

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums Halle (Saale) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Körholz

***In-vitro*-Studien zur Wirksamkeit von Kinase-Inhibitoren
bei der Behandlung von Neuroblastomen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Marianne Bremer
geboren am 25.08.1982 in Halle/Saale

Betreuer: Herr Privatdozent Dr. rer. nat., rer. medic habil. Martin S. Staeger

Gutachter:

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit einer Behandlung von Neuroblastomen mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib-Mesylat und Dasatinib untersucht werden. Hierbei sollten die beiden Substanzen hinsichtlich Ihrer Wirksamkeit miteinander verglichen werden und möglicherweise auftretende Resistenzentwicklungen der Tumorzellen untersucht werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die molekularbiologische Analyse von Thyrosinkinaseinhibitor-behandelten Tumorzellen dar, um die Wirkungsweisen der Inhibitoren zu charakterisieren und gegebenenfalls neue Zielstrukturen zu finden.

Methoden

Anhand von *in-vitro*-Studien mit der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wurde durch Zellproliferationstests die Effektivität einer Tyrosinkinaseinhibitor-Behandlung untersucht. Durch eine Langzeitbehandlung mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib wurden resistente Tumorzellen gewonnen. Mittels DNA-Microarrayanalysen, konventioneller und quantitativer Polymerasekettenreaktion sowie Durchflusszytometrie wurden Unterschiede in der Genexpression von behandelten Tumorzellen im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen herausgearbeitet.

Ergebnisse

Sowohl Imatinib-Mesylat als auch Dasatinib zeigten einen hemmenden Einfluss auf die Tumorphiliferation. Jedoch besass Dasatinib eine höhere Effektivität, selbst bei Imatinib-Mesylat resistenten Zellen. Durch die Behandlung mit beiden Tyrosinkinaseinhibitoren kam es zu interessanten Veränderungen in der Genexpression bei Neuroblastom-Zellen. Hierbei wurden insbesondere Gene mit Bezug zum Interferon-Signalweg beeinflusst.

Schlussfolgerung

Imatinib-Mesylat und besonders Dasatinib könnten bei therapieresistenten oder fortgeschrittenen Neuroblastomen gegebenenfalls auch zur Ergänzung von Chemotherapie eine mögliche Therapieoption darstellen. Aufgrund der komplexen Auswirkungen von Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Genexpression von Neuroblastomzellen erscheinen weitergehende Untersuchungen zu den Wirkmechanismen der genannten Inhibitoren wünschenswert.

Bremer, Marianne: In-vitro-Studien zur Wirksamkeit von Kinase-Inhibitoren bei der Behandlung von Neuroblastomen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 68 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

1.EINLEITUNG.....	1
1.1.Das Neuroblastom	1
1.1.1.Definition	1
1.1.2.Leitsymptome	2
1.1.3.Stadieneinteilung	2
1.1.4.Diagnostik.....	2
1.1.5. Prognose	3
1.2.Tyrosinkinaseinhibitoren	4
1.2.1.Imatinib-Mesylat (STI-571).....	4
1.2.2.Dasatinib (BMS 354825).....	7
1.3. Zielsetzung.....	8
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1. Chemikalien und Reagenzien	9
2.2. Zelllinie SH-SY5Y	11
2.3. Zellkultur	11
2.4.Langzeit-Behandlung von Zellen mit Imatinib-Mesylat bzw. Dasatinib:	12
2.5. Zellproliferationstest	13
2.6. ED50 -Werte	14
2.7. Durchflusszytometrie	15
2.8. cDNA-Synthese.....	15
2.9. Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	17
2.10. quantitative RT-RT-PCR	19
2.11. Microarray-Analyse	19

3. ERGEBNISSE	21
3.1. Vergleich der Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit den Kinase- inhibitory	
Imatinib-Mesylat (STI) und Dasatinib (BMS)	21
3.1.1. Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat und Dasatinib auf	
unbehandelten SH-SY5Y Zellen	21
3.1.2. Dasatinib-Wirkung auf Imatinib-Mesylat-resistente SH-SY5Y-Zellen.....	22
3.1.3. Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat gegenüber Imatinib-Mesylat-	
resistenten-Zellen und unbehandelten SH-SY5Y-Zellen.....	23
3.1.4. Vergleich Titration Dasatinib bei Dasatinib-resistenten SH-SY5Y-Zellen.....	25
3.1.5. Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat und Dasatinib gegenüber	
Dasatinib-resistenten SH-SY5Y-Zellen	27
3.2. Differentiell exprimierte Gene von SH-SY5Y-Zellen unter dem Einfluß von	
Imatinib-Mesylat und Dasatinib	30
3.2.1. Microarray-Analyse: differentiell exprimierte Gene von SH-SY5Y-Zellen nach	
Imatinib-Mesylat- und Dasatinib-Inkubation	30
3.2.2. RT-PCR-Analyse: Veränderung der Genexpression bei SH-SY5Y-Zellen durch	
Imatinib-Mesylat- und Dasatinib-Inkubation	35
3.2.3. Quantitative RT-PCR der differentiell exprimierten Gene	39
3.2.4. Zusammenfassung Microarray, PCR und RT-PCR.....	45
3.3. Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen nach Inkubation	
mit Imatinib-Mesylat	46
3.3.1. CD184 (CXCR4).....	46
3.3.2. CD54 (ICAM1).....	48
3.3.3. CD137	49
3.3.4. HLA-A,B,C	50
4. DISKUSSION	51
4.1. Mögliche Therapieoptionen mit Imatinib-Mesylat (Glivec) oder Dasatinib	
(Sprycel) bei Neuroblastomen	51
4.2. Modulation der Genexpression durch Kinaseinhibitoren	53
4.3. Modulation der Oberflächenantigen-Expression nach Kinaseinhibitor-	
Behandlung.....	56

5. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN:	57
6. AUSBLICK	58
7. LITERATUR	59
8. THESEN	68

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
°C	Grad Celsius
Ak	Antikörper
ALS2CR8	<i>amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosome region, candidate 8</i>
ASCL1	<i>achaete-scute complex, drosophila, homolog of 1</i>
ATRA	all-trans-Retinsäure, engl. <i>all-trans retinoic acid</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BRC-ABL	BCR-Gen: breakpoint cluster region; c-ABL1: Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
BMSres	Dasatinib vorbehandelt
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDKN1A	<i>Cyclin- dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	komplementäre DNA
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CXCR4	<i>chemokine, cxc motif, receptor 4</i>
DMEM	<i>Dulbeccos' modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAVL3	<i>embryonic lethal abnormal Vision like 3</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FC	<i>Fold change</i>
g	Gramm
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HMGB4	<i>High mobility group box 4</i>
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFI16	<i>Interferon, gamma-inducible protein 16</i>
IFIH1	<i>Interferon induced with helicase c domain protein 1</i>
Ig	Immunglobulin

Imatinib	Imatinib-Mesylat
kg	Kilogramm
KIT	V-KIT Hardy-Zuckermann 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog
l	Liter
m	milli
M	molar
MES	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazoliumbromid
MycT1	<i>myc target 1</i>
nt	Nukleotide
OAS2	2'-5' Oligoadenylat-Synthetase 2
P450RAI-2	cytochrome p450 retinoic acid-inactivating, 2;
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	platet-derived growth factor
PML	Promyelozytenleukemie
RET	protoonkogen, engl: <i>rearranged during tranfection</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
RT-RT-PCR	<i>realtime RT-PCR</i>
s	Sekunde
SRC	zusammengesetztes Akronym aus <u>c</u> ellular und <u>s</u> arcoma
STIres	Imatinib vorbehandelt
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGFB2	<i>Human transforming growth factor beta 2</i>
TTP	Thymidintriphosphat
Tween 20 [®]	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaureat
U	<i>Unit</i>

1. Einleitung

1.1. Das Neuroblastom

1.1.1. Definition

Das Neuroblastom stellt einen hochmalignen Tumor im Kindesalter dar, der mit etwa 180 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland (Inzidenz von 6,1 Fällen / 100000 Säuglinge pro Jahr) als der häufigste extrakranielle solide Tumor in der Pädiatrie gilt (Graf et al., 1995). Er weist eine extreme klinische Heterogenität auf und besitzt nach wie vor bei Kleinkindern noch eine sehr schlechte Prognose.

1865 wurde das Neuroblastom erstmals von Virchow beschrieben, während Wright den Begriff „Neuroblastom“ erst 1910 prägte. Neuroblastome zählen zu den klein-blau-rundzelligen Tumoren, die Zellen sind uniform mit hyperchromatischem Kern und wenig Zytoplasma.

Der Tumor entwickelt sich während der Embryonal- und Fetalperiode aus sympathoadrenergen Vorläuferzellen der Neuralleiste. Etwa 50% der Neuroblastome entstehen primär aus dem Nebennierenmark, weitere Lokalisationen sind entlang des sympathischen Grenzstranges (cervikal, thorakal und abdominal) zu finden. Sehr oft produzieren Neuroblastome Katecholamine. Dadurch kann der Nachweis einer erhöhten Ausscheidung von Katecholaminmetaboliten (Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure) im Urin und Serum zur Diagnostik und Verlaufkontrolle eingesetzt werden (von Harnack et al., 2000).

In einigen Fällen besteht über einen autosomal dominanten Erbgang eine Prädisposition ein Neuroblastom zu entwickeln (Knudson et al., 1972). Möglicherweise spielt die bei Neuroblastomen bis zu 50% vorkommende Deletion von Chromosom 1p36 eine Rolle. Diese strukturelle Abberation ist mit einer schlechteren Prognose verbunden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass durch die Deletion an diesem Locus ein Gen verloren geht, das als Tumorsuppressorgen agiert (Maris et al. 1997, Brodeur et al. 1997).

Eine Amplifizierung des N-myc Protoonkogens in 25% der Neuroblastome geht ebenfalls mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, einer raschen Tumorprogression und einer schlechten Prognose einher (Brodeur et al., 1997).

Die Wahrscheinlichkeit an einem Neuroblastom zu erkranken nimmt mit zunehmendem Alter ab. Am häufigsten sind Säuglinge und Kleinkinder betroffen, in Einzelfällen ältere Kinder und Jugendliche. Der mittlere Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei einem Alter von 2 Jahren.

1.1.2.Leitsymptome

Erstsymptom ist je nach Lokalisation und Ausdehnung häufig ein sicht- oder tastbarer Tumor im Abdominalbereich. Sekundär treten Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Ernährungsstörung, Erbrechen, Enteritis, Fieber und Anämie auf. Da bereits zum Diagnosezeitpunkt über 50% Metastasen v. a. im Knochen vorhanden sind, gelten Knochenschmerzen ebenfalls als ein häufiges Symptom von Neuroblastomen. Durch die räumliche Nähe der Wirbelsäule dringen einige Neuroblastome durch die neuronalen Foramina in den Spinalkanal ein und führen durch Kompression des Rückenmarks zu entsprechenden neurologischen Ausfällen. Bei Tumoren mit cervikaler und thorakaler Lokalisation kommen Symptome wie Horner-Syndrom, periorbitale Ekchymosen (Brillenhämatome), Husten, Dyspnoe, Dysphagie etc. noch hinzu (Graf et al., 1995; von Harnack et al., 2000).

1.1.3.Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS), das sich an der Evans-Klassifikation mit fünf Stadien orientiert.

Im Stadium I (10% aller Fälle) ist der Tumor noch lokalisiert bzw. auf sein Ursprungsgewebe begrenzt. Eine komplette makroskopische Entfernung ist möglich. Bereits im Stadium II (10%) sind die Lymphknoten befallen, sodass nur noch eine inkomplette Tumorentfernung möglich ist. Die Mittellinie bzw. die Wirbelsäule wird nicht überschritten. Bei den 25% der Neuroblastompatienten im Stadium III ist der Tumor nicht mehr resektabel, die kontralateralen Lymphknoten sind befallen und die Mittellinie überschritten. Im Stadium IV, das bis zu 45% der Fälle ausmacht, handelt es sich um eine disseminierte Erkrankung mit hämatogenen und lymphogenen Metastasen im Knochenmark, Knochen, Lymphknoten, Haut, selten in Lunge und Gehirn. Eine Sonderstellung nimmt das Stadium IVS ein, das 10% der Patienten betrifft und fast nur bei Säuglingen vorkommt. Hierbei handelt es sich um einen lokalisierten Primärtumor mit Metastasen in Leber, Haut und Knochenmark, wo eine bisher ungeklärte Spontanremission auftreten kann (Neuroblastomstudie NB 97 und 2004).

1.1.4.Diagnostik

Zur Diagnostik wird eine histologische Untersuchung des Tumors zusammen mit der Überprüfung erhöhter Katecholaminmetaboliten (Vanillinmandelsäure und

Homovanillinsäure) im Serum oder Urin (sensitiver) herangezogen. Als Tumormarker gelten Homovanillin- und Vanillinmandelsäure zur Diagnose und Verlaufskontrolle, die neurospezifische Enolase (NSE) als Verlaufsparemeter und LDH und Ferritin als prognostische Faktoren (Graf et al., 1995; Mayatepek, 2007).

Das Grading-System von Hughes und die internationale INPC-Klassifizierung werden zur histopathologischen Einteilung herangezogen (AWMF, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Nr. 025/008). Für prognostische Einschätzungen ist die genetische Charakterisierung des Neuroblastoms (Deletion 1p36 oder N-myc-Amplifikation) wichtig.

Eine Knochenmarkspunktion an 4 Stellen mit morphologischer und immunzytochemischer Untersuchung, gegebenenfalls Polymerasekettenreaktion (PCR)-Untersuchung und andere molekulargenetische Untersuchungen (AWMF, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Nr. 025/008) ist zur Abklärung von Metastasierung obligat. Bildgebende Verfahren wie Sonographie, i. v. Urogramm, Röntgen, CT und MRT werden zur Darstellung des Neuroblastoms genutzt. Das spezielle Verfahren der Metaiodbenzylguanidin (mIBG)-Szintigraphie ermöglicht eine gezielte Darstellung von Tumor und Metastasen, da sich ¹²³Iod-markiertes Metaiodbenzylguanidin in katecholaminproduzierendem Gewebe und somit auch im Neuroblastomgewebe anreichert (Neuroblastomstudie NB 97 und 2004).

Bei mIBG-negativen Tumoren können auch markiertes Somatostatin oder markierte monoklonale Antikörper verwendet werden. Ein Technetium-Szintigramm ist bei Verdacht auf Metastasierung angezeigt (AWMF, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Nr. 025/008)

1.1.5. Prognose

Die Prognose ist abhängig von Alter, Tumorstadium, Amplifizierung des N-myc-Protoonkogens und einer Deletion 1p (Mayatepek, 2007). Während bei Säuglingen die 5 Jahresüberlebensrate (JÜR) unabhängig vom Stadium noch 85% beträgt, ist sie bei Kleinkindern nach dem ersten Lebensjahr schon auf 40% gesunken (von Harnack et al., 2000). Im Stadium I liegt die 5-JÜR bei 98%, im Stadium II bei 95% und im Stadium III bei 75%. Neuroblastompatienten im Stadium IV haben nur noch eine 5 Jahresüberlebensrate von 33%, während sie im Stadium IVS noch 76% beträgt, da hier ein spontanes Ausreifen des malignen Neuroblastoms zu einem gutartigen

Ganglioneurom die Prognose deutlich verbessern kann. Die gesamte 5 Jahresüberlebensrate aller Stadien liegt bei 62% (Hero et al. 2004; Schmidt et al. 2000).

1.1.6. Therapie

Für die Therapie gilt die Operation als wichtigster prognostischer Faktor. Neben der möglichst vollständigen Resektion des Primärtumors werden eine histologische Sicherung der Diagnose und eine Beurteilung der Tumorausbreitung durch den Chirurgen angestrebt.

Eine Chemotherapie erfolgt im Rahmen kontrollierter Studien (z.B. Neuroblastomstudie NB 2004). Verwendet werden alkylierende Substanzen (Ifosfamid, Dacarbazin), Anthracycline (Adriamycin), Etoposid, Melphalan, Cisplatin und Vincaalkaloide (Vincristin, Vindesin) in Kombination. Bei Tumoren im Säuglingsalter kann als „Anstoß zur Regression“ auch eine milde Chemotherapie (Vincristin, Adriamycin oder Cyclophosphamid) angewandt werden. (AWMF, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Nr. 025/008) In einigen Fällen wird auch eine Nachbestrahlung des nach Chemotherapie verbliebenen Resttumors durchgeführt.

Da es sich beim Neuroblastom um einen embryonalen Tumor mit Tendenz zur spontanen Remission handelt, wird versucht durch Differenzierungsinduktoren wie 13-*cis*-Retinsäure eine Ausreifung des Neuroblastoms zum gutartigen Ganglioneurom zu bewirken.

Insgesamt gilt die Prognose eines Kindes mit einem Neuroblastom als sehr unterschiedlich. Zwar besitzen Säuglinge mit 85% eine sehr gute Überlebenschance, aber Kleinkinder, besonders mit N-myc-Amplifikation oder 1p Deletion haben immer noch eine erschreckend niedrige Überlebensrate bis zu 20% (von Harnack et al. 2000). Diese Tumore sprechen durch die Resistenzentwicklung kaum noch auf Chemo- oder Strahlentherapie an. Für diese Kinder sind neue, alternative Therapieoptionen zwingend erforderlich.

1.2. Tyrosinkinaseinhibitoren

1.2.1. Imatinib-Mesylat (STI-571)

Imatinib-Mesylat (STI-571) ist ein Tyrosinkinaseinhibitor und wird von der Firma Novartis unter dem Handelsnamen Gleevec[®] bzw. Glivec[®] vertrieben (Abbildung 1).

Über eine kompetitive und selektive Blockade von ATP-Bindungsstellen spezifischer Tyrosinkinase wie BCR-ABL, KIT und PDGFR (Bond et al. 2007) beeinflusst Imatinib-Mesylat Zellproliferation, Motilität und Apoptose.

Deswegen wird Imatinib-Mesylat vor allem bei der Therapie von CML und Philadelphia-Chromosom-positiver ALL erfolgreich eingesetzt, die das BCR-ABL Fusionsprotein als Zielstruktur aufweisen. Bis zu 87% dieser Patienten erreichen eine vollständige Remission (Helmann et al., 2007), aber etwa 10% entwickeln eine Imatinibresistenz (Ault, 2007). Mögliche Erklärungen dafür sind Mutationen im BCR-ABL-Gen, die Amplifikation des BCR-ABL-Gens (Gorre et al., 2001) sowie die zusätzliche Aktivierung von SRC-Kinasen (Yokota et al., 2007).

Ebenso gehört bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eine Behandlung mit Imatinib-Mesylat bei nicht resezierbaren und metastasierenden Tumoren zur Therapie erster Wahl. Hier spielen vor allem c-kit und PDGFR-alpha als Angriffziel des Kinaseinhibitors eine Rolle. Jedoch sind durch Resistenzentwicklungen bei etwa 15% der Patienten Progressionen zu verzeichnen (Boyar und Taub, 2007).

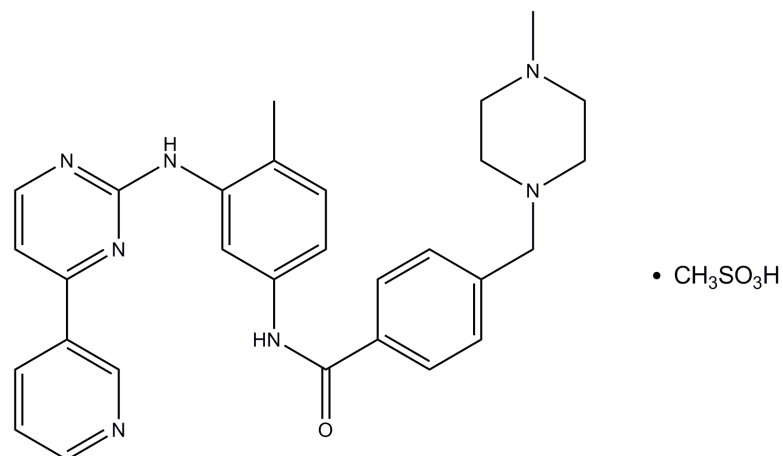


Abbildung 1) Strukturformel von Imatinib-Mesylat

Die Strukturformeln wurden mit ChemBioDraw, Level: Ultra, Version: 11.0, cambridgesoft, Cambridge erstellt.

Weitere Anwendungsgebiete der Therapie mit Imatinib-Mesylat sind das medulläre Schilddrüsenkarzinom, wobei die RET Rezeptortyrosinkinase blockiert wird (Frank-Raue et al. 2007), und die systemische Mastozytose (Droogendijk et al., 2006), bei welcher c-kit als Zielstruktur dient.

Bei Tumoren wie dem Ewing-Sarkom, Osteosarkom und Neuroblastom, die eine erhöhte Expression von c-kit und PDGF-Rezeptoren aufweisen, hat Imatinib-Mesylat als alleinige Therapie allerdings kaum einen klinisch relevanten Effekt gezeigt

(Bond et al., 2007). Die Kombination mit Retinsäure jedoch könnte beim Neuroblastom eine interessante Option darstellen (Rössler et al. 2006). Die Rolle von c-kit und PDGF-Rezeptor als Zielstrukturen von Imatinib-Mesylat beim Neuroblastom ist bis heute noch unklar. Die Antitumorwirkung von Imatinib-Mesylat erwies sich in einigen Versuchen als unabhängig von einer c-kit Expression. Andere bis jetzt noch nicht bekannte Signalwege und Tyrosinkinase scheinen hier möglicherweise von Bedeutung zu sein (Korja et al., 2005; Meco et al., 2005).

Es werden Dosierungen von 400 mg bis 600 mg (800 mg) pro Tag bei Erwachsenen eingesetzt. Die Dosierung bei Kindern wird anhand der Körperoberfläche vorgenommen (mg/m^2). 260 bzw. 340 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$ führen zu einer vergleichbaren Exposition wie Dosen von 400 mg bzw. 600 mg bei Erwachsenen. Erfahrungen mit der Behandlung von Kindern unter zwei Jahren, die einen Großteil der Neuroblastompatienten ausmachen, liegen jedoch nicht vor. (Fachinformation Glivec[®], Novartis pharma 2009)

Glivec[®] wird hauptsächlich über die Leber metabolisiert und nur zu 13% über die Niere ausgeschieden, sodass bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen (z.B. auch durch Metastasen) eine Dosisreduktion empfohlen wird.

Die häufigsten Nebenwirkungen sind Störungen des Blut- und Lymphsystems (Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie) (Hartmann et al., 2009), Gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit und Durchfall), Muskelkrämpfe, und Hautausschlag (Breccia et al., 2008).

Eine seltenere, jedoch gelegentlich schwer verlaufende Nebenwirkung bei etwa 1 bis 2% der Patienten ist die Flüssigkeitsretention (Pleura-Erguss, Aszites, Lungenödem) und Kardiotoxizität (Orphanos et al., 2009). Eine regelmäßige Blutbildkontrolle und regelmäßiges Wiegen wird daher dringend empfohlen. Spezielle sicherheitsrelevante Befunde in klinischen Studien bei Kindern gab es nicht (Fachinformation Glivec[®], Novartis Pharma 2009).

1.2.2. Dasatinib (BMS 354825)

Seit 2006 ist in den USA und in der EU der Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation Dasatinib (BMS 354825) zugelassen (Ault, 2007). Er wurde von Bristol-Myers Squibb entwickelt und trägt den Handelsnamen Sprycel[®]. Dasatinib (Abbildung 2) wird vor allem bei Imatinib-Resistenz oder -Unverträglichkeit eingesetzt. Neben der Blockade von c-kit und PDGFR-Kinasen wie bei Imatinib-Mesylat hemmt Dasatinib zusätzlich noch Ephrin (EPH)-

Rezeptorkinasen und SRC-Kinasen. SRC-Protoonkogene spielen wahrscheinlich bei der Entstehung verschiedener Tumore eine Rolle, indem sie zur Zellproliferation, Adhäsion, Invasion und Motilität beitragen (Lombardo et al., 2004).

Dasatinib bindet an die inaktive und aktive Konformation des BCR-ABL-Enzyms und stellt einen potenten subnanomolaren Inhibitor dieser Kinase bei Konzentrationen von 0,6-0,8 nM dar (Fachinformation Sprycel, Bristol-Myers Squibb, 2008). Dasatinib ist fähig diese Kinasen zu binden, ihre Autophosphorylierung zu hemmen und die Phosphorylierung zusätzlicher Zielstrukturen zu unterbinden, wodurch die onkogene Aktivität verhindert wird (Nam et al., 2006).

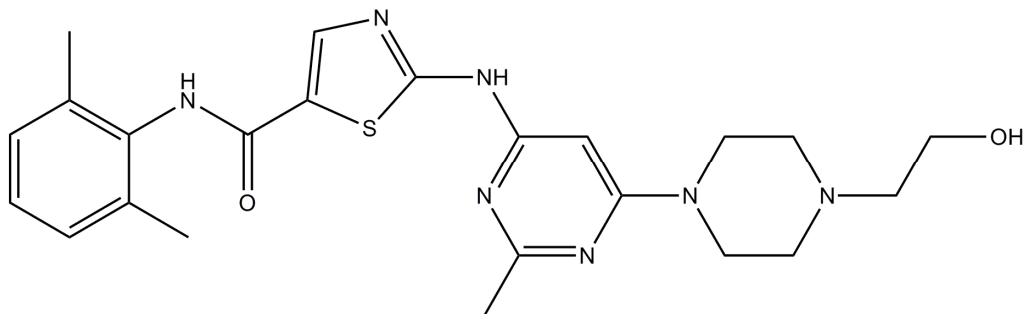


Abbildung 2) Strukturformel von Dasatinib

Die Strukturformeln wurden mit ChemBioDraw, Level: Ultra, Version: 11.0, cambridgesoft, Cambridge erstellt.

Über Zytotoxizität, Zellzyklusarrest (G1-Arrest) und Apoptose wird die Tumorzellinvasion eingedämmt (Johnson et al., 2007; Jahrestagung der dt., öster. und schweiz. Gesellschaft für Häm. und Onkol., Leipzig 2006; Fabarius et al., 2008). Durch dieses *Multi-Targeting* scheint Dasatinib eine bis zu 300fach stärkere Antitumorwirkung als Imatinib-Mesylat zu besitzen. Bereits in sehr niedrigen Dosierungen wird dieser neue Tyrosinkinaseinhibitor bei Fällen von CML und ALL angewandt, wo eine Imatinib-Unverträglichkeit oder eine Imatinib-Resistenzentwicklung vorliegt. Auch Toxizität und schwere Nebenwirkungen scheinen hierbei weniger aufzutreten. Nahezu alle BCR-ABL-Mutationen, die zu einer Imatinib-Mesylat-Resistenz führen, können durch Dasatinib gehemmt werden (Jahrestagung der dt., öster. und schweiz. Gesellschaft für Häm. und Onkol., Leipzig 2006; Shah, 2007; Shah et al., 2008). Auch bei Sarkomzellen ist ein therapeutischer Effekt von Dasatinib durch Hemmung von Migration und Invasion wahrscheinlich (Shor et al., 2007), ebenso wie bei Imatinib-Mesylat-resistenten GIST (Schittenhelm et al., 2006).

Die Dosierung bei Erwachsenen beträgt 100 mg bis 140 mg pro Tag. Sprycel® wird laut Hersteller Bristol-Myers Squibb aufgrund fehlender Daten nicht bei Kindern und Jugendlichen unter 18 Jahren empfohlen. Folgende Nebenwirkungen sind bekannt: Blutbildveränderungen (Thrombozytopenie, Neutropenie, Anämie), Blutungen, Flüssigkeitsretention, Dyspnoe, Lungenfunktionseinschränkungen (Bergeron et al., 2007), Übelkeit, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Hautausschlag (Wong, 2008) und im EKG QT-Zeitverlängerungen (Fachinformation Sprycel, Bristol-Myers Squibb, 2008).

1.3. Zielsetzung

Inwieweit Imatinib-Mesylat und Dasatinib erfolgreich bei der Therapie von Neuroblastomen eingesetzt werden können, sollte in dieser Arbeit anhand von *in-vitro*-Studien untersucht werden.

Dabei wurde zunächst ein Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat- und Dasatinib-Behandlung an der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y vorgenommen. Die Klärung von Resistenzentwicklungen und möglichen Interaktionen beider Behandlungen stellten ein weiteres Ziel der Versuche dar. Mittels Microarray-Analyse, konventioneller PCR, quantitativer PCR und Durchflusszytometrie sollte weiterhin untersucht werden, welche Änderungen in der Genexpression und dem Oberflächenantigenprofil nach Inkubation mit einem der Kinaseinhibitoren auftraten, um mögliche Zielstrukturen der Antitumorwirkung von Imatinib-Mesylat und Dasatinib bei Neuroblastomen zu finden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen VWR (Darmstadt), Carl Roth Chemie (Karlsruhe), Merck Eurolab (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2 nd -Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid-Bis-Lösung	Merck
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Antifoam	Sigma
Biotin-11 CTP	Enzo, Lörrach, Deutschland
Biotin-16 UTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-Anti-Streptavidin-AK	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BSA	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth Chemie
Control Oligonucleotide B2	Affymetrix, Santa Clara, USA
Dasatinib	Bristol Myers Squibb
DEPC-Wasser	Ambion, Austin, USA
DMSO	Sigma
DNA-Ligase (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Polymerase I (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Probenpuffer	MBI Fermentas
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's MEM Medium	Biochrom AG, Berlin
Ethanol (96%)	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Eucaryotic Hybridization Controls	Affymetrix, Santa Clara, USA
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Imatinib-Mesylat	Novartis Pharma
MEGAscript T7 Kit	Ambion, Austin, USA
MgCl ₂ (25 mM)	Promega, Mannheim
Oligo-(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Promega, Mannheim
PBS	Lonza, Köln, Deutschland
PCR-Puffer (10x)	Promega, Mannheim
Penicillin-Streptomycin (PS)	Biochrom AG, Berlin

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma
Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
RNaseH	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseZap®	Ambion, Austin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RT Puffer (5x)	Promega, Mannheim
SSPE	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Superscript II RT	Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase (5U/μl)	Promega, Mannheim
T7-(dT)24-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin

Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer, Lösungen und Nährmedien:

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA):

2,0 M Tris; 50 mM EDTA; 1M Eisessig; pH 8,3

5x Fragmentierungspuffer:

0,25 M Tris/Acetat; 32,4 g/l Mg(OAc)₂; 49 g/l KOAc; pH 8,1

5x DNA-Probenpuffer:

250 mM Tris-HCl; 0,2% Bromphenolblau; 40% Glycerol; pH 7,5

2x Hybridisierungspuffer:

200 mM MES; 2 M NaCl; 40 mM EDTA; 0,02% Tween-20

12x MES, (2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure)-Lösung:

1,22 M MES; 0,89 M MES-Natriumsalz; pH 6,5

Non Stringent Wash A-Puffer: 6x SSPE (20x SSPE-Stock: 3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,02 M EDTA); 0,1% Tween-20; 0,005% Antifoam

Stringent Wash B-Puffer

100 mM MES; 0,1 M NaCl; 0,01% Tween-20

2x Färbepuffer:

200 mM MES; 2 M NaCl; 0,1% Tween-20; 0,01% Antifoam

2.2. Zelllinie SH-SY5Y

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (Abbildung 3) verwendet, die von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) erworben wurde.

Wie andere stabile etablierte Zelllinien auch, sind SH-SY5Y in ihrer Lebensdauer durch eine Modifikation ihrer genetischen Information (Transformation) nicht begrenzt. Die Linie SH-SY5Y stellt ein Neuroblastom der dritten Generation dar, aus der Linie SH-SY5 kloniert, die ihrerseits von SH-SY, und diese wiederum von SK-N-SH-Zellen ausgehend kloniert wurden. Die originale Zelllinie wurde 1970 von einem 4 Jahre alten Mädchen mit einem metastasierenden Knochentumor isoliert. Die SH-SY5Y Zellen besitzen zwei X-Chromosomen und ein abnormales Chromosom 1 durch eine zusätzliche Kopie von dem Segment 1q. Die Zellen neigen zu Differenzierung durch Ausbildung von Neuriten, die sich in der Umgebung der Tumorzelle ausbreiten. Während der Teilung können sich die Zellen zu Clustern formieren, was an ihre kanzerogene Herkunft erinnert, jedoch können die Zellen durch Behandlung z. B. mit Retinsäure auch zur Dendritenausbildung und Differenzierung gebracht werden. Trotz der Veränderung einiger Zelleigenschaften wird die Zelllinie SH-SY5Y aufgrund weiterhin bestehender Gemeinsamkeiten mit den ursprünglichen Neuroblastomzellen bei vielen Untersuchungen in der Tumorforschung verwendet (Biedler et al., 1973; Jalava et al., 1990; Ross et al., 1983).

2.3. Zellkultur:

Die Zelllinie SH-SY5Y wurde in 75 cm²-Flaschen unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, 95% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zellzüchtung erfolgte in Dulbecco's MEM Medium (Biochrom AG, Berlin) mit Zugabe von 20% fetalem Kälberserum (FBS, Biochrom AG) und Penicillin und Streptomycin (10000U/ml und 10000 µg/ml). Der Mediumwechsel wurde ein- bis zweimal die Woche vorgenommen. Dabei wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit je 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C im Brutschrank ca. 5-10 min inkubiert, sodass sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Dazu kamen 10 ml neues Kulturmedium. Daraus wurden dann 2 ml Zellsuspension in eine neue 75 cm²-Flasche, die bereits mit 18 ml frischen

Medium gefüllt war, überführt. Die restliche Zellsuspension in der alten Kulturflasche wurde verworfen oder für weitergehende Experimente verwendet.

2.4. Langzeit-Behandlung von Zellen mit Imatinib-Mesylat bzw. Dasatinib:

20 ml Zellsuspension SH-SY5Y wurde mit 25 μ l Imatinib-Mesylat (10 mM Stocklösung) bzw. 25 μ l Dasatinib (10 mM Stocklösung) und somit mit 12,5 μ M (Endkonzentration) der Inhibitoren behandelt (Abbildung 4).



Abbildung 3) Phasenkontrastaufnahme der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y im Medium Dulbecco's MEM

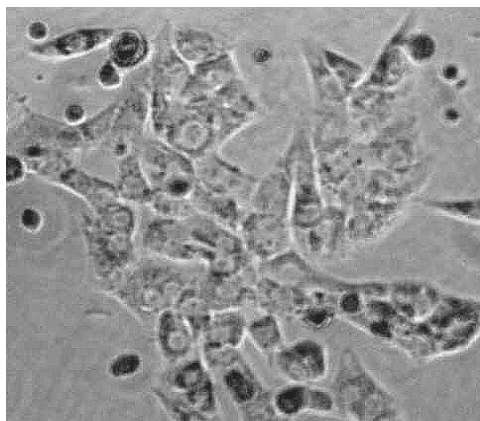


Abbildung 4) Phasenkontrastaufnahme der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, nachdem sie 5 Tage lang mit 12,5 μ M Imatinib-Mesylat behandelt wurde.

Deutlich sind eine vermehrte Granulation im Zytoplasma und eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Zellen sichtbar.

Die Stammlösungen wurden in DMSO gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Alle 7 Tage erfolgte Mediumwechsel mit Zugabe frischer Inhibitoren der gleichen Konzentration.

2.5. Zellproliferationstest

Um die Wirkung verschiedener Substanzen wie ATRA (all-trans-Retinsäure), Imatinib-Mesylat und Dasatinib auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde ein Zellproliferationstest (MTT-basiert, Roche Mannheim, Germany) durchgeführt. Hierbei ging es vor allem auch um den Vergleich unbehandelter Zellen und vorbehandelter Zellen in Bezug auf mögliche Resistenzentwicklungen und Interaktionen verschiedener Behandlungen.

Das Prinzip des MTT-Testes ist folgendes: Das Enzym Succinatdehydrogenase ist in Mitochondrien lokalisiert und wandelt den gelben, wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein dunkelblaues, wasserunlösliches Produkt (MTT-Formazan) um (siehe Abbildung 5). Das Formazanderivat wird durch Zellyse freigesetzt, mit Isopropanol extrahiert und kann anschließend im Photometer bei 570 nm gemessen werden. Die optische Dichte des Farbstoffes ist dem Anteil der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen direkt proportional.

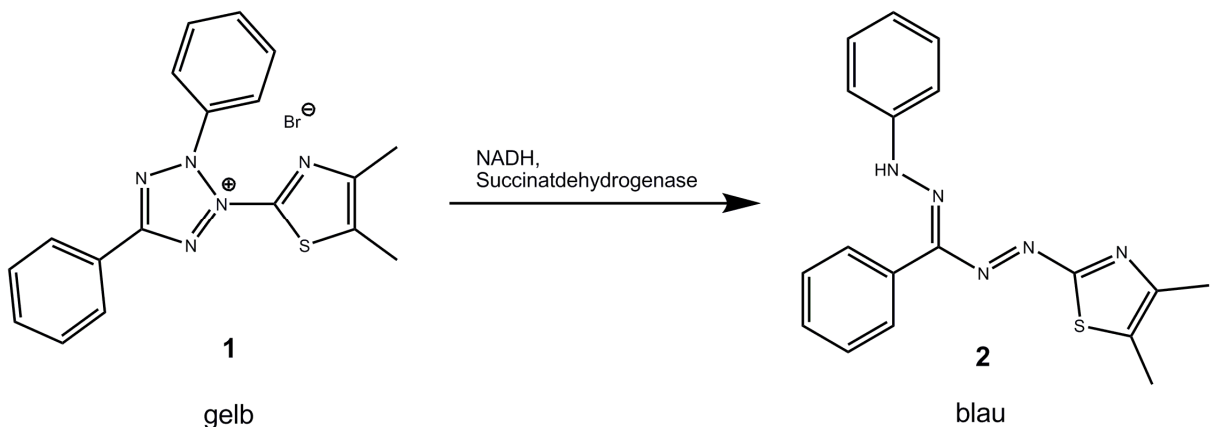


Abbildung 5) Prinzip des MTT-Testes

Das Enzym Succinatdehydrogenase wandelt den gelben, wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, **1**) in ein dunkelblaues, wasserunlösliches Produkt (MTT-Formazan, **2**) um.

Die Strukturformeln wurden mit ChemBioDraw, Level: Ultra, Version: 11.0, cambridgesoft erstellt.

Zur Durchführung wurden die Zellen einer Kulturflasche zunächst geerntet, indem das Medium abgesaugt wurde und 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung dazugegeben wurde. Die anschließende Inkubierung im Brutschrank für etwa 5 min erfolgte bei 37 °C. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und 10 min bei 1000 U/min (200g) zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl ermittelt werden.

Mit dem Ziel etwa 5000 Zellen pro Well zu erhalten, wurden die resuspendierten Zellen entsprechend mit Medium verdünnt. Jeweils 100 µl Zellsuspension wurden in ein Well der Zellkultur-Testplatte (96 F, TPP, Trasadingen, Schweiz) gefüllt, wobei die äußeren Wells mit 100 µl Aqua B. Braun (Ecotainer, Melsungen) gefüllt wurden, um Verdunstungserscheinungen vorzubeugen. Die Inkubation erfolgte für 24 h.

Schließlich wurde eine Verdünnungsreihe von Imatinib bzw. Dasatinib-Lösungen hergestellt, woraus sich folgende Konzentrationen ergaben: 104 µM, 52 µM, 26 µM, 13 µM, 6,5 µM und 0 µM (Medium) mit je 50 µl pro Well. Nach 48 h Inkubation und dem Absaugen von je 100 µl Überstand wurde pro Wells 10 µl MTT *labeling reagent* (0,5 mg/ml) zugegeben. Nach 4-5 h erfolgte die Zugabe von je 100 µl *solubilization solution* mit anschließender Inkubation von 24 h. Gemessen wurde der MTT-Umsatz mithilfe eines Microplate reader (Biorad, Model 550) bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm. Schließlich wurde basierend auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ ein zweiseitiger t-Test angewendet.

2.6. ED50 -Werte

„Die Effektivdosis 50 (ED50) ist die Dosis oder Konzentration, die 50% der maximalen Wirkung auslöst oder bei der bei 50% der Fälle der erwartete Effekt eintritt“ (Karow und Lang-Roth, 2007). In dieser Arbeit bedeutet ED50 die Dosis, bei der 50% der SH-SY5Y-Zellen abgestorben sind.

Die Berechnung der ED-50 Werte erfolgte mit Hilfe des Programms E50plusv1.0 von Mario H. Vargas, April 2000, Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias (<http://www.freesoft.cc/review.asp?id=3008>).

2.7. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird die Fluoreszenzeigenschaft von Zellen gemessen. Gelesen wird die Information pro Einzelzelle, sodass die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen die Summe der Einzelinformationen darstellt.

Die Tumorzellen wurden mit dem jeweiligen Antikörper (siehe Tabelle 1) versehen, der an den Fluoreszenzfarbstoff PE (Phycoerythrin) gekoppelt war.

Etwa eine Million Zellen wurden pro Färbung bereitgestellt und anschließend zentrifugiert. Dazu wurden 20 µl eines PE-markierten Antikörpers mit einer Konzentration von 20 µg/ml gegeben. Die Zellen inkubierten 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln (Kühlschrank), damit eine stabile Antikörper-Bindung erreicht werden konnte. Durch drei Waschschrte mit je 1 ml DPBS wurden die bis dahin noch nicht gebundenen Antikörper entfernt. Die Tumorzellen wurden danach in 1 ml DPBS aufgenommen und gemessen. Isotypkontrollen (Negativkontrollen) wurden ebenfalls angelegt, da die Durchflusszytometrie eine relative Messmethode darstellt und deshalb keine „0-Fluoreszenz“ existiert. Als Isotypkontrollen werden die Proben bezeichnet, die mit einem nicht bindenden Antikörper gleichen Isotyps (Maus IgG1) wie der spezifische Antikörper versetzt wurden (Shapiro, 2003). Die Messung erfolgte mithilfe des FACScan (Becton-Dickinson, Heidelberg) und die Messdaten wurden mit dem Computerprogramm CELLQuestPro (Becton-Dickinson) verarbeitet.

Tabelle 1) Verwendete Antikörper mit PE (Phycoerythrin) gefärbt

Spezifität	Isotyp	Klon
Isotyp-kontrolle	IgG1,kappa	X36
Isotyp-kontrolle	IgG2a,kappa	MOPC173
CD54	IgG1,kappa	HA58
CD117	IgG1	104D2
CD137	IgG1,kappa	1AH2
CD184	IgG2a,kappa	12G5

2.8. cDNA-Synthese

Zur Isolation von RNA aus SH-SY5Y-Zellen wurden diese durch Zentrifugation bei 4 °C (10 Minuten, 200 g) von Medienresten getrennt, in einem Milliliter TRIzol-Reagenz

aufgenommen und mittels einer Kanüle durch mehrmaliges Auf- und Abziehen homogenisiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10 Minuten, 12000 g) abgetrennt und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, für 15 Sekunden gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einer Zentrifugierung (15 Minuten, 12000 g) bei 4 °C wurde die in der oberen Phase befindliche RNA abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt, bei 4°C zentrifugiert (10 Minuten, 12000 g) und mit 1 ml kaltem Ethanol (80%ig) gewaschen. Anschließend wurde die RNA bei 4 °C zentrifugiert (5 Minuten, 7500 g) und nach Abnahme des Überstandes für 5 Minuten luftgetrocknet, um dann in 50 µl Wasser aufgenommen zu werden. Die RNA wurde für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt, sofort für zwei Minuten auf Eis gestellt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurden 10 µl einer wässrigen RNA-Lösung mit ca. 2 µg RNA zunächst mit 1 µl Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer (Invitrogen, Germany) versetzt und für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde die Mischung schnell durch Einbringen des Reaktionsgefäßes in eisgekühltes Wasser abgekühlt, mit 9 µl RT-Reaktionsgemisch (4 µl RT-Puffer (5fach *first strand buffer*); 2 µl DTT (100 mM); 1 µl dNTP-Lösung (10 mM); 1 µl reverse Transkriptase) auf 20 µl aufgefüllt, für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt. Die reverse Transkription wurde mit SuperScript RTII (Invitrogen, Germany) durchgeführt.

Tabelle 2) Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

	Volumen [µl]	Endkonzentration
5x RT Puffer	4	1x
100 mM DTT	2	10 mM
Oligo-(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	1	5 µM
10 mM dNTPs (Mix)	1	500 µM
Superscript II RT (200U/µl)	1	200 U/Reaktion
H ₂ O	11-x	
RNA (2 µg)	x	0,1 µg/ml
Gesamtvolumen	20	

2.9. Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

In PCR-Reaktionsgefäßen wurden zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) jeweils 23 µl PCR-Reaktionsgemisch (2,5 µl PCR-Puffer (10fach); 1,5 µl MgCl₂-Lösung (25 mM); 0,5 µl dNTP-Lösung (10 mM); jeweils 0,25 µl der beiden Primer (25 µM) (siehe unten; Tabelle 4); 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl); 17,8 µl Wasser) mit 2 µl cDNA versetzt (Tabelle 3). Die PCR-Gefäße wurden in das PCR-Gerät eingebracht, nachdem der Heizblock auf 95 °C vorgeheizt worden war. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

Im Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) wurde folgendes Temperaturprofil programmiert:

Für Aktin-Primer: 25 Cyclen (1. hold 95 °C; 2. 95 °C, 5 min; 3. 94 °C, 45 s; 4. 60 °C, 45 s; 5. 72 °C, 45s; 6. 3. repeat 24; 7. 72 °C, 7 min)

Für andere Primer: 32 Cyclen (1. hold 95 °C; 2. 95 °C, 5 min; 3. 94 °C, 45 s; 4. 60 °C, 45 s; 5. 72 °C, 45 s; 6. 3.repeat 31; 7. 72 °C, 7 min)

Tabelle 3) Reaktionsansatz für die PCR

	Volumen [µl]	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2,5	1x
25 mM MgCl ₂	1,5	1,5 nM
10 mM dNTPs	0,5	200 µM
Sense Primer (25 µM)	0,25	0,5 µM
Antisense Primer (25 µM)	0,25	0,5 µM
Taq Polymerase (5U/µl)	0,2	1
H ₂ O	17,8	
cDNA (2-4 µl)	2	
Gesamtvolumen	25	

Im Anschluss an den letzten Zyklus wurde für 7 Minuten bei 72 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurde Agarose (0,01 g/ml bis 0,02 g/ml) in TAE-Puffer auf 75 g gewogen, aufgekocht, das verdunstete Wasser durch Wägung bestimmt und durch neues Wasser ersetzt. Nach geringer Abkühlung wurden dem noch flüssigen Gel 8 µl Ethidiumbromid (0,7 µg/ml Gel)

dazugegeben und in eine Gelkammer mit Gelschlitten eingebracht. 10 µl pro Probe und je 3 µl *Gel Loading Buffer* (Ambion), sowie 1,5 µl *Ladder plus* (100 bp GeneRuler, Fermentas) und 9,5 µl PCR-Wasser wurden zusammen pipettiert. Davon wurden je 10 µl in die Geltaschen übertragen. Anschließend wurden die DNA-Proben bei etwa 5 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt und später unter UV-Beleuchtung dargestellt. Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes Primer3 (Rozen et al., 2000; frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Tabelle 4) Verwendete Primer. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

Gen	Produktgröße	sense-Primer	antisense-Primer
ALS2CR8	462	5'-GGA AAG CAG GTC TTG TCA GC-3'	5'-ACC TCA TCG GGT TTG AAC AG-3'
CDKN1A	449	5'-CTC TGG GTG GTC ATG GAG TT-3'	5'-TTG TGC AGG TTC TTC AGT CG-3'
CTGF	385	5'-CCT GGT CCA GAC CAC AGA GT-3'	5'-GTA ATG GCA GGC ACA GGT-3'
ELAVL3	338	5'-AGC AAG ACC AAC CTC ATC GT-3'	5'-CCG TAC TGG GAG AAG AGC TG-3'
HMGB4	332	5'-GTT GGC AAG AGG AAG AAA CG-3'	5'-ATC CAT CAG CTC TGC CTG AC-3'
IFIH1	500	5'-GCT GCA AAA GAA GGA AAT CG-3'	5'-ATC AGA TGG TGG GCT TTG AC-3'
IFI16	374	5'-CAT CCC CAC ACT CCT CAG AT-3'	5'-ATC TCC ATG TTT CGG TCA GC-3'
NRXN2	356	5'-GGC TGG AGT TCC ACA ACA TT-3'	5'-CTT GAC CAG CTC GAT GAC AA-3'
MYCT1	331	5'-ACT GGA TTT TAC CGC CAC AG-3'	5'-GGA ATG CCT TGA TGA TGG AC-3'
PML	303	5'-ACA CCA GTG GTT CCT CAA GC-3'	5'-CCA AAG GCA CTA TCC TGC TC-3'
SYN1	305	5'-CAA ATA TGA CGT GCG TGT CC-3'	5'-TGA CCA CGA GCT CTA CGA TG-3'
TGFB2	425	5'-ACT GTC CCT GCT GCA CTT TT-3'	5'-TAA GCT CAG GAC CCT GCT GT-3'

2.10. quantitative RT-RT-PCR

Die quantitative RT-RT-PCR (Reaktionsansatz siehe Tabelle 5) wurde mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Primeranlagerung bei 62 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 45 s. Jede Reaktion wurde der Schmelztemperaturanalyse unterzogen, um die Anwesenheit der einzelnen amplifizierten Produkte zu überprüfen. Die RT-RT-PCR wurde in Dreifachansätzen durchgeführt und die spezifische Genamplifikation über GAPDH kalibriert. Die Zielgene und GAPDH wurden in 40 Zyklen unter der Verwendung von Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research) light cycler und Rotor-Gene 6 software amplifiziert.

Tabelle 5) Reaktionsansatz für die quantitative RT-RT-PCR

	Volumen [µl]
Sybergreenmix (QuantiTect, Qiagen)	10
Sense-Primer	1
Antisense-Primer	1
RNA free water (Qiagen)	6
cDNA	2
Gesamtvolumen	20

Die relative Genexpression (Fold change) wurde berechnet nach der Formel (Livak und Schmittgen, 2001):

$$\Delta Ct = Ct \text{ target} - Ct \text{ GAPDH}; \Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ Probe} - \Delta Ct \text{ Kontrolle};$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

2.11. Microarray-Analyse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Microarrays des Typs HG_U133Plus2.0 der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet.

Das Protokoll für die Prozessierung von Proben für die Microarray-Analyse lehnte sich im Wesentlichen an Angaben der Hersteller an.

Die RNA wurde mit Trizol (Invitrogen) aus den Neuroblastomzellen SH-SY5Y extrahiert. Nach der Herstellung von Doppelstrang-DNA anhand von Standardprotokollen wurde biotinylierte cRNA mittels *in-vitro*-Transkription prepariert. Nach anschließender cRNA-Fragmentierung und Hybridisierung mit den Microarrays

wurden die Hybridisierungsprodukte mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt. Eine Signalerhöhung wurde mit biotinylierten Ziegen-Anti-Streptavidin-Antikörpern durchgeführt. Die Arrays wurden mit einer Fluidics Station 450 gewaschen und mit einem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 gescannt.

Alle Mikroarray-Rohdaten wurden mittels der primären Bilderfassungs- und Auswertungssoftware (Microarray Suite 5.0) auf einen Wert von 500 skaliert. Nach Überführung der Daten in eine Text-Datei erfolgte die Auswertung. Hierbei wurde eine einfache Tabellenkalkulation mithilfe von Microsoft Excel durchgeführt. Gene mit unterschiedlicher Expression zwischen Medium-, Imatinib-Mesylat- und Dasatinib-behandelten Zellen wurden aufgrund folgender Kriterien identifiziert: Der Quotient der Signalintensitäten aus Imatinib-Mesylat- bzw. Dasatinib- inkubierten Zellen und Wildtypzellen sollte größer als 10 sein. Die Signalintensitätswerte der Zellen mit höherer Expression sollten größer als 100 sein. Aus der sich hieraus ergebenden Liste von unterschiedlich exprimierten Genen wurden interessant erscheinende Gene in Bezug auf Tumorgenese und neuronale Differenzierung herausgesucht. Nähere Informationen zu den einzelnen Genen wurden mit Hilfe der Internetdatenbank mit Informationen zu Genen und deren Expression „SOURCE“ (Diehn et al., 2003) zusammengetragen (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

3. Ergebnisse

3.1.1. Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat und Dasatinib auf unbehandelten SH-SY5Y Zellen

Um die Wirksamkeit der Kinaseinhibitoren Imatinib-Mesylat und Dasatinib gegenüber Neuroblastomzellen zu untersuchen wurden SH-SY5Y-Zellen mit steigenden Konzentrationen der Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität bestimmt (Abb. 6).

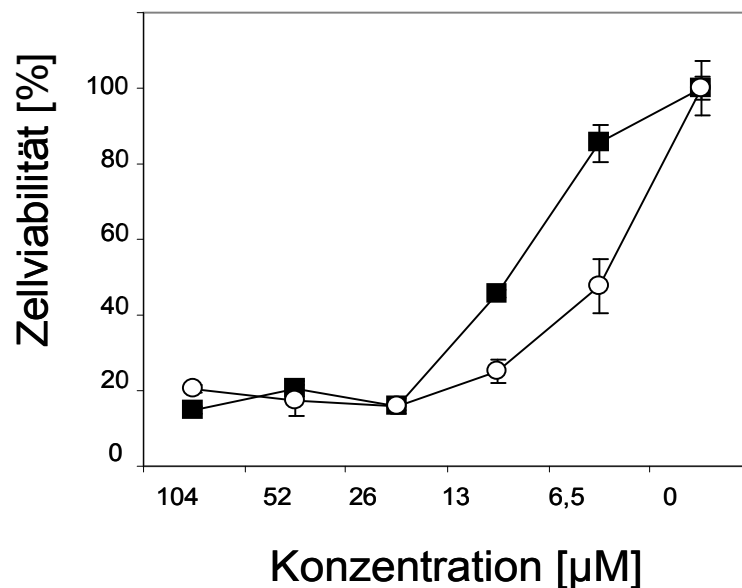


Abbildung 6) Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat und Dasatinib bei unbehandelten SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für den Zellproliferationstest wurden 5000 Zellen pro Well in eine 96-well-Platte überführt und 24 h inkubiert. Je 50 μl Imatinib-Mesylat bzw. Dasatinib wurden nach einer Verdünnungsreihe in absteigenden Konzentrationen (104 μM , 52 μM , 26 μM , 13 μM , 6,5 μM und 0 μM) dazugegeben. Nach 48 h Inkubation wurde der Zellproliferationstest, wie unter 2.4. beschrieben, durchgeführt

Die Vierecke entsprechen der Behandlung von SH-SY5Y Zellen mit Imatinib-Mesylat, die Kreise der Behandlung mit Dasatinib. Das Bild repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt 30 Einzelmessungen).

Dasatinib bewirkte in Konzentrationen unterhalb von 26 μM eine effektivere Hemmung der Zellviabilität als Imatinib-Mesylat.

So lag beispielsweise bei einer Konzentration von 6,5 μM bei Dasatinib nur noch eine Zellviabilität von 47,8% vor, während sie bei Imatinib-Mesylat noch 85,4% betrug. In höheren Konzentrationen waren beide Kinaseinhibitoren vergleichbar aktiv (siehe Abbildung 6).

3.1.2. Dasatinib-Wirkung auf Imatinib-Mesylat-resistente SH-SY5Y-Zellen

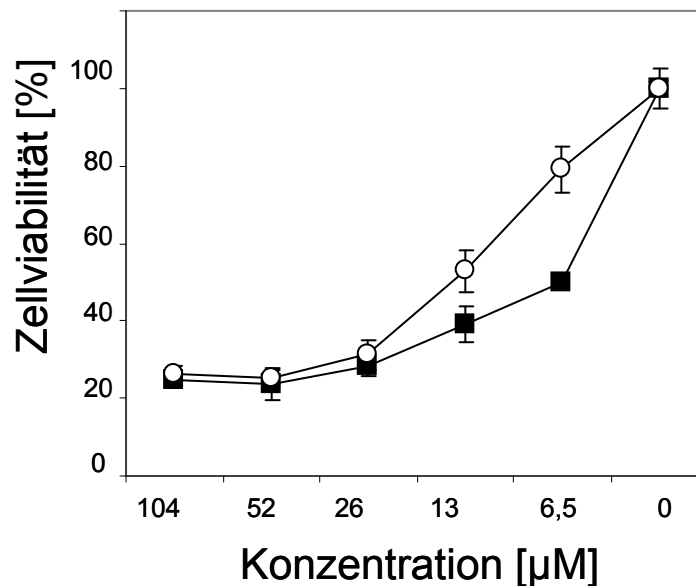


Abbildung 7) Vergleich der Titration von Imatinib-Mesylat und Dasatinib bei Imatinib-Mesylat-behandelten SH-SY5Y (STires)

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit Imatinib-Mesylat behandelt (STires). Für den Zellproliferationstest wurden 5000 Zellen pro Well in eine 96- well-Platte überführt und 24 h inkubiert. Je 50 μl Imatinib-Mesylat bzw. Dasatinib wurden nach einer Verdünnungsreihe in absteigenden Konzentrationen (104 μM , 52 μM , 26 μM , 13 μM , 6,5 μM und 0 μM) dazugegeben. Nach 48 h Inkubation wurde der Zellproliferationstest wie unter 2.5. beschrieben durchgeführt.

Die Vierecke entsprechen der Behandlung mit Dasatinib, die Kreise der Behandlung mit Imatinib-Mesylat. Das Bild repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt 30 Einzelmessungen.

SH-SY5Y-Zellen wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben über einen Zeitraum von 14 Tagen einmal pro Woche mit Imatinib-Mesylat behandelt.

Die überlebenden Zellen (im Folgenden als STIres bezeichnet) wurden anschließend mit SH-SY5Y-Zellen ohne vorherige Behandlung (WT), die ausschließlich in Medium gehalten wurden, verglichen.

Um die Wirkung von Dasatinib auf Imatinib-Mesylat-resistente Neuroblastomzellen beurteilen zu können, wurde die Empfindlichkeit von Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Tumorzellen gegenüber Imatinib-Mesylat und Dasatinib verglichen.

Nach einer Imatinib-Mesylat-Behandlung sprachen SH-SY5Y-Zellen weniger auf eine weitere Imatinib-Mesylat-Behandlung an, jedoch wurden sie durch eine Dasatinib-Behandlung weiterhin in ihrer Aktivität gehemmt (Abbildung 7), d. h. einer möglichen Resistenzentwicklung durch Imatinib-Mesylat konnte mit einer Dasatinib-Behandlung entgegnet werden. Während bei einer Konzentration von 13 μM bei einer Dasatinib-Behandlung die Zellviabilität bei 39,2 % lag, betrug sie bei einer Imatinib-Mesylat-Titration noch 52,9 %.

3.1.3. Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat gegenüber Imatinib-Mesylat-resistenten-Zellen und unbehandelten SH-SY5Y-Zellen.

Um mögliche Resistenzausbildungen nach Langzeitbehandlung (siehe 2.4.) mit Imatinib-Mesylat zu überprüfen, wurden Imatinib-vorbehandelte Zellen zum Vergleich mit unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mit Imatinib inkubiert.

Bei der Langzeitbehandlung mit Imatinib-Mesylat war eine Resistenzentwicklung im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei der Inkubation mit Imatinib-Mesylat zu verzeichnen (Abbildung 8). Während bei einer Konzentration von 13 μM bei unbehandelten Zellen die Zellviabilität 70,5 % betrug, lag sie bei Imatinib-Mesylat vorbehandelten Zellen bei 93,2 %.

Durch Berechnung der ED50-Werte (siehe 2.6.) wurde die Wirksamkeit von Dasatinib und Imatinib-Mesylat gegenüber den verschiedenen Zelltypen quantifiziert (siehe Abbildung 9). Niedrige ED50 Werte bedeuten hierbei eine stärkere Inhibition der Zellaktivität. So waren bei einem Wert von 31 μM etwa 50% der WT-Zellen bei Imatinib-Mesylat-Behandlung noch lebend, während bei der Dasatinib-Behandlung von WT-Zellen bereits bei einem Wert von 10 μM nur noch 50% der Zellen lebten. Nach einer Dasatinib-Titration lag der ED50 Wert bei STIres-Zellen bei 18 μM . STIres-Zellen, die nochmals mit Imatinib-Mesylat behandelt wurden, waren mit einem ED50 Wert von 38 μM , die am wenigsten in ihrer Aktivität gehemmten Zellen.

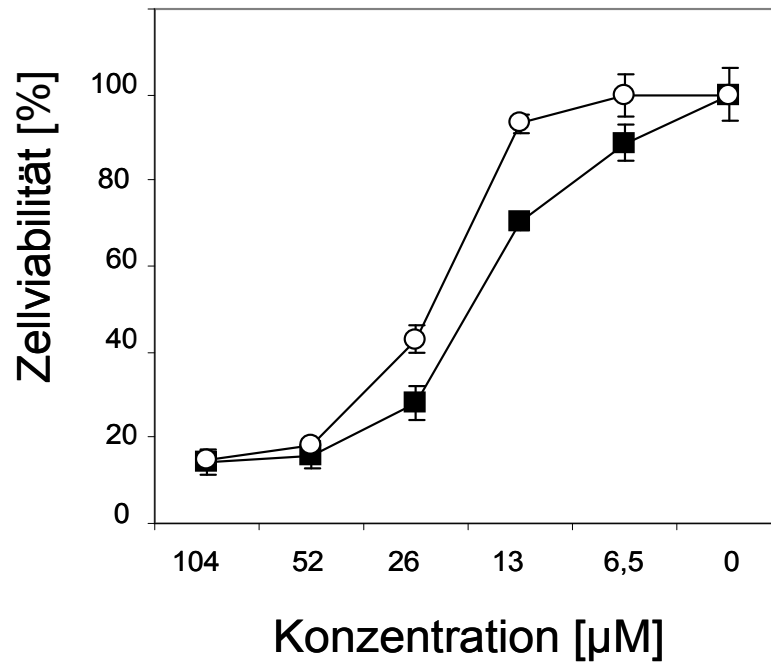


Abbildung 8) Vergleich Titration mit Imatinib-Mesylat bei unbehandelten SH-SY5Y (WT) und Imatinib-Mesylat behandelten SHSY-5Y (STires)

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen aller 7 Tage mit Imatinib-Mesylat behandelt (STires). Für den Zellproliferationstest wurden 5000 Zellen pro Well in eine 96- well-Platte überführt und 24 h inkubiert.

Je 50 μl Imatinib-Mesylat wurden nach einer Verdünnungsreihe in absteigenden Konzentrationen (104 μM , 52 μM , 26 μM , 13 μM , 6,5 μM und 0 μM) dazugegeben. Nach 48 h Inkubation wurde der Zellproliferationstest wie unter 2.5. beschrieben, durchgeführt.

Die Vierecke entsprechen der Behandlung von unbehandelten SH-SY5Y Zellen mit Imatinib-Mesylat, die Kreise der Behandlung mit Imatinib-Mesylat von STires-Zellen. Das Bild repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt 30 Einzelmessungen.

Demnach war die Dasatinib-Behandlung sowohl bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (WT) als auch bei Imatinib-Mesylat-vorbehandelten bzw. Imatinib-Mesylat-resistenten SH-SY5Y-Zellen (STires) in ihrer Inhibition der Zellaktivität wirksamer als die Imatinib-Mesylat-Behandlung.

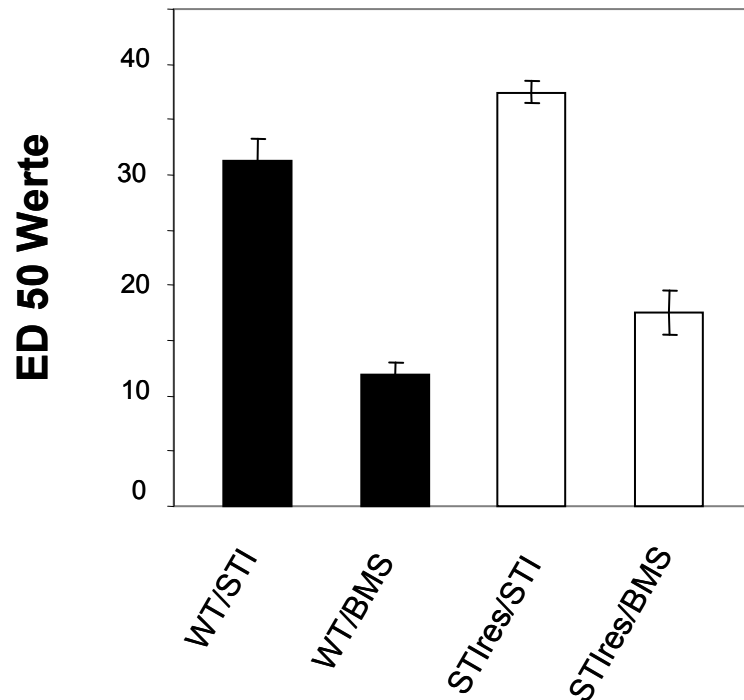


Abbildung 9) ED50-Werte der Titration mit Imatinib-Mesylat (STI) bzw. Dasatinib (BMS) bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (WT) und bei Imatinib-Mesylat-behandelten SH-SY5Y-Zellen (STIres)

Die Effektivdosis 50 (ED50) ist die Dosis oder Konzentration, die 50% der maximalen Wirkung auslöst oder bei der in 50% der Fälle der erwartete Effekt eintritt (Karow und Lang-Roth, 2007). In dieser Arbeit wird unter ED50 die Dosis verstanden, bei der 50% der SH-SY5Y-Zellen abgestorben waren.

Damit ergab sich folgende Reihenfolge der Effektivität: WT/Dasatinib (ED50 = 10 μ M), STIres/Dasatinib (ED50 = 18 μ M), WT/Imatinib-Mesylat (ED50 = 31 μ M) und STIres/Imatinib-Mesylat (ED50 = 38 μ M). Mittels zweiseitigen t-Test wurde ein signifikanter Unterschied ($P < 0,01$) zwischen der Behandlung von WT mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib festgestellt, sowie zwischen der Behandlung von Imatinib-Mesylat bei WT und STIres. Aufgrund der stark schwankenden Daten bei STIres Zellen, die mit BMS behandelt wurden, ergab sich hierbei im Vergleich kein signifikanter Unterschied.

3.1.4. Vergleich Titration Dasatinib bei Dasatinib-resistenten SH-SY5Y-Zellen versus unbehandelte Zellen

Bei diesem Experiment wurden SH-SY5Y-Zellen mit Dasatinib in einem Zeitraum von 14 Tagen vorbehandelt (siehe 2.4.). Es sollte überprüft werden, ob Dasatinib-

vorbehandelte Zellen ein ähnliches Resistenzverhalten wie Imatinib-Mesylat-vorbehandelte Zellen aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Dasatinib-Vorbehandlung eine Resistenzentwicklung (siehe Abbildung 10) ähnlich wie bei einer Imatinib-Mesylat-Vorbehandlung eintrat. Bei einer Konzentration von 6,5 μM hatte die Zellviabilität bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen einen Wert von 41,3 %, während die Zellviabilität bei Dasatinib-vorbehandelten Zellen 57,7 % betrug.

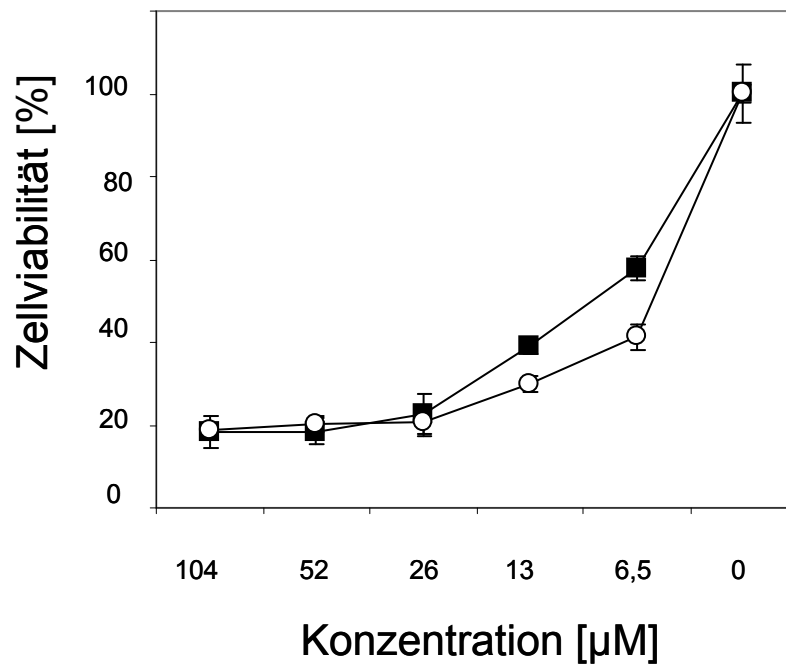


Abbildung 10) Vergleich der Titration von Dasatinib bei un behandelter SH-SY5Y-Zellen (WT) und mit Dasatinib-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen (BMSres)

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm^2 unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen aller 7 Tage mit Dasatinib behandelt (BMSres). Für den Zellproliferationstest wurden 5000 Zellen pro Well in eine 96-well-Platte überführt und 24 h inkubiert. Je 50 μl Dasatinib wurden nach einer Verdünnungsreihe in absteigenden Konzentrationen (104 μM , 52 μM , 26 μM , 13 μM , 6,5 μM und 0 μM) dazugegeben. Nach 48 h Inkubation wurde der Zellproliferationstest wie unter 2.5. beschrieben durchgeführt.

Die Vierecke entsprechen der Behandlung von un behandelten SH-SY5Y-Zellen mit Dasatinib, die Kreise der Behandlung mit Dasatinib von BMSres SH-SY5Y-Zellen. Das Bild repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt 20 Einzelmessungen.

3.1.5. Vergleich der Wirksamkeit von Imatinib-Mesylat und Dasatinib gegenüber Dasatinib-resistenten SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden wie unter 3.1.4. beschrieben behandelt. Es wurde untersucht, ob Dasatinib-vorbehandelten Zellen (BMSres) trotzdem auf eine Imatinib-Mesylat-Behandlung ansprechen.

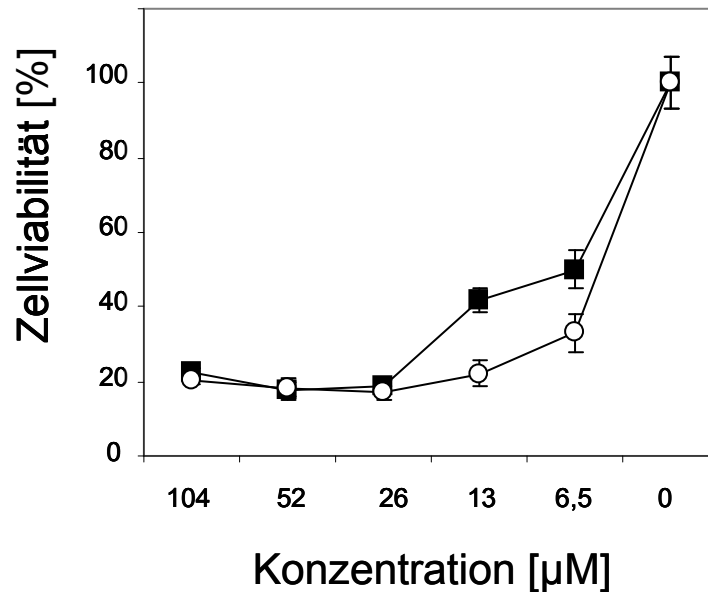


Abbildung 11) Vergleich der Titration von Imatinib-Mesylat bzw. Dasatinib bei Dasatinib-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen aller 7 Tage mit Dasatinib behandelt (BMSres). Für den Zellproliferationstest wurden 5000 Zellen pro Well in eine 96-well-Platte überführt und 24 h inkubiert. Je 50 µl Imatinib bzw. Dasatinib wurden nach einer Verdünnungsreihe in absteigenden Konzentrationen (104 µM, 52 µM, 26 µM, 13 µM, 6,5 µM und 0 µM) dazugegeben. Nach 48 h Inkubation wurde der Zellproliferationstest wie unter 2.5. beschrieben durchgeführt.

Die Vierecke entsprechen der Behandlung von BMSres-Zellen mit Imatinib-Mesylat, die Kreise der Behandlung von BMSres-Zellen mit Dasatinib.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, konnte ein synergistischer Effekt einer Imatinib-Mesylat-Behandlung bei Dasatinib-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen (BMSres) nicht nachgewiesen werden. So betrug z.B. bei einer Konzentration von 13 µl die

Zellviabilität bei Imatinib-Mesylat-behandelten BMSres-Zellen 41,8 %, während bei einer Dasatinib-Titration derselben Dasatinib-vorbehandelten Zellen die Zellviabilität auf 22,2 % gesunken war (siehe Abbildung 11).

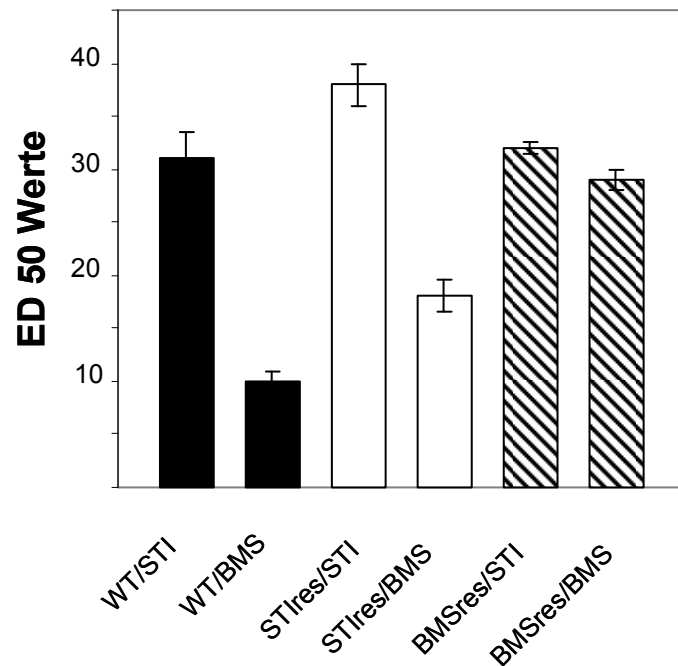


Abbildung 12) ED50 Werte der Titration von Imatinib-Mesylat (STI) bzw. Dasatinib (BMS) bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (WT) und bei Imatinib-Mesylat- bzw. Dasatinib-behandelten SH-SY5Y-Zellen

Die Berechnung der ED50 Werte erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Die Effektivität der Kinaseinhibitoren nahm in der Reihenfolge: WT/Dasatinib (ED50=10), STires/Dasatinib (ED50=18), BMSres/Dasatinib (ED50=29), WT/Imatinib-Mesylat (ED50=31), BMSres/Imatinib-Mesylat (ED50=32) und STires/Imatinib-Mesylat (ED50=38) ab.

Mittels zweiseitigen t-Test wurde ein signifikanter Unterschied ($P < 0,01$) zwischen der Behandlung von WT mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib festgestellt, sowie zwischen der Behandlung von Imatinib-Mesylat bei WT und STires. Aufgrund der stark schwankenden Daten bei STires Zellen und BMSres Zellen, die mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib behandelt wurden, ergab sich hierbei im Vergleich kein signifikanter Unterschied.

Zusammengefasst war eine Dasatinib-Behandlung auch bei Dasatinib-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen effektiver als eine Imatinib-Mesylat-Behandlung. Dennoch bestand eine vergleichbare Resistenzentwicklung wie bei einer Imatinib-Mesylat-Vorbehandlung.

Abschließend wurden die bisherigen Versuchsergebnisse mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen noch einmal gemeinsam in einem Versuch ($n = 3$) überprüft. Mittels einer ED50-Analyse (siehe Abbildung 12) ließen sich folgende Aussagen treffen: Eine Dasatinib-Behandlung war bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen wesentlich effektiver ($ED_{50} = 10 \mu\text{M}$) als eine Imatinib-Mesylat-Behandlung ($ED_{50} = 31 \mu\text{M}$). Sowohl bei Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen, als auch bei Dasatinib-vorbehandelten Zellen bestand eine Resistenzentwicklung: Bei einer Weiterbehandlung mit demselben Kinaseinhibitor wie bei der Vorbehandlung betrug der ED_{50} -Wert bei Imatinib-Mesylat $38 \mu\text{M}$, bei Dasatinib $29 \mu\text{M}$. Jedoch sprachen Imatinib-Mesylat-resistente Zellen immer noch auf eine Dasatinib-Behandlung an ($ED_{50} = 18$). Eine Behandlung mit Imatinib-Mesylat bei Dasatinib-resistenten Zellen zeigte dagegen keinen stark hemmenden Effekt ($ED_{50} = 32 \mu\text{M}$).

3.2. Differentiell exprimierte Gene von SH-SY5Y-Zellen unter dem Einfluß von Imatinib-Mesylat und Dasatinib

Der genaue Wirkmechanismus von Kinaseinhibitoren in Neuroblastomzellen ist bis heute noch nicht geklärt. Eine mögliche Annäherung an die Erklärung für die Funktionsweise von Imatinib-Mesylat und Dasatinib liegt in der Betrachtung molekularbiologischer Veränderungen nach einer Zellbehandlung mit Kinaseinhibitoren.

Durch die Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib wurden unterschiedliche Gene differentiell exprimiert. Gemeinsam war jedoch beiden Kinaseinhibitor-Behandlungen, dass es sich oft um Gene handelte, die durch Interferon induziert werden können (z.B. OAS2, IFIH1) und eine Rolle in Zellproliferation, Zellzyklus, Apoptose oder neuronaler Differenzierung spielen. Im Folgenden soll die unterschiedliche Genexprimierung anhand von Microarray-Analyse, PCR und RT-RT-PCR dargestellt werden.

3.2.1. Microarray-Analyse: differentiell exprimierte Gene von SH-SY5Y-Zellen nach Imatinib-Mesylat- und Dasatinib-Inkubation

SH-SY5Y-Zellen wurden in Anwesenheit von Medium, Imatinib-Mesylat und Dasatinib inkubiert und anschließend einer Microarray-Analyse unterworfen (siehe 2.3., 2.4. und 2.11.). Dargestellt sind Signalintensitäten der Sondensätze mit höchsten Unterschieden zwischen Medium- und Imatinib-Mesylat- bzw. Dasatinib-behandelten Zellen. Die Auswahl der in dieser Arbeit näher untersuchten Gene aus insgesamt ca. 54600 differentiell exprimierten Genen erfolgte nach ihrem möglichen Zusammenhang mit Tumorgenese und neurogener Differenzierung.

Nach einer Imatinib-Mesylat-Inkubation von SH-SY5Y-Zellen waren die Gene IFIH1, PML, BCL2 und OAS2 (Abk.) erhöht exprimiert (Abbildung 13), während CTGF erniedrigt exprimiert wurde (Abbildung 15).

Nach einer Dasatinib-Inkubation von SH-SY5Y-Zellen waren die Gene CDKN1A und TGFB2 überexprimiert (Abbildung 14), während MYCT1 niedriger exprimiert war (Abbildung 16).

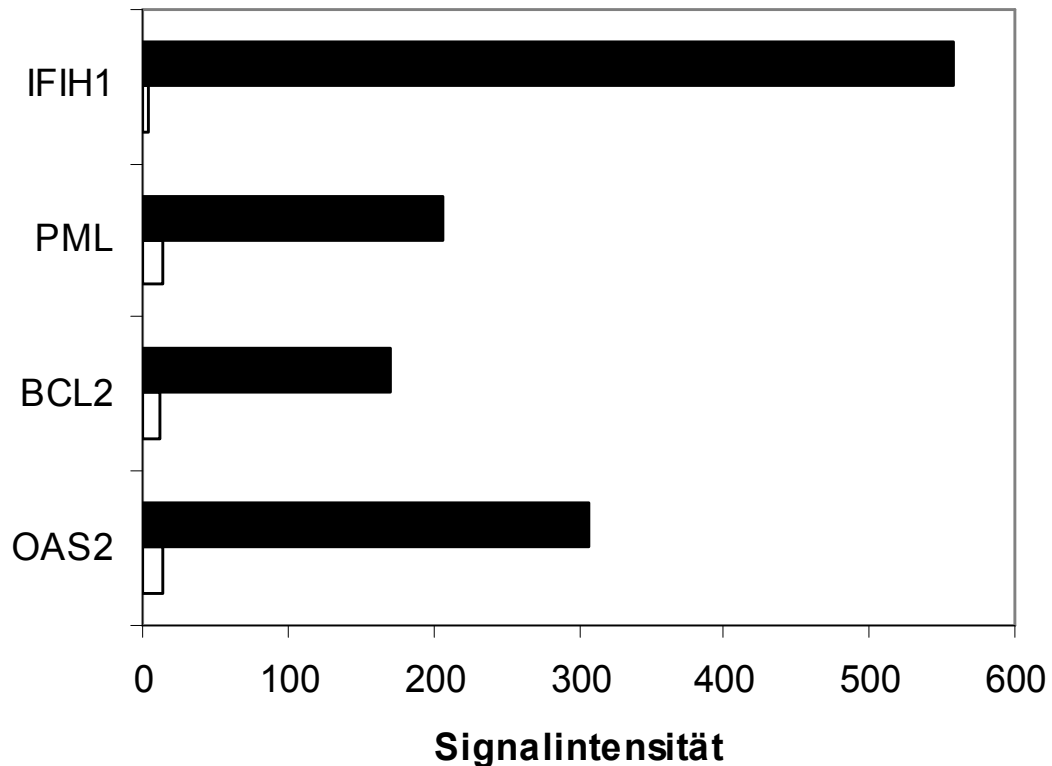


Abbildung 13) Microarray-Analyse: Genexpression von IFIH1, PML, BCL2 und OAS2 in SH-SY5Y-Zellen nach einer Inkubation mit Imatinib-Mesylat im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die Microarray-Analyse erfolgte wie unter 2.11. beschrieben. Dargestellt sind Signalintensitäten von Sondensätzen mit hohen Unterschieden zwischen Medium- und Imatinib-Mesylat behandelten Zellen. Die Auswahl der Gene erfolgte nach ihrem möglichen Zusammenhang mit Tumorgenese und neurogener Differenzierung. Die schwarzen Balken entsprechen den Imatinib-Mesylat-behandelten SH-SY5Y-Zellen, die weißen Balken den unbehandelten Zellen.

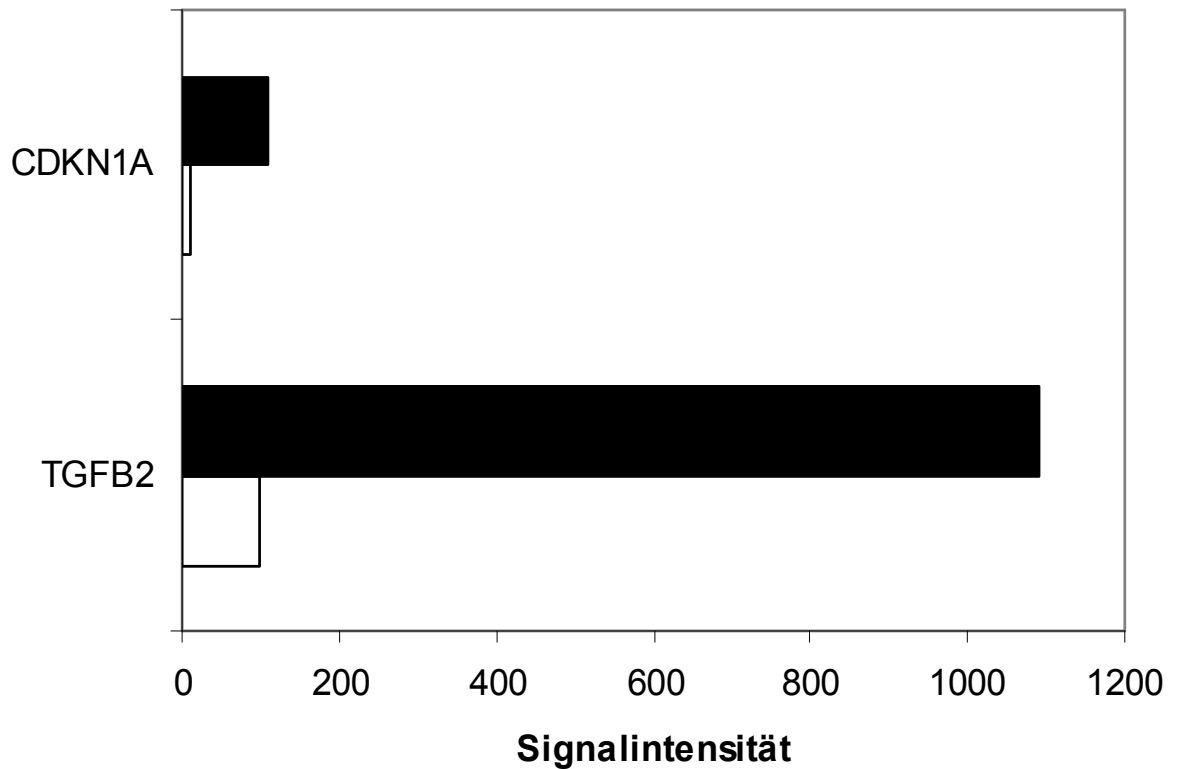


Abbildung 14) Microarray-Analyse: Genexpression von CKN1A und TGFB2 in SH-SY5Y-Zellen nach einer Inkubation mit Dasatinib im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Dasatinib behandelt. Die Microarray-Analyse erfolgte wie unter 2.11. beschrieben. Dargestellt sind Signalintensitäten von Sondensätzen mit hohen Unterschieden zwischen Medium- und Dasatinib-behandelten Zellen. Die Auswahl der Gene erfolgte nach ihrem möglichen Zusammenhang mit Tumorgenese und neurogener Differenzierung. Die schwarzen Balken entsprechen den Dasatinib-behandelten-SH-SY5Y Zellen, die weißen Balken den unbehandelten Zelle.

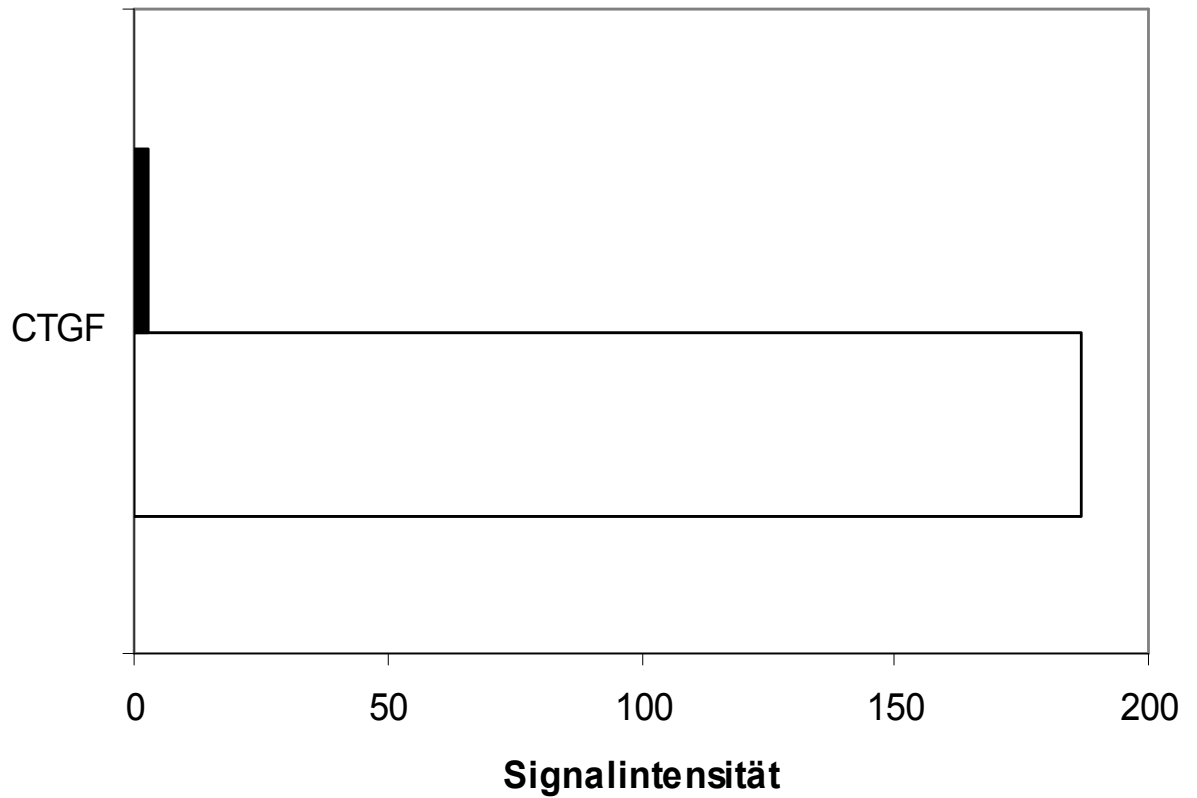


Abbildung 15) Microarray-Analyse: Genexpression von CTGF bei SH-SY5Y-Zellen nach einer Inkubation mit Imatinib-Mesylat im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die Microarray-Analyse erfolgte wie unter 2.11. beschrieben. Dargestellt sind Signalintensitäten von SONDENSÄTZEN für CTGF. Der schwarze Balken entspricht den Imatinib-behandelten-SH-SY5Y Zellen, der weiße Balken den unbehandelten Zellen.

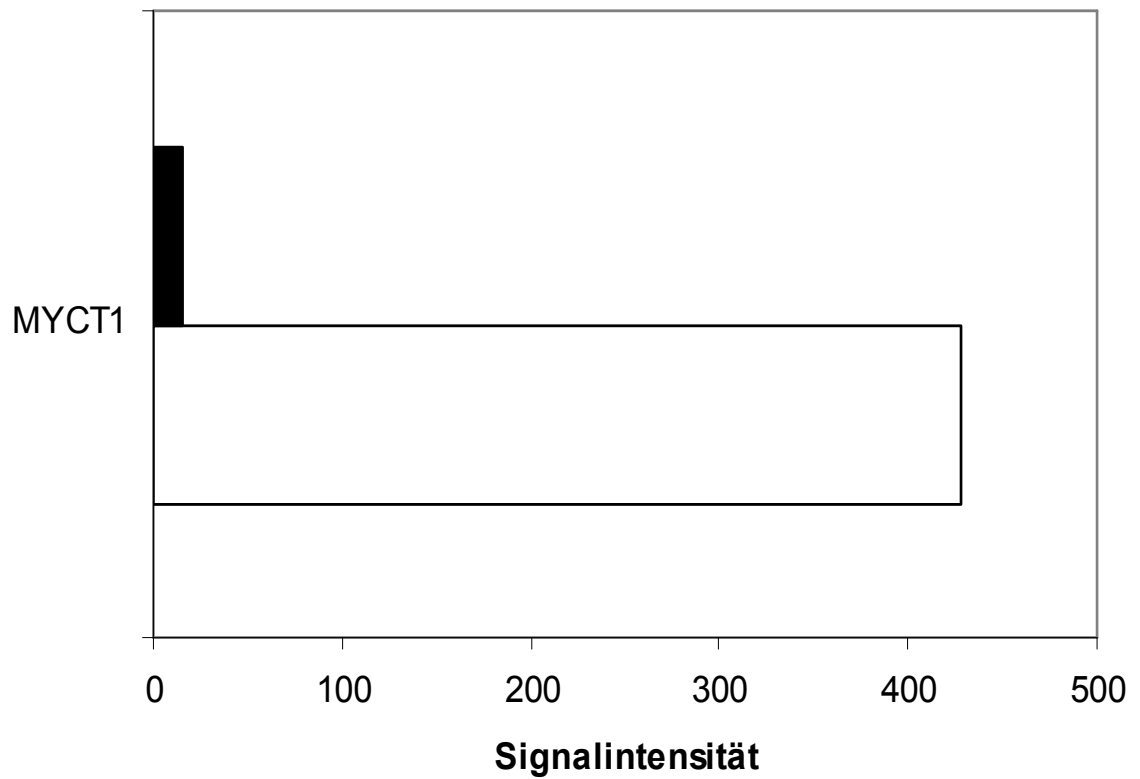


Abbildung 16) Microarray-Analyse: Genexpression von MYCT1 in SH-SY5Y-Zellen nach einer Inkubation mit Dasatinib im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen aller 7 Tage mit je 12,5 µM Dasatinib behandelt. Die Microarray-Analyse erfolgte wie unter 2.11. beschrieben. Dargestellt sind Signalintensitäten von Sondensätzen mit hohen Unterschieden zwischen Medium- und Dasatinib-behandelten Zellen. Die Auswahl der Gene erfolgte nach ihrem möglichen Zusammenhang mit Tumorgenese und neurogener Differenzierung. Der schwarze Balken entspricht den Dasatinib behandelten SH-SY5Y-Zellen, der weiße Balken den unbehandelten Zellen.

3.2.2. RT-PCR-Analyse: Veränderung der Genexpression bei SH-SY5Y-Zellen durch Imatinib-Mesylat- und Dasatinib-Inkubation

3.2.2.1. Veränderung der Genexpression bei Langzeitinkubation mit Imatinib-Mesylat

SH-SY5Y-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen in regelmäßigen Abständen dreimal mit 25 µl Imatinib-Mesylat behandelt (siehe 2.4.). Die RT-PCR wurde wie unter 2.7. beschrieben durchgeführt. Die gewonnene cDNA dieser „resistenten“ Zellen wurde mit cDNA unbehandelter (Medium) SH-SY5Y-Zellen zum Vergleich analysiert. Die zu untersuchenden Gene wurden durch die Ergebnisse der Microarray-Analyse (Affymetrix HG-U133A) (siehe 2.11. und 3.2.1.) bestimmt. Die Expression einzelner Gene, von denen bekannt ist, dass sie Prognose und Tumorgenese bei Neuroblastomen beeinflussen (c-kit, c-myc, N-myc), bei neurogener Differenzierung (ASCL1) oder bei Differenzierungstherapie mit Retinsäure (P450RAI-2) eine Rolle spielen, wurde ebenfalls mittels RT-PCR untersucht.

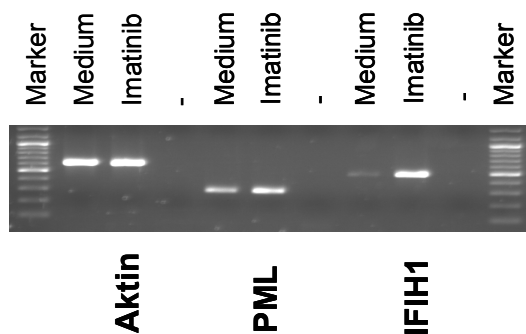


Abbildung 17) RT-PCR: Expresssion der Gene PML und IFIH1 in SH-SY5Y-Zellen nach einer Inkubation mit Imatinib-Mesylat im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die mittels Microarray-Analyse gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11. und 3.2.1.) nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat wurden mittels RT-PCR (siehe 2.9.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y-Zellen (Medium) mit Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen parallel analysiert.

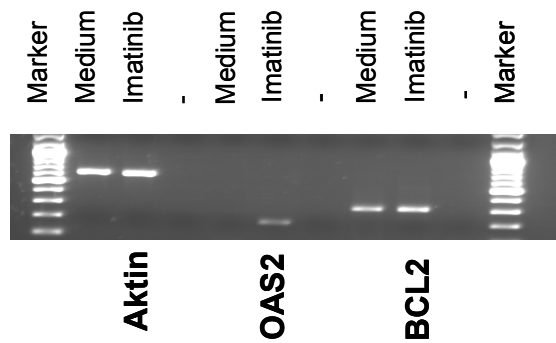


Abbildung 18) RT-PCR: Expression der Gene OAS2 und BCL2 in SH-SY5Y Zellen nach einer Inkubation mit Imatinib-Mesylat im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die mittels Microarray-Analyse gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11.und 3.2.1.) nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat wurden mittels RT-PCR (siehe 2.9.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y-Zellen (Medium) und Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen parallel analysiert.

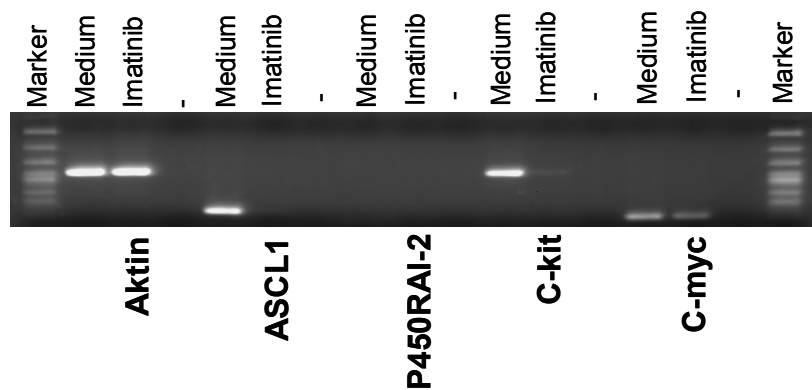


Abbildung 19) RT-PCR: Expression der Gene ASCL1, P450RAI-2, c-kit und c-myc in SH-SY5Y- Zellen nach einer Inkubation mit Imatinib im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen.

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die Expression einzelner Gene, von denen bekannt ist, dass sie Prognose und Tumorgenese bei Neuroblastomen beeinflussen (c-kit, c-myc), bei

neurogener Differentierung (ASCL1) eine Rolle spielen oder durch Retinsäure induziert werden (P450RAI-2), wurde mittels RT-PCR untersucht (siehe 2.9.). Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y-Zellen (Medium) und Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen parallel analysiert.

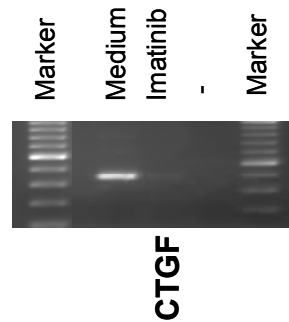


Abbildung 20) RT-PCR: Expression von CTGF in SH-SY5Y Zellen nach einer Inkubation mit Imatinib-Mesylat im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y Zellen. SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die im Microarray gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11.und 3.2.1.) nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat wurden mittels RT-PCR (siehe 2.9.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y-Zellen (Medium) und Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen parallel analysiert.

Bei den Genen PML, IFIH1 (Abbildung 17) und OAS2 (Abbildung 18) kam es durch die Behandlung mit Imatinib-Mesylat zu einer erhöhten Expression in den Tumorzellen. Andererseits wurden die Gene ASCL1, c-kit (CD117), c-myc (Abbildung 19) und CTGF infolge der Imatinib-Mesylat-Inkubation erniedrigt exprimiert (Abbildung 20). Bei BCL2 kam es zu keiner relevanten Veränderung der Genexpression (Abbildung 18). P450RAI-2 wurde weder bei unbehandelten Neuroblastomzellen noch bei Imatinib-Mesylat-Inkubation exprimiert (Abbildung 19).

3.2.2.2. Veränderung der Genexpression bei Langzeitinkubation mit Dasatinib

SH-SY5Y-Zellen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen alle 7 Tage mit 12,5 µM Dasatinib behandelt (siehe 2.4.). Die RT-PCR wurde wie bereits unter 2.9. beschrieben durchgeführt. Die cDNA der Dasatinib-resistenten Zellen wurde mit cDNA unbehandelter (Medium) SH-SY5Y-Zellen zum Vergleich analysiert. Die entsprechenden, zu untersuchenden Gene wurden ebenfalls durch die Ergebnisse der Microarray-Analyse (Affymetrix HG-U133A) (siehe 2.11. und 3.2.1.) bestimmt

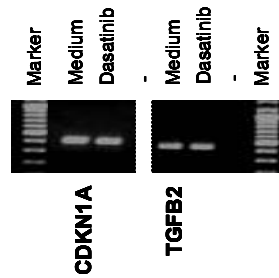


Abbildung 21) RT-PCR: Expresssion der Gene CDKN1A und TGFB2 in SH-SY5Y Zellen nach einer Inkubation mit Dasatinib im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y- Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Dasatinib behandelt. Die im Microarray gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11. und 3.2.1.) nach Inkubation mit Dasatinib wurden mittels PCR (siehe 2.9.) analysiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y-Zellen (Medium) mit Dasatinib-vorbehandelten Zellen parallel analysiert.

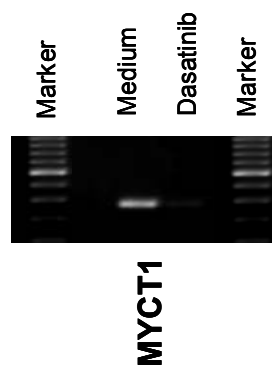


Abbildung 22) RT-PCR: Expresssion des Gens MYCT1 in SH-SY5Y-Zellen nach einer Inkubation mit Dasatinib im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Dasatinib behandelt. Die im Microarray gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11. und 3.2.1.) nach Inkubation mit Dasatinib wurden mittels PCR (siehe 2.9.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y-Zellen (Medium) mit Dasatinib-vorbehandelten Zellen parallel analysiert.

CDKN1A und TGFB2 wiesen keinen Unterschied in der Expression nach einer Dasatinib-Behandlung auf (Abbildung 21). Eine erniedrigte Genexpression fand sich nach einer Dasatinib-Behandlung bei MYCT1 (Abbildung 22).

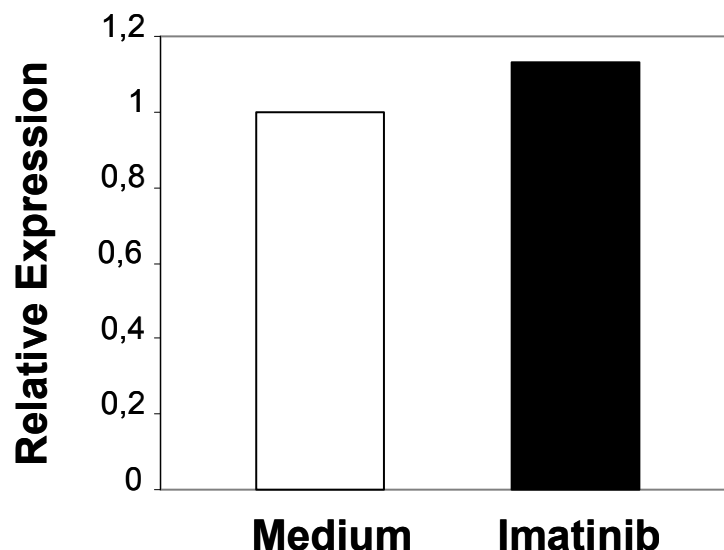
3.2.3. Quantitative RT-RT-PCR der differentiell exprimierten Gene

Da die konventionelle RT-PCR zur Quantifizierung nur bedingt einsatzfähig ist, wurde zusätzlich die RT-RT-PCR angewendet.

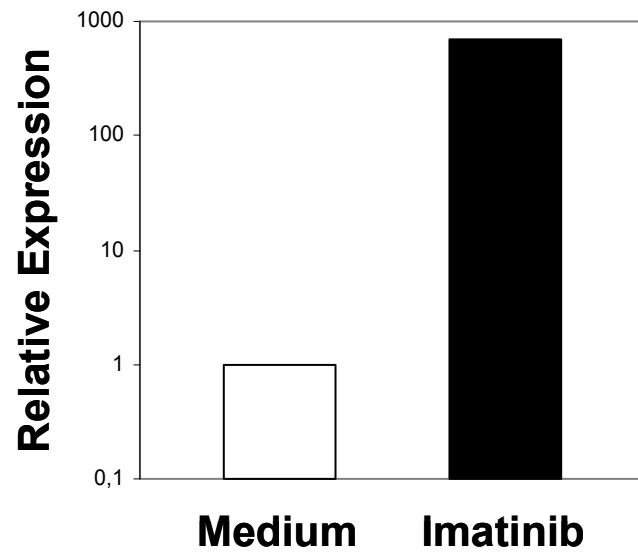
Um die Ergebnisse (siehe 3.2.2.) der Genexpressionsveränderungen durch die Inkubation mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib zu überprüfen, wurde eine quantitative Real-Time-RT-PCR durchgeführt. Die Berechnung der relativen Expression dieser Gene nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat bzw. Dasatinib im Vergleich zur Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit Medium (WT) erfolgte nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen, 2001).

Dabei bestätigte sich die erhöhte Expression bei einer Imatinib-Mesylat-Inkubation besonders von OAS2 sowie von IFIH1, BCL2 und PML (Abbildung 23 A-D). CTGF war nach Imatinib-Mesylat-Behandlung wie in der konventionellen PCR ebenfalls herunterreguliert (Abbildung 24).

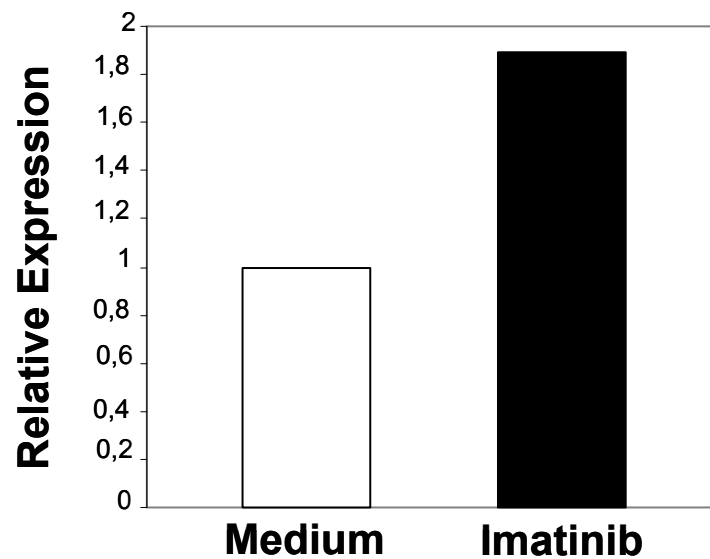
TGFB2 und CDKN1A (Abbildung 25) wurden nach Dasatinib-Inkubation im Gegensatz zu der konventionellen PCR überexprimiert. Auch die herabgesetzte Expression von MYCT1 bei Dasatinib-resistenten SH-SY5Y bestätigte sich. (Abbildung 26)



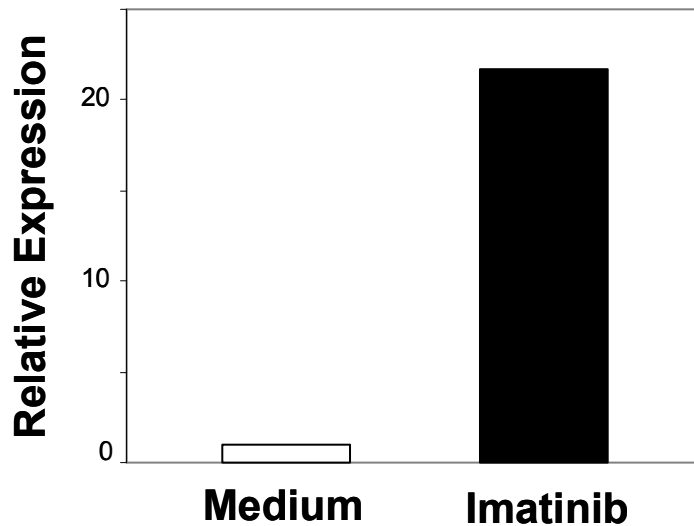
A) Relative Expression von BCL2 bei Imatinib-Mesylate-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium)



B) Relative Expression von OAS2 bei Imatinib-Mesylat-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium)



C) Relative Expression von PML bei Imatinib-Mesylat vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium)



D) Relative Expression von IFIH1 bei Imatinib-Mesylat-vorbehandelten SH-SY5Y Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium)

Abbildung 23 A-D) Real-Time-RT-PCR: Genexpression von OAS2, BCL2, PML und IFIH1 nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen.

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die im Microarray gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11. und 3.2.1.) nach Inkubation mit Imatinib wurden mittels PCR (siehe 2.9. und 3.2.2.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y- Zellen (Medium) mit Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen parallel analysiert. Um die relative Expression zu errechnen, wurden die Werte der unbehandelten Zellen (Medium) gleich eins gesetzt.

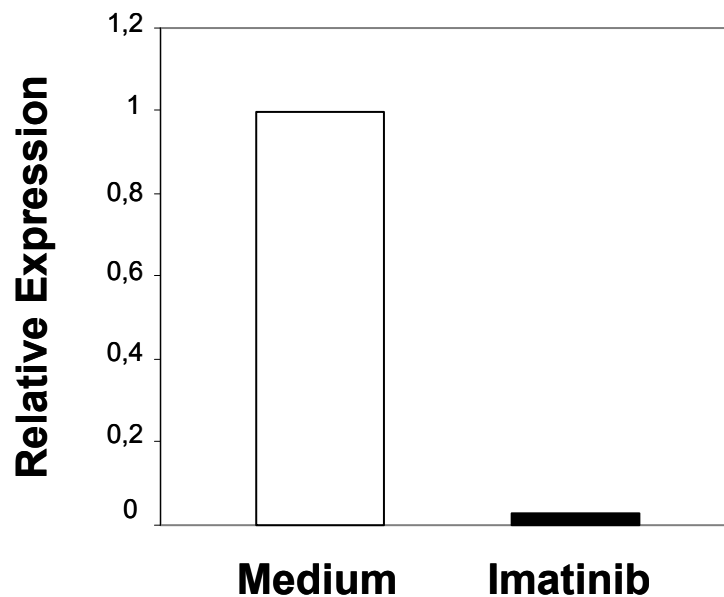
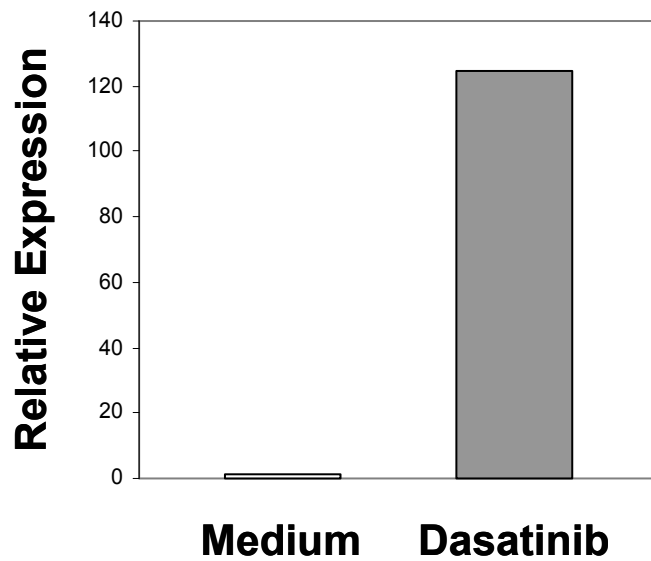
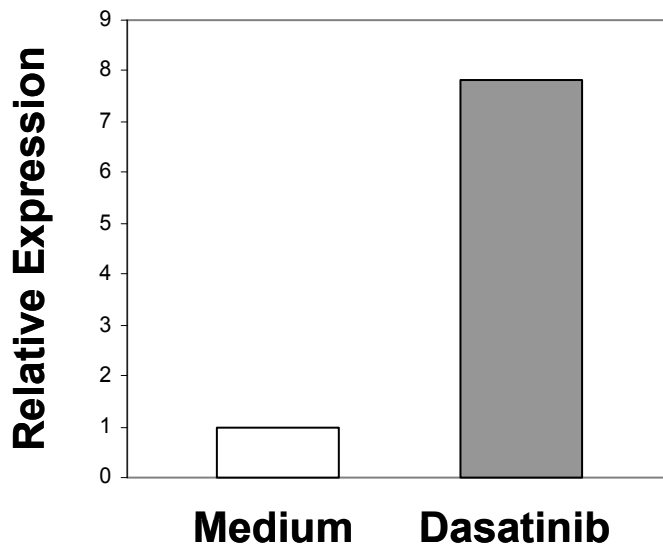


Abbildung 24) Real-Time-RT-PCR: Genexpression von CTGF nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (Medium).

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Imatinib-Mesylat behandelt. Die im Microarray gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11. und 3.2.1.) nach Inkubation mit Imatinib wurden mittels PCR (siehe 2.9. und 3.2.2.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y- Zellen (Medium) mit Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen parallel analysiert. Um die relative Expression zu errechnen, wurden die Werte der unbehandelten Zellen (Medium) gleich eins gesetzt.



A) Relative Expression von TGFB2 bei Dasatinib-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium)



B) Relative Expression von CDKN1A bei Dasatinib-vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium)

Abbildung 25 A-B) Real-Time-RT-PCR: Genexpression von TGFB2 und CDKN1A nach Inkubation mit Dasatinib im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y- Zellen.

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Dasatinib behandelt. Die im Microarray gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11. und 3.2.1.) nach Inkubation mit Dasatinib wurden mittels PCR (siehe 2.9. und 3.2.2.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y- Zellen (Medium) mit Dasatinib-vorbehandelten Zellen parallel analysiert. Um die relative Expression zu errechnen, wurden die Werte der unbehandelten Zellen (Medium) gleich eins gesetzt.

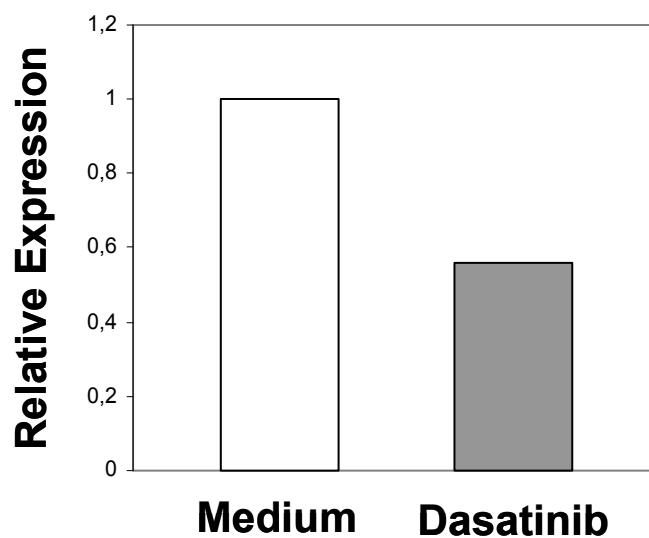


Abbildung 26) Real-Time-RT-PCR: Genexpression von MYCT1 nach Inkubation mit Dasatinib im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen.

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 12,5 µM Dasatinib behandelt. Die im Microarray gefundenen differentiell exprimierten Gene (siehe 2.11. und 3.2.1.) nach Inkubation mit Dasatinib wurden mittels PCR (siehe 2.9. und 3.2.2.) validiert. Dabei wurden unbehandelte SH-SY5Y- Zellen (Medium) mit Dasatinib-vorbehandelten Zellen parallel analysiert. Um die relative Expression zu errechnen, wurden die Werte der unbehandelten Zellen (Medium) gleich eins gesetzt.

3.2.4.Zusammenfassung Microarray, RT-PCR und RT-RT-PCR

In der folgenden Tabelle werden die einzelnen Werte der analysierten Gene bei Inkubation mit Imatinib-Mesylat und Dasatinib bei Microarray, Real-Time-RT-PCR und konventioneller RT-PCR noch einmal gegenüber gestellt:

Die RT-RT-PCR hat die Ergebnisse der RT-PCR bestätigen können (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6) Auswertung Microarray, Real-Time-PCR und PCR

Gen	Microarray Imatinib/WT	RT-RT-PCR FC Imatinib	RT-PCR Imatinib
OAS2	20,53	689,78	++
BCL2	14,65	1,13	+/-
PML	13,37	1,89	+
IFIH1	150,81	21,7	++
CTGF	0,015	0,027	--
Gen	Microarray Dasatinib/WT	RT-RT-PCR FC Dasatinib	RT-PCR Dasatinib
TGFB2	10,91	124,29	+/-
CDKN1A	11,47	7,84	+/-
MYCT1	0,035	0,56	--

Erklärung der Symbole bei der RT-PCR in Bezug auf die Genexpression: stark erhöht (++), erhöht (+), keine Veränderung (+/-), erniedrigt (--), FC (Fold change).

3.3. Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat

SH-SY5Y-Zellen wurden in einem Zeitraum von vier Wochen zweimal mit 12,5 μ M Imatinib-Mesylat inkubiert (siehe 2.4.) und anschließend gemeinsam mit unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (Medium) mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.7.).

3.3.1. CD184 (CXCR4)

Es bestand eine direkte Abhängigkeit der steigenden Imatinib-Mesylat-Konzentration und der sinkenden CD184-Expression der behandelten SH-SY5Y-Zellen. (Abbildung 27) So betrug der Medianwert der gemessenen CD184-positiven Tumorzellen in Medium 33,08, bei einer Inkubation von 0,0125 mM Imatinib-Mesylat nur noch 31,62 und bei einer Inkubation mit 0,025 mM Imatinib-Mesylat 25,48. Wie in Abbildung 28 ersichtlich, sank im Vergleich zu den unbehandelten Zellen durch die Imatinib-Mesylat-Inkubation die CD184 Expression, d.h. es waren mehr CD184 negative Tumorzellen vorhanden.

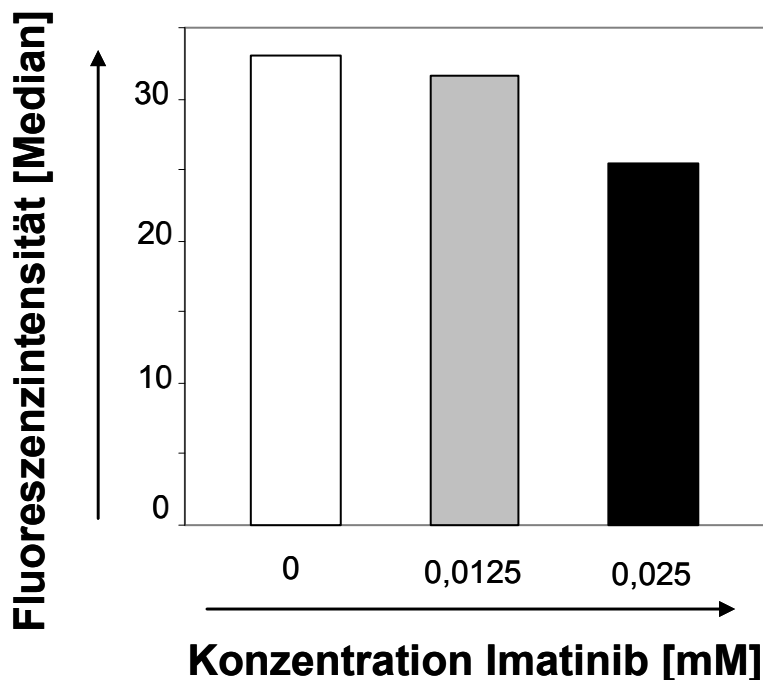


Abbildung 27) CD184 Expression in Abhängigkeit von der Imatinib-Mesylat-Inkubation bei SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Für zwei Wochen wurden die Zellen alle 7 Tage mit je 25 µl Imatinib-Mesylat (0,0125 mM, grauer Balken) bzw. 50 µl Imatinib-Mesylat (0,025 mM, schwarzer Balken) behandelt. Anschließend wurde eine Durchflusszytometrie für die Expression des Oberflächenantigens CD184 zusammen mit unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (0 mM, weißer Balken) durchgeführt (siehe 2.7.).

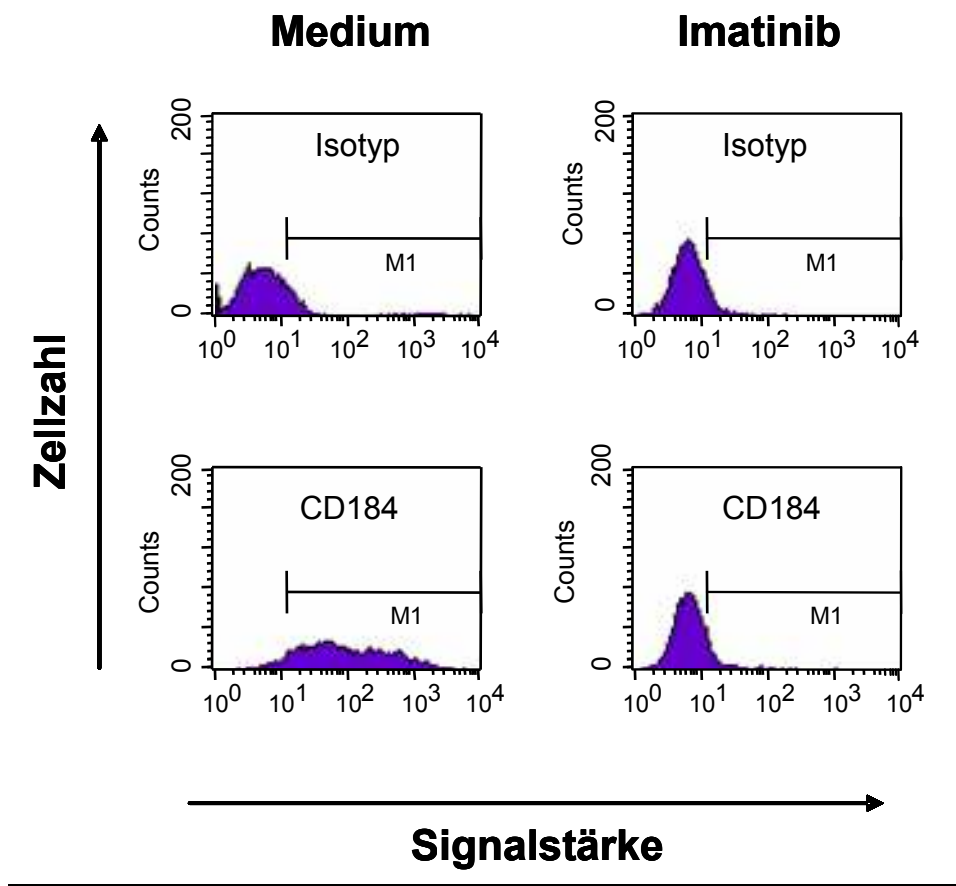


Abbildung 28) Expression von CD184 bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Die Inkubation der Zellen mit 12,5 µM Imatinib-Mesylat erfolgte alle 7 Tage für vier Wochen. Anschließend wurde eine Durchflusszytometrie für die Darstellung der Expression des Oberflächenantigens CD184 zusammen mit unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (Medium) durchgeführt (siehe 2.7.).

3.3.2. CD54 (ICAM1)

Unbehandelte SH-SY5Y-Zellen waren schwach CD54-positiv. Durch eine Imatinib-Inkubation wurde die CD54-Expression noch deutlich erhöht (Abbildung 29).

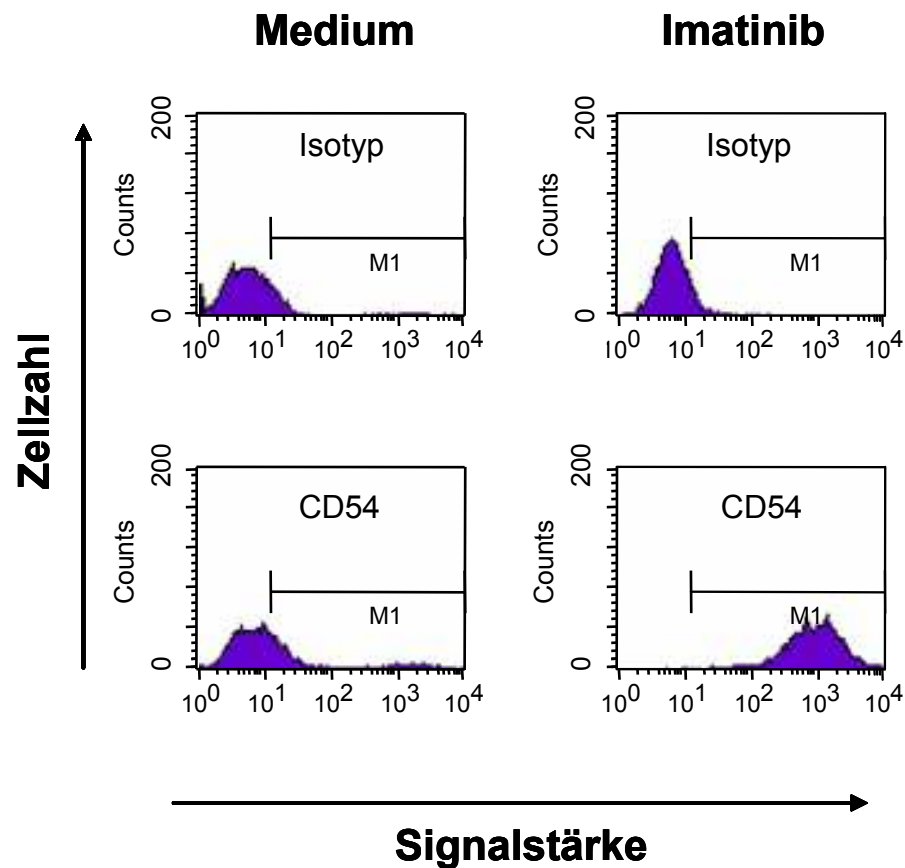


Abbildung 29) Expression von CD54 bei unbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Die Inkubation der Zellen mit 12,5 µM Imatinib erfolgte alle 7 Tage für vier Wochen. Anschließend wurde eine Durchflusszytometrie für die Darstellung der Expression des Oberflächenantigens CD54 zusammen mit unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (Medium) durchgeführt (siehe 2.7.).

3.3.3. CD137

Bei Imatinib-Mesylat-inkubierten Zellen fand sich eine Überexpression von CD137 im Vergleich zu den Wildtypzellen (Abbildung 30).

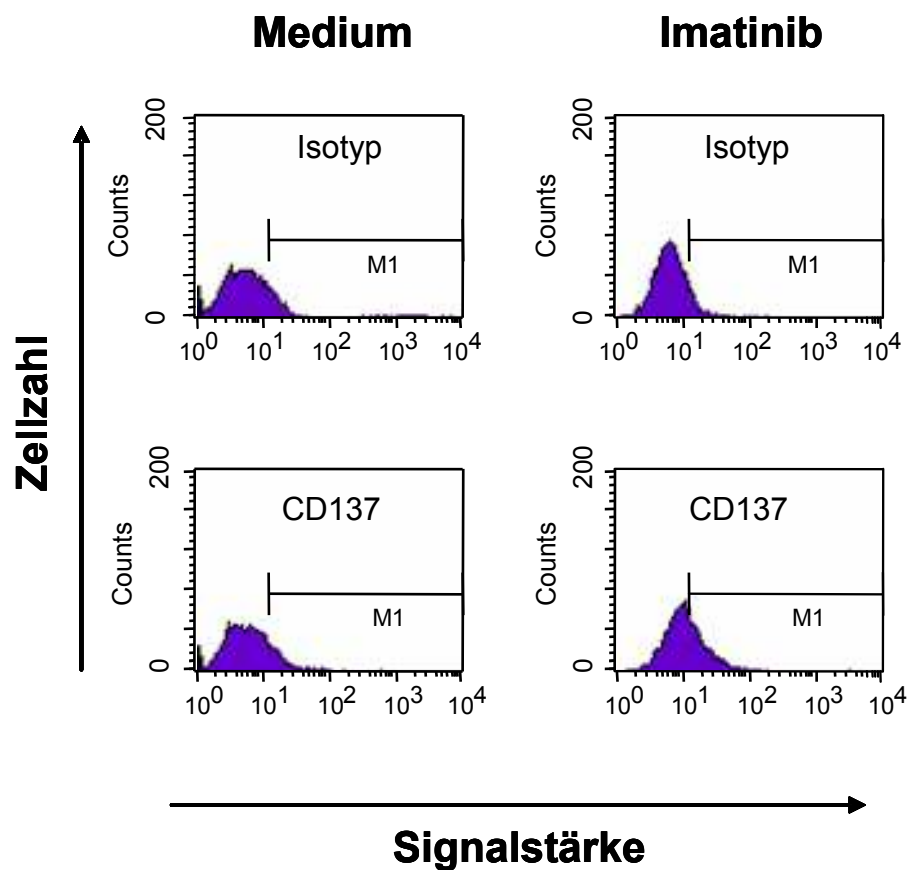


Abbildung 30) Expression von CD137 auf unbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Die Inkubation der Zellen mit 12,5 µM Imatinib-Mesylat erfolgte alle 7 Tage für vier Wochen. Anschließend wurde eine Durchflusszytometrie für die Darstellung der Expression des Oberflächenantigens CD137 zusammen mit unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (Medium) durchgeführt (siehe 2.7.).

3.3.4. HLA-A,B,C

HLA-A,B,C wurde nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat erhöht exprimiert (Abbildung 31).

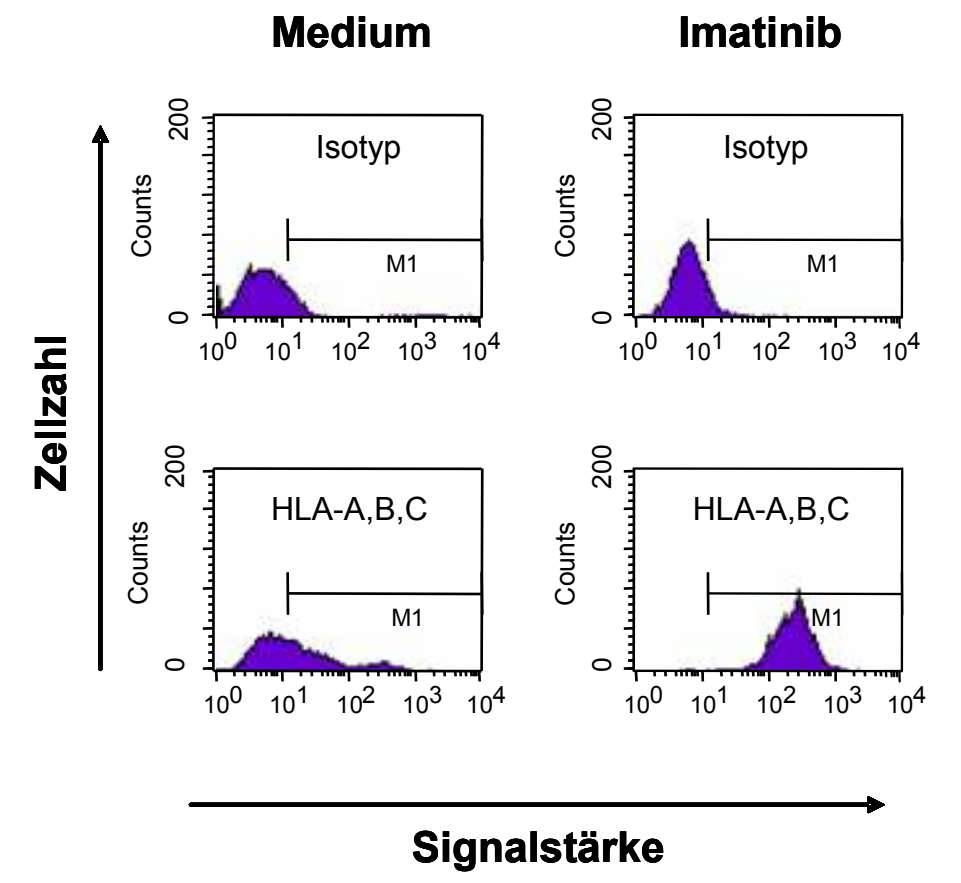


Abbildung 31) Expression von HLA-A,B,C auf unbehandelten SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu Imatinib-Mesylat-vorbehandelten Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen kultiviert. Die Inkubation der Zellen mit 12,5 μ M Imatinib-Mesylat erfolgte alle 7 Tage für vier Wochen. Anschließend wurde eine Durchflusszytometrie für die Darstellung der Expression von HLA-A,B,C zusammen mit unbehandelten SH-SY5Y-Zellen (Medium) durchgeführt (siehe 2.7.).

Durch die Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit 12,5 μM Imatinib-Mesylat für 4 Wochen kam es zu Änderungen der Oberflächenantigenexpression: CD184 wurde erniedrigt exprimiert, CD54, CD137 und HLA-A,B,C wurden erhöht exprimiert.

4. Diskussion

4.1. Mögliche Therapieoptionen mit Imatinib-Mesylat (Glivec) oder Dasatinib (Sprycel) bei Neuroblastomen

Die Therapie von Neuroblastomen stellt aufgrund der besonderen Heterogenität des Tumors trotz bedeutender Fortschritte in der Diagnostik, bei operativen Resektionsmethoden und Chemotherapie weiterhin eine Herausforderung dar. Viele Fragen der genetischen Prädisposition, der Tumorgenese, der Entwicklung von Resistenzen und der spontanen Redifferenzierung im Stadium 4S sind bis heute nicht geklärt.

Tyrosinkinaseinhibitoren stellen eine neue erfolgversprechende Therapieoption bei einigen Tumoren dar. Zulassung und Indikation ist vor allem die Chronische Myeloische Leukämie. Inwieweit die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib-Mesylat und Dasatinib auch bei der Behandlung von Neuroblastomen angewandt werden können, sollte in dieser Arbeit anhand von *in-vitro*-Studien mit SH-SY5Y-Zellen untersucht werden.

Wie die meisten Arzneimittel sind Glivec und Sprycel in ihrer Wirksamkeit speziell für Kinder noch unzureichend untersucht worden. Angewendete Dosierungen von Imatinib-Mesylat in der Pädiatrie basieren auf Erfahrungen, welche Dosen sicher und effektiv bei Erwachsenen sind.

Champagne et al. (2004) untersuchten in einer Studie die Behandlung mit Imatinib-Mesylat bei Kindern mit Philadelphia-Chromosom-positiver Leukämie. Die tägliche Dosis von 260 bis 570 mg/m^2 wurde von den Kindern gut toleriert. Dosierungen von 260-340 mg/m^2 lieferten ähnliche Ergebnisse wie die Dosierung von Erwachsenen von 400 bis 600 mg/m^2 .

In der Europäischen Arzneimittelagentur (engl. European Medicines Agency, Abk. EMA) wurde die klinisch relevante Plasmakonzentration von Dasatinib mit 100-500 ng/ml angegeben, das entspricht 0,2-1 μM .

In dieser Arbeit wurden jedoch Dasatinib-Konzentrationen von ca. 6,5 μM verwendet, bei der 50% der Viabilität der Neuroblastomzellen gehemmt war. Diese Konzentrationen sind durch orale Therapie im Serum sicherlich nur schwer zu erreichen bzw. sind dann schwerere Nebenwirkungen wie stark verlängerte

Blutungszeit zu erwarten. Es könnte allerdings vermutet werden, dass in Kombination mit anderen Chemotherapeutika geringere Dosierungen von Dasatinib ausreichende Effekte auf die Tumorpheriferation haben.

Bisher wurde versucht Imatinib-Mesylat (Glivec) bei der gezielten Therapie von soliden Tumoren im Kindesalter, die PDGFR oder c-kit exprimieren, einzusetzen. Palmberg et al. konnten in einer Langzeitbehandlung mit niedriger Dosierung (1-3 Wochen, 0,5-5 μM) eine Proliferationshemmung aller getesteten Neuroblastomzelllinien mit ED50-Werten $< 2,5 \mu\text{M}$ erreichen, während eine Kurzzeitbehandlung ($< 96\text{h}$) ineffektiv blieb. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl Imatinib-Mesylat als auch Dasatinib *in-vitro* das Zellwachstum von SH-SY5Y-Zellen bei einer Kurzzeitbehandlung hemmen. Imatinib-Mesylat bewirkte eine Proliferationshemmung von SH-SY5Y-Zellen mit ED50-Werten bei ca. $13 \mu\text{M}$ bei einmaliger Inkubation von 48h.

Dasatinib bewirkte nach den Ergebnissen dieser Arbeit eine Proliferationshemmung bei SH-SY5Y-Zellen mit ED50-Werten bei ca. $6,5 \mu\text{M}$ bei einmaliger Inkubation von 48h. Bei einer Langzeitbehandlung von Dasatinib über 2-4 Wochen mit Dosierungen von $12,5 \mu\text{M}$ entwickelten sich jedoch „Dasatinib-resistente“ Neuroblastomzellen.

Zu dem Ergebnis, dass Dasatinib auch bei Neuroblastomen und Ewing-Sarkomen einen antiproliferativen Effekt haben könnte, kam auch die Forschungsgruppe von F. Timeus (Turin, Italien). In Untersuchungen konnte eine antiproliferative Wirkung innerhalb 24 Stunden auf verschiedene Neuroblastomzelllinien nachgewiesen werden. Eine Induktion von Apoptose konnte allerdings nicht beobachtet werden. Durch einen Scratch-Test wurde zusätzlich eine mögliche Hemmung der Migration bzw. Metastasierung der Tumorzellen durch Dasatinib beschrieben, sodass ein Einsatz im Rahmen einer Kombinationstherapie bei metastasierten, fortgeschrittenen Tumoren in Betracht gezogen werden könnte (Timeus et al., 2008).

Dasatinib zeigte in dieser Arbeit bei *in-vitro*-Versuchen im Zellproliferationstest mit SH-SY5Y-Zellen bei gleichen Konzentrationen eine deutlich höhere Effektivität der Wachstumshemmung als Imatinib-Mesylat. So lag beispielsweise bei einer Konzentration von $6,5 \mu\text{M}$ bei Dasatinib nur noch eine Zellviabilität von 47,8 % vor, während sie bei Imatinib noch 85,4 % betrug.

SH-SY5Y-Zellen können durch längere Inkubation (2-4 Wochen) mit beiden Tyrosinkinaseinhibitoren in niedrigen Konzentrationen ($12,5 \mu\text{M}$) „resistent“ werden, d.h. sie sprechen weniger auf eine erneute Behandlung mit dem jeweiligen Tyrosinkinaseinhibitor an als nicht vorbehandelte Zellen. Zudem war die Wachstumsgeschwindigkeit von vorbehandelten „resistenten“ Zellen geringer als von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen. Während die Proliferation von Imatinib-Mesylat

vorbehandelten Neuroblastomzellen noch immer durch eine Dasatinib-Inkubation gehemmt werden konnte, zeigte sich bei Dasatinib-vorbehandelten Zellen und anschließender Imatinib-Inkubation keine Wachstumshemmung. Somit sind unterschiedliche Targets und Wirkmechanismen beider Tyrosinkinaseinhibitoren denkbar.

Mögliche Effekte von Tyrosinkinaseinhibitoren in Kombination mit Chemotherapeutika bei Neuroblastomen sind noch unbekannt. Wie sich herausstellte, wirkte eine niedrigdosierte Behandlung mit Imatinib-Mesylat synergistisch mit Doxorubicin und führte zu einer Verstärkung eines G2/M- und S-Phasearrestes sowie zur Auslösung von Apoptose (Palmberg et al., 2009). *In vivo* konnte durch die Kombinationsbehandlung eine Wachstumshemmung bei Neuroblastomxenotransplantaten beobachtet werden. Alle verwendeten Neuroblastomzelllinien exprimierten PDGFR, was einerseits die Zellen vor einer Doxorubicin-induzierten Apoptose bewahrte, andererseits die Sensitivität für Imatinib-Mesylat erhöhte. Somit könnte eine Kombination von Tyrosinkinaseinhibitoren mit Chemotherapeutika eine zukünftige mögliche Therapieoption bei Hochrisiko-Neuroblastomen darstellen (Palmberg et al., 2009).

4.2. Modulation der Genexpression durch Kinaseinhibitoren

Mittels PCR, RT-RT-PCR und FACS konnten nach einer jeweiligen Tyrosinkinaseinhibitor-Inkubation unterschiedlich exprimierte Gene und Oberflächenantigene gefunden werden. Oft handelte es sich dabei um Interferon-induzierte Gene. Die gefundenen Gene könnten teilweise in die Differenzierung, teilweise aber auch in die Resistenzentwicklung involviert sein.

OAS2 (2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase 2) zeigte sich sowohl in der DNA-Microarray-Analyse (Abbildung 12), der PCR (Abbildung 18) als auch in der RT-RT-PCR (Abbildung 23B) in der Genexpression nach Imatinib-Mesylat-Inkubation erhöht. OAS2 wird durch Interferon induziert und hemmt sowohl die Proteinsynthese, als auch die Virusreplikation. Es spielt eine Rolle bei der Kontrolle von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose (Hovnanian et al., 1998). Mit einer erhöhten Expression nach Imatinib-Mesylat-Inkubation könnten eine geringere Zellproliferation der Neuroblastomzellen und eine höher aktivierte Immunreaktion verbunden sein.

BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) wurde ebenfalls in der Microarray-Analyse (Abbildung 13) und der RT-RT-PCR (Abbildung 23A) überexprimiert. Es zählt zu den Protoonkogenen und ist ein Membranprotein in den Mitochondrien. Dem Gen wird die Funktion zugeschrieben, die Apoptose bei lymphatischen und neuronalen Zellen zu

hemmen und eine negative Regulationsauswirkung auf Zellproliferation und Zellzyklus zu haben (Hockenbery et al., 1990). BCL2 scheint mit c-myc zu kooperieren, indem es die Proliferation von B-Zell-Vorläufern fördert, von denen einige maligne entarten. (Vaux et al., 1998). Die erhöhte Expression dieses anti-apoptotischen Faktors in Zellen, welche die Kinaseinhibitor-Inkubation überlebten, könnte die Resistenzentwicklung dieser Zellen erklären.

Das Protein, das von dem Gen PML (Promyelocytic leukemia) kodiert wird, gehört zu den Tumorsuppressorgenen und reguliert u.a. die p53 Antwort bei Tumorsignalen, da es für die Acetylierung von p53 benötigt wird und den Alterungsprozess von Zellen induziert (Pearson et al., 2000). Es wurde ebenfalls in Mikroarray-Daten (Abbildung 13), PCR (Abbildung 17) und RT-RT-PCR (Abbildung 23C) nach einer Imatinib-Mesylat-Vorbehandlung der SH-SY5Y-Zellen erhöht exprimiert. Eine vermehrte Expression von PML könnte eine erhöhte Antitumorwirkung nach Imatinib-Mesylat-Behandlung somit unterstützen.

Das mit Melanom-Differenzierung assoziierte Gen 5 (IFIH1) ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase, die durch Interferon β induziert wird und somit einen positiven Zusammenhang mit Zelldifferenzierung und Apoptose aufweist (Kang et al., 2002). Eine erhöhte Expression konnte bei allen drei durchgeführten Analysen (Abbildung 13, 17 und 23D) gefunden werden. Demnach könnte eine erhöhte Expressierung von IFIH1 mit gesteigerter Differenzierung und damit verminderter maligner Entartung verbunden sein.

Das Protein, welches durch das Gen TGFB2 (Human transforming growth factor beta 2) kodiert wird, ist ein Wachstumsfaktor und stammt von Glioblastomzellen. TGFB2 fördert über seine autokrine Funktion das Tumorstadium bzw. hemmt die Immunkontrolle der Tumorentwicklung (de Martin et al., 1987). Dabei war es sowohl bei SH-SY5Y-Zellen in der Microarray-Analyse (Abbildung 14) als auch bei der RT-RT-PCR (Abbildung 25A) nach Dasatinib-Behandlung hochexprimiert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für eine Resistenzentwicklung bei Dasatinib-Inkubation von SH-SY5Y-Zellen sein.

CDKN1A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) bewirkt einen Zellzyklusarrest (Benndjennat et al., 2003). MYC inhibiert die Expression von CDKN1A und begünstigt somit statt Zellzyklusarrest die Apoptose (Seoanne et al., 2002). Auch hier konnte eine erhöhte Expression nach Dasatinib-Behandlung bei SH-SY5Y-Zellen mittels Microarray-Analyse (Abbildung 14) und RT-RT-PCR (Abbildung 25B) nachgewiesen werden. Durch eine erhöhte Expression von CDKN1A könnte somit durch eine Dasatinib-Behandlung eine verminderte Proliferation der Tumorzellen bewirkt werden.

Neben den genannten Genen, welche durch die Behandlung in der Expression heraufreguliert wurden, kam es auch zur Suppression einzelner Gene. Das Gen CTGF (*connective tissue growth factor*) wurde nach Imatinib-Mesylat-Behandlung in SH-SY5Y-Zellen sowohl in der Micoarray-Analyse (Abbildung 15), der PCR (Abbildung 20) als auch in der RT-RT-PCR (Abbildung 24) erniedrigt exprimiert. CTGF gehört zu einer Gruppe von Genen, die sofort nach einer Induktion von Wachstumsfaktoren oder Onkogenen exprimiert werden und spielt demnach eine Rolle bei der Zellwachstumsregulation. Es bestehen signifikante Übereinstimmungen der Sequenzen zu dem IGFBP (*insulin like growth factor binding protein*) (Kim et al., 1997). Demnach könnte eine verminderte CTGF-Expression und eine Hemmung des Tumorwachstums durch Imatinib-Mesylat in Zusammenhang stehen.

Das Protoonkogen c-myc spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und Proliferation. Eine Überexpression führt u.a. zu einer gesteigerten DNA-Replikation und anschließender DNA-Schädigung, was eine Krebsentstehung fördern kann (Dominguez-Sola et al., 2007). In anderen Tumor-Modellen ist die Zellproliferation abhängig von der Expression von c-myc (Schuhmacher et al., 1999). In der PCR war c-myc nach einer Behandlung mit Imatinib runterreguliert (Abbildung 19). Die Hemmung dieses Protoonkogens könnte eine weitere Wirkungsweise von Imatinib-Mesylat darstellen.

Interessanterweise wurde auch c-kit (CD117) durch Behandlung mit Imatinib-Mesylat herunterreguliert. Durch die Bindung von SCF (hematopoietic stem cell factor) an CD117 werden anti-apoptotische Signale ausgesendet (Ricotti et al., 1998). CD117 ist besonders bei prognostisch ungünstigen Neuroblastomen exprimiert (Vitali et al., 2003) und durch Imatinib-Mesylat gehemmt (Bond et al., 2007). Die Reduktion der basalen Expression von c-kit könnte für eine reduzierte Malignität behandelter Zellen sprechen. Neben c-kit wurde auch ASCL1 durch Behandlung mit Imatinib-Mesylat in SH-SY5Y-Zellen herunter reguliert (Abbildung 19). Dieses Gen scheint die Entwicklung von Neuronen im Zentralnervensystem zu fördern (Pattyn, 2004). Außerdem ist es auf einigen neuroendokrinen Tumoren exprimiert (Ball et al., 1993). Eine Mutation im ASCL1 Gen könnte die noradrenerge neuronale Entwicklung hemmen (de Pontual et al., 2003). Die erniedrigte Expression von ASCL1 könnte eine Erklärung für die Resistenzentwicklung bei Behandlung mit Imatinib-Mesylat sein.

Myc target 1 (MYCT1) zählte ebenfalls zu den niedrig exprimierten Genen nach Dasatinib-Behandlung. Da MYCT1 bei anderen Tumoren einen pro-apoptotischen Faktor darstellt (Qiu et al., 2003), könnte die erniedrigte Expression hier an der Resistenzentstehung beteiligt sein

Wie die bisherigen Erfahrungen mit Kinaseinhibitoren zeigen, ist die Monotherapie mit diesen Medikamenten oft nicht effizient genug, sodass die Kombination mit anderen Chemotherapeutika sinnvoll erscheint. Beim Neuroblastom wird mit Erfolg die Differenzierungstherapie mit Retinsäure durchgeführt. Das Cytochrom-P450-Enzym P450RAI-2 ist teilweise für die Inaktivierung von Retinsäure verantwortlich (White et al., 2000). Retinsäure induziert v.a. eine Zelldifferenzierung (Germain et al., 2006). P450RAI-2 konnte in der PCR auch nach Behandlung mit Kinaseinhibitoren nicht nachgewiesen werden (Abbildung 19). Es kann somit gefolgert werden, dass die Behandlung mit Imatinib-Mesylat nicht zur Induktion dieses Retinsäure-inaktivierenden Enzyms führt. Daher könnte es z.B. im Rahmen einer Kombinationstherapie aus Imatinib-Mesylat und Retinsäure zu keiner Hemmung der Retinsäurewirkung durch die gleichzeitige Anwendung von Imatinib-Mesylat kommen.

4.3. Modulation der Oberflächenantigen-Expression nach Kinaseinhibitor-Behandlung

Der CXCR4 (CD184)-Chemokinrezeptor gehört zu den bekannten exprimierten Markern bei Neuroblastomen. Die Expression korreliert mit einem höhergradigen Stadium der Tumorerkrankung. Außerdem scheint eine autokrine Stimulation von CXCR4 durch seinen Liganden (CXCL12) für einige Neuroblastome *in vitro* zum Überleben notwendig zu sein. Eine Inhibition des CXCL12-CXCR4 Signalwegs in Neuroblastomen könnte somit eine mögliche Unterdrückung des Tumorwachstums bewirken. (Zagozdzon et al., 2008)

Mittels Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit nach einer Interaktion von Imatinib-Mesylat-Behandlung und CD184-Expression auf Neuroblastomzellen gesucht.

Wie in Abbildung 27 und 28 ersichtlich, sank im Vergleich zu den unbehandelten Zellen durch die Imatinib-Mesylat-Inkubation die CD184-Expression, d.h. es waren mehr CD184-negative Tumorzellen vorhanden. Je höher die Konzentration der Imatinib-Mesylat-Behandlung war, desto weniger wurde CXCR4 (CD184) exprimiert. Dieses Ergebnis kann somit gut mit oben genannten Aussagen in Einklang gebracht werden und eine weitere Zielstruktur der Tyrosinkinaseinhibitoren bei Neuroblastomen aufzeigen. Imatinib-Mesylat könnte demnach über die Hemmung einer CXCR4-Expression einer Tumorprogression entgegen wirken.

CD54 ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM1) das u.a. für die Leukozytenadhäsion verantwortlich ist (Carlos und Harlan, 1994). Mittels FACS-Analyse (Abbildung 29) konnte eine erhöhte Expression bei SH-SY5Y-Zellen durch eine Imatinib-Mesylat-Inkubation beobachtet werden. Dieses Ergebnis könnte für eine Förderung der Anti-Tumor-Immunantwort durch Imatinib-Mesylat sprechen.

Das Oberflächenantigen CD 137 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Anti-Tumor-Immunantworten. Es gehört zu den Tumornekrosefaktoren und aktiviert T-Zellen und zytotoxische Lyse (Arch und Thompson, 1998; Kwon und Weissmann 1989). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels FACS-Analyse eine Überexpression von mCD137 bei SH-SY5Y-Zellen nach Imatinib-Mesylat-Inkubation ermittelt werden (Abbildung 30), was in Bezug auf oben genannte Ergebnisse neue Hinweise zur Wirkungsweise von Imatinib-Mesylat auf Tumorzellen aufzeigt. Wang et al. (2008) untersuchten die Expression von dem Rezeptor und Liganden CD137 auf humanen Primärtumoren. Nach ihren Ergebnissen waren beide auf verschiedenen Primärtumoren exprimiert. Dabei beeinflussen sie die Tumorprogression: Auf der einen Seite wird die T-Zellaktivierung unterstützt, indem T-Zellen zur Produktion von IFN- γ angeregt werden. Auf der anderen Seite werden Tumorzellen mit einem CD137 Rezeptor bei der Ligation von CD137L zur Produktion von IL-8 gebracht (Salih et al., 2000). IL-8 bewirkt dabei sowohl eine chemotaktische Aktivierung der Leukozyten, aber auch eine Förderung der Tumor- und Angiogenese (Brat et al., 2005). Somit ist der Zusammenhang einer Überexpression von CD137 mit Tumorprogression komplex und kritisch zu bewerten. Möglicherweise ist hier eher eine mögliche Resistenzentwicklung der Neuroblastomzellen zu erklären.

Das humane Leukozytenantigen-System (HLA) spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Die Proteine des HLA-Systems sind hochpolymorphe Moleküle der Zellmembran, die Peptide binden und den T-Zellen präsentieren (Todd et al., 1988). HLA-A,B,C wurde nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat erhöht exprimiert. (Abbildung 31). Dadurch könnte eine vermehrte T-Zell-vermittelte Immunantwort auf die Tumorzellen bewirkt werden.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen:

Sowohl Imatinib-Mesylat als auch Dasatinib hemmen die Proliferation bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Jedoch besass Dasatinib eine höhere Effektivität, selbst bei Imatinib-Mesylat resistenten Zellen. So lag bei einer Konzentration von 6,5 μ M bei Dasatinib nur noch eine Zellviabilität von 47,8 % vor, während sie bei Imatinib noch 85,4 % betrug. SH-SY5Y-Zellen können durch längere Inkubation (2-4 Wochen) mit beiden Tyrosinkinaseinhibitoren in niedrigen Konzentrationen (12,5 μ M) „resistent“ werden, d.h. sie sprechen weniger auf eine erneute Behandlung mit dem jeweiligen Tyrosinkinaseinhibitor an als nicht vorbehandelte Zellen. In dieser Arbeit zeigte sich, dass bei Imatinib-Mesylat-resistenten Zellen Dasatinib ebenfalls eine effektivere Proliferationshemmung der SH-SY5Y-Zellen bewirkt als Imatinib-Mesylat. Somit wäre

ein Einsatz von Dasatinib bei Imatinib-resistenten Neuroblastomen denkbar. Imatinib-Mesylate erreicht bei Dasatinib-resistenten Zellen im Vergleich zu einer erneuten Dasatinib-Inkubation keine effektivere Proliferationshemmung. Daher wäre der Einsatz von Imatinib-Mesylat bei Dasatinib-resistenten Neuroblastomen nicht sinnvoll.

Durch die Behandlung mit beiden Tyrosinkinaseinhibitoren kam es zu interessanten Veränderungen in der Genexpression und Expression von Oberflächenantigenen bei Neuroblastom-Zellen. Nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat ist die Expression von den Genen OAS2, BCL2, PML, IFIH1, sowie von den Oberflächenantigenen CD54, CD137, HLA-A,B,C erhöht. Erniedrigt waren nach Behandlung mit Imatinib-Mesylat CTGF, C-Kit, ASCL1 und CD184. P450RAI-2 wurde durch Imatinib-Mesylat nicht induziert. Dagegen zeigte sich bei einer Dasatinib-Inkubation eine erhöhte Expression der Gene TGFB2 und CDKN1A, während MYCT1 erniedrigt war. Dadurch könnten mögliche Erklärung für die Wirkungsweise beider Tyrosinkinaseinhibitoren oder einer Resistenzentwicklung gegeben werden.

Imatinib-Mesylat und besonders Dasatinib könnten bei therapieresistenten oder fortgeschrittenen Neuroblastomen gegebenenfalls auch zur Ergänzung von Chemotherapie eine mögliche Therapieoption darstellen. Aufgrund der komplexen Auswirkungen von Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Genexpression von Neuroblastomzellen erscheinen weitergehende Untersuchungen zu den Wirkmechanismen der genannten Inhibitoren wünschenswert.

6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie SH-SY5Y als Modell verwendet. Um eine sichere Aussage über mögliches Ansprechen von Neuroblastomen auf Tyrosinkinaseinhibitoren und die beteiligten Zielstrukturen zu treffen, sollten die Ergebnisse an weiteren Neuroblastomzelllinien überprüft werden. Anschließend wären *in-vivo*-Versuche sicher eine wichtige Ergänzung. Eine Analyse der gewonnenen Microarray-Daten unter dem Gesichtspunkt einzelner Stoffwechselwege und Signalkaskaden könnte weitere Einblicke in Änderungen des Genexpressionsprofils von Tumorzellen bei Inkubation mit Tyrosinkinaseinhibitoren liefern. Zusätzlich wäre interessant, einzelne Gene, welche durch Kinaseinhibitoren induziert wurden (z.B. BCL2), auszuschalten (z. B. mittels RNA-Interferenz) und das Resistenzverhalten dieser Zellen zu untersuchen. Hierdurch könnten neue Wege zur Überwindung dieser Resistenzen gefunden werden.

7. Literatur

Arch R H, Thompson C B. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol. Cell. Biol.* (1998) 18: 558-565

Ault P. Overview of second-generation tyrosine kinase inhibitors for patients with imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia. *Clin J Oncol Nurs* (2007) 11:125-129

AWMF, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Nr. 025/008

Ball DW, Azzoli CG, Baylin SB, Chi D, Dou S, Donis-Keller H, Cumaraswamy A, Borges M, Nelkin BD. Identification of a human achaete-scute homolog highly expressed in neuroendocrine tumors. *Proc Nat Acad Sci U S A* (1993) 90:5648-5652

Behrends U, Jandl T, Golbeck A, Lechner B, Müller-Wehrich S, Schmid I, Till H, Berthold F, Voltz R, Mautner JM. Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and alpha-internexin genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library. *Int J Cancer* (2002) 100:669-677

Bendjennat M, Boulaire J, Jascur T, Brickner H, Barbier V, Sarasin H, Fotedar A, Fotedar R. UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* (2003) 114:599-610

Bergeron A, Réa D, Levy V, Picard C, Meignin V, Tamburini J, Bruzzoni-Giovanelli H, Calvo F, Tazi A, Rousselot P. Lung abnormalities after dasatinib treatment for chronic myeloid leukemia: a case series. *Am J Respir Crit Care Med* (2007) 176:814-818

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* (1973) 33:2643-2652

Bond M, Bernstein ML, Pappo A, Schultz KR, Krailo M, Blaney SM, Adamson PC. A phase II study of imatinib mesylate in children with refractory or relapsed solid tumors: A Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* (2007) 50:254-258

Boyar MS, Taub RN, New Strategies for Treating GIST When Imatinib Fails. *Cancer Invest.* (2007) 25:328-335

Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncol.* (2005) 7:122-133

Breccia M et al. Differences in hematological and non-hematological toxicity during treatment with imatinib in patients with early and late chronic phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* (2008) 49:2328-2332

Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol.* (1997) 19:93-101

Carlos TM, Harlan JM, Leukocyte-Endothelial Adhesion molecules. *Blood* (1994) 7:2068-2101

Champagne MA, Capdeville R, Krailo M, Qu W, Peng B, Rosamilia M, Therrien M, Zoellner U, Blaney SM, Bernstein M. Children's Oncology Group phase 1 study Imatinib mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome-positive leukemia: results from a Children's Oncology Group phase 1 study. *Blood* (2004) 104:2655-2660

de Martin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitisch H, Wrann M, Schusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *EMBO J* (1987): 6:3673-3677

de Pontual L, Nepote V, Attie-Bitach T, Al Halabiah H, Trang H, Elghouzzi V, Levacher B, Benihoud K, Auge J, Faure C, Laudier B, Vekemans M, Munnich A, Perricaudet M, Guillemot F, Gaultier C, Lyonnet S, Simonneau M, Amiel J. Noradrenergic neuronal development is impaired by mutation of the proneural HASH-1 gene in congenital central hypoventilation syndrome (Ondine's curse). *Hum. Molec. Genet.* (2003) 12:3173-3180

Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* (2007) 448:445-451

Droogendijk HJ, Kluin-Nelemans HJ, van Doormaal JJ, Oranje AP, van de Loosdrecht AA, van Daele PL. Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis: a phase II trial. *Cancer* (2006) 107:345-351

Europäische Arzneimittelagentur, engl. European Medicines Agency: EMEA
www.emea.europa.eu/human-docs/PDFs/EPAR/sprycel/H-709-en6.pdf

Fabarius A, Giehl M, Rebacz B, Krämer A, Frank O, Haferlach C, Duesberg P, Hehlmann R, Seifarth W, Hochhaus A. Centrosome aberrations and G1 phase arrest after in vitro and in vivo treatment with the SRC/ABL inhibitor dasatinib. *Haematologica* (2008) 93:1145-1154

Fachinformation Glivec, Novartis pharma (www.glivec.de) 2009

Fachinformation Sprycel, Bristol-Myers Squibb (www.sprycel.com) 2009

Frank-Raue K, Fabel M, Delorme S, Haberkorn U, Raue F, Efficacy of imatinib mesylate in advanced medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* (2007) 157:215-2120

Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. Review. *Pharmacol Rev.* (2006) 58:760-72

Giovedi S, Darchen F, Valtorta F, Greengard P, Benfenati F. Synapsin is a novel Rab3 effector protein on small synaptic vesicles. II. Functional effects of the Rab3A-synapsin I interaction. *J. Biol. Chem.* (2004) 279:43769-43779

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* (2001) 293:876-80

Graf N: Tumorerkrankungen im Kindesalter. In: Sitzmann FC (Hrsg.) Pädiatrie. Duale Reihe, Hippokrates Verlag Stuttgart 1995, S. 552-554

Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP. Tyrosine kinase inhibitors- a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab.* (2009) 10:470-481

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* (2007) 370:342-350

Hero B, Christiansen H. Neuroblastom. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram CR. Hrsg. Die Onkologie. Teil 2. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York (2004) 1655-1675

Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci.* (2008) 65:3168-3181

Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* (1990) 348:334-336

Hovnanian A, Rebouillat D, Mattei MG, Levy ER, Marie I, Monaco AP, Hovanessian AG. The human 2-prime, 5-prime-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms. *Genomics* (1998) 52:267-277

Jahrestagung der Deutschen, österreichischen und schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Dasatinib: Effektive Alternative bei Imatinib-Resistenz und -Intoleranz, Pharma Forum, Leipzig 2006

Jalava AM, Heikkilä J, Akerlind G, Pettit GR, Akerman KE. Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Department of Biochemistry and Pharmacy, Abo Akademi, Finland. *Cancer Res.* (1990) 50:3422-3428

Johnson FM, Saigal B, Tran H, Donato NJ, Abrogation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Reactivation after Src Kinase Inhibition Results in Synergistic Antitumor Effects. *Clin Cancer Res.* (2007) 13:4233-4244

Kang D, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. mda-5: an interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (2002) 99:637-642

Karow Thomas, Lang-Roth Ruth, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden, 15. Auflage, Köln, Eigenverlag Karow, 2007

Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. Proc. Nat. Acad. Sci. (1997) 94:12981-12986

Knudson AG Jr, Strong IC. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. Am J Hum Genet. (1972) 24:514-532

Korja M, Finne J, Salmi TT, Haapasalo H, Tanner M, Isola J. No GIST-type c-kit gain of function mutations in neuroblastic tumours. Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Turku, Finland. J Clin Pathol. (2005) 58:762-765

Kwon BS, Weissman SM. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86:1963–1967

Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. Methods (2001) 25:402-408

Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweiko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D, Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J, Borzilleri RM. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino) thiazole - 5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. J Med Chem. (2004) 47:6658-6661

Maris JM, Kyemba SM, Rebbeck TR, White PS, Sulman EP, Jensen SJ, Allen C, Biegel JA, Brodeur GM. Molecular genetic analysis of familial neuroblastoma. Eur J Cancer (1997) 33:1923-1928

Mayatepek E: Pädiatrie. Elsevier Urban und Fischer, München, 2007, S.664-667

Meco D, Riccardi A, Servidei T, Brueggen J, Gessi M, Riccardi R, Dominici C. Antitumor activity of imatinib mesylate in neuroblastoma xenografts. *Cancer Lett.* (2005) 228:211-219

Nam S, Kim D, Cheng JQ, Zhang S, Lee JH, Buettner R, Mirosevich J, Lee FY, Jove R. Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells. *Cancer Res.* (2005) 65:9185-189

Neuroblastomstudie NB 97 und 2004 , Berthold F, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinik Köln

http://cms.uk-koeln.de/kinderonkologie/content/forschung_kinderonkologie/neuroblastom_studie/index_ger.html

Orphanos GS, Ioannidis GN, Ardavanis AG. Cardiotoxicity induced by tyrosine kinase inhibitors. *Acta Oncol.* (2009) 4:1-7

Palmberg E, Johnsen JI, Paulsson J, Gleissman H, Wickström M, Edgren M, Ostman A, Kogner P, Lindskog M. Metronomic scheduling of imatinib abrogates clonogenicity of neuroblastoma cells and enhances their susceptibility to selected chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. *Int J Cancer* (2009) 124:1227-1234

Pattyn A, Simplicio N, van Doorninck JH, Goridis C, Guillemot F, Brunet JF. *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nature Neurosci.*(2004)7:589-595

Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* (2000) 406:207-210

Qiu GB, Gong LG, Hao DM, Zhen ZH, Sun KL. Expression of MTLC gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* (2003) 9:2160-3

Ricotti E, Fagioli F, Garelli E, Linari C, Crescenzo N, Horenstein AL, Pistamiglio P, Vai S, Berger M, di Montezemolo LC, Madon E, Basso G. c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. *Blood* (1998) 91:2397-405

Rössler J, Zambrzycka I, Lagodny J, Kontny U, Niemeyer CM. Effect of STI-571 (imatinib mesylate) in combination with retinoic acid and gamma-irradiation on viability of neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2006) 342:1405-12

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst.* (1983) 71:741-747

Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F et al. Constitutive Expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol.* (2000) 165: 2903-2910

Seoane J, Le HV, Massague J. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* (2002) 419: 729-734

Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, Griffith D, Lee FY, Bokemeyer C, Deininger MW, Druker BJ, Heinrich MC. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res.* (2006) 66:473-481

Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, Stram DO, Perez C, Haase GM, Matthay KK. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer group study. *J Clin Oncol.* (2000) 18:1260-1268

Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, Polack A, Weidle UH, Bornkamm GW, Eick D, Kohlhuber F. Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol.* (1999)9:1255-1258

Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, Réa D, Dorlhiac-Llacer PE, Milone JH, Vela-Ojeda J, Silver RT, Khoury HJ, Charbonnier A, Khoroshko N, Paquette RL, Deininger M, Collins RH, Otero I, Hughes T, Bleickardt E, Strauss L, Francis S, Hochhaus A. Intermittent target inhibition with Dasatinib 100 mg once daily preserves Efficacy and improves tolerability in Imatinib-resistant and –intolerant chronic-Phase chronic myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* (2008) 26:3204-3212

Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. (2004) 305:399-401

Shah NP. Dasatinib. Division of Hematology/Oncology. *Drugs Today (Barc)*. (2007) 43:5-12

Shor AC, Keschman EA, Lee FY, Muro-Cacho C, Letson GD, Trent JC, Pledger WJ, Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. *Cancer Res*. (2007) 67:2800-2808

Timeus F, Crescenzo N, Fandi A, Doria A, Foglia L, Cordero di Montezemolo L. In vitro antiproliferative and antimigratory activity of dasatinib in neuroblastoma and ewing sarcoma cell lines. *Oncol Rep*. (2008) 19:353-359

Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, et al. A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* (1988) 240:1003-1009

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* (1998) 335:440-442

Vitali R, Cesi V, Nicotra MR, McDowell HP, Donfrancesco A, Mannarino O, Natali PG, Raschella G, Dominici C. c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571. *Int J Cancer* (2003) 106:147-152

von Harnack G-A: Neuroblastom. In: Koletzko S (Hrsg.), *Kinderheilkunde*. 11. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York, 2000, S. 364-365

Wang Q, Zhang P, Zhang Q, Wang X, Li J, Ma C, Sun W, Zhang L. Analysis of CD137 and CD137L Expression in Human Primary Tumor Tissues. *Croat Med J*. (2008) 49: 192-200

White JA, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam SP, Jones G, Petkovich M. Identification of the human cytochrome P450,

P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (2000) 97: 6403-6408.

Wong SF. Dasatinib dosing strategies in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *J Oncol Pharm Pract.* (2009) 15:17-27

Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* (1987) 6:3341-3351

Yokota A, Kimura S, Masuda S, Ashihara E, Kuroda J, Sato K, Kamitsuji Y, Kawata E, Deguchi Y, Urasaki Y, Terui Y, Ruthardt M, Ueda T, Hatake K, Inui K, Maekawa T. INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph⁺ leukemia cells in the central nervous system, and cyclosporine A augments its in vivo activity. *Blood.* (2007) 109:306-314

Zagozdzon R, Fu Y, Avraham HK. Csk homologous kinase inhibits CXCL12-CXCR4 signaling in neuroblastoma. *Int J Oncol.* (2008) 32:619-623

8. Thesen

1. Sowohl eine Behandlung mit Imatinib-Mesylat als auch Dasatinib führten *in-vitro* zu einer Proliferationshemmung von SH-SY5Y-Neuroblastomzellen.
2. Dasatinib bewirkte eine effektivere Proliferationshemmung der SH-SY5Y-Zellen als Imatinib-Mesylat.
3. Auch bei Imatinib-Mesylat-resistenten Zellen bewirkte Dasatinib eine effektivere Proliferationshemmung der SH-SY5Y-Zellen als Imatinib-Mesylat.
4. Imatinib-Mesylat erreicht bei Dasatinib-resistenten Zellen im Vergleich zu einer erneuten Dasatinib-Inkubation keine effektivere Proliferationshemmung.
5. Eine Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit Dasatinib und Imatinib-Mesylat führte zu verschiedenen Änderungen in der Genexpression und in der Expression von Oberflächenantigenen, die eine mögliche Erklärung für die Wirkungsweise beider Tyrosinkinaseinhibitoren oder einer Resistenzentwicklung geben könnten.
6. Nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat ist die Expression von den Genen OAS2, BCL2, PML, IFIH1, sowie von den Oberflächenantigenen CD54, CD137, HLA-A,B,C erhöht.
7. Nach Inkubation mit Imatinib-Mesylat ist die Expression von CTGF, C-kit, ASCL1 und CD184 erniedrigt.
8. P450RAI-2 wurde durch Imatinib-Mesylat nicht induziert, sodass die Behandlung nicht mit der Wirksamkeit von Retinoiden negativ interferieren sollte.
9. Es zeigte sich bei einer Dasatinib-Inkubation eine erhöhte Expression der Gene TGFB2 und CDKN1A, während MYCT1 erniedrigt war.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marianne Bremer
Geboren am: 25.08.1982
Familienstand: ledig
Wohnhaft: Bertramstraße 14, 06110 Halle

Ausbildung

1989 – 1993 Grundschule Kanena/ Halle
1993 – 2002 Landesgymnasium August Hermann Franke
2002 – 2008 Medizinstudium an der MLU Halle-Wittenberg

Beruflicher Werdegang

Seit Februar 2009 Assistenzärztin für Psychiatrie und Psychotherapie an der
Universitätsklinik der MLU Halle-Wittenberg

Marianne Bremer

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäss § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Halle, Januar 2010

Marianne Bremer

Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit:

Neumann, I., M. Bremer, J. Föll, S. Burdach und M. S. Staeger. Kombination von Retinoiden und Kinase-Inhibitoren in der Behandlung des Neuroblastoms. Jahrestagung der Sächsisch-Thüringischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin und Kinderchirurgie, 30.-31.03.2007. Halle. Kinder- und Jugendmedizin. 7:A25 (2007).

Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. rer. nat., rer. medic habil. Martin S. Staeger für die Betreuung im Labor, für die fachliche Beratung und unermüdliche Hilfe sowie seine stete Bereitschaft, die Ergebnisse kritisch zu diskutieren.

Bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Kinderklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die technische Unterstützung sowie für die stets freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. med. Dieter Körholz, der es mir ermöglichte in seiner Klinik zu promovieren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der Firma Novartis und Bristol-Myers Squibb für die großzügige Bereitstellung der Substanzen Imatinib-Mesylat und Dasatinib für meine Arbeit bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gebührt darüber hinaus René Frank, der mir liebevoll zur Seite stand und mich mit Rat und Tat unterstützt hat.

Schließlich danke ich an dieser Stelle meiner Familie für die gewährte Unterstützung meiner gesamten Ausbildung.