172 wurden die Monotherapien mit Abemaciclib und Fadraciclib, sowie die zugehörigen Kombinationen mit 13-cis-RA auf Veränderung bezüglich der p27-Expression untersucht.

In allen drei betrachteten Zelllinien kam es unter Behandlung mit Abemaciclib und Fadraciclib Monotherapie und der entsprechenden CDKi/ 13-cis-RA Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der Konzentration des p27-Proteins. Es zeigte sich für beide CDKis kein signifikanter Unterschied der Wirkung zwischen der Monotherapie und der Kombinationstherapie. Die Monotherapie mit 13-cis-RA führte zu keiner relevanten Veränderung der p27-Expression. Die Bilder sind exemplarisch in Abbildung 14 für die drei Zelllinien LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172 zu sehen. Hierbei erfolgt die Darstellung als Bilder des Einzelkanals für p27.

Die Aussagen aus den Bildern ließen sich durch die Quantifizierung bestätigen (Abbildung 15). Es kam zu einem Anstieg von p27 in allen drei Zelllinien unter Behandlung mit Abemaciclib und Fadraciclib Mono- und Kombinationstherapie mit 13-cis-RA. Die Monotherapie mit 13-cis-RA führte zu keiner Veränderung von p27.

Folglich konnte auf einen Zellzyklusarrest unter der CDKi Behandlung geschlossen werden, jedoch ohne Verstärkung bei der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie.

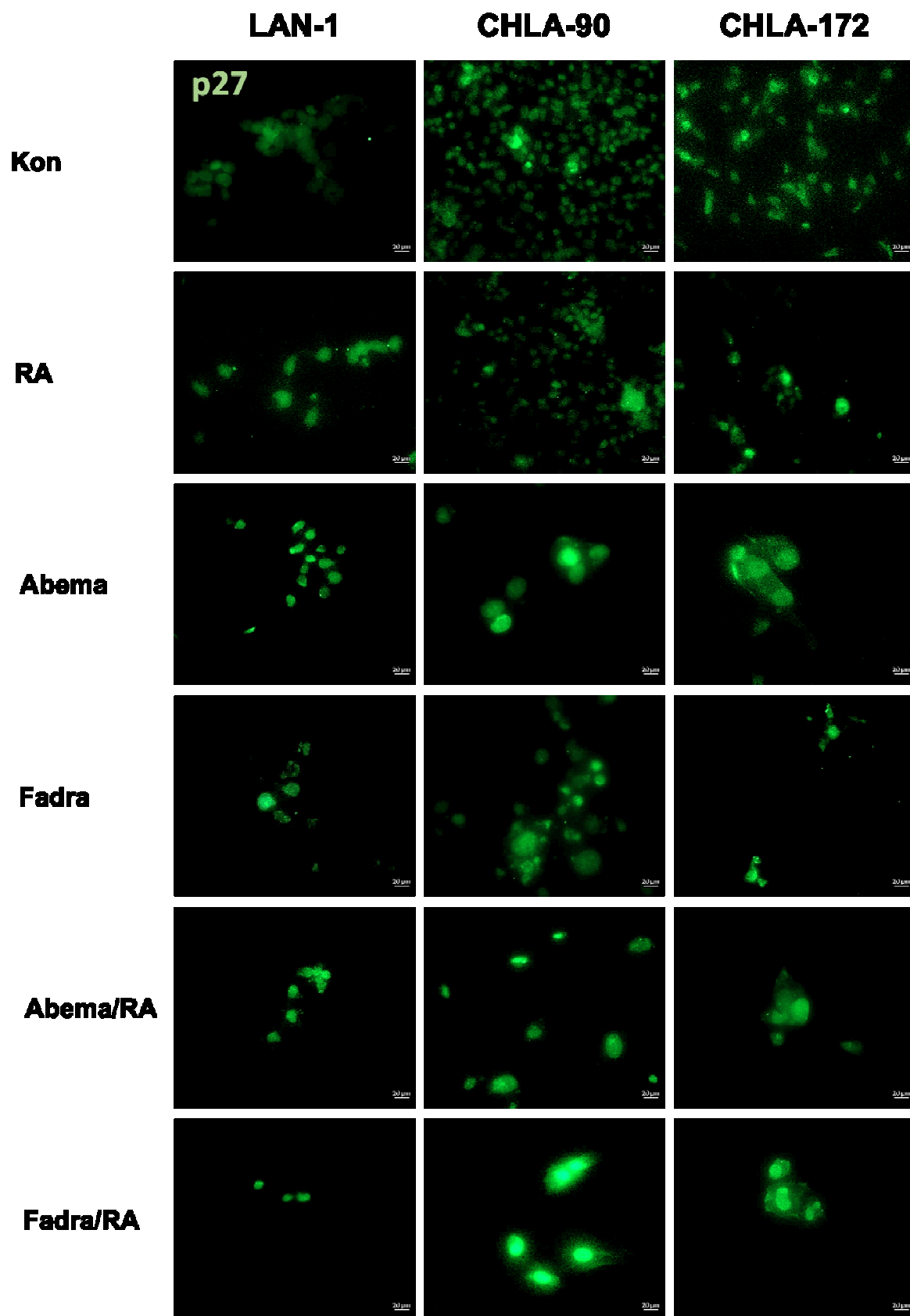


ABBILDUNG 14: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON p27 NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG

Darstellung repräsentativer Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie der LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172 nach Färbung mit p27-Antikörpern. Gezeigt sind die Einzelkanalbilder mit Alexa Fluor 488 für p27. Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop, der Maßstab in der rechten unteren Ecke gibt 20 µm an.

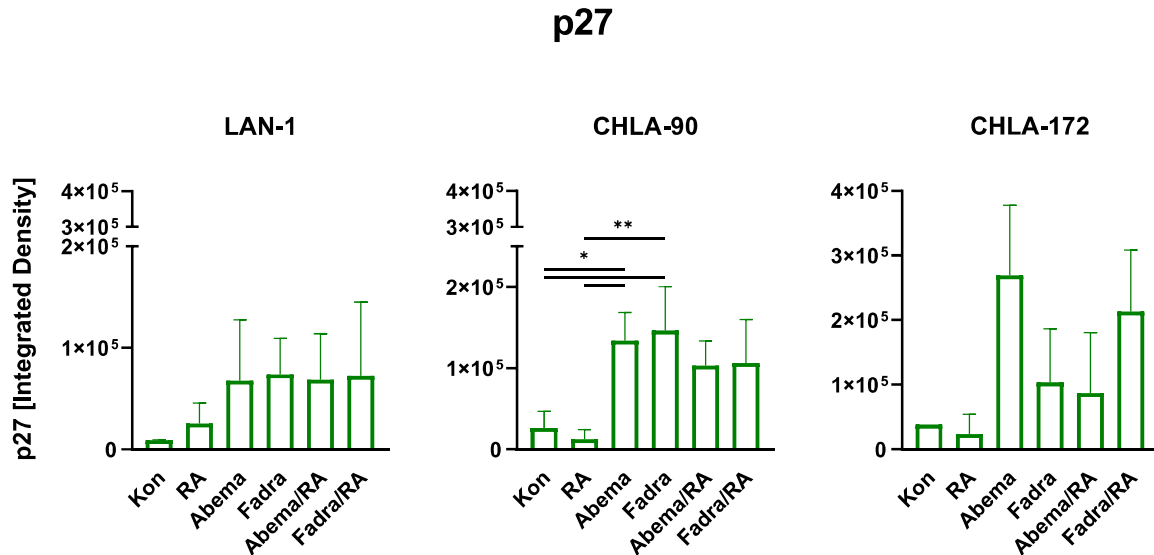


ABBILDUNG 15: QUANTIFIZIERUNG DER P27-FÄRBUNG

Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ (Integrated Density Analyse). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung von mindestens drei Bildern aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit dem one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). Die Quantifizierung wurde freundlicherweise von M.Sc. Annabell Wolff zur Verfügung gestellt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

4.5 EINFLUSS DER BEHANDLUNG AUF ZELLSTRESS

Der Effekt der genutzten Therapeutika auf Zellstress wurde ebenfalls durch eine Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Es wurden die Marker Cytochrom C und Calnexin verwendet. Die Untersuchung fand an den drei Zelllinien LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172 statt und die Behandlungen beinhalteten die Monotherapien und Kombinationen der CDKis Abemaciclib und Fadraciclib.

Unter CDKi Behandlung zeigte sich sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombinations-therapie ein Anstieg von Cytochrom C und Calnexin im Vergleich zur Kontrolle in allen drei untersuchten Zelllinien. Die Monotherapie mit 13-cis-RA hatte keine Auswirkung auf die beiden Zellstress-Marker. Zusätzlich zu Cytochrom C und Calnexin konnten anhand der Färbung mit Phalloidin Grün Auswirkungen der Behandlung auf das Zytoskelett der Zellen untersucht werden. Es kam zu einer Vergrößerung und zum Anschwellen der Zellen und teilweise zur Ausbildung langer Zellausläufer. In Abbildung 16 sind die Einzelkanäle der Färbung und das zusammengesetzte Bild aus allen Kanälen zu sehen. In Abbildung 17 sind repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung von der Zelllinie CHLA-90 dargestellt. Die Bilder der Zelllinien LAN-1 und CHLA-172 sind im Anhang zu finden.

Einschränkend muss gesagt werden, dass in dieser Färbung die Bildqualität aufgrund von Artefakten teilweise weniger gut war und somit insgesamt für die Auswertung weniger Bilder zur Verfügung standen. Dennoch konnte die Quantifizierung die Aussagen der Bilder bestätigen (Abbildung 18). Es kam in allen drei Zelllinien zum Anstieg beider Zellstress-Marker sowohl bei Abemaciclib und Fadraciclib Monotherapie als auch in den Kombinationstherapien. Die Monotherapie mit 13-cis-RA hatte keinen Anstieg der Marker zur Folge.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die CDKi Behandlung zu erhöhtem Zellstress führte, welcher sich sowohl in einem Anstieg der Zellstressmarker Cytochrom C und Calnexin als auch morphologisch zeigte. Dabei ergab sich kein Unterschied im Vergleich der Mono- und Kombinationstherapie.

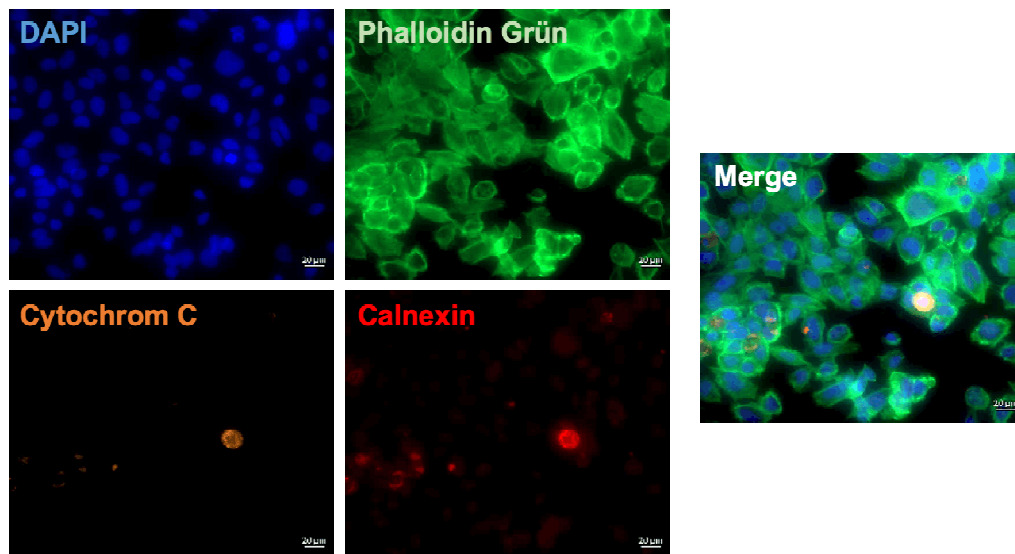
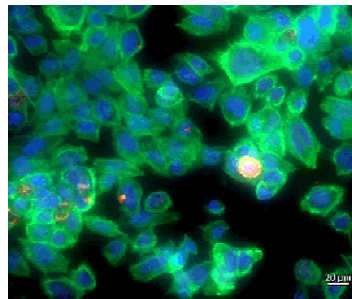
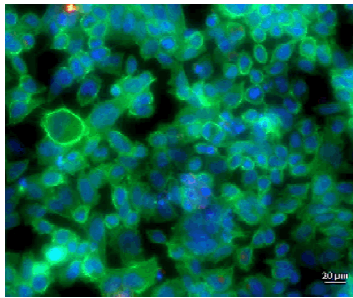


ABBILDUNG 16: EINZELKANÄLE DER CYTOCHROM C, CALNEXIN FÄRBUNG

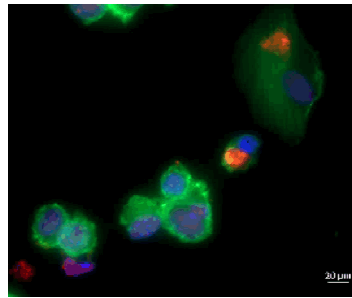
Dargestellt sind die Einzelkanäle der Cytochrom C, Calnexin Färbung, sowie das zusammengesetzte Bild aller Kanäle. Zusätzlich zu den Markern für Zellstress Cytochrom C und Calnexin wurden die Zellkerne mit DAPI und das Zytoskelett mit Phalloidin Grün gefärbt. Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop, der Maßstab in der rechten unteren Ecke zeigt 20 µm an.



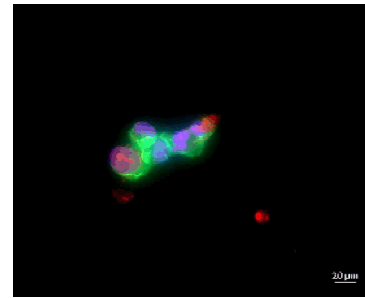
Kon



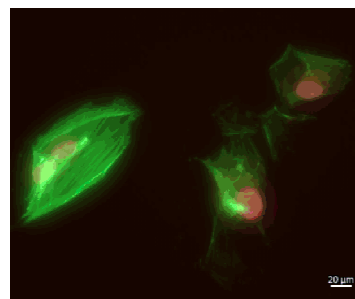
RA



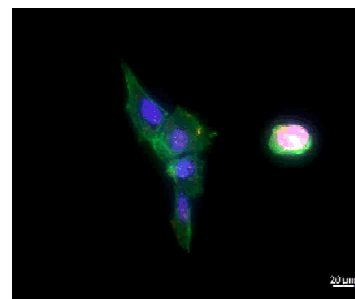
Abema



Fadra



Abema/RA



Fadra/RA

ABBILDUNG 17: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT CYTOCHROM C UND CALNEXIN NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG

Darstellung repräsentativer Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie der CHLA-90 nach Färbung von Cytochrom C (orange) und Calnexin (rot), Zytoskelettfärbung mit Phalloidin Grün, Kernfärbung mit DAPI (blau). Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop, der Maßstab in der rechten unteren Ecke zeigt 20 µm an.

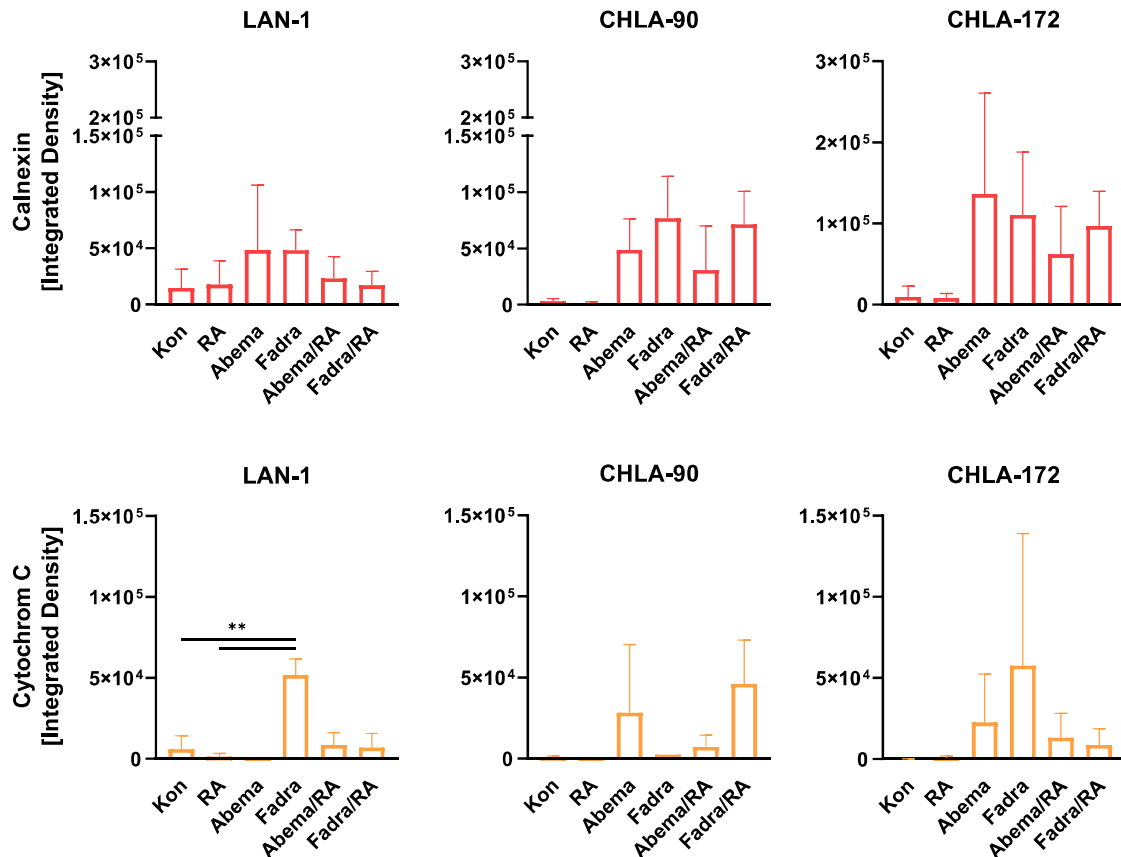


ABBILDUNG 18: QUANTIFIZIERUNG DER CYTOCHROM C, CALNEXIN FÄRBUNG

Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ (Integrated Density Analyse). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung von mindestens drei Bildern aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test), ** $p \leq 0,01$.

4.6 EINFLUSS DER BEHANDLUNG AUF MEDIKAMENTENRESISTENZ

Für die weitere Charakterisierung der Mono- und Kombinationstherapie mit CDKis wurde die Erhöhung der mit Medikamentenresistenz assoziierten Proteine MDR1 (P-Glykoprotein), MRP1/2 und BCRP in der Durchflusszytometrie untersucht. Der Versuch wurde an den Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 mit den Monotherapien der CDKis Abemaciclib und Fadraciclib, der Monotherapie mit 13-cis-RA und der Kombinationstherapie mit Abemaciclib und 13-cis-RA durchgeführt. Für die Auswertung wurde der MAF berechnet. Ab MAF-Werten größer 25 kann von Medikamentenresistenz ausgegangen werden.

Bei der Zelllinie LAN-1 zeigte sich in beinahe allen Behandlungen ein Anstieg aller drei mit Resistenz assoziierten Proteine (Abbildung 19). Einen Wert oberhalb der Schwelle von 25

erreichte allerdings nur die Kombinationstherapie mit Abemaciclib und 13-cis-RA für das Protein MRP1/2 (MAF 33), wobei hier bereits der Ausgangswert der Kontrolle (MAF 15) höher war als der Ausgangswert bei MDR1 (P-Glykoprotein) (MAF -4) und BCRP (MAF 1).

Bei CHLA-90 fiel die Veränderung der mit Resistenz assoziierten Proteine weniger gleichförmig aus. Lediglich bei BCRP gab es unter allen Behandlungen einen Anstieg. Für MDR1 (P-Glykoprotein) und MRP1/2 waren bereits die Ausgangswerte knapp oberhalb der Schwelle für Medikamentenresistenz (MAF 28 und MAF 27) und es ließen sich nur geringe Anstiege unter Behandlung verzeichnen. Auffällig war in dieser Zelllinie ein Anstieg aller drei Proteine unter Abemaciclib Monotherapie (MAF 37 bis 57) im Vergleich zur Kontrolle (MAF 0 bis 28).

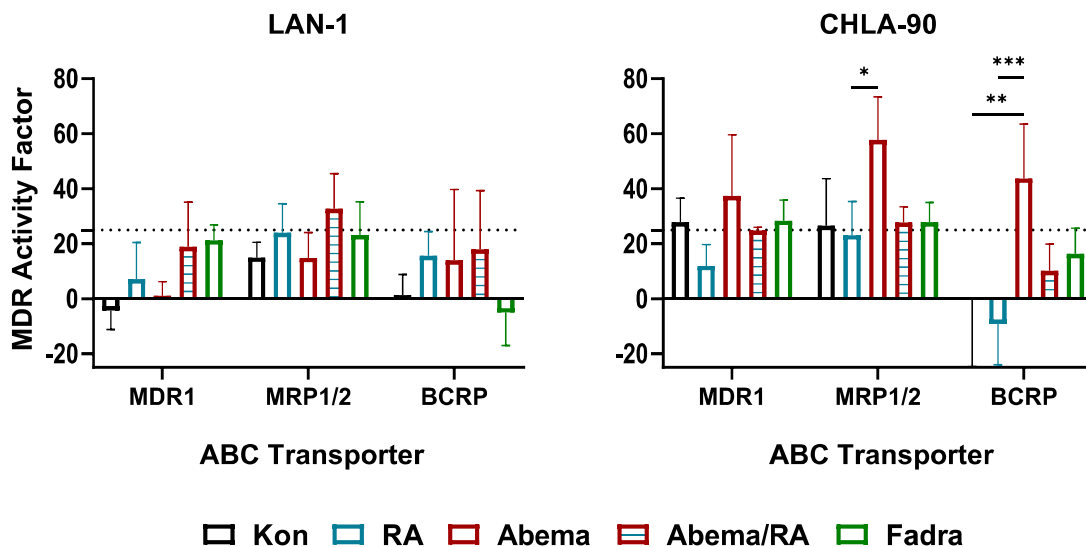


ABBILDUNG 19: MEDIKAMENTENRESISTENZ ASSOZIIERTE PROTEINE

Quantitative Darstellung des MDR Activity Factor (MAF) als Mittelwerte und Standardabweichung. MAF > 25 spricht für Medikamentenresistenz. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

4.7 NACHWEIS VON APOPTOTISCHEM UND NEKROTISCHEM ZELLTOD

Der zytotoxische Effekt der CDKi Monotherapie und der Kombinationstherapie mit Abemaciclib und Fadraciclib sollte genauer charakterisiert werden. Die Untersuchungen erfolgten an den drei Zelllinien LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172. Hierbei wurde anhand der Aufnahme von YO-PRO-1 und PI in die Zellen unterschieden, ob es sich um einen früh- beziehungsweise spät-apoptotischen oder einen nekrotischen Zelltod handelte.

Als Ergebnis zeigten sich in allen drei Zelllinien in der Kontrolle 95 % der Zellen vital (Abbildung 20). Die Monotherapie mit 13-cis-RA brachte in den Zelllinien CHLA-90 und CHLA-172 ein vergleichbares Ergebnis wie die Kontrolle. In der Zelllinie LAN-1 kam es bei Monotherapie mit 13-cis-RA zu einem Anstieg der avitalen Zellen auf 28 %. Darunter befanden sich 5 % früh-apoptotische Zellen, 10 % spät-apoptotische Zellen und 12 % nekrotische Zellen.

Die Behandlung mit den CDKis Abemaciclib und Fadraciclib und mit den Kombinationen mit 13-cis-RA führte in allen drei Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg der avitalen Zellen. In der genaueren Betrachtung zeigten sich in der Zelllinie LAN-1 unter CDKi Mono- und Kombinationstherapie bis zu 13 % der Zellen apoptotisch im Vergleich zu unter 2 % in der Kontrolle mit einer gleichmäßigen Verteilung zwischen früh- und spät-apoptotischen Zellen. Nekrosen waren in bis zu 11 % der behandelten Zellen im Vergleich zu 3 % in der Kontrolle zu beobachten. Es zeigte sich außerdem ein signifikanter Anstieg der spät-apoptotischen Zellen auf 9 % unter der Kombinationstherapie mit Abemaciclib und 13-cis-RA im Vergleich zur Abemaciclib Monotherapie (1 %).

In der Zelllinie CHLA-90 kam es unter CDKi Mono- und Kombinationstherapie mit Abemaciclib zu einem signifikanten Anstieg der nekrotischen Zellen mit bis zu 28 % der behandelten Zellen im Vergleich zu 2 % in der Kontrolle. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen der Mono- und der Kombinationstherapie. Die Behandlung mit Fadraciclib und Fadraciclib/ 13-cis-RA zeigte einen Anstieg der nekrotischen Zellen auf bis zu 15 %. Weiterhin kam es zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen in allen Behandlungsansätzen mit bis zu 15 % im Vergleich zur Kontrolle mit 3 %.

Die Wirkung der Behandlung auf CHLA-172 war vergleichbar zu CHLA-90. Es kam zu einem Anstieg der Nekrosen in den Kombinationstherapien auf bis zu 37 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit 2 %. Die Monotherapien führten ebenfalls zum Anstieg der Nekrosen auf bis zu 35 %. Bei der Apoptose war ein geringerer Anstieg zu verzeichnen mit bis zu 13 % im Vergleich zur Kontrolle mit 2 %. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Mono- und der Kombinationstherapie.

Insgesamt konnte unter Behandlung in der Zelllinie LAN-1 ein Anstieg sowohl des apoptotischen als auch des nekrotischen Zelltodes gesehen werden. In den Zelllinien CHLA-90 und CHLA-172 war die Nekrose die vorherrschende Zelltodform.

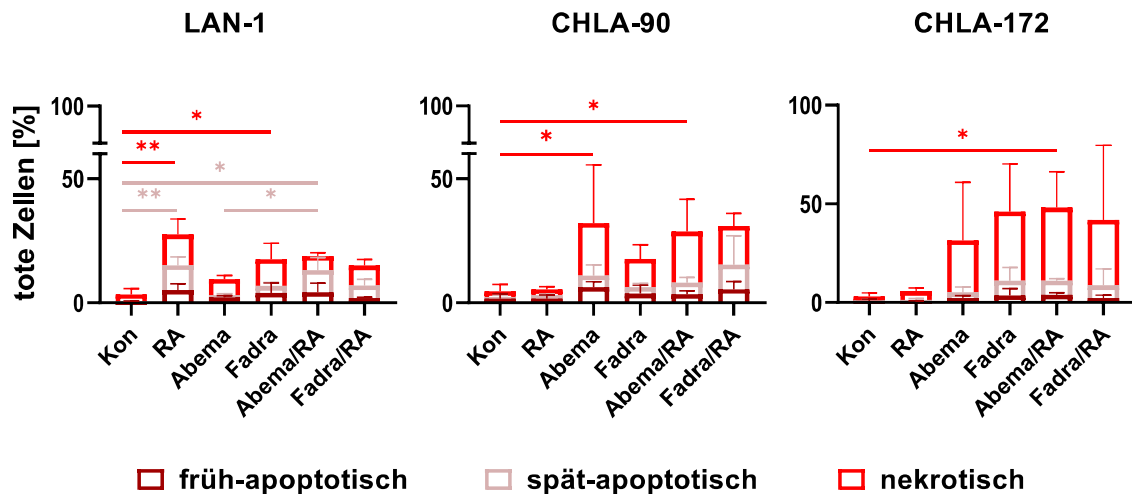


ABBILDUNG 20: UNTERSUCHUNG DER APOPTOSE UND NEKROSE

Darstellung des prozentualen Anteils der früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen nach Behandlung. Angegeben sind die Mittelwerte [%] und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test), * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

4.8 UNTERSUCHUNG DER DIFFERENZIERUNG AUF TRANSKRIPTIONSEBENE

Die Differenzierung der NB-Zellen unter CDKi Mono- und Kombinationstherapie wurde zusätzlich zur Immunfluoreszenzfärbung ebenfalls mittels qPCR untersucht. Es fand eine Messung der Genexpression der Differenzierungsmarker *ROBO2*, *STMN4*, *RBFOX3*, *MAP2*, *ENO2* und *TUBB3* sowie des Stammzellmarkers *KLF4* statt. Die Versuche wurden an den Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 durchgeführt.

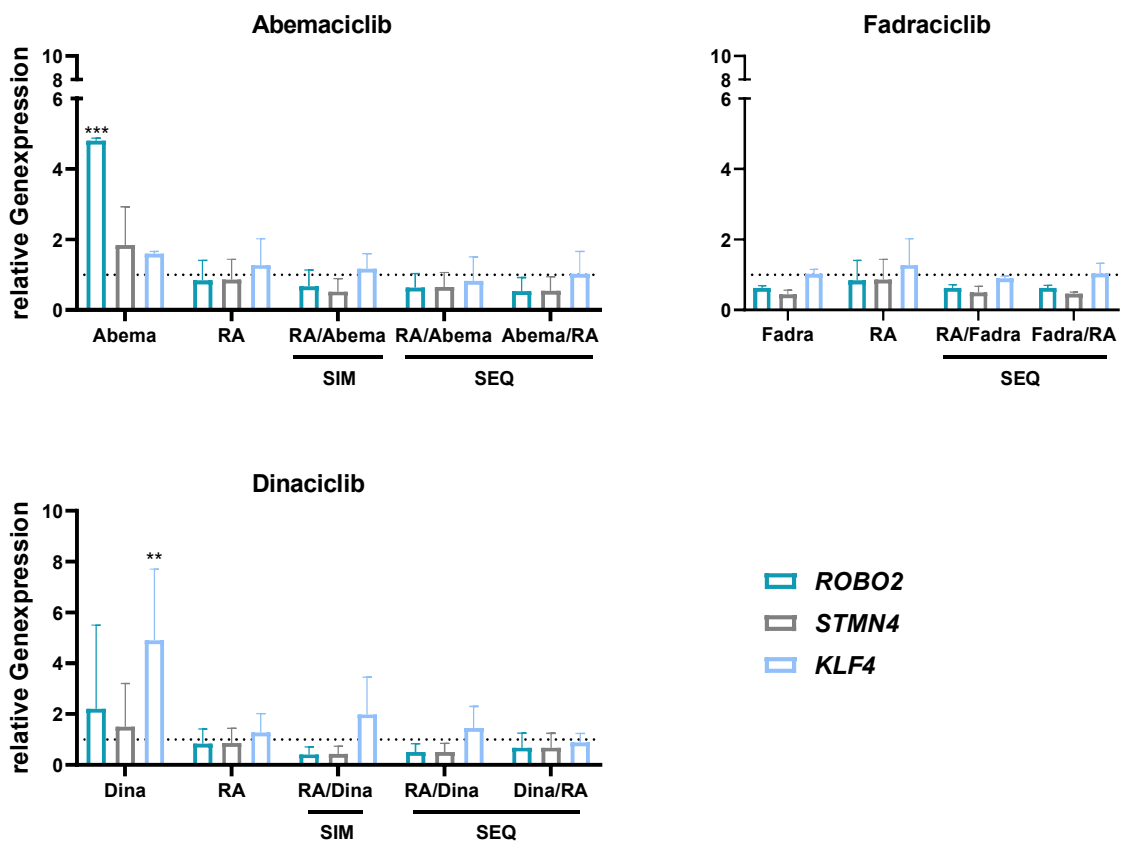
Zunächst wurden die Differenzierungsmarker *ROBO2* und *STMN4* und der Stammzellmarker *KLF4* untersucht (Abbildung 21). Die Zelllinie LAN-1 zeigte keine Veränderung der Marker, die auf eine Differenzierung hinweisen, lediglich die Abemaciclib Monotherapie führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression von *ROBO2* im Vergleich zur Kontrolle. Bei CHLA-90 waren in der Kombinationstherapie aller drei CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadraciclib mit 13-cis-RA teilweise Anstiege der Expression der Differenzierungsmarker *ROBO2* und *STMN4* im Vergleich zu Kontrolle zu sehen. Dies zeigte sich in der simultanen Behandlung und in der sequentiellen Behandlung in der Reihenfolge 13-cis-RA/ CDKi. Die Expression des Stammzellmarkers *KLF4* war bei LAN-1 teilweise erhöht, bei CHLA-90 zeigte sie sich durchgängig auf einem niedrigen Niveau.

Zur weiteren Untersuchung, ob andere Marker besser geeignet sind für die Zelllinie LAN-1, wurden die Versuche mit den Differenzierungsmarkern *RBFOX3*, *MAP2*, *ENO2* und *TUBB3*

ausgeweitet (Abbildung 22). Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle unter Behandlung ein Anstieg der Expression von *MAP2* und *TUBB3* und zum Teil auch *ENO2* in den Kombinations-therapien mit Abemaciclib und Dinaciclib. Zu beachten ist, dass auch die Monotherapie mit 13-cis-RA zu einer geringen Erhöhung der Differenzierungsmarker *MAP2*, *RBFOX3*, *TUBB3* und *ENO2* führte.

A

LAN-1



B

CHLA-90

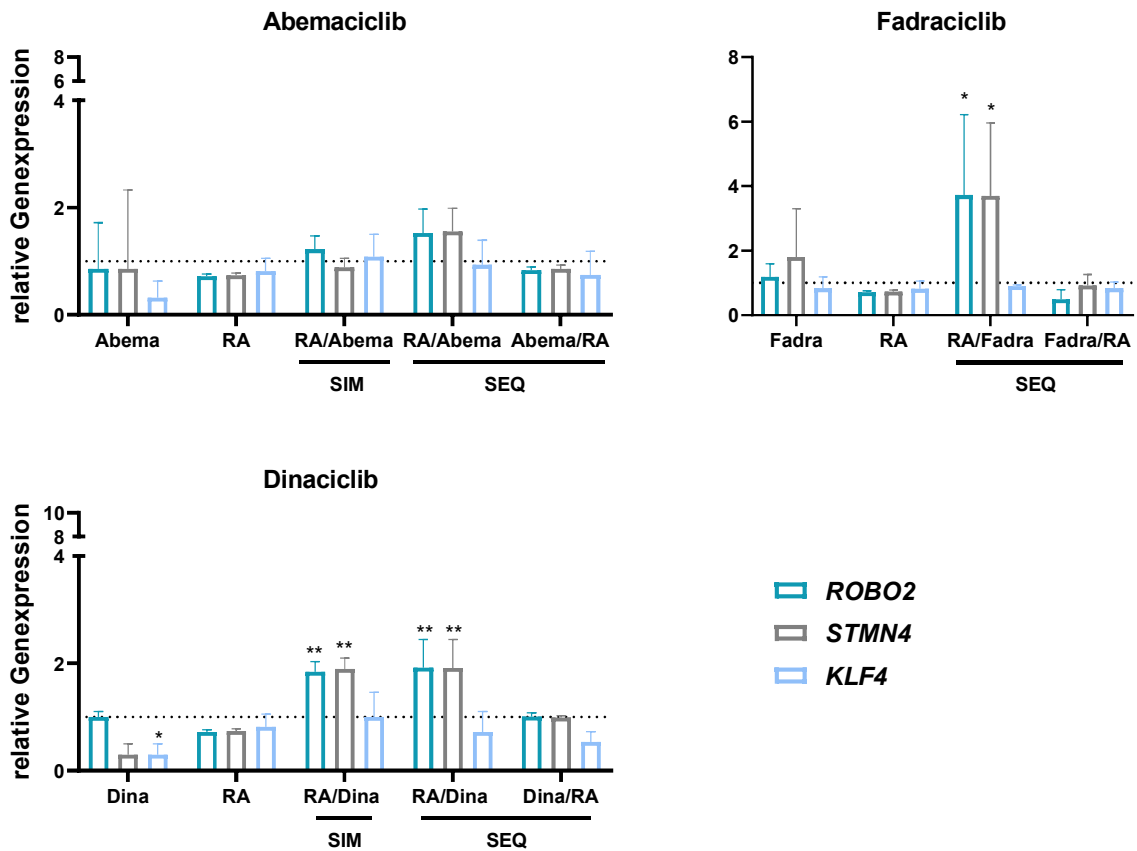


ABBILDUNG 21: EXPRESSION VON *ROBO2*, *STMN4* UND *KLF4* NACH BEHANDLUNG

(A, B) Darstellung der relativen Genexpression (Kontrolle = 1) als Mittelwerte und Standardabweichung nach Auswertung der qPCR nach $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Ergebnisse sind auf das Referenzgen *GAPDH* normiert. Die Untersuchung wurde in Triplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). Kennzeichnung der Signifikanz gegenüber der Kontrolle: * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

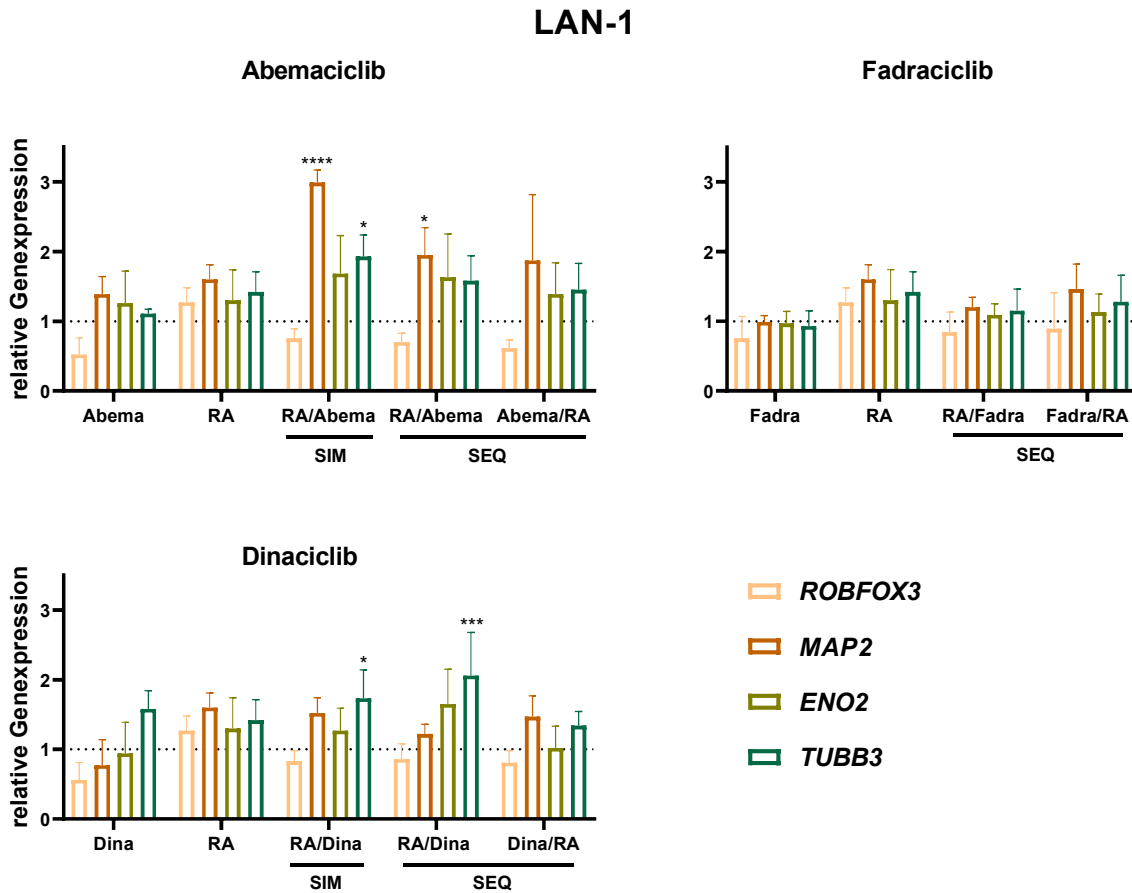


ABBILDUNG 22: EXPRESSION VON *ROBFOX3*, *MAP2*, *ENO2* UND *TUBB3* NACH BEHANDLUNG

Darstellung der relativen Genexpression (Kontrolle = 1) als Mittelwerte und Standardabweichung nach Auswertung der qPCR nach $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Die Ergebnisse sind auf das Referenzgen *GAPDH* normiert. Die Untersuchung wurde in Triplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). Kennzeichnung der Signifikanz gegenüber der Kontrolle: * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$.

V. DISKUSSION

Das NB ist für 10 % der Krebstodesfälle im Kindesalter verantwortlich (3). In Hochrisikostadien sind die Behandlungsmöglichkeiten limitiert und nur teilweise effektiv. Bei Rezidiven bestehen geringe Überlebenschancen (55). Die Verträglichkeit der Therapien spielt in diesem Patientenkollektiv eine große Rolle, da hauptsächlich sehr junge Kinder betroffen sind. Es sind sowohl die akute Toxizität als auch die Langzeitfolgen der Chemotherapie und der Bestrahlung zu beachten. So kann es zu einer dauerhaften Einschränkung des Hörvermögens, Wachstumsstörungen und chronischer Niereninsuffizienz kommen. Das Auftreten von Zweitmalignomen bei 3,5 % der Patient:innen innerhalb von 25 Jahren darf ebenfalls nicht vernachlässigt werden (41,115–117). Der Bedarf nach alternativen, besser verträglichen Behandlungen besteht somit weiterhin.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die antitumorale Wirkung von CDKis in Monotherapie und eine Verbesserung des Effekts durch die Kombination mit 13-cis-RA *in vitro* getestet. Im NB konnten mit schlechter Prognose assoziierte Mutationen nachgewiesen werden, die zu einer verstärkten Expression der CDKs führen (61,64,65) und somit als Zielstrukturen für die Behandlung mit CDKis dienen können. Neben der Wachstums- und Viabilitäts-einschränkung durch die Therapie wurde die Induktion einer Differenzierung der Tumorzellen als möglicher Behandlungsansatz geprüft. Die gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

5.1 ZYTOTOXIZITÄT DER CDKI MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE BEI NB-ZELLEN

CDKis entfalten ihre Wirkung auf Zellen hauptsächlich über zwei Mechanismen. Durch die Inhibition von CDK1/2/4/6, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind, kommt es zu einem Zellzyklusarrest, welcher nachfolgend in einer Apoptose oder Nekrose resultieren kann. Außerdem kommt es über die Inhibition von CDK7/8/9/12/13 zur Hemmung der RNA-Polymerase II und damit zu einer veränderten Transkription (57,60,118). Auch hierdurch kann es zum Wachstumsarrest kommen, unter anderem durch verminderte Transkription von N-myc (67). In dieser Arbeit wurden CDKis für beide Mechanismen verwendet. Abemaciclib hemmt über CDK4/6 hauptsächlich den Zellzyklus, während Dinaciclib als globaler CDKi durch Hemmung von CDK1/2/5/9 und Fadraciclib durch Hemmung von CDK2/9 sowohl den Zellzyklus als auch die Transkription beeinflussen. 13-cis-RA wirkt als Agonist an den Retinsäurerezeptoren RAR und RXR und führt darüber zu einer veränderten Genexpression (78). Hierbei

wurde ein Wachstumsarrest über Erhöhung des endogenen Zellzyklusinhibitors p27 sowie die Induktion einer morphologischen Differenzierung von NB-Zellen beschrieben (80).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der neue CDKi Fadraciclib auf das Zellwachstum und die Viabilität der drei verwendeten NB-Zelllinien wirkt. Es kam zelllinienabhängig unter Verwendung von Konzentrationen von 0,4 - 6 μ M zur Reduktion der Viabilität auf unter 50 %. Die längere Behandlung im zweimal 72-stündigen Ansatz zeigte ein etwas besseres Ansprechen als der einmal 72-stündige Ansatz. In den folgenden Kombinationsversuchen wurde Fadraciclib sowie Abemaciclib und Dinaciclib, deren Wirksamkeit in der Monotherapie bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte, zusammen mit 13-cis-RA eingesetzt. Hierbei zeigten sich synergistische Effekte der Viabilitätsreduktion mit einer Verstärkung der Wirkung im Vergleich zur Monotherapie. Besonders die Kombination mit Fadraciclib wirkte in allen Zelllinien synergistisch. Eine Überlegenheit der selektiven CDKis Abemaciclib und Fadraciclib gegenüber des globalen CDKi Dinaciclib war ebenfalls zu beobachten. So konnte Dinaciclib lediglich bei der Zelllinie LAN-1 einen Synergismus bewirken.

In einer Studie von Martinez-Monleon *et al.* wurde die Wirksamkeit von Abemaciclib *in vitro* gezeigt. Neun von zehn Zelllinien sprachen auf die Behandlung im einstelligen mikromolaren Bereich mit verminderter Proliferation an. Neben Abemaciclib wurde auch die Kombinationstherapie mit MDM2-Inhibitoren getestet. Bei *MDM2* handelt es sich um ein Protoonkogen, welches an der Regulation von p53 beteiligt ist. Die Kombinationstherapie CDK4/6i/MDM2i wirkte bei den Zelllinien mit p53-Wildtyp, allerdings nicht bei denen mit mutiertem p53. Auf die Wirksamkeit der Monotherapie mit Abemaciclib hatte der p53-Status keinen Einfluss (65). Zwei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, CHLA-90 und CHLA-172, tragen ebenfalls eine p53-Mutation (119) und es zeigte sich auch hier die gute Wirksamkeit von Abemaciclib. In einer Studie von Chen *et al.* wurde die Wirksamkeit von Dinaciclib an sechs NB-Zelllinien und zwei orthotopen Mausmodellen gezeigt. Hier führten zelllinienabhängig 7 bis 38 nM zu einer Wachstumsreduktion *in vitro*. Am *in vivo* Modell konnte eine Tumorregression bzw. eine Verhinderung der Tumorbildung an *MYCN*-transgenen Mäusen gesehen werden. Weiterhin beschrieben sie, dass die Wirkung hauptsächlich durch die Hemmung von CDK2 und CDK9 geschieht (61). Poon *et al.* zeigten die Wirksamkeit von Fadraciclib auf neun verschiedene NB-Zelllinien. Es kam zu verminderter Proliferation der Zellen. Die Autor:innen beschrieben eine bessere Wirkung bei *MYCN*-amplifizierten im Gegensatz zu nicht amplifizierten Zellen mit einer IC_{50} von 1 μ M vs. > 10 μ M. Sie sahen die Wirkung von Fadraciclib in der Herunterregulation von *MYCN*, welche zu Wachstumsarrest und Induktion der Apoptose führt (67). Dies deckt sich teilweise mit den Ergebnissen dieser Arbeit. LAN-1 trägt im Gegensatz zu CHLA-90

und CHLA-172 eine *MYCN*-Amplifikation (120) und zeigte sich sensitiver gegenüber der Inhibition durch Fadraciclib mit einer IC_{50} von 0,4 μM . Dennoch sprachen auch CHLA-90 und CHLA-172 gut auf Fadraciclib mit einer IC_{50} von 1 μM an. Poon *et al.* verwendeten einen 8-stündigen Behandlungsansatz, der in dieser Arbeit verwendete 72-stündige und zweimal 72-stündige Ansatz trug hier möglicherweise zu niedrigeren IC_{50} Werten bei. Die Autor:innen konnten die Wirksamkeit von Fadraciclib auch am *in vivo* Mausmodell zeigen. In drei verschiedenen Modellen, unter anderem einem *MYCN*-transgenen Modell und einem Modell mit einer *ALK*-Mutation konnte ein verringertes Tumorstadium und ein verlängertes Überleben bei guter Verträglichkeit gezeigt werden. Im *MYCN*-transgenen Modell erfolgte die Behandlung hierfür mit einer Kombinationstherapie aus Fadraciclib und dem DNA-alkylierenden Zytostatikum Temozolomid (67,121). Ferguson *et al.* untersuchten 2023 vergleichbar zur vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit eines CDKi in Kombination mit RA. Der CDK4/6i Palbociclib konnte hierbei mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmend synergistische Effekte in Bezug auf die Wachstumsreduktion in der Kombinationstherapie mit all-trans-RA an drei Zelllinien zeigen. Die Autor:innen vermuteten die Ursache des Synergismus in einem verstärkten Zellzyklusarrest durch die kombinierte Wirkung der beiden Therapeutika (101).

Die Monotherapie mit 13-cis-RA zeigte in der vorliegenden Arbeit lediglich eine geringe Wirkung bei der Zelllinie LAN-1 und keine Wirkung bei den Zelllinien CHLA-90 und CHLA-172. Dies steht im Gegensatz zu Publikationen der Vergangenheit, die die Wirksamkeit von RA auf NB-Zelllinien belegen (82,122,123). Allerdings zeigte der klinische Einsatz von 13-cis-RA in den letzten 20 Jahren nicht die erwünschte Wirkung, nur wenige Patient:innen sprechen auf die Behandlung an (84,124,125). Dies könnte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit widerspiegeln. LAN-1 trägt eine *MYCN*-Amplifikation und es wurde beschrieben, dass *MYCN*-amplifizierte Tumoren besser auf 13-cis-RA ansprechen (78,86,87). CHLA-90 und CHLA-172 hingegen wurden in der Literatur als besonders chemoresistent charakterisiert. Es wurde außerdem gezeigt, dass Tumoren im Verlauf der Therapie vermehrt Resistenzen entwickeln (126). Die drei in dieser Arbeit verwendeten etablierten Zelllinien entstammen jeweils von Patient:innen, die mit Chemotherapie und teilweise mit Stammzelltherapie behandelt wurden. Somit ist eine geringe Wirksamkeit der 13-cis-RA Monotherapie im Falle von LAN-1 und eine Wirkverstärkung in der Kombinationstherapie mit CDKis in allen drei Zelllinien umso beachtenswerter. Ferguson *et al.* konnten in ihrer Studie ebenfalls nur eine geringe Wirksamkeit der Monotherapie mit all-trans-RA zeigen (101). Es wurden verschiedene Erklärungen für die Resistenz von Tumoren gegenüber RA vorgeschlagen, darunter die verminderte RA Aufnahme, der verstärkte Abbau über das Cytochrom p450 System, die aktive Ausscheidung über Efflux-Pumpen, die Herunterregulation von RA-responsiven Genen sowie die veränderte Expression von Koaktivatoren und *downstream*-Zielgenen (127–129).

Somit sind die vorliegenden Ergebnisse zur Wirksamkeit der CDKis in Mono- und Kombinationstherapie mit der Literaturrecherche vereinbar. Durch die Nutzung von Zelllinien in dieser Arbeit, an denen bisher keine Studien mit CDKis durchgeführt wurden, werden neue Erkenntnisse erbracht. Ebenfalls wurde die Kombinationstherapie eines CDKi mit RA bisher in nur einer anderen Studie beschrieben (101), deren Ergebnisse bestätigt werden konnten.

Auf die Untersuchung der grundlegenden Wirksamkeit der CDKis in Mono- und Kombinationstherapie folgten genauere Untersuchungen des Mechanismus. Dabei konnte in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die Behandlung mit Abemaciclib und Fadraciclib allein und in Kombination mit 13-cis-RA bei LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172 zur Verstärkung von Zellstress führte, angezeigt durch die Erhöhung von Cytochrom C und Calnexin. Auch morphologische Veränderungen in Sinne einer Zellschwellung unterstützten diese Schlussfolgerung. Dieser Zellstress führte zum Zelltod, welcher in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte. So resultierte die Mono- und Kombinationstherapie der CDKis in allen drei untersuchten Zelllinien in einer Erhöhung des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes im Vergleich zur Kontrolle. Bei LAN-1 dominierte dabei die Apoptose, während bei CHLA-90 und CHLA-172 die Nekrose die vorherrschende Zelltodform war. Bei diesem Versuch zeigten sich zum Teil höhere Standardabweichungen in den Zelllinien CHLA-90 und CHLA-175, welche möglicherweise aufgrund methodischer Ungenauigkeiten entstanden. Auch eine unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Zellklone gegenüber der Behandlung sind als Erklärung denkbar. Somit lassen die Ergebnisse zwar eine Tendenz der Behandlung für die beiden Zelllinien erkennen, sollten allerdings in der Zukunft durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Die apoptotische Wirkung der CDKis konnte in anderen Studien ebenfalls gesehen werden. Swadi *et al.* verwendeten den CDK4/6i Palbociclib und den CDK1i RO-3306. Beide konnten in den zwei verwendeten Zelllinien einen apoptotischen Zelltod induzieren (69). Poon *et al.* konnten wie oben beschrieben durch den Einsatz von Fadraciclib ebenfalls eine Apoptose in ihren NB-Zelllinien sehen. Hierbei war die gemeinsame Hemmung von CDK2 und CDK9 wichtig, da weder der Einsatz eines selektiven CDK9 Inhibitors noch der Knockout von CDK2 oder CDK9 einzeln zur Apoptose führten. Die Autor:innen schlussfolgerten, dass die Herunterregulation von *MYCN* durch die Hemmung von CDK9 die Zellen für die Induktion des Zelltodes durch CDK2 sensibilisierte. Am *in vivo* Mausmodell fanden die Autor:innen ebenfalls apoptotische Zellen in den Tumoren (67).

5.2 DIFFERENZIERUNG VON NB-ZELLEN DURCH CDKi MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE

Das NB als embryonaler Tumor behält in seiner Entartung die Fähigkeit zur Differenzierung (80). Dieser Mechanismus wird als Ursache der spontanen Regression, welche vor allem junge Patient:innen betrifft, vermutet (41,92). Auch wurde die Differenzierung häufig als Wirkmechanismus von RA bei NB-Zellen beschrieben (82,122). Andere Substanzen wie *nerve growth factor* (NGF), Prostaglandine, Glukokortikoide und Zytostatika haben *in vitro* ebenfalls bereits zu einer Differenzierung der NB-Zellen geführt (41).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte eine Differenzierung der NB-Zellen durch niedrige Konzentrationen von Abemaciclib anhand morphologischer Kriterien und genetischer Marker gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt bei der Fadraciclib Monotherapie und in den Kombinationstherapien von Abemaciclib und Fadraciclib mit 13-cis-RA ebenfalls gesehen werden. Auf Proteinebene zeigte sich in der Immunfluoreszenz ein Anstieg der Differenzierungsmarker ROBO2 und STMN4. Die visuelle Auswertung der Immunfluoreszenz wurde mittels Quantifizierung verbessert. Diese wandelt den subjektiven Bildeindruck in objektive Zahlen um. Auch auf Transkriptionsebene konnte in einigen Fällen ein Anstieg der Differenzierungsmarker *ROBO2* und *STMN4* in der qPCR gesehen werden. An der Zelllinie LAN-1 erfolgte zusätzlich die Testung der Differenzierungsmarker *RBFOX3*, *MAP2*, *ENO2* und *TUBB3*, welche eine Veränderung zeigten. In der qPCR waren jedoch hohe Standardabweichungen zu verzeichnen, sodass deren Aussagekraft einschränkt ist. Insgesamt waren die Ergebnisse der qPCR zu uneinheitlich, um sicher auf eine Differenzierung der Zellen schließen zu können. In keiner der beiden Untersuchungen war eine Verstärkung der Differenzierung durch die Zugabe von 13-cis-RA im Vergleich zur CDKi Monotherapie zu sehen. Der Stammzellmarker KLF4 zeigte sich bei LAN-1 unverändert unter Behandlung. Bei CHLA-90 war in der Immunfluoreszenz bei KLF4 ein leichter Anstieg zu sehen. Eine mögliche Erklärung dafür stellt ein besseres Überleben eben jener Zellen dar, die stammzellähnlich sind, sodass diese für die Färbung weiterhin vorhanden waren. In der Zukunft sollten die Ergebnisse durch weitere Versuche bestätigt werden.

Die Differenzierung von NB-Zellen durch CDKis wurde in der Literatur in wenigen Fällen beschrieben. Swadi *et al.* erreichten durch niedrige Konzentrationen von Palbociclib eine Differenzierung in einer von zwei NB-Zelllinien. Höhere Konzentrationen führten in dieser Zelllinie lediglich zu zytotoxischen Effekten (69). Diese konzentrationsabhängige Differenzierungsinduktion entspricht den Ergebnissen der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe und führte in der vorliegenden Arbeit zur Verwendung möglichst geringer Konzentrationen der CDKis. In einer anderen Studie von Molenaar *et al.* konnte durch den Knockdown von CDK4 ebenfalls die

Differenzierung *in vitro* erreicht werden (102). In der oben beschriebenen Studie von Ferguson *et al.* führte die Palbociclib Monotherapie in drei von fünf Zelllinien zur Differenzierung. Diese drei Zelllinien werden laut Autor:innen dem adrenergen Zelltyp zugeordnet. Bei den Zelllinien, die besonders den mesenchymalen Zelltyp ausprägen, zeigte sich vor allem eine zytotoxische Wirkung (101). LAN-1 wurde ebenfalls als adrenerger Zelltyp charakterisiert (130,131) und zeigte in unseren Untersuchungen die Differenzierung unter Behandlung. Bei Ferguson *et al.* führte die längere Behandlung mit Palbociclib über mehr als 17 Tage zur neuronalen Differenzierung der Zellen, sie behielten aber die Fähigkeit zur Expansion. Die Autor:innen schlossen daraus, dass der Zellzyklusarrest durch den CDKi nicht ausreichend sei und eine Kombinationstherapie die Wirkung verbessern könne. In der Kombination mit all-trans-RA kam es zur Differenzierung aller drei untersuchten Zelllinien. Im Sphäroidmodell, einer dreidimensionalen Form der Zellkultur, konnte dies ebenfalls bestätigt werden. Insgesamt kam es durch die Kombinationstherapie zur Differenzierung, diese war jedoch nicht in allen Zelllinien stärker ausgeprägt als in der Palbociclib Monotherapie (101). Diese Ergebnisse decken sich insgesamt mit den Feststellungen dieser Arbeit, dass die Monotherapie mit CDKis und auch die Kombinationstherapie mit CDKis und 13-cis-RA zur Differenzierung der NB-Zellen führen kann. Dabei führt jedoch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie nicht zur Verstärkung des differenzierenden Effekts.

Der Zellzyklusarrest wurde als Voraussetzung der Differenzierung sowohl für die Wirkung von RA (80,99) als auch für CDKis beschrieben (69,98). In einer Studie wurde gezeigt, dass besonders CDK3, CDK4 und CDK6 als Regulatoren der Differenzierung über einen induzierten Zellzyklusarrest wirken (98). In der vorliegenden Arbeit wurde der Zellzyklusarrest an allen drei Zelllinien unter Färbung des endogenen Zellzyklusinhibitors p27 in der Immunfluoreszenz untersucht. Dabei konnte ein Zellzyklusarrest sowohl unter Monotherapie mit Abemaciclib und Fadraciclib als auch in den Kombinationstherapien gesehen werden.

Der Inhibitor p27 kontrolliert den Zellzyklus, indem er die CDK/ Cyclin-Komplexe des G1/S-Übergangs bindet und somit einen G1-Arrest bewirkt. Es wurde beschrieben, dass p27 an der Regulation von Zellentwicklung und Differenzierung beteiligt ist (107). So war in zwei Studien die Differenzierung von Oligodendrozyten mit einem Anstieg von p27 verbunden (132,133) und wurde bei p27-defizienten Mäusen gehemmt (132). Die Induktion der Differenzierung in APL-Zellen durch Vitamin D3 führte zu einer verstärkten Expression von p27 (134). Das Gleiche konnte an murinen NB-Zellen bei Induktion der Differenzierung durch DMSO gezeigt werden (135). Bei zentralen Glia-4 Zellen führte die Induktion der Differenzierung zu Astrozyten ebenfalls zu einem p27-Anstieg (136). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die

Überexpression von p27 selbst zur Differenzierung führen kann (107,135). Eine mögliche Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist folglich, dass der Zellzyklusarrest durch CDKis und durch kombinierte Hemmung mit 13-cis-RA zu einem Zellzyklusarrest führt, welcher in der Differenzierung der Zellen mündet und dabei mit einem Anstieg des Zellzyklusinhibitors p27 einhergeht. Die Zunahme von p27 fördert dabei möglicherweise die Differenzierung der Zellen zusätzlich.

5.3 CDKIS IN DER KLINISCHEN ANWENDUNG

Zum jetzigen Zeitpunkt haben wenige Studien die klinische Wirksamkeit von CDKis an Patient:innen mit NB untersucht. Das pädiatrische Patientenkollektiv stellt eine besondere Herausforderung für Medikamentenstudien dar, sowohl aus ethischer Sicht als auch in Bezug auf die Durchführbarkeit und die Finanzierung (137–139). In einer Phase-I-Studie des CDK4/6i Ribociclib an Patient:innen mit NB, rhabdoiden Tumoren und anderen soliden Tumoren konnten Georger *et al.* eine akzeptable Sicherheit mit vor allem hämatologischen Nebenwirkungen zeigen. Bei 7 von 15 Patient:innen mit NB zeigte sich eine stabile Erkrankung. In einem Fall hielt dies für 8 Monate an, in einem für 15 Monate und eine/r der Patient:innen war nach 26 Monaten noch unter Therapie. Laut den Autor:innen ist das in diesen fortgeschrittenen Hochrisikostadien mit stark vorbehandelten und rezidierten Patient:innen ein vielversprechendes Ergebnis. Die Behandlung zeigte besonders beim NB Erfolg, von den übrigen 17 Patient:innen mit anderen Tumoren sprachen nur zwei auf die Behandlung an (70). Abemaciclib wird in zwei laufenden Studien an Patient:innen mit NB untersucht (NCT02644460 und NCT04238819), bisher liegen noch keine Ergebnisse vor. Von der europäischen ESMART-Studie (NCT02813135), in der unter anderem Ribociclib und Fadraciclib in Kombinationstherapien untersucht werden, gibt es für die Behandlung mit Ribociclib erste Ergebnisse. Von den drei eingeschlossenen Patient:innen mit NB zeigten zwei eine stabile Erkrankung unter Therapie mit Ribociclib/Topotecan/Temozolomid bzw. Ribociclib/Everolimus (140). Diese insgesamt wenigen Patient:innen bieten aktuell nur eine limitierte Aussagekraft und es müssen in der Zukunft weitere Studien durchgeführt werden. Dennoch zeigen die ersten Ergebnisse das große Potential der CDKis in der Behandlung des NB und bestätigen die Tendenz der im Rahmen der vorliegenden *in vitro*-Studie erhobenen Ergebnisse.

Die Übertragung positiver *in vitro* Ergebnissen auf die Wirksamkeit in der Anwendung an Patient:innen stellt stets eine Herausforderung dar. So wurde in der Literatur die Differenzierung der NB-Zellen *in vitro* durch einige Agenzien beschrieben, unter anderem RA, bei der der tatsächliche klinische Einsatz als Therapeutikum weniger gute Wirkung zeigt (84). Als Limitation

dieser Arbeit ist die Verwendung etablierter, kommerziell erhältlicher Zelllinien zu nennen. Im Laufe der Langzeitkultivierung etablierter Zelllinien können sich einige Charakteristika der Zelllinien im Vergleich zu den Ursprungstumoren verändern (141,142), sodass für eine sichere Aussage zur Wirksamkeit an Patient:innen *in vivo* Untersuchungen benötigt werden. Außerdem wurden die Therapeutika in der vorliegenden Arbeit nicht im Langzeitansatz untersucht. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie die Zellen sich unter einer Langzeittherapie verhalten und ob möglicherweise eine kurze Behandlung für die Wirkung ausreicht. Das NB ist ein sehr heterogener Tumor, sowohl intertumoral als auch intratumoral (7,91). Dies lässt sich im *in vitro* Modell nur bedingt nachbilden. Durch die Verwendung drei verschiedener Zelllinien in der vorliegenden Arbeit können jedoch Einblicke in die Auswirkungen der Behandlung auf Tumorwachstum, Wirkmechanismus und Medikamentenresistenz gezeigt werden. Zur Verbesserung der Aussagekraft der Versuche wurden Zelllinien von Hochrisikotumoren verwendet, eben des Patientenkollektivs, bei dem die weitere Forschung benötigt wird. LAN-1 trägt im Gegensatz zu CHLA-90 und CHLA-172 eine *MYCN*-Amplifikation (120). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen somit, dass die Therapie mit CDKis *in vitro* sowohl bei *MYCN*-amplifizierten als auch bei nicht amplifizierten NB-Zellen Wirkung zeigt. Dies ist relevant, da eine *MYCN*-Amplifikation für eine Einstufung in die Hochrisikogruppe sorgt, es jedoch auch Patient:innen in dieser Gruppe gibt, die andere Mutationen tragen wie zum Beispiel die *ATRX*-Mutation, welche auch bei CHLA-90 gefunden wurde (37,143).

Neben der Wirksamkeit auf Tumorzellen ist ein weiterer wichtiger Punkt jedes Therapeutikums die Wirkung auf gesunde Zellen und damit die Verträglichkeit. Die CDKis wirken durch ihren Mechanismus auf die CDKs aller Zellen und somit auch der gesunden Zellen. Der Verlust von CDK4/6 wurde in Versuchen von den meisten Zellen gut vertragen, ebenso der Verlust von CDK2, da diese sich gegenseitig kompensieren können (144,145). Die meisten gesunden Zellen scheinen nicht von diesen CDKs abhängig zu sein. Anderes gilt für CDK1, welche essentiell zu sein scheint und unter anderem für die hohe Toxizität von Pan-CDK-Inhibitoren in der Vergangenheit verantwortlich gemacht wird (63,146). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass besonders Tumorzellen von der RNA-Polymerase II, welche durch CDK9i in ihrer Aktivität verringert wird, abhängig sind. So untersuchten Frame *et al.* Fadraciclib an Brustkrebszelllinien und non-malignen epithelialen Zelllinien. Dabei konnten sie zusätzlich zu deutlich höheren IC₅₀ Werten für non-maligne Zellen zeigen, dass es bei diesen zwar zur Hemmung der RNA-Polymerase II kam, diese aber nur bei den transformierten Zellen zur Induktion der Apoptose führte (76). Insgesamt ergibt sich daraus eine gute Verträglichkeit für die in dieser Arbeit verwendeten CDK4/6i und CDK2/9i. Durch ihre Zulassung für die Behandlung von hormonrezeptorpositivem, HER2-negativem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs in den Jahren 2016, 2017 und 2018 können für die CDK4/6is Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib

die Nebenwirkungen nach mehrjähriger klinischer Anwendung evaluiert werden. Hierbei zeigt sich insgesamt eine gute Verträglichkeit (147–151). Auch Fadracilib konnte in einer ersten Studie im erwachsenen Patientenkollektiv eine gute Verträglichkeit bestätigen (77). In der oben genannten bisher einzigen Studie im pädiatrischen Patientenkollektiv mit Ribociclib wurde ebenfalls eine gute Verträglichkeit beobachtet (70).

Ein Aspekt, der auch bei bisherigen Behandlungen des NB eine Rolle spielt, sind Resistenzen, die entweder vorbestehen oder sich durch die chemotherapeutische Behandlung entwickeln. Diese tragen dazu bei, dass Patient:innen mit rezidiertem NB eine sehr schlechte Prognose haben (7,12,152). In der Anwendung von CDK4/6is bei Brustkrebs wurde gesehen, dass ein großer Teil der Patient:innen Resistenzen entwickelt (146,153). Dies geschieht unter anderem durch die Überexpression von *CCNE1* (Cyclin E) und die Herunterregulation oder Mutation von *RB1* (154–156). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Resistenzentwicklung in der Durchflusszytometrie anhand der Enzymaktivität der Efflux-Proteine MDR1 (P-Glykoprotein), MRP1/2 und BCRP untersucht. Die Efflux-Proteine entfernen Therapeutika spezifisch aus der Zelle und können als Resistenzmechanismus von Tumorzellen vermehrt exprimiert und in die Zellwand eingebaut werden. In den Untersuchungen an den Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 zeigten sich geringe Anstiege der Proteine unter Mono- und Kombinationstherapie, die jedoch nicht die Schwelle erreichten, ab welcher von Multiresistenz gesprochen werden kann. Diese Ergebnisse gilt es im Langzeitsatz zu überprüfen, da bei dem hier verwendeten zweimal 72-stündigem Ansatz möglicherweise nicht das volle Ausmaß der Resistenzentwicklung abgebildet werden konnte. Dennoch sind die Ergebnisse des Kurzzeitansatzes vielversprechend. Eine Möglichkeit zum Überwinden von Resistenzen ist der Einsatz von Kombinationstherapien (70,78,154). Die Resistenzen gegen CDKis entstehen unter anderem über den Phosphoinosid-3-Kinase(PI3K)/ Akt-Signalweg (60,146,155). In Einklang damit konnte die Kombinationstherapie von Palbociclib mit PI3K-Inhibitoren bei Brustkrebs die Entstehung einer Medikamentenresistenz gegen Palbociclib *in vitro* und *in vivo* verhindern (154). Welche Kombinationstherapien mit CDKis beim NB wirksam sind, sollte in weiteren Studien evaluiert werden. Die Kombinationstherapie mit 13-cis-RA scheint in Bezug auf den zytotoxischen Effekt vorteilhaft, für eine Verstärkung der Differenzierung könnte es vorteilhaftere Kombinationspartner geben.

5.4 AUSBLICK

In dieser Studie konnte die Wirksamkeit des CDKi Fadracilib und der Kombinationstherapien der CDKis Abemaciclib, Dinaciclib und Fadracilib mit 13-cis-RA auf drei NB-Zelllinien gezeigt werden. Es kam zu einer Wirkungsverstärkung durch die Kombinationstherapien in Bezug auf

den zytotoxischen Effekt. Durch die Behandlung konnte eine Differenzierung der Tumorzellen erreicht werden, diese wurde jedoch durch die Kombinationstherapien im Vergleich zur Monotherapie nicht verstärkt. Die CDKis stellen somit eine Möglichkeit der Behandlung beim Hochrisiko-NB dar. Nicht zuletzt wegen ihrer guten Verträglichkeit könnten sie in der Zukunft im pädiatrischen Patientenkollektiv zum Einsatz kommen. Die wenigen bisher durchgeführten klinischen Studien (70,140) bestätigen das große Potenzial der CDKis in der Anwendung beim NB.

Zukünftige Untersuchungen sollten sich darauf konzentrieren herauszufinden, wie CDKis beim NB in Kombination mit herkömmlichen Zytostatika wirken und ob hierdurch synergistische Effekte erzielt werden können. In den Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte eine Induktion des immunogenen Zelltodes in NB-Zellen durch die Behandlung mit CDKis gesehen werden. Die Ergebnisse sind im Anhang unter 8.2 dargestellt. In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass CDKis in der Vergangenheit eine Verstärkung der Wirkung von Immuntherapien sowie die Induktion von immunogenen Mechanismen selbst zeigten (157–160). Die Kombination mit Immuntherapeutika scheint deshalb ebenfalls ein vielversprechender Ansatz zu sein, den es für die zukünftige Behandlung des NB zu untersuchen gilt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Neuroblastom (NB) ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindes- und Jugendalter und ist dabei für 10 % der Krebstodesfälle verantwortlich. Bisher sind die Behandlungsmöglichkeiten in Hochrisikostadien begrenzt und die Überlebensrate liegt bei unter 50 %. Dies bedingt die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten. Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CDKi) sind eine Substanzgruppe, die in den Zellzyklus und außerdem in die Regulation der Transkription der RNA-Polymerase II eingreifen. Der Einsatz einer zielgerichteten Therapie mit CDKis beim NB erscheint sinnvoll, da in den Tumoren vermehrt Mutationen, die den G1 Kontrollpunkt betreffen und als Zielstrukturen dienen können, gezeigt wurden. Dazu gehören die verstärkte Expression von Cyclin D und CDK4. Ein weiterer Aspekt der Behandlung des NB als embryonaler Tumor, welcher in seiner Entwicklung angehalten wurde, ist die Induktion einer Differenzierung der Tumorzellen. Diese steht womöglich in Zusammenhang mit der hohen spontanen Regressionsrate des NB und bietet sich somit auch als Therapiestrategie an.

In der vorliegenden *in vitro*-Studie wurde die Wirksamkeit des neuen CDKi Fadraciclilb und die Kombinationstherapien der selektiven CDKis Abemaciclib und Fadraciclilb sowie des globalen CDKi Dinaciclib mit 13-cis-Retinsäure (13-cis-RA) untersucht. Die Versuche wurden an drei NB-Zelllinien, LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172, durchgeführt. Zunächst wurde die Auswirkung der Behandlung auf die Viabilität der Tumorzellen getestet. Dabei zeigten alle drei Zelllinien bei Monotherapie mit Fadraciclilb eine deutlich reduzierte Viabilität. Die Kombinationstherapie von Abemaciclib und Fadraciclilb mit 13-cis-RA konnte den Effekt der Monotherapie auf die Zellviabilität synergistisch verstärken. In der Immunfluoreszenz kam es unter den Mono- und Kombinationstherapien zur Verstärkung von Zellstress mit Calnexin und Cytochrom C Erhöhung. Die Induktion des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes durch die Behandlung zeigte sich in der Durchflusszytometrie.

Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit war, aufbauend auf Vorversuchen der Arbeitsgruppe, die Fähigkeit der CDKi Mono- und Kombinationstherapie zur Induktion der Differenzierung der Tumorzellen. Diese zeigte sich in den untersuchten Zelllinien LAN-1 und CHLA-90 auf Proteinebene in der Immunfluoreszenz sowohl in Mono- als auch in Kombinationstherapie mit Abemaciclib und Fadraciclilb, jedoch ohne Verstärkung durch die Kombination. Die Analyse auf Genexpressionsniveau mittels qPCR ergab hingegen keine verstärkte Differenzierung. Der Zellzyklusarrest, welcher als Voraussetzung für die Differenzierung beschrieben wurde, konnte in der Immunfluoreszenz mit Erhöhung des endogenen Zellzyklusinhibitors p27 gesehen werden. Die für die klinische Anwendung neben der Wirksamkeit und Verträglichkeit wichtige Resistenzbildung gegen die Therapie wurde mithilfe der Proteine MDR1 (P-Glykoprotein),

MRP1/2 und BCRP durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei kam es zu einem geringen Anstieg der Proteine unter der Behandlung, der jedoch nicht die Schwelle für eine Multiresistenz erreichte.

Insgesamt zeigten sich die CDKis Abemaciclib und Fadraciclib in dieser *in vitro*-Studie sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie mit 13-cis-RA als vielversprechende Therapeutika für die zielgerichtete Behandlung des NB. In der Zukunft gilt es, weitere Untersuchungen am *in vivo*-Xenograft-Modell und mit weiteren potentiellen Kombinationspartnern durchzuführen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet*. 23. Juni 2007;369(9579):2106–20.
2. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. April 2017;17(4):369–86.
3. Erdmann F, Kaatsch P, Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz; 2020.
4. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboun SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, u. a. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 20. September 2015;33(27):3008–17.
5. Luksch R, Castellani MR, Collini P, De Bernardi B, Conte M, Gambini C, u. a. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours). *Crit Rev Oncol Hematol*. 1. November 2016;107:163–81.
6. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, u. a. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primer*. 10. November 2016;2(1):16078.
7. Qiu B, Matthay KK. Advancing therapy for neuroblastoma. *Nat Rev Clin Oncol*. August 2022;19(8):515–33.
8. Karalexi MA, Katsimpris A, Panagopoulou P, Bouka P, Schüz J, Ntzani E, u. a. Maternal lifestyle factors and risk of neuroblastoma in the offspring: A meta-analysis including Greek NARECHEM-ST primary data. *Cancer Epidemiol*. April 2022;77:102055.
9. Shojaei-Brosseau T, Chompret A, Abel A, de Vathaire F, Raquin MA, Brugières L, u. a. Genetic epidemiology of neuroblastoma: A study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;42(1):99–105.
10. Rohrer T, Trachsel D, Engelcke G, Hammer J. Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies. *Pediatr Pulmonol*. Januar 2002;33(1):71–6.
11. Emery LG, Shields M, Shah NR, Garbes A. Neuroblastoma associated with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Cancer*. 1. Juli 1983;52(1):176–9.
12. Zafar A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F, u. a. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev*. März 2021;41(2):961–1021.
13. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, u. a. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*. März 2013;45(3):279–84.
14. Kholodenko IV, Kalinovskiy DV, Doronin II, Deyev SM, Kholodenko RV. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J Immunol Res*. 11. Juli 2018;2018:7394268.

15. Jansky S, Sharma AK, Körber V, Quintero A, Toprak UH, Wecht EM, u. a. Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma. *Nat Genet.* Mai 2021;53(5):683–93.
 16. Boeva V, Louis-Brennetot C, Peltier A, Durand S, Pierre-Eugène C, Raynal V, u. a. Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries. *Nat Genet.* September 2017;49(9):1408–13.
 17. van Groningen T, Koster J, Valentijn LJ, Zwijnenburg DA, Akogul N, Hasselt NE, u. a. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat Genet.* August 2017;49(8):1261–6.
 18. Kildisiute G, Kholosy WM, Young MD, Roberts K, Elmentaite R, van Hooff SR, u. a. Tumor to normal single-cell mRNA comparisons reveal a pan-neuroblastoma cancer cell. *Sci Adv.* 5. Februar 2021;7(6):eabd3311.
 19. Marshall GM, Carter DR, Cheung BB, Liu T, Mateos MK, Meyerowitz JG, u. a. The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer.* April 2014;14(4):277–89.
 20. Westermarck UK, Wilhelm M, Frenzel A, Henriksson MA. The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol.* Oktober 2011;21(4):256–66.
 21. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J.* 2. Juni 1997;16(11):2985–95.
 22. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N- myc in Untreated Human Neuroblastomas Correlates with Advanced Disease Stage. *Science.* 8. Juni 1984;224(4653):1121–4.
 23. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, u. a. Association of Multiple Copies of the N- myc Oncogene with Rapid Progression of Neuroblastomas. *N Engl J Med.* 31. Oktober 1985;313(18):1111–6.
 24. Thompson D, Vo KT, London WB, Fischer M, Ambros PF, Nakagawara A, u. a. Identification of patient subgroups with markedly disparate rates of MYCN amplification in neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Cancer.* 15. März 2016;122(6):935–45.
 25. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, u. a. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature.* 16. Oktober 2008;455(7215):930–5.
 26. Bellini A, Pötschger U, Bernard V, Lapouble E, Baulande S, Ambros PF, u. a. Frequency and Prognostic Impact of ALK Amplifications and Mutations in the European Neuroblastoma Study Group (SIOPEN) High-Risk Neuroblastoma Trial (HR-NBL1). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20. Oktober 2021;39(30):3377–90.
 27. Zhu S, Lee JS, Guo F, Shin J, Perez-Atayde AR, Kutok JL, u. a. Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell.* 20. März 2012;21(3):362–73.
 28. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, u. a. Germline Mutations of the Paired-Like Homeobox 2B (PHOX2B) Gene in Neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* April 2004;74(4):761–4.
-

29. Limpt V van, Schramm A, Lakeman A, Sluis P van, Chan A, Noesel M van, u. a. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene*. Dezember 2004;23(57):9280–8.
30. White PS, Maris JM, Beltinger C, Sulman E, Marshall HN, Fujimori M, u. a. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci*. 6. Juni 1995;92(12):5520–4.
31. Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, u. a. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene*. 2. September 1999;18(35):4948–57.
32. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, Łastowska M, Bown N, Combaret V, u. a. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer*. 1. März 2001;91(5):680–6.
33. Bown N, Cotterill S, Łastowska M, O'Neill S, Pearson ADJ, Plantaz D, u. a. Gain of Chromosome Arm 17q and Adverse Outcome in Patients with Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 24. Juni 1999;340(25):1954–61.
34. Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, u. a. Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 24. November 2005;353(21):2243–53.
35. Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA, Hasselt NE, van Sluis P, Volckmann R, u. a. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nat Genet*. Dezember 2015;47(12):1411–4.
36. Peifer M, Hertwig F, Roels F, Dreidax D, Gartlgruber M, Menon R, u. a. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*. 29. Oktober 2015;526(7575):700–4.
37. Koneru B, Lopez G, Farooqi A, Conkrite KL, Nguyen TH, Macha SJ, u. a. Telomere Maintenance Mechanisms Define Clinical Outcome in High-Risk Neuroblastoma. *Cancer Res*. 15. Juni 2020;80(12):2663–75.
38. Ackermann S, Cartolano M, Hero B, Welte A, Kahlert Y, Roderwieser A, u. a. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science*. 7. Dezember 2018;362(6419):1165–70.
39. Cheung NKV, Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo SK, u. a. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA*. 14. März 2012;307(10):1062–71.
40. Brady SW, Liu Y, Ma X, Gout AM, Hagiwara K, Zhou X, u. a. Pan-neuroblastoma analysis reveals age- and signature-associated driver alterations. *Nat Commun*. 14. Oktober 2020;11(1):5183.
41. Oberthür A, Berthold F, Hero B, Holger T. Neuroblastome, in: Solide Tumoren im Kindesalter: Grundlagen - Diagnostik - Therapie. Fuchs J, Herausgeber. Stuttgart: Schattauer; 2012. 386 S.

42. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, u. a. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. August 1993;11(8):1466–77.
 43. D'Angio Giulio J, Evans Audrey E, Koop CE. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *The Lancet*. 22. Mai 1971;297(7708):1046–9.
 44. De Bernardi B, Gerrard M, Boni L, Rubie H, Cañete A, Di Cataldo A, u. a. Excellent outcome with reduced treatment for infants with disseminated neuroblastoma without MYCN gene amplification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1. März 2009;27(7):1034–40.
 45. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, u. a. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10. Januar 2009;27(2):298–303.
 46. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, u. a. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol*. 10. Januar 2009;27(2):289–97.
 47. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). S1-Leitlinie 025-008 Neuroblastom, Langversion, 30.06.2019, verfügbar unter: https://register.awmf.org/assets/guidelines/025-008l_S1_Neuroblastom_2019-07_01.pdf, Zugriff am 02.04.2024.
 48. Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL, Maris JM, London WB, Buxton A, u. a. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med*. 30. September 2010;363(14):1313–23.
 49. Strother DR, London WB, Schmidt ML, Brodeur GM, Shimada H, Thorner P, u. a. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20. Mai 2012;30(15):1842–8.
 50. Simon T, Hero B, Schulte JH, Deubzer H, Hundsdoerfer P, Schweinitz D von, u. a. 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klin Pädiatr*. Mai 2017;229(3):147–67.
 51. Dilloo D, Göbel U. Erkrankungen des Nebennierenmarks und des Grenzstrangs. In: Reinhardt D, Nicolai T, Zimmer KP, Herausgeber. *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [zitiert 2. April 2024]. S. 201–7. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-41814-3_26
 52. Simon T, Häberle B, Hero B, von Schweinitz D, Berthold F. Role of surgery in the treatment of patients with stage 4 neuroblastoma age 18 months or older at diagnosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20. Februar 2013;31(6):752–8.
 53. Ladenstein R, Pötschger U, Pearson ADJ, Brock P, Luksch R, Castel V, u. a. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. April 2017;18(4):500–14.
 54. Giammarile F, Chiti A, Lassmann M, Brans B, Flux G, EANM. EANM procedure guidelines for ¹³¹I-meta-iodobenzylguanidine (¹³¹I-mIBG) therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Mai 2008;35(5):1039–47.
-

55. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson ADJ, Cohn SL, u. a. Clinical and Biologic Features Predictive of Survival After Relapse of Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. *J Clin Oncol.* 20. August 2011;29(24):3286–92.
 56. Sherr CJ. *Cancer Cell Cycles.* Science. 6. Dezember 1996;274(5293):1672–7.
 57. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* Dezember 2001;1(3):222–31.
 58. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 1. August 2013;140(15):3079–93.
 59. Bregman DB, Pestell RG, Kidd VJ. Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Front Biosci-Landmark.* 1. Februar 2000;5(3):244–57.
 60. Riess C, Irmscher N, Salewski I, Strüder D, Classen CF, Große-Thie C, u. a. Cyclin-dependent kinase inhibitors in head and neck cancer and glioblastoma—backbone or add-on in immune-oncology? *Cancer Metastasis Rev.* März 2021;40(1):153–71.
 61. Chen Z, Wang Z, Pang JC, Yu Y, Bieerkehazhi S, Lu J, u. a. Multiple CDK inhibitor dinaciclib suppresses neuroblastoma growth via inhibiting CDK2 and CDK9 activity. *Sci Rep.* 5. Juli 2016;6(1):29090.
 62. Rader J, Russell MR, Hart LS, Nakazawa MS, Belcastro LT, Martinez D, u. a. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. November 2013;19(22):6173–82.
 63. Whittaker SR, Mallinger A, Workman P, Clarke PA. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 1. Mai 2017;173:83–105.
 64. Molenaar JJ, Koster J, Ebus ME, van Sluis P, Westerhout EM, de Preter K, u. a. Copy number defects of G1-cell cycle genes in neuroblastoma are frequent and correlate with high expression of E2F target genes and a poor prognosis. *Genes Chromosomes Cancer.* Januar 2012;51(1):10–9.
 65. Martinez-Monleon A, Kryh Öberg H, Gaarder J, Berbegall AP, Javanmardi N, Djos A, u. a. Amplification of CDK4 and MDM2: a detailed study of a high-risk neuroblastoma subgroup. *Sci Rep.* 20. Juli 2022;12(1):12420.
 66. Delehouzé C, Godl K, Loaëc N, Bruyère C, Desban N, Oumata N, u. a. CDK/CK1 inhibitors roscovitine and CR8 downregulate amplified MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 11. Dezember 2014;33(50):5675–87.
 67. Poon E, Liang T, Jamin Y, Walz S, Kwok C, Hakkert A, u. a. Orally bioavailable CDK9/2 inhibitor shows mechanism-based therapeutic potential in MYCN-driven neuroblastoma. *J Clin Invest.* 5. Oktober 2020;130(11):5875–92.
 68. De Rosa P, Severi F, Zadran SK, Russo M, Aloisi S, Rigamonti A, u. a. MYCN Amplification, along with Wild-Type RB1 Expression, Enhances CDK4/6 Inhibitors' Efficacy in Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 12. März 2023;24(6):5408.
 69. Swadi RR, Sampat K, Herrmann A, Losty PD, See V, Moss DJ. CDK inhibitors reduce cell proliferation and reverse hypoxia-induced metastasis of neuroblastoma tumours in a chick embryo model. *Sci Rep.* 24. Juni 2019;9(1):9136.
-

70. Georger B, Bourdeaut F, DuBois SG, Fischer M, Geller JI, Gottardo NG, u. a. A Phase I Study of the CDK4/6 Inhibitor Ribociclib (LEE011) in Pediatric Patients with Malignant Rhabdoid Tumors, Neuroblastoma, and Other Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 15. Mai 2017;23(10):2433–41.
 71. Research C for DE and. FDA approves abemaciclib with endocrine therapy for early breast cancer. FDA [Internet]. 31. Januar 2022 [zitiert 26. Mai 2024]; Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-abemaciclib-endocrine-therapy-early-breast-cancer>
 72. ESMO. EMA Recommends Extension of Therapeutic Indications for Abemaciclib [Internet]. [zitiert 26. Mai 2024]. Verfügbar unter: <https://www.esmo.org/oncology-news/ema-recommends-extension-of-therapeutic-indications-for-abemaciclib>
 73. Chong QY, Kok ZH, Bui NLC, Xiang X, Wong ALA, Yong WP, u. a. A unique CDK4/6 inhibitor: Current and future therapeutic strategies of abemaciclib. *Pharmacol Res.* 1. Juni 2020;156:104686.
 74. Zhang M, Zhang L, Hei R, Li X, Cai H, Wu X, u. a. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *Am J Cancer Res.* 15. Mai 2021;11(5):1913–35.
 75. Wu T, Qin Z, Tian Y, Wang J, Xu C, Li Z, u. a. Recent Developments in the Biology and Medicinal Chemistry of CDK9 Inhibitors: An Update. *J Med Chem.* 25. November 2020;63(22):13228–57.
 76. Frame S, Saladino C, MacKay C, Atrash B, Sheldrake P, McDonald E, u. a. Fadraciclib (CYC065), a novel CDK inhibitor, targets key pro-survival and oncogenic pathways in cancer. *PLOS ONE.* 9. Juli 2020;15(7):e0234103.
 77. Do KT, Frej K, Bhushan K, Pruitt-Thompson S, Zheleva D, Blake D, u. a. 2 Oral - Phase 1 safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of fadraciclib (CYC065), a cyclin dependent kinase inhibitor, in patients with advanced cancers (NCT02552953). *Eur J Cancer.* 1. Oktober 2020;138:S7.
 78. Bayeva N, Coll E, Piskareva O. Differentiating Neuroblastoma: A Systematic Review of the Retinoic Acid, Its Derivatives, and Synergistic Interactions. *J Pers Med.* 16. März 2021;11(3):211.
 79. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, u. a. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *J Neurochem.* 2000;75(3):991–1003.
 80. Borriello A, Pietra VD, Criscuolo M, Oliva A, Tonini GP, Iolascon A, u. a. p27Kip1 accumulation is associated with retinoic-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation. *Oncogene.* 6. Januar 2000;19(1):51–60.
 81. Dobrotkova V, Chlapek P, Mazanek P, Sterba J, Veselska R. Traffic lights for retinoids in oncology: molecular markers of retinoid resistance and sensitivity and their use in the management of cancer differentiation therapy. *BMC Cancer.* 1. November 2018;18:1059.
 82. Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature.* 31. Februar 1985;313(6001):404–6.
-

83. Masetti R, Biagi C, Zama D, Vendemini F, Martoni A, Morello W, u. a. Retinoids in Pediatric Onco-Hematology: the Model of Acute Promyelocytic Leukemia and Neuroblastoma. *Adv Ther.* September 2012;29(9):747–62.
 84. Peinemann F, Dalen EC van, Enk H, Berthold F. Retinoic acid postconsolidation therapy for high-risk neuroblastoma patients treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2017 [zitiert 16. April 2024];(8). Verfügbar unter: <https://www.cochrane-library.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD010685.pub3/full>
 85. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, u. a. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med.* 30. September 2010;363(14):1324–34.
 86. Edsjö A, Nilsson H, Vandesompele J, Karlsson J, Pattyn F, Culp LA, u. a. Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation. *Lab Invest.* April 2004;84(4):406–17.
 87. Guglielmi L, Cinnella C, Nardella M, Maresca G, Valentini A, Mercanti D, u. a. MYCN gene expression is required for the onset of the differentiation programme in neuroblastoma cells. *Cell Death Dis.* Februar 2014;5(2):e1081.
 88. Rössler J, Zambrzycka I, Lagodny J, Kontny U, Niemeyer CM. Effect of STI-571 (imatinib mesylate) in combination with retinoic acid and γ -irradiation on viability of neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 21. April 2006;342(4):1405–12.
 89. Duffy DJ, Krstic A, Halasz M, Schwarzl T, Konietzny A, Iljin K, u. a. Retinoic acid and TGF- β signalling cooperate to overcome MYCN-induced retinoid resistance. *Genome Med.* 10. Februar 2017;9(1):15.
 90. Clark O, Daga S, Stoker AW. Tyrosine phosphatase inhibitors combined with retinoic acid can enhance differentiation of neuroblastoma cells and trigger ERK- and AKT-dependent, p53-independent senescence. *Cancer Lett.* 1. Januar 2013;328(1):44–54.
 91. Zeineldin M, Patel AG, Dyer MA. Neuroblastoma: When differentiation goes awry. *Neuron.* 21. September 2022;110(18):2916–28.
 92. Brodeur GM. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res.* 1. Mai 2018;372(2):277–86.
 93. Bar-Hai N, Ishay-Ronen D. Engaging plasticity: Differentiation therapy in solid tumors. *Front Pharmacol* [Internet]. 11. August 2022 [zitiert 21. April 2024];13. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2022.944773/full>
 94. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther.* 1. Mai 2001;90(2):105–56.
 95. Brum PO, Viola GD, Saibro-Girardi C, Tiefensee-Ribeiro C, Brum MO, Gasparotto J, u. a. Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Inhibition Impairs Retinoic Acid-Induced Differentiation in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells, Leading to Reduced Neurite Length and Diminished Gene Expression Related to Cell Differentiation. *Neurochem Res.* Februar 2022;47(2):409–21.
-

96. Sung PJ, Boulos N, Tilby MJ, Andrews WD, Newbold RF, Tweddle DA, u. a. Identification and characterisation of STMN4 and ROBO2 gene involvement in neuroblastoma cell differentiation. *Cancer Lett.* 1. Januar 2013;328(1):168–75.
 97. Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood.* 16. April 2009;113(16):3655–65.
 98. Vernaza A, Cardus DF, Smith JL, Partridge V, Baker AL, Lewis EG, u. a. Identification of CDKN3 as a Key Gene that Regulates Neuroblastoma Cell Differentiation. *J Cancer.* 1. Januar 2024;15(5):1153–68.
 99. McClellan KA, Slack RS. Novel functions for cell cycle genes in nervous system development. *Cell Cycle Georget Tex.* Juli 2006;5(14):1506–13.
 100. Hardwick LJA, Philpott A. Nervous decision-making: to divide or differentiate. *Trends Genet TIG.* Juni 2014;30(6):254–61.
 101. Ferguson KM, Gillen SL, Chaytor L, Poon E, Marcos D, Gomez RL, u. a. Palbociclib releases the latent differentiation capacity of neuroblastoma cells. *Dev Cell.* 9. Oktober 2023;58(19):1967-1982.e8.
 102. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJM, Versteeg R, u. a. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res.* 15. April 2008;68(8):2599–609.
 103. MedChem Express. Manual Cell Counting Kit-8. 2023.
 104. Bliss CI. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Ann Appl Biol.* 1939;26(3):585–615.
 105. Murphy PL, Isaacman-Beck J, Granato M. Robo2 Drives Target-Selective Peripheral Nerve Regeneration in Response to Glia-Derived Signals. *J Neurosci.* 2. Februar 2022;42(5):762–76.
 106. Bièche I, Maucuer A, Laurendeau I, Lachkar S, Spano AJ, Frankfurter A, u. a. Expression of stathmin family genes in human tissues: non-neural-restricted expression for SCLIP. *Genomics.* April 2003;81(4):400–10.
 107. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27Kip1 and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol.* 2000;183(1):18–27.
 108. Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, Polticelli F, Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *Int J Biol Macromol.* September 2019;136:1237–46.
 109. Delom F, Fessart D, Chevet E. Regulation of calnexin sub-cellular localization modulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Apoptosis.* Februar 2007;12(2):293–305.
 110. Enzo. Product Manual - EFFLUX-ID Green Multidrug Resistance Assay Kit. 2023.
 111. Kumar M, Katyal A. Data on retinoic acid and reduced serum concentration induced differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Elsevier Data Brief.* Dezember 2018;21:2435–40.
-

112. Kommalapati VK, Kumar D, Tangutur AD. Quisinostat mediated autophagy is associated with differentiation in neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Biol Rep.* Mai 2021;48(5):4973–9.
 113. Sharif S, Ghahremani MH, Soleimani M. Induction of morphological and functional differentiation of human neuroblastoma cells by miR-124. *J Biosci.* Dezember 2017;42(4):555–63.
 114. Qiagen. RNeasy Mini Handbook. 2023.
 115. Laverdière C, Liu Q, Yasui Y, Nathan PC, Gurney JG, Stovall M, u. a. Long-term Outcomes in Survivors of Neuroblastoma: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 19. August 2009;101(16):1131–40.
 116. Gurney JG, Tersak JM, Ness KK, Landier W, Matthay KK, Schmidt ML, u. a. Hearing loss, quality of life, and academic problems in long-term neuroblastoma survivors: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatrics.* November 2007;120(5):e1229–1236.
 117. Cohen LE, Gordon JH, Popovsky EY, Gunawardene S, Duffey-Lind E, Lehmann LE, u. a. Late effects in children treated with intensive multimodal therapy for high-risk neuroblastoma: high incidence of endocrine and growth problems. *Bone Marrow Transplant.* April 2014;49(4):502–8.
 118. Peyressatre M, Prével C, Pellerano M, Morris MC. Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers: From Small Molecules to Peptide Inhibitors. *Cancers.* 23. Januar 2015;7(1):179–237.
 119. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, u. a. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 15. August 2001;61(16):6185–93.
 120. Cheng NC, Van Roy N, Chan A, Beitsma M, Westerveld A, Speleman F, u. a. Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35-36 region, only one of which is associated with N-myc amplification. *Oncogene.* 19. Januar 1995;10(2):291–7.
 121. Zhang J, Stevens M, Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 24. November 2011;5:102–14.
 122. Sidell N, Altman A, Haussler MR, Seeger RC. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res.* 1. Oktober 1983;148(1):21–30.
 123. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, u. a. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Children's Cancer Group. N Engl J Med.* 14. Oktober 1999;341(16):1165–73.
 124. Kohler JA, Imeson J, Ellershaw C, Lie SO. A randomized trial of 13-Cis retinoic acid in children with advanced neuroblastoma after high-dose therapy. *Br J Cancer.* November 2000;83(9):1124–7.
-

125. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, u. a. Long-Term Results for Children With High-Risk Neuroblastoma Treated on a Randomized Trial of Myeloablative Therapy Followed by 13-cis-Retinoic Acid: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* März 2009;27(7):1007–13.
 126. Keshelava N, Seeger RC, Groshen S, Reynolds CP. Drug resistance patterns of human neuroblastoma cell lines derived from patients at different phases of therapy. *Cancer Res.* 1. Dezember 1998;58(23):5396–405.
 127. Moise AR, Noy N, Palczewski K, Blaner WS. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry.* 17. April 2007;46(15):4449–58.
 128. Su M, Alonso S, Jones JW, Yu J, Kane MA, Jones RJ, u. a. All-Trans Retinoic Acid Activity in Acute Myeloid Leukemia: Role of Cytochrome P450 Enzyme Expression by the Microenvironment. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127790.
 129. Chlapek P, Slavikova V, Mazanek P, Sterba J, Veselska R. Why Differentiation Therapy Sometimes Fails: Molecular Mechanisms of Resistance to Retinoids. *Int J Mol Sci.* 3. Januar 2018;19(1):132.
 130. Francisco R, Pérez-Tomás R, Giménez-Bonafé P, Soto-Cerrato V, Giménez-Xavier P, Ambrosio S. Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Pharmacol.* 31. Oktober 2007;572(2):111–9.
 131. Hopkins-Donaldson S, Yan P, Bourlout KB, Muhlethaler A, Bodmer JL, Gross N. Doxorubicin-induced death in neuroblastoma does not involve death receptors in S-type cells and is caspase-independent in N-type cells. *Oncogene.* 5. September 2002;21(39):6132–7.
 132. Casaccia-Bonofil P, Tikoo R, Kiyokawa H, Friedrich V, Chao MV, Koff A. Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev.* 15. September 1997;11(18):2335–46.
 133. Durand B, Gao FB, Raff M. Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J.* 15. Januar 1997;16(2):306–17.
 134. Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science.* 29. März 1996;271(5257):1861–4.
 135. Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Zantema A. Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol.* Oktober 1995;131(1):227–34.
 136. Tikoo R, Casaccia-Bonofil P, Chao MV, Koff A. Changes in Cyclin-dependent Kinase 2 and p27kip1 Accompany Glial Cell Differentiation of Central Glia-4 Cells*. *J Biol Chem.* 3. Januar 1997;272(1):442–7.
 137. Boos J. Probleme und Chancen klinischer Studien in der Pädiatrie. In: Brochhausen C, Herausgeber. *Kinder in klinischen Studien - Grenzen medizinischer Machbarkeit?* LIT Verlag Münster; 2005.
 138. Joseph PD, Craig JC, Caldwell PHY. Clinical trials in children. *Br J Clin Pharmacol.* März 2015;79(3):357–69.
-

139. Laventhal N, Tarini BA, Lantos J. Ethical issues in neonatal and pediatric clinical trials. *Pediatr Clin North Am.* Oktober 2012;59(5):1205–20.
 140. Bautista F, Paoletti X, Rubino J, Brard C, Rezai K, Nebchi S, u. a. Phase I or II Study of Ribociclib in Combination With Topotecan-Temozolomide or Everolimus in Children With Advanced Malignancies: Arms A and B of the AcSé-ESMART Trial. *J Clin Oncol.* 10. November 2021;39(32):3546–60.
 141. Franzen J, Georgomanolis T, Selich A, Kuo CC, Stöger R, Brant L, u. a. DNA methylation changes during long-term in vitro cell culture are caused by epigenetic drift. *Commun Biol.* 19. Mai 2021;4(1):1–12.
 142. Fernandez-Rebollo E, Franzen J, Goetzke R, Hollmann J, Ostrowska A, Oliverio M, u. a. Senescence-Associated Metabolomic Phenotype in Primary and iPSC-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rep.* 11. Februar 2020;14(2):201–9.
 143. Qadeer ZA, Valle-Garcia D, Hasson D, Sun Z, Cook A, Nguyen C, u. a. ATRX In-Frame Fusion Neuroblastoma Is Sensitive to EZH2 Inhibition via Modulation of Neuronal Gene Signatures. *Cancer Cell.* 11. November 2019;36(5):512-527.e9.
 144. Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, u. a. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 20. August 2004;118(4):493–504.
 145. Barrière C, Santamaría D, Cerqueira A, Galán J, Martín A, Ortega S, u. a. Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Mol Oncol.* Juni 2007;1(1):72–83.
 146. Morrison L, Loibl S, Turner NC. The CDK4/6 inhibitor revolution — a game-changing era for breast cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* Februar 2024;21(2):89–105.
 147. Johnston SRD, Toi M, O'Shaughnessy J, Rastogi P, Campone M, Neven P, u. a. Abemaciclib plus endocrine therapy for hormone receptor-positive, HER2-negative, node-positive, high-risk early breast cancer (monarchE): results from a preplanned interim analysis of a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 1. Januar 2023;24(1):77–90.
 148. Gnant M, Dueck AC, Frantal S, Martin M, Burstein HJ, Greil R, u. a. Adjuvant Palbociclib for Early Breast Cancer: The PALLAS Trial Results (ABCSG-42/AFT-05/BIG-14-03). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20. Januar 2022;40(3):282–93.
 149. Finn RS, Rugo HS, Gelmon KA, Cristofanilli M, Colleoni M, Loi S, u. a. Long-Term Pooled Safety Analysis of Palbociclib in Combination with Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Updated Analysis with up to 5 Years of Follow-Up. *The Oncologist.* Mai 2021;26(5):e749–55.
 150. Lu YS, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Cardoso F, u. a. Updated Overall Survival of Ribociclib plus Endocrine Therapy versus Endocrine Therapy Alone in Pre- and Perimenopausal Patients with HR+/HER2– Advanced Breast Cancer in MONALEESA-7: A Phase III Randomized Clinical Trial. *Clin Cancer Res.* 1. März 2022;28(5):851–9.
 151. Slamon DJ, Neven P, Chia S, Fasching PA, De Laurentiis M, Im SA, u. a. Phase III Randomized Study of Ribociclib and Fulvestrant in Hormone Receptor–Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Advanced Breast Cancer: MONALEESA-3. *J Clin Oncol.* 20. August 2018;36(24):2465–72.
-

152. London WB, Bagatell R, Weigel BJ, Fox E, Guo D, Van Ryn C, u. a. Historical time to disease progression and progression-free survival in patients with recurrent/refractory neuroblastoma treated in the modern era on Children's Oncology Group early-phase trials. *Cancer*. 2017;123(24):4914–23.
153. Kettner NM, Vijayaraghavan S, Durak MG, Bui T, Kohansal M, Ha MJ, u. a. Combined Inhibition of STAT3 and DNA Repair in Palbociclib-Resistant ER-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 1. Juli 2019;25(13):3996–4013.
154. Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, Rivas MA, Cutts RJ, Garcia-Murillas I, u. a. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Cancer Res*. 14. April 2016;76(8):2301–13.
155. Jansen VM, Bhola NE, Bauer JA, Formisano L, Lee KM, Hutchinson KE, u. a. Kinome-Wide RNA Interference Screen Reveals a Role for PDK1 in Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in ER-Positive Breast Cancer. *Cancer Res*. 30. April 2017;77(9):2488–99.
156. Condorelli R, Spring L, O'Shaughnessy J, Lacroix L, Bailleux C, Scott V, u. a. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 1. März 2018;29(3):640–5.
157. Goel S, DeCristo MJ, Watt AC, BrinJones H, Sceneay J, Li BB, u. a. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*. August 2017;548(7668):471–5.
158. Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, Huber L, Forest A, Amaladas N, u. a. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep*. 13. März 2018;22(11):2978–94.
159. Deng J, Wang ES, Jenkins RW, Li S, Dries R, Yates K, u. a. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-cell Activation. *Cancer Discov*. Februar 2018;8(2):216–33.
160. Zhang H, Pandey S, Travers M, Sun H, Morton G, Madzo J, u. a. Targeting CDK9 Reactivates Epigenetically Silenced Genes in Cancer. *Cell*. 15. November 2018;175(5):1244–1258.e26.
161. Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM, Bremer E, Eggleton P. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Front Oncol*. 29. Januar 2015;5:7.

VIII. ANHANG

8.1 CYTOCHROM C, CALNEXIN-IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

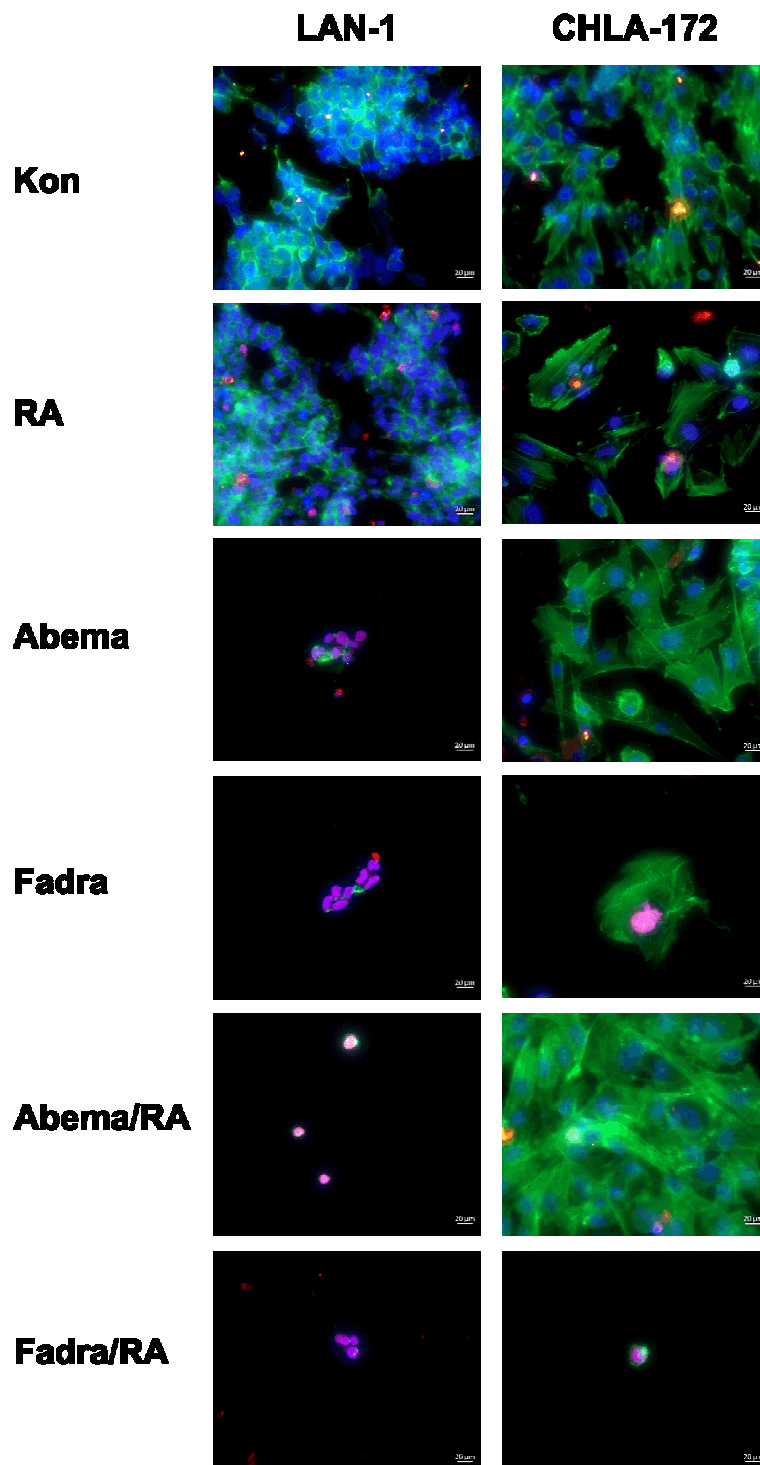


ABBILDUNG 23: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG MIT CYTOCHROM C UND CALNEXIN NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG

Darstellung repräsentativer Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie der Zelllinien LAN-1 und CHLA-172 nach Färbung von Cytochrom C (orange) und Calnexin (rot), Zytoskelettfärbung mit Phalloidin Grün, Kernfärbung mit DAPI (blau). Aufgenommen mit dem Zeiss Axiovert A1 Mikroskop, der Maßstab in der rechten unteren Ecke zeigt 20 µm an. Die zugehörigen Quantifizierungen sind unter Abschnitt 4.5 zu finden.

8.2 CALRETICULINFÄRBUNG IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

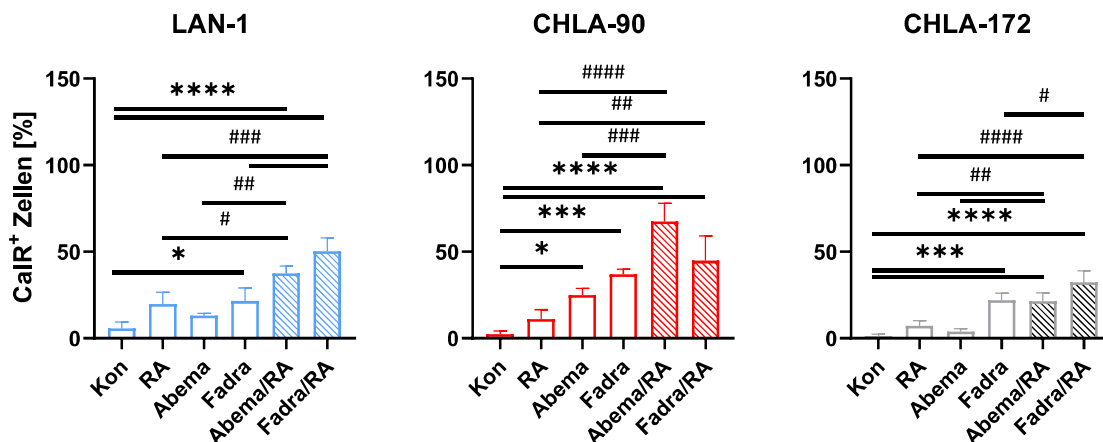


ABBILDUNG 24: CALRETICULIN-TRANSLOKATION NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG

Der immunogene Zelltod wurde anhand der Calreticulin Färbung an den Zelllinien LAN-1, CHLA-90 und CHLA-172 in der Durchflusszytometrie untersucht. Calreticulin kann vom endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche transloziert werden und dort als Angriffspunkt für das Immunsystem dienen (161). Es wurden die Monotherapien mit 13-cis-RA, Abemaciclib und Fadraciclib und die Kombinationen Abemaciclib/ 13-cis-RA und Fadraciclib/ 13-cis-RA untersucht, als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte [%] und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test), * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$ vs. Monotherapie. Der Versuch wurde von Dr. Shokraie und PD Dr. Maletzki durchgeführt.

8.3 PRÄSENTATIONEN

Publikation

Shokraie F, Lechermeier L, Bordihn P, Kaps P, Möller S, Schulz AS, Schneider B, Koczan D, Roshan SK, Lode HN, Classen CF, Hahn O, Troschke-Meurer S, Maletzki C. CDK inhibitors promote neuroblastoma cell differentiation and increase sensitivity to retinoic acid-a promising combination strategy for therapeutic intervention. Cell Death Discov. 2025 Aug 2; 11(1):363. doi: 10.1038/s41420-025-02637-z. PMID: 40753072; PMCID: PMC12318081.

Kongressbeiträge

1. Lechermeier L, Shokraie F, Freitag T, Troschke-Meurer S, Lode HN, Kaps P, Classen CF, Maletzki C. Retinsäure in Kombination mit CDK-Inhibition fördert Differenzierung von Neuroblastomzellen. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Hamburg, 13.-16. Oktober 2023, Vortrag
2. Lechermeier L, Shokraie F, Troschke-Meurer S, Lode HN, Kaps P, Classen CF, Maletzki C. Differentiation of neuroblastoma cells using targeted combination therapy. 17th Rostock Symposium for Tumor Immunology and Brain Tumor Research in Pediatrics, Rostock, 3.- 4. Februar 2023, Vortrag
3. Lechermeier L, Shokraie F, Kaps P, Troschke-Meurer S, Lode HN, Classen CF, Maletzki C. Targeted combination therapy using CDK inhibitors and retinoic acid induces neuroblastoma cell differentiation. 19th Rostock Symposium for Tumor Immunology and Brain Tumor Research in Pediatrics, Rostock, 28 Februar - 1. März 2025, Vortrag

8.4 LEBENSLAUF

8.5 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit durchführen zu können. Auch für die Unterstützung im gesamten Verlauf und die Korrektur möchte ich mich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. habil. Claudia Maletzki. Eine bessere Betreuung und ein angenehmeres Arbeitsumfeld hätte ich mir bei Weitem nicht vorstellen können. Weiterhin möchte ich besonders M. Sc. Philipp Kaps danken, der mir durch die ersten Monate der Arbeit half und mir auch danach jederzeit tatkräftig zur Seite stand. Allen anderen Mitgliedern des Labors in der Kinderklinik und in der Hämatologie und Onkologie möchte ich ebenfalls danken. Ihr habt das Arbeiten deutlich schöner gemacht und mir sehr vieles beigebracht, M. Sc. Annabel Wolff, M. Sc. Thomas Freitag, Dr. rer. hum. Fatemeh Shokraie und B. Sc. Sarah Bertels.

Auch möchte ich Dr. rer. med. Sascha Troschke-Meurer und Prof. Dr. med. Holger Lode aus Greifswald danken, mit deren Kooperation dieses Projekt erst möglich wurde und die für Fragen und weitere Überlegungen zur Zusammenarbeit jederzeit zur Verfügung standen.

Der letzte Dank gilt meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden. Ihr habt mich durch diese Zeit gebracht, mich fortwährend unterstützt und mir Kraft gegeben. Vielen Dank dafür.

IX. THESEN

1. Das Neuroblastom (NB) ist ein pädiatrischer Tumor, der derzeit in Hochrisikostadien und bei Rezidiven mit den gängigen Behandlungsmethoden nur unzureichend behandelt werden kann. Die Überlebensrate liegt bei unter 50 %.
2. Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CDKi) bieten eine neue Möglichkeit der zielgerichteten Therapie, die bereits beim Mammakarzinom klinisch zum Einsatz kommt.
3. Die in dieser *in vitro*-Studie verwendeten CDKis wirken sowohl durch die Initiierung eines Zellzyklusarrests über CDK2/4/6 als auch durch die Veränderung der Transkription der RNA-Polymerase II über CDK9.
4. Beim NB wurden vermehrt Mutationen gefunden, die den G1-Kontrollpunkt betreffen und als Zielstrukturen der CDKis dienen können.
5. Der neue selektive CDKi Fadraciclub zeigt *in vitro* Wirksamkeit in Bezug auf Zellwachstum und Viabilität von Neuroblastomzellen.
6. Die Kombinationstherapie der selektiven CDKis Abemaciclib und Fadraciclub mit 13-cis-Retinsäure (13-cis-RA) zeigt *in vitro* synergistische Effekte in Bezug auf Zellwachstum und Viabilität. Der globale CDKi Dinaciclib profitiert nicht von der Kombinationstherapie.
7. Die Behandlung mit den CDKis Abemaciclib und Fadraciclub in Mono- und Kombinationstherapie mit 13-cis-RA führt *in vitro* zu verstärktem Zellstress und Zellzyklusarrest sowie zu Apoptose und Nekrose.
8. Ein potentieller Wirkansatz beim NB als embryonalem Tumor ist die Induktion der Differenzierung der Tumorzellen. Diese kann unter Abemaciclib und Fadraciclub Mono- und Kombinationstherapie mit 13-cis-RA *in vitro* beobachtet werden.
9. Die Kombinationstherapie mit 13-cis-RA verstärkt die Differenzierung im Vergleich zur Monotherapie nicht.
10. In der Therapie des NB spielen Medikamentenresistenzen eine Rolle, besonders bei Hochrisikotumoren und Rezidiven. Im Kurzzeitansatz kann unter der Behandlung mit Abemaciclib und Fadraciclub Mono- und Kombinationstherapie mit 13-cis-RA *in vitro* keine Entwicklung von Resistenzen gesehen werden.
11. Die Behandlung des NB mit CDKis bietet einen vielversprechenden neuen Therapieansatz, den es in der Zukunft in weiteren besonders auch *in vivo*-Studien zu untersuchen gilt.

X. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

31.03.2025

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)