

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -

**In-vitro-Effekte von SAHA, Tyrphostin AG 1478 und Carmustin an  
einem Panel von 18 pädiatrisch-onkologischen Zelllinien**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Greiwe, Gillis  
aus Ostercappeln

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Boos

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. P. Boknik

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens-3  
Referent: Prof. Dr. med. Jürgen Boos  
Koreferent:

## **Zusammenfassung**

In-vitro-Effekte von SAHA, Tyrphostin AG 1478 und Carmustin an einem Panel von 18 pädiatrisch-onkologischen Zelllinien

Greiwe, Gillis

In den letzten Jahrzehnten hat die Weiterentwicklung der konventionellen Chemotherapie maßgeblichen Anteil an der Prognoseverbesserung bei pädiatrischen Neoplasien. Allerdings geht dieser Erfolg mit teils schwerwiegender Toxizität der heutigen Polychemotherapieregime einher.

Verbessertes molekularpathologisches Verständnis hat dazu beigetragen, neue zielgerichtete Therapieansätze zu entwickeln und zu etablieren. Neue Substanzen sollen neoplastische Zellen selektiv angreifen und gesundes Gewebe schonen. Zwei der hier getesteten Substanzen, SAHA und Tyrphostin, sind solche „*Target-specific-drugs*“.

Tyrphostin ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor und soll an Tumorentstehung und -wachstum beteiligte Signalkaskaden unterbrechen. SAHA gehört zur Gruppe der Histondeacetylase-Inhibitoren, die in die epigenetische Regulation der Genexpression eingreifen und so antineoplastisch wirken sollen.

An einem Panel von 18 Zelllinien pädiatrisch-onkologische Tumorentitäten wurde die In-vitro-Toxizität von SAHA, Tyrphostin und dem etablierten Chemotherapeutikum Carmustin getestet. Zusätzlich wurde die Wirkung der Kombination der genannten Substanzen überprüft. Der in dieser Arbeit verwendete MTT-Assay ist ein etabliertes Verfahren und ermöglicht, reproduzierbar die Zytotoxizität von Substanzen auf Zelllinien zu bestimmen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ergänzen den bisherigen Forschungsstand und tragen zur Klärung der teils widersprüchlichen wissenschaftlichen Erkenntnisse bei. Außerdem liefern sie für einige pädiatrische Entitäten die ersten Ergebnisse für SAHA und Tyrphostin überhaupt.

Bemerkenswerte synergistische Effekte zeigten sich bei der Kombination von Carmustin und SAHA bei Medulloblastomen und bei der Kombination von Carmustin und Tyrphostin bei Leukämie- und Ewingsarkomzelllinien. Gegenstand fortführender Untersuchungen könnte die Kombination von SAHA oder Tyrphostin mit den Substanzen der üblichen Therapieregime ausgewählter Entitäten sein.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Einzelsubstanzen konnte keine vielversprechende Wachstumshemmung der hier getesteten „*Target-specific-drugs*“ beobachtet werden.

## **Erklärung**

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

*In-vitro-Effekte von SAHA, Tyrphostin AG 1478 und Carmustin an einem Panel von 18 pädiatrisch-onkologischen Zelllinien*

im Universitätsklinikum Münster, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin,  
unter der Anleitung von Prof. Dr. med. J. Boos

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in-oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Hamburg, 30.05.2014

Gillis Greiwe

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie kindlicher maligner Neoplasien .....	1
1.2	Entitäten und Häufigkeitsverteilungen .....	1
1.3	Prognosen und Mortalitätsraten.....	2
1.4	Therapieoptionen .....	3
1.4.1	Radiotherapie.....	4
1.4.2	Chirurgische Therapie .....	4
1.4.3	Chemotherapie.....	4
1.4.4	Zielgerichtete Therapie.....	5
1.5	Einführung zu Tyrphostin AG1478.....	6
1.6	Einführung zur Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) .....	9
1.6.1	Histonmodifikation durch HAT und HDAC .....	9
1.6.2	Weitere Funktion der HAT und HDAC .....	9
1.6.3	HAT, HDAC und Tumorentstehung .....	10
1.6.4	HDAC-Inhibitoren.....	11
1.6.5	Wirkungsweise der HDAC-Inhibitoren, insbesondere SAHA .....	11
1.6.6	Studienlage bezüglich SAHA.....	12
1.6.6.1	Antineoplastische Wirkung von SAHA in vitro.....	13
1.6.6.2	Antineoplastische Wirkung von SAHA in klinischen Studien.....	13
1.6.7	Unerwünschte Wirkungen von SAHA .....	14
1.6.8	Zulassung von SAHA.....	14
1.7	Einführung zu Carmustin.....	15
1.7.1	Entdeckung und Einführung.....	15
1.7.2	Wirkmechanismus .....	15
1.7.3	Unerwünschte Wirkungen .....	16
1.7.4	Heutige Indikationen .....	16
1.8	Zielsetzung der Arbeit .....	16
2.	Materialien und Methoden.....	17
2.1	Materialien.....	17
2.1.1	Zelllinien.....	17
2.1.1.1	Leukämien .....	18
2.1.1.2	Ewing-Sarkome .....	18
2.1.1.3	Neuroblastome.....	19
2.1.1.4	Medulloblastome .....	20
2.1.1.5	Osteosarkome .....	20
2.1.1.6	Rhabdomyosarkome .....	21
2.1.2	Testsubstanzen.....	21
2.1.4	Einmal-Laborbedarf.....	23
2.1.5	Laborgeräte .....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Umgang mit Zellkulturen .....	25
2.2.1.1	Wachstumsbedingungen.....	25
2.2.1.2	Passagieren .....	25
2.2.1.3	Kollagenbeschichtung der Kulturflaschen und Mikrotiterplatten .....	27
2.2.2	Ermittlung der Zellzahl.....	28
2.2.3	Aussaat der Zellen .....	28

2.2.4	Herstellung der Zytostatika-Konzentrationsstufen .....	29
2.2.5	Versuchsansatz und Messung Tag 0.....	30
2.2.6	MTT-Assay.....	31
2.2.7	Wiederholung der Versuche und Reproduzierbarkeit .....	32
2.2.8	Software zur Datenerfassung und Auswertung .....	32
2.2.9	Definition der GI <sub>50</sub> und der LC <sub>50</sub> .....	33
2.2.10	Kombinationsindizes .....	34
3.	Ergebnisse der Toxizitätstest.....	34
3.1	Einleitende Anmerkungen zu den grafischen Darstellungen .....	34
3.2	Ergebnisse der Toxizitätstests der Einzelsubstanzen.....	36
3.2.1	Carmustin.....	36
3.2.2	Tyrphostin AG1478.....	44
3.2.3	SAHA .....	54
3.3	Ergebnisse der Toxizitätstests der Substanzkombinationen.....	62
3.3.1	Carmustin in Kombination mit Tyrphostin .....	62
3.3.2	Carmustin in Kombination mit SAHA .....	74
4.	Diskussion der Ergebnisse.....	86
4.1	Einordnung der Wertigkeit des In-vitro-Modells .....	86
4.2	Übersichtsdarstellung der Ergebnisse.....	90
4.3	Bewertung der Ergebnisse und Einordnung in den Forschungsstand .....	90
4.3.1	Antineoplastische Wirkung von SAHA in klinischen Studien.....	91
4.3.2	Ergebnisse bisheriger In-vitro-Studien mit SAHA.....	92
4.3.3	Wirkung von SAHA auf die Tumorzelllinien .....	94
4.3.4	SAHA als Teil einer Polychemotherapie.....	96
4.3.5	Fazit der Diskussion von SAHA .....	97
4.3.6	Ergebnisse anderer Studien mit Tyrphostin AG1478.....	98
4.3.7	Wirkung von Tyrphostin AG1478 auf die Tumorzelllinien.....	99
4.3.8	Synergistische Effekte von Tyrphostin AG1478 und Carmustin .....	101
4.3.9	Fazit der Diskussion von Tyrphostin AG1478 .....	102
4.4	Abschlussbetrachtung.....	102
5.	Literaturverzeichnis .....	104
6.	Abkürzungsverzeichnis .....	116
7.	Lebenslauf .....	118
8.	Danksagung .....	119

## **1. Einleitung**

### **1.1 Epidemiologie kindlicher maligner Neoplasien**

Bei Kindern ist Krebs die dritthäufigste (Altersgruppe 1-4 Jahre) bzw. zweithäufigste (Altersgruppe 5-14 Jahre) Todesursache in Deutschland. Nur an Unfällen und angeborenen Fehlbildungen sterben mehr Kinder.

Ca. jedes 500. Kind erkrankt bis zum 15. Lebensjahr an einer bösartigen Neubildung (50). Dies entspricht ca. 1800 Kindern jährlich in Deutschland und einer altersstandardisierten Inzidenz von 15,6 pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren im Jahr 2007 (27). Die altersstandardisierte Inzidenz zeigt in den letzten Jahren eine leicht ansteigende Tendenz (27).

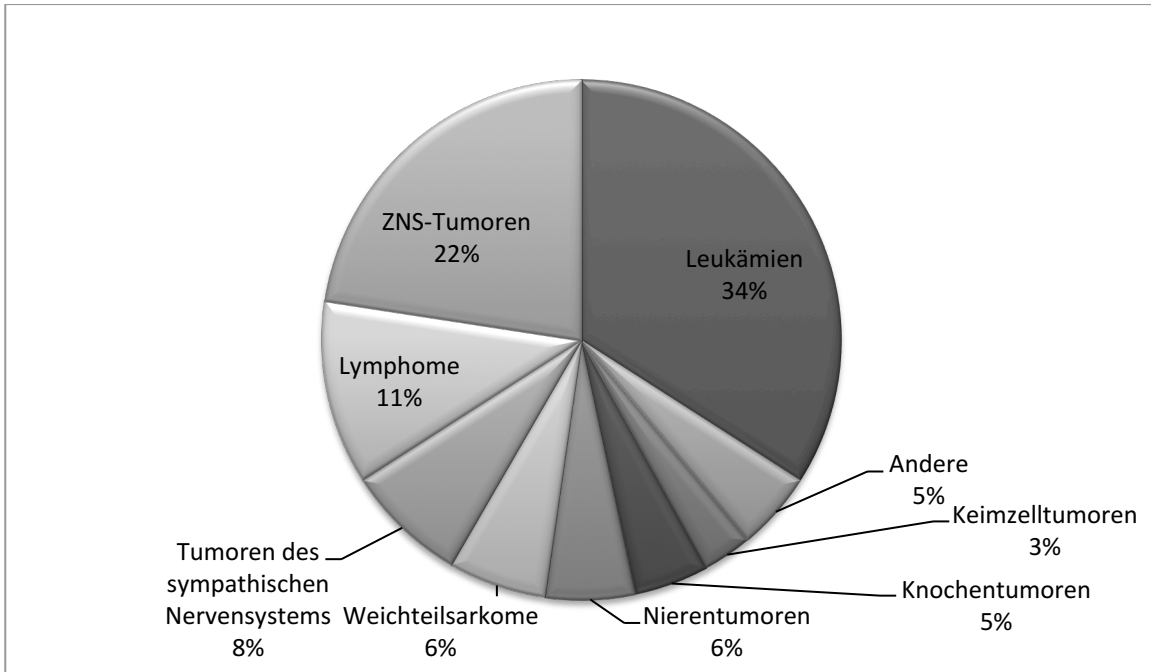
Die ca. 1800 jährlichen Neuerkrankungen bei Kindern machen jedoch nur einen geringen Anteil von ca. 0,4 % der insgesamt 426.800 bösartigen Neuerkrankungen in Deutschland (Stand: 2006) aus (50).

### **1.2 Entitäten und Häufigkeitsverteilungen**

Anders als die Mehrheit der malignen Erkrankungen des Erwachsenenalters entstammen die meisten kindlichen Neoplasien nicht dem epithelialen Gewebe. Viele kindliche Tumoren, wie Wilms-Tumoren, Neuroblastome, Retinoblastome, Hepatoblastome oder Medulloblastome entstehen als embryonale Tumoren durch Gewebefehldifferenzierung bei der Organentwicklung. Andere, wie Rhabdomyosarkome, Ewing-Sarkome oder Osteosarkome haben ihren Ursprung in Zellen des Binde- und Stützgewebes. Die bei Kindern häufigen Leukämien leiten sich aus Blut- und Blutstammzellen ab. Einen Überblick über die Anteile der einzelnen Diagnosegruppen an der Gesamtheit der pädiatrischen malignen Neoplasien gibt Abb.1. Die größten Diagnosegruppen, Leukämien, ZNS-Tumoren und Lymphome, machen zusammen etwa zwei Drittel (68,2%) der kindlichen malignen Neoplasien aus (27).



Abb.1.1: Anteile der einzelnen Diagnosen-/gruppen an der Gesamtheit der pädiatrischen malignen Neoplasien (27).



### 1.3 Prognosen und Mortalitätsraten

Über alle pädiatrischen Malignome hinweg hat sich in den letzten 30 Jahren die Überlebenswahrscheinlichkeit von einer 5-Jahres-Überlebensrate von 67 % am Anfang der 80er Jahre auf mittlerweile 83 % gesteigert (50). Die Mortalitätsrate konnte auf 2,5 Todesfälle pro 100000 Kinder im Diagnosejahr 2002 gesenkt werden (27).

Dieser Erfolg ist der differenzierteren Diagnostik und dem Einsatz multimodaler Therapieansätze zu verdanken (50). Die Unterschiede in der Prognose sind jedoch für die verschiedenen Diagnosen sehr groß, wie in Tab.1 dargestellt.

Tab.1: 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei ausgewählten Diagnosegruppen bei unter 15-jährigen Patienten der deutschen Bevölkerung in einem gegebenen Diagnosezeitraum. Die Zahlen beruhen auf Hochrechnungen (27).

<b>Diagnose/-gruppe mit Diagnosezeitraum</b>	<b>5-Jahres-Überlebensrate</b>
alle Malignome (2002-2006)	81%
Leukämien (2002-2006)	86%
Retinoblastome (1998-2007)	97%
Lymphome (2002-2006)	93%
ZNS-Tumoren (2002-2006)	72%
Neuroblastome (2002-2006)	75%
Osteosarkome (1998-2007)	72%
Ewingsarkome (1998-2007)	67%
Rhabdomyosarkome (1998-2007)	67%

#### **1.4 Therapieoptionen**

Der schon oben erwähnte multimodale Therapieansatz besteht aus einer alleinigen oder kombinierten Behandlung mit Poly- oder Monochemotherapie, Bestrahlung und chirurgischer Therapie. Der Einsatz der verschiedenen Modalitäten ist abhängig von der Diagnose, dem Stadium der Erkrankung, dem Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten und erfolgt regulär im Rahmen von Studienprotokollen. Ergänzende Maßnahmen, wie die Hyperthermie, bleiben speziellen Indikationen und Einzelfällen vorbehalten (150).

Durch die Kombination der unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten bei der kurativen Primärtherapie können die Nebenwirkungen der einzelnen Behandlungsoptionen bei vergleichbarer Effektivität oft reduziert werden (115).

### **1.4.1 Radiotherapie**

Im Zuge der generellen Prognoseverbesserung im Bereich pädiatrischer Neoplasien sind die Konzepte der Behandlung mit ionisierenden Strahlen einem starken Wandel unterworfen gewesen. So ist die Reduktion der therapieassoziierten Spätfolgen heutzutage ein wichtiges Ziel bei der Weiterentwicklung von Therapieprotokollen (115). Im Rahmen der Anpassung der Therapiekonzepte kann bei einigen Malignomen und deren Subgruppen (ALL, NHL, Nephroblastome, Neuroblastome) heute auf die früher übliche Bestrahlung verzichtet werden (115). Dennoch ist die Strahlentherapie bei bestimmten Indikationen weiterhin unverzichtbar und erfolgt dann meist im Rahmen eines multimodalen Konzeptes nach einer chirurgischen Resektion und/oder Kombination mit Chemotherapie (116,117). Bei nicht kurativ behandelbaren Patienten wird die Strahlentherapie oftmals zur Palliation eingesetzt (115).

### **1.4.2 Chirurgische Therapie**

Die operative Behandlung eines soliden Tumors geschieht regelhaft im Rahmen eines therapeutischen Gesamtkonzeptes. Hierbei sind Entität und Ausbreitung des Tumors ebenso zu berücksichtigen wie die Operabilität des Tumors, das Alter des Patienten und die zu erwartenden postoperativen Einschränkungen. Die Entscheidung zur Operation sollte gemäß und im Rahmen der entsprechenden Studienprotokolle erfolgen (87).

### **1.4.3 Chemotherapie**

Die wichtigste Säule in den Behandlungskonzepten pädiatrischer maligner Neoplasien ist die Chemotherapie. Hierbei spielt die konventionelle Chemotherapie eine herausragende Rolle und wird diese wohl auch in nächster Zeit behalten (57). Die Neu- und Weiterentwicklung der konventionellen Chemotherapeutika hat entscheidenden Anteil an der oben erwähnten Prognoseverbesserung der pädiatrischen Malignome, allerdings mit dem Preis der oftmals lebensbedrohlichen Toxizität auf Grund der geringen Selektivität der verfügbaren Substanzen (58). Regelmäßig werden Chemotherapeutika, meist in Form einer Polychemotherapie, im multimodalen Behandlungskonzept angewandt. Klinische und molekularpharmakologische Beobachtungen unterstützen das Konzept der Polychemotherapie, da es die Heterogenität der malignen Zellen besser berücksichtigt und somit eine Selektion von

resistenten Zellen wirksamer verhindert (57). Weitere Vorteile liegen in der geringeren Toxizität im Vergleich zu höher dosierten Monochemotherapien und in den Unterschieden im zellulären Wirkmechanismus (57). Das Prinzip der Kombination unterschiedlicher Wirkstoffe wurde auch in dieser Arbeit aufgegriffen. Es ist nicht zu erwarten, dass die hier geprüften Substanzen als alleinige Medikation bei pädiatrischen Malignomen zum Einsatz kommen. Vielmehr sollen gemäß den Prinzipien der Polychemotherapie eventuell vorliegende synergistische oder additive Effekte in den Kombinationsversuchen aufgedeckt werden.

#### **1.4.4 Zielgerichtete Therapie**

Der molekularbiologische Wissenszuwachs der letzten Jahrzehnte führte zur Entwicklung neuer Strategien und Substanzen zur Behandlung von Malignomen (4). Durch das gewonnene Verständnis von molekularpathologischen Prozessen konnten bereits in diese Abläufe zielgerichtet eingreifende Substanzen erfolgreich im klinischen Alltag etabliert werden. So ist der monoklonale Antikörper Trastuzumab bei der Therapie des HER-2-Rezeptor (Human Epidermal Growth Factor 2) positiven Mammakarzinoms erfolgreich etabliert worden (139). Ein weiteres erfolgreiches Beispiel ist der Einsatz von all-trans Retinsäure bei der Behandlung der akuten promyelozytären Leukämie (141) oder die Zulassung von Bevacicumab, eines Inhibitors des Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptors (VEGF-Rezeptor) zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms (92).

Unter „*Target-specific-drugs*“ werden Substanzen verstanden, die spezifisch protoonkogene Signalkaskaden und Schlüsselmoleküle inhibieren und so eine Tumorprogression oder ein Tumorwachstum verhindern oder einschränken (102). Hierbei macht man sich die Onkogen-Abhängigkeit bestimmter Krebszellen zu Nutze, ein Phänomen, welches darauf beruht, dass bestimmte Krebszellen und deren Proliferation von der Aktivität eines einzelnen Genprodukts abhängen (26,120). Die so entwickelten Arzneistoffe sollen maligne Zellen gezielt angreifen und gesunde Zellen nicht beeinflussen, um sicherer und effektiver als konventionelle Zytostatika zu wirken (59). Die Entwicklung dieser „*Target-specific-drugs*“ wurde in den letzten Jahren zur Verbesserung der Therapie onkologischer Erkrankungen stark vorangetrieben

(103). „*Target-specific-drugs*“ sind nach der Definition des National Cancer Institutes Substanzen, die das Wachstum oder die Ausbreitung von Malignomen behindern, indem sie mit spezifischen Molekülen interagieren, die für das Tumorstadium verantwortlich gemacht werden (102). Zwei der hier untersuchten Substanzen, SAHA und Tyrphostin AG1478 haben definierte Zielmoleküle. In beiden Fällen werden diese Zielmoleküle mitverantwortlich für Tumorentstehung- oder Wachstum gemacht. Beide Substanzen sind somit den „*Target-specific –drugs*“ zuzuordnen.

### **1.5 Einführung zu Tyrphostin AG1478**

Proteinkinasen spielen in gesunden, eukaryoten Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Signaltransduktion (84) und sind somit potentiell Ziel der „*Target-specific-drugs*“. In Krebszellen fehlregulierte oder überexprimierte Proteinkinasen beeinflussen für die Tumorprogression wichtige Prozesse, wie den Stoffwechsel, die Transkription, den Zellzyklus, das Arrangement des Zytoskeletts, die Apoptose und die Differenzierung (84).

Mehr als die Hälfte der bekannten Proteinkinasen gehören zur Familie der transmembranösen Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche eine intrinsische, ligandenabhängige, katalytische Aktivität besitzen (127).

In gesunden Zellen wird die Aktivität dieser Rezeptor-Tyrosinkinasen streng reguliert und eine Mutation oder Strukturveränderung kann stark onkogen wirken und eine Zelltransformation fördern (5).

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ist einer dieser transmembranösen Rezeptor-Tyrosinkinasen zur Regulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Invasion und Apoptose (90). Zur EGFR-Familie, oder auch ErbB-Familie genannt, gehören der prototypische EGFR (auch ErbB1 oder HER1 (Human Epidermal Growth Factor Receptor) genannt), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (14). Alle Rezeptoren dieser Familie verfügen über eine extrazelluläre ligandenbindende Domäne, eine membrandurchspannende Region und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität (52). Eine Ligandenbindung an den Rezeptor führt zur Konformationsänderung und Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität, die wiederum die Phosphorylierung bestimmter zytoplasmatischer

Tyrosinreste zur Folge hat (52). Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstelle für eine Reihe weiterer Proteine, die verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden kontrollieren (52). Im Tumorgewebe beeinflussen diese Signalkaskaden die Tumorangiogenese, fördern die Transkription von regulatorischen Proteinen und die Tumorzellproliferation (52). Dies geschieht z.B. durch Aktivierung der Mitogen-Activated Proteinkinase-Signalkaskade (MAPK) (153), der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (107) oder durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus der Signal Transducer and Activator of Transcription-Familie (STAT) (82).

Eine pathologische Veränderung der Aktivität des EGFR konnte in einer großen Bandbreite von menschlichen Tumoren nachgewiesen werden: Hierzu zählen Tumoren des zentralen Nervensystems, Kopf- und Halstumoren, Kolonkarzinome und Tumoren des Pankreas und der Lunge (31). Des Weiteren Magen-, Brust- und Ovarialkarzinome (52). Meist handelt es sich um eine Hochregulation der Signalwege auf Grund einer Rezeptormutation, einer Genamplifikation, einer Überexpression des Rezeptors oder durch eine autokrine Überstimulation durch spezifische Rezeptorliganden (61,152).

Dieser Ansatz wird bei der Entwicklung und Erforschung von „*Target-specific-drugs*“, die auf den EGFR abzielen, verfolgt. Die Aktivität von Tyrosinkinase soll beeinflusst und die nachgeschalteten Signalkaskaden somit moduliert werden.

Hierbei muss zwischen zwei Hauptgruppen der auf den EGFR abzielenden Arzneitherapien unterschieden werden: monoklonale Antikörper und an der ATP (Adenosintriphosphat) -Bindungsstelle kompetitiv wirkende Tyrosinkinase-Inhibitoren (147).

Unter den monoklonalen Antikörpern sind zwei Substanzen hervorzuheben: Die von der Food and Drug Administration (FDA) in Kombination mit anderen Therapieoptionen oder als Einzeltherapie zur Behandlung des Kolorektalen Karzinoms und des Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Halsbereichs zugelassenen Antikörper Cetuximab und Panitumumab (104,105,119).

Die zweite Gruppe der auf den EGFR abzielenden Substanzen umfasst die niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren, von denen heute drei in der klinischen Anwendung sind: Erlotinib, Gefitinib und Lapatinib. Erlotinib wird in den U.S.A. regelmäßig gegen das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom eingesetzt (81) und inhibiert spezifisch den EGFR (147), Lapatinib wird bei Patienten mit einem HER2-positiven

Mammakarzinom, die nicht mehr auf den HER2 Antikörper Trastuzumab reagieren angewandt und inhibiert zusätzlich zu HER1 auch HER2 (147). Gefitinib wird in Japan gegen das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom eingesetzt und inhibiert HER1 (147). Erlotinib, Gefitinib und Lapatinib sind alle drei reversible, an der ATP-Bindungsstelle des Rezeptors kompetitiv wirkende Tyrosinkinase-Inhibitoren (147). Weitere, irreversible EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren, die sich derzeit in verschiedenen Phasen der klinischen Testung oder deren Vorbereitung befinden sind z.B. BIBW-2992, Neratinib (HKI-272), Canertinib (CI-1033), PF00299804 und XL-647 (147).

Unter den verschiedenen Klassen der niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren scheinen die Quinazoline die vielversprechendsten Eigenschaften aufzuweisen und sind im Rahmen klinischer Studien und präklinischer Evaluationen am weitesten fortgeschritten (31).

Der in dieser Arbeit verwendete Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin AG1478 ((4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline) gehört wie Gefitinib und Erlotinib zur Gruppe der Quinazoline (31). Tyrphostin AG1478 hemmt hochpotent den EGFR (ErbB1) kompetitiv und reversibel (31) an der ATP-Bindungsstelle der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne (80) mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von ca. 3 nM (112).

Von den in der klinischen Prüfung schon weiter getesteten Quinazolinen unterscheidet sich Tyrphostin AG1478 durch hydrophile Seitenketten (12,31).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Tyrphostin AG1478 sowohl in vitro an Zelllinien aus Kolonkarzinomen (112) nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (142), Glioblastomen (104), Karzinomen des Nasopharynx (156), Plattenepithelkarzinomen (13), Nephroblastomen (101), als auch in vivo an Glioblastom- und Mammakarzinom-Mausmodellen (76,99) eine antiproliferative Wirkung hat.

Tyrphostin AG1478 sorgt in Kombination mit anderen Chemotherapeutika außerdem für eine verbesserte zytotoxische Wirkung. Dies gilt für Cisplatin (31,55), Doxorubicin (31), Temozolomid (55) und spezifische EGFR-Antikörper (55).

Der Einfluss von Tyrphostin AG1478 auf das Tumorzellwachstum in vitro wurde im Bereich der pädiatrischen Tumoren noch nicht ausreichend untersucht und das in dieser Arbeit verwendete Screening am Tumorzellpanel ist hierzu gut geeignet. Die Hinweise auf die synergistischen Effekte des Einsatzes von EGFR-Inhibitoren mit anderen

Chemotherapeutika geben zudem Anlass zur Überprüfung der Wirksamkeit in Kombination mit etablierten Substanzen, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Die Konzentrationsauswahl für den in dieser Arbeit verwendeten Assay erfolgte in Anlehnung an bisher gewonnene präklinische In-vitro-Daten (31). Ziel war es, ein Konzentrationsspektrum abzudecken, in dem eine etwaige Wachstumshemmung zu erwarten wäre. Für Tyrphostin AG 1478 liegen Daten vor, die nahelegen, dass in dieser Arbeit applizierte Substanzkonzentrationen auch in vivo erreicht werden können (30).

## **1.6 Einführung zur Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)**

Für die Entstehung maligner Neoplasien werden ursächlich Genmutationen, Deletionen und chromosomale Veränderungen verantwortlich gemacht (48). Diese können zu einer Fehlfunktion oder -regulation von Tumorsuppressorgenen oder einer Aktivierung von Onkogenen führen und so ein Tumorwachstum auslösen oder unterhalten (48,69). Es mehren sich aber Hinweise, dass die Genexpression, die von epigenetischen Prozessen kontrolliert wird, ebenfalls maßgeblich an der Krebsentstehung beteiligt ist (32,138).

### **1.6.1 Histonmodifikation durch HAT und HDAC**

Ein entscheidender Faktor in der epigenetischen Regulation der Genexpression ist das jeweilige Vorhandensein oder Fehlen von chemischen Modifikationen an Histonen (10). Histone bilden zusammen mit der DNA die Nukleosomen. Nukleosomen sind die strukturellen Untereinheiten des Chromatins und essentiell für die Verpackung der DNA im Chromatin (96). Die dem Nukleosomenkern abgewandte Schwanzregion der Histone unterliegt entscheidenden regulatorischen Modifikationen (125). Bei diesen Modifikationen handelt es sich unter Anderem um Acetylierungen (10). Hierbei spielen die entgegengesetzte Aktivität der Histonacetyltransferasen (HAT) und der Histondeacetylasen (HDAC) bei der Regulation der Genexpression durch die Chromatinmodifikation eine wichtige Rolle (131,142).

### **1.6.2 Weitere Funktion der HAT und HDAC**

Über die oben beschriebenen Substrate der HAT und HDAC hinaus, können Acetylierungen auch an einer Reihe von Proteinen und weiteren Substraten



vorgenommen werde (96). Histone sind sicherlich die häufigsten Substrate der HAT und HDAC, es ist aber nicht auszuschließen, dass unter den Nicht-Histonen weitere für die Onkogenese wichtige Substrate zu finden sind (96).

So beeinflusst der Acetylierungsstatus von Proteinen deren Stabilität (43,96) und damit deren Lebensdauer (96). Der Acetylierungsstatus hat auch Auswirkungen auf die Protein-Protein Interaktion und trägt so z.B. zur Steuerung des Transkriptionsprozesses (96,97) und der Einleitung der Apoptose bei (23). Des Weiteren beeinflussen Alterationen des Acetylierungsstatus die Lokalisation von Proteinen auf subzellulärer Ebene (96) und regulieren die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA (15). So wird z.B. die Aktivität des Tumorsuppressors p53 (8) und die DNA-Affinität des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor  $\kappa$ B durch HAT und HDAC reguliert (16).

### **1.6.3 HAT, HDAC und Tumorentstehung**

Im physiologischen Gleichgewicht übertragen HAT Acetylgruppen auf die aminoterminalen Lysinreste in Histonen (131). Dies führt zu einer lokal begrenzten Expansion des Chromatins und einer besseren Erreichbarkeit der DNA für regulatorische Proteine (131). HDAC hingegen katalysieren die Entfernung von Acetylgruppen und begünstigen so eine Kondensation des Chromatins und eine Unterdrückung des Transkriptionsprozesses (131,142).

Eine vom normalen Status abweichende Acetylierung von Histonen wird eng mit der Entstehung von Neoplasien in Verbindung gebracht (54). So konnte eine Beteiligung der HDAC bei der Entstehung der akuten promyelozytären Leukämie nachgewiesen werden (95). Der Arrest der leukämischen Zellen im promyelozytären Stadium der Differenzierung wird durch die Fehlregulation eines HDAC beinhaltenden Komplexes und der damit verbundenen Unterdrückung der Transkription von differenzierungsfördernden Genen aufrechterhalten (96).

Es scheint auch eine Verbindung von post-translationalen Modifikationen in Form von Veränderungen am Acetylierungsstatus an Nicht-Histonen und der Entstehung von Neoplasien zu geben. Untersucht wurde dieses am Beispiel einer akuten promyelozytären leukämischen Zelllinie (53). Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Acetylierung des Tumorsuppressors p53 zur Instabilität und Degradierung von p53 führt und als Folge dessen protoonkogen wirkt (53). Bei soliden

Tumoren gibt es lückenhafte, dennoch deutliche, Belege für das Vorliegen von Imbalancen beim Acetylierungsstatus (96). So weisen eine große Anzahl von Tumorzelllinien und Primärtumoren, im Gegensatz zu gesunden Zellen, eine Überexpression von HDAC auf (17,46,151). Auch deshalb verwundert es nicht, dass HDAC intensiven Forschungsanstrengungen unterliegen und als vielversprechendes Ziel von medikamentösen Interventionen gelten (10).

Besonders reizvoll scheint dieser Ansatz zu sein, da er die Möglichkeit bietet, den nachgeschalteten Transformationsprozess in einer großen Breite zu beeinflussen und nicht nur am Ende eines fehlgeleiteten molekularen Pfades zu intervenieren (56). Andererseits werden durch diesen breiten Ansatz auch viele nicht am neoplastischen Geschehen beteiligte und wichtige Zellfunktionen gestört (96).

#### **1.6.4 HDAC-Inhibitoren**

Zur Klassifikation der verschiedenen HDAC-Inhibitoren kann ihre chemische Struktur herangezogen werden. So gibt es Hydroxamate, zu denen SAHA gehört, zyklische Peptide, aliphatische Säuren und Benzamide (64). Eine funktionelle Einteilung orientiert sich an der Hemmung der verschiedenen Klassen der humanen HDAC. Von diesen Klassen sind drei beschrieben: Klasse 1 umfasst die HDAC 1, 2, 3 und 8, mit einem Molekulargewicht von 22-55 kDa (64). Klasse 2 besteht aus den HDAC 4, 5, 6, 9 und 10 mit einem höheren Molekulargewicht (64). Die dritte Klasse der HDAC ist NAD-abhängig, scheint Histone nicht als Hauptsubstrat zu haben und wird von den üblichen HDAC-Inhibitoren nicht inhibiert (64). Es gibt unter den HDAC-Inhibitoren unselektive, d.h. sie inhibieren Klasse 1 und Klasse 2 HDAC, hierzu zählt auch SAHA, welches eine breite biologische Aktivität aufweist (10). Die selektiven HDAC-Inhibitoren hemmen entweder klassenspezifisch oder nur bestimmte HDAC (10).

#### **1.6.5 Wirkungsweise der HDAC-Inhibitoren, insbesondere SAHA**

Wie oben beschrieben, hat der Acetylierungsstatus von Histonen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression (64). HDAC-Bindungsstellen sind im Chromatin weitverbreitet und eine Inhibierung von HDAC, wie z.B. durch SAHA, führt zu einer vermehrten oder verminderten Genexpression bei bis zu 20 % aller bekannten Gene (44,96,114). Die nachgewiesene antiproliferative Wirkung von SAHA beruht auf der

Beeinflussung der Genexpression: SAHA beeinflusst, wie oben geschildert, direkt die Chromatinstruktur und verändert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch die Modifikation des Acetylierungsstatus des Protein-Transkriptionsfaktor-Komplexes (64). Ein durch SAHA induziertes Gen ist z.B. CDKN1A. Die Induktion von CDKN1A kann zu einem G<sub>1</sub>-Phasen-Arrest im Zellzyklus führen (64).

Wie bereits erwähnt haben HDAC auch viele Nicht-Histone als Substrate (85) und HDAC-Inhibitoren somit Einfluss auf diese. Als solches Nicht-Histon Substrat ist z.B. der Tumorsuppressor p53 zu nennen. Dessen Acetylierung führt zu einer vermehrten Transkription p53-regulierter Gene (64,85). Ein weiteres Beispiel ist der transkriptionshemmende Faktor BCL6, dessen Aktivität in einigen Lymphomen erhöht ist, und dessen Aktivität durch Acetylierung inhibiert wird (6).

Die durch die Anwendung von SAHA gesteigerte Acetylierung von Proteinen wie  $\alpha$ -Tubulin und Hitzeschockprotein 90 führt bei diesen zu einer Funktionsänderung und wirkt daraufhin antiproliferativ (64). Zusätzlich scheinen HDAC-Inhibitoren eine hypoxisch induzierte Tumorangiogenese über noch nicht verstandene Signalwege zu bremsen (79). Die beschriebenen mannigfaltigen Angriffspunkte der HDAC-Inhibitoren machen es unwahrscheinlich, dass sich ein einziger molekularer Mechanismus identifizieren lässt, der zur Abtötung von Tumorzellen führt (10). Es ist eher anzunehmen, dass die Wirkung der HDAC-Inhibitoren zelltypabhängig ist und auch verschiedene HDAC-Inhibitoren auf Grund ihrer Selektivität an gleichen Zellen unterschiedliche Effekte haben (10). Derzeit sind die molekularen Mechanismen, die zur nachgewiesenen Abtötung neoplastischer Zellen führen, nicht ausreichend aufgedeckt (10). Nicht zu vergessen ist auch die Möglichkeit, dass es HDAC-Inhibitor-abhängige Signalkaskaden geben könnte, die dem therapeutischen Ziel der antiproliferativen Wirkung entgegenstehen (96).

Eine abschließende und umfassende Erklärung der nachgewiesenen antiproliferativen Effekte von SAHA und anderer HDAC-Inhibitoren steht demnach noch aus.

#### **1.6.6 Studienlage bezüglich SAHA**

HDAC-Inhibitoren, wie die in dieser Arbeit verwendete SAHA, induzieren in unterschiedlichem Ausmaß eine Wachstumshemmung, eine Differenzierung oder die Einleitung der Apoptose, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* (56).

Hierbei reagieren gesunde Zellen überwiegend weniger empfindlich auf die Applikation von SAHA als neoplastische Zellen (126).

#### **1.6.6.1 Antineoplastische Wirkung von SAHA in vitro**

Es konnte gezeigt werden, dass SAHA an einem breiten Spektrum von neoplastischen Zelllinien eine antiproliferative Wirkung hat. Diese Zelllinien gehören zu folgenden Tumorentitäten: Lymphome, Myelome, Leukämien, Mesotheliome, nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Blasenkarzinome, Kolonkarzinome, Schilddrüsenkarzinome, Mammakarzinome, Pankreaskarzinome, Glioblastome, Prostatakarzinome, Ovarialkarzinome, Melanome, Nierenzellkarzinome und Endometriumkarzinome (85,126).

Die bei diesen Versuchen für eine Wachstumshemmung von 50%, im Vergleich zur unbehandelten Kultur, benötigten Konzentrationen lagen im Bereich von 0,5 bis 10  $\mu\text{M}$  (126). Die Wachstumshemmung variierte, auch bei unterschiedlichen Zelllinien einer Tumorentität (126). Es werden aber, wie oben bereits erwähnt, nicht nur transformierte Zellen im Wachstum gehemmt, sondern auch gesunde Zellen, allerdings in geringerem Maße (126).

Es wurde beschrieben, dass SAHA in Kombination mit anderen antineoplastischen Substanzen synergistische oder additive Effekte aufweist (64). Zu diesen Substanzen zählen: Anthrazykline, Fludarabin, Imatinib, Bortezomib und antiangiogenetisch wirksame Substanzen (64).

#### **1.6.6.2 Antineoplastische Wirkung von SAHA in klinischen Studien**

Mehrere klinische Phase 1 Studien wurden im Bereich hämatologischer Neoplasien durchgeführt (118). In unterschiedlichem Umfang wurden hierbei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen, diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen, kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL), fortgeschrittenen Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen eingeschlossen (118). Diese und weitere Phase 1 Studien lieferten zudem erste Hinweise auf die Aktivität von SAHA gegen Blasenkarzinome, Prostatakarzinome, Mammakarzinome und papilläre Schilddrüsenkarzinome (63,65,86,124,132).

In der ersten durchgeführten Phase 1 Studie, bei der 35 Patienten eingeschlossen wurden, konnte ein Tumorrückgang bei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen, diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und kutanen T-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden (108). In den sich daran anschließenden Phase 2 Studien konnte die Beobachtung an Patienten mit CTCL mit Remissionsraten von 23% (30) bzw. 30% (109) bestätigt werden.

Das in den initial durchgeführten Phase 1 Studien beobachtete sporadische Ansprechen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie auf die Therapie mit SAHA konnte in einer weiteren Phase 1 Studie für Patienten mit fortgeschrittenen Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen ebenfalls beobachtet werden (42).

Das Ansprechen von soliden Tumoren in Phase 1 Studien hat Erwartungen geweckt, die jedoch durch weitere Phase 2 Studien (11,24,40,70,75,145) größtenteils nicht erfüllt wurden.

#### **1.6.7 Unerwünschte Wirkungen von SAHA**

Die häufigsten unerwünschten Wirkungen bei der oralen Gabe von SAHA waren Fatigue, Diarrhö, Anorexie, Dehydration und milde Thrombozytopenie (86,108). Die unerwünschten Wirkungen waren im Schweregrad meist mild bis moderat ausgeprägt (118). Bei intravenöser Applikation ist die dosislimitierende unerwünschte Wirkung meist die Thrombozytopenie (65,86).

#### **1.6.8 Zulassung von SAHA**

Auf Basis der bis dahin verfügbaren Daten wurde SAHA 2006 unter dem Handelsnamen Zolinza von der FDA für die Behandlung von Patienten mit progressiven, persistierenden oder rezidivierenden kutanen T-Zell-Lymphomen als Drittlinientherapie zugelassen (36,157). Der Antrag auf Zulassung in der Europäischen Union für ein ähnliches Indikationsspektrum wurde 2009 vom Antragssteller zurückgezogen, da er die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Entscheid als sehr gering einstufte (157). Die europäische Zulassungsbehörde vertrat die Ansicht, „dass der Nutzen von SAHA nicht hinreichend nachgewiesen worden war und ein etwaiger Nutzen die zu erwartenden Risiken nicht überwog“ (157). Zu Beginn des Jahres 2013

wurden 241 klinische Studien der verschiedenen Phasen mit SAHA als Einzeltherapie oder in Kombination mit verschiedenen anderen Behandlungen gelistet (106).

## **1.7 Einführung zu Carmustin**

### **1.7.1 Entdeckung und Einführung**

Carmustin wurde im Rahmen eines Medikamentenentwicklungsprogramms des National Cancer Institutes (NCI) synthetisiert und zeigte in seiner Testung am Tiermodell eine antitumoröse Wirkung (135).

Klinische Studien zur Testung der antineoplastischen Wirkung von Carmustin wurden in den U.S.A. seit 1964 durchgeführt (148). Diese führten zu einer Zulassung von Carmustin zur Behandlung von Gehirntumoren, des Morbus Hodgkin und anderer Lymphome und Myelome (148).

### **1.7.2 Wirkmechanismus**

Carmustin gehört zur Gruppe der alkylierenden Zytostatika. Die Gemeinsamkeit von Substanzen dieser Gruppe besteht in ihrer phasenunspezifischen Fähigkeit zur Alkylierung von Nukleinsäuren, was mittelbar zur Beeinträchtigung der Nukleinsäuresynthese und damit zur Störung der Zellteilung führt (98). Alkylantien fördern DNA-Zwischenstrang- und Proteinvernetzungen. Hierdurch wird die Replikation und Transkription gestört. Alkylantien sind zytotoxisch, mutagen und kanzerogen (60). Carmustin ist, wie Lomustin und Nimustin, ein N-Nitrosoharnstoff-Derivat. Zusätzlich zur Nitrosogruppe besitzen sie Chlorethyl-Reste und haben somit eine chemische Ähnlichkeit mit Stickstoff-Lost-Derivaten (98). Carmustin führt zu einer Vernetzung von DNA-Strängen durch die Ausbildung von Ethylverbindungen. Dieses führt zu einer Unterbrechung der DNA-Replikation und als Folge zur Störung der Zellteilung (73,83). Zusätzlich zur Alkylierung der DNA hemmen Abbauprodukte der Nitrosoharnstoffe die DNA-Polymerase und über die Replikation hinaus auch die Reparatur von DNA-Schäden (98).

### **1.7.3 Unerwünschte Wirkungen**

Die schweren Nebenwirkungen der Nitrosoharnstoffderivate limitieren den Einsatz in der Klinik (98). So kommt es bei einigen Patienten zu einer, manchmal tödlichen, verzögerten Myelosuppression, die ca. 3-5 Wochen nach Substanzgabe auftritt und noch nicht abschließend erklärt werden konnte (148). Ein weiteres Problem stellt die potentiell lebensbedrohliche pulmonale Toxizität von Carmustin in Form einer fibrosierenden Alveolitis oder einer interstitiellen Pneumonitis dar (149). Studien legen nahe, dass bei hohen kumulativen Dosen (1200-1400 mg/m<sup>2</sup>) das Risiko einer pulmonalen Affektion fast 50% erreicht (148). Weitere häufige Nebenwirkungen sind Übelkeit und Erbrechen, seltene Nebenwirkungen umfassen die Beeinflussung der Nierenfunktion, Enzephalopathie, Visusstörungen, Venenreizungen bei Infusion, Gynäkomastie und das Auslösen von akuten Leukämien (148).

### **1.7.4 Heutige Indikationen**

Die Lipophilie der Nitrosoharnstoffderivate erlaubt eine gute Penetration ins zentrale Nervensystem und ist somit Grundlage für den heutigen Einsatz bei Hirntumoren (77,98). Weitere Therapieindikationen sind maligne Lymphome und andere Karzinome (98).

## **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Die in der Klinik weitverbreiteten Prinzipien der Polychemotherapie sollen sich auch in dieser Arbeit widerspiegeln. Es ist nicht zu erwarten, dass die hier geprüften Substanzen als alleinige Medikation bei pädiatrischen Malignomen zum Einsatz kommen. Vielmehr sollen gemäß den Prinzipien der Polychemotherapie, eventuell vorliegende synergistische oder additive Effekte in den Kombinationsversuchen aufgedeckt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche dienen der präklinischen Evaluation der eingesetzten Substanzen an einem breit angelegten, aus 18 Zelllinien bestehenden, pädiatrisch-onkologischen Panel. Es soll eine fundierte, erste Einschätzung der zytostatischen Aktivität der jeweiligen Substanz bei einer Reihe pädiatrischen Neoplasien ermöglichen.

Zu diesem Zweck sollen die antiproliferativen Wirkungen eines herkömmlichen Zytostatikums und zweier neuer Substanzen aus der Gruppe der „*Target-specific-Drugs*“ erforscht werden.

Aus diesem Ansatz heraus ergeben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

- Sind die beschriebenen antiproliferativen Wirkungen der getesteten Substanzen auch an diesem pädiatrisch-onkologischen Zellpanel reproduzierbar?
- Gibt es besondere Auffälligkeiten bei der Sensibilität oder Resistenz einer Tumorentität gegenüber einer eingesetzten Substanz?
- Zeigen sich bei der Kombination der Substanzen synergistische antiproliferative Effekte oder wird ihre Wirkung wechselseitig abgeschwächt?
- In wie weit sind die Ergebnisse dieser Arbeit auf andere Modelle oder die Wirksamkeit am Menschen übertragbar?
- Sollte die Wirksamkeit der Substanzen in weiteren Untersuchungen evaluiert werden, oder ist es vielversprechender, andere Substanzen weiter zu untersuchen?

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Zelllinien**

Die Zytotoxizität und Wachstumshemmung der drei getesteten Substanzen wurde an 18 exemplarischen Tumorzelllinien typischer maligner Tumoren des Kinder- und Jugendalters getestet.

Dazu gehörten die vier leukämischen Zelllinien MOLT-4, CCRF-CEM, REH und HL-60, die vier Ewing-Sarkom-Zelllinien CADO-ES-1, STA-ET-1, STA-ET-2.1 und VH-64, die vier Neuroblastom-Zelllinien IMR-5, SMS-KCN, SHEP und SH-SY5Y, die zwei Medulloblastom-Zelllinien DAOY und UW228.2, die zwei Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST, die zwei Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH-30.



### **2.1.1.1 Leukämien**

#### **MOLT-4**

MOLT-4 ist eine Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines 19-jährigen Patienten mit einem Rezidiv einer akuten lymphoblastischen T-Zell Leukämie isoliert wurde (94) . MOLT-4 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) bezogen.

#### **CCRF-CEM**

Die T-ALL Zelllinie CCRF-CEM wurde 1964 aus dem Blut einer 3-jährigen Patientin mit kaukasischer Herkunft etabliert (35,89).

CCRF-CEM wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) bezogen.

#### **REH**

Die humane B-Zell-Vorläufer-ALL-Zelllinie REH wurde 1973 aus dem Blut einer 15-jährigen Nordafrikanerin etabliert (128).

REH wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) bezogen.

#### **HL-60**

Die AML-Zelllinie (FAB M2) HL-60 wurde 1976 aus dem Blut einer 35-jährigen Frau etabliert.

HL-60 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) bezogen.

### **2.1.1.2 Ewing-Sarkome**

#### **CADO-ES-1**

CADO-ES-1 wurde aus dem Pleuraerguss einer 19-jährigen japanischen Patientin etabliert. Primarius war ein pulmonal metastasiertes Ewingsarkom des Gesäßbereichs (71,72).

CADO-ES-1 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) bezogen.

#### STA-ET-1

Die Zelllinie STA-ET-1 wurde aus einem peripheren neuroektodermalen Tumor mit primärer Lokalisation im Humerus eines 13-jährigen Mädchens etabliert (110,146).

Die Zelllinie wurde von F. van Valen (Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Münster) bereitgestellt.

#### STA-ET-2.1

Diese Zelllinie wurde aus einem primären peripheren neuroektodermalen Tumor mit Lokalisation in der Fibula eines 15-jährigen Jungen isoliert (1,110).

Die Bereitstellung der Zelllinie erfolgte durch F. van Valen (Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Münster).

#### VH-64

Diese Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguss eines 24-jährigen Patienten mit metatarsalem Primärtumor und multiplen Lungenmetastasen etabliert (110,146).

Die Zelllinie wurde durch F. van Valen (Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Münster) bereitgestellt.

### **2.1.1.3 Neuroblastome**

#### IMR-5

Diese Zelllinie wurde aus der abdominalen Tumormasse eines 1-jährigen kaukasischen Jungen etabliert. IMR-5 ist ein Subklon der Zelllinie IMR.32 (34,74,113,144).

#### SMS-SMS-KCN

Diese Zelllinie wurde vor Therapiebeginn aus dem Tumor eines männlichen Patienten isoliert (66,123).

SMS-SMS-KCN wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. Poremba (Institut für Pathologie, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

**SHEP**

Diese Zelllinie ist ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH, welche 1970 aus der Knochenmarkbiopsie eines 4-jährigen Mädchens mit metastasiertem Neuroblastom etabliert wurde (129,133).

SHEP wurde freundlicherweise Prof Dr. C. Poremba (Institut für Pathologie, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

**SH-SY5Y**

Diese Zelllinie ist ebenfalls ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH (129,133).

SH-SY5Y wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) bezogen.

**2.1.1.4 Medulloblastome****DAOY**

DAOY entstammt einer Biopsie aus der hinteren Schädelgrube eines 4-jährigen kaukasischen Jungen. Die Zelllinie weist entgegen des originären Tumors keine gliale oder neuronale Differenzierung auf (49,121).

DAOY wurde von der Firma Promochem GmbH, Wesel, bezogen.

**UW228.2**

UW228.2 wurde aus einem Medulloblastom der hinteren Schädelgrube einer 9-jährigen Patientin etabliert (62).

UW228.2 wurde von PD Dr. Michael Frühwald (Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Uniklinikums Münster) und Prof. John Silber (Department of Neurological Surgery, University of Washington, Seattle, Washington) bereitgestellt.

**2.1.1.5 Osteosarkome****MNNG-HOS**

MNNG-HOS ist eine chemisch transformierte Zelllinie, die aus einem Osteosarkom einer 13-jährigen Patientin etabliert wurde (45,111).

MNNG-HOS wurde von der Firma Promochem GmbH, Wesel, bezogen.

OST

Ost wurde aus einem diaphysären osteoblastischen Osteosarkom des linken Femurs einer 15-jährigen Patientin etabliert (143).

OST wurde von Prof. Dr. C. Poremba (Pathologisches Institut, Universität Düsseldorf) bereitgestellt.

#### **2.1.1.6 Rhabdomyosarkome**

RD

RD wurde aus einem embryonalen Rhabdomyosarkom des Beckens einer 7-jährigen Patientin kaukasischer Abstammung etabliert (33,88).

RD wurde von der Firma Promochem GmbH, Wesel, bezogen.

RH-30

RH-30 wurde aus einer Knochenmarkmetastase eines 17-jährigen Patienten mit einem undifferenzierten alveolären Rhabdomyosarkom etabliert (29,33).

RH-30 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) bezogen.

#### **2.1.2 Testsubstanzen**

Carmustin ; 1,3-bis( 2-chloroethyl)-1-nitroso-urea. Carmustin wurde in der als Handelspräparat zugelassenen Formulierung und nicht als Reinsubstanz verwendet.

Bezugsquelle: Carmubris™ Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA (München, Deutschland)

Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). Bezugsquelle: Merck, Darmstadt, Deutschland

AG1478 hydrochloride; N-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-quinazolinanin hydrochloride, Bezugsquelle: Tocris Cookson Inc., Ellisville, Missouri, USA

**2.2.2 Nährmedium, Zusätze, Reagenzien**

RPMI 1640 Medium; GibcoBRL, Cat No.: 21875-034

Antibiotic-Antimycotic; GibcoBRL, Cat No.: 15240-062

(Penicillin G sodium 10.000 Units/ml,

Streptomycin sulphate 10.000 µg/ml

Amphotericin B als Fungizone® 25 µg/ml)

In 0,85 % NaCl) 5,5 ml Antibiotic-Antimycotic auf 500 ml

L-Glutamine (100x) 200 mol/L; GibcoBRL, Cat No.: 25030-024

FCS (Fötale Kälberserum) 50 ml (entsprech einem FCS Anteil im Medium von 10 %)

GibcoBRL, Cat No.: 10108-165

DMSO

Dimethylsulfoxid, Hybri Max, sterile; Sigma

Ethanol 96%

Apotheke des UKM Münster

Trypsin-EDTA-Solution (0,5g Trypsin, 0,2g EDTA pro Liter

in phosphatgepuffertes Salzlösung (PBS) (1x))

Lot-No.: H04121-254 PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Collagen

Collagen 1 Typ R, aus Rattenschwanz

6 mg/ml in 0,2% Essigsäure-Lösung, pH 3,2-4,0

Cell Concepts GmbH, Umkirch, Deutschland, Order No.: Z-

17C03-A

Verdünnt auf 0,2 mg/ml 0,1 N Essigsäure

Essigsäure

Fluka, Chemie AG; Neu Ulm, Deutschland EEC No.: 2005807

MTT

3[4,5- Dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide;

(Sigma, Deisenhofen, Deutschland; M2128, Lot.: 66H5033)

5 mg MTT pro ml in PBS (Phosphatgepufferte Saline, pH 7,4)

Lysepuffer                    20 g SDS (SDS-Sodiumdodecylsulphate; Sigma)  
 gelöst in 50 ml H<sub>2</sub>O und 50 ml DMF (N,N-Dimethylformamid);  
 Merck, Darmstadt, Deutschland

MycoAlert® Kit            Fa. Lonza, Köln, Deutschland

#### 2.1.4 Einmal-Laborbedarf

Zellkulturflaschen, steril, 25 cm <sup>2</sup>	Falcon, Becton Dickinson
Zentrifugenröhrchen, steril, 14 ml	Falcon, Becton Dickinson
sterile Pipetten, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml	Falcon, Becton Dickinson
Standardtips, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Kombitips, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Microtiterplatten, 96 Well	Microtest™ 96, Tissue Culture Plate Falcon, Becton Dickinson Labware Order No. 353072
Zytostatika-Handschuhe	Nitrile, 242 mm
Handschuhe	Satin Plus AQL 1,5; SafeSkin GmbH, Neufahrn

### 2.1.5 Laborgeräte

Eine ordnungsgemäße, qualifizierte und regelmäßige Wartung und Kalibration der folgenden Laborgeräte wurde durchgeführt.

Varipette, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Akkupipette	pipetus-akku; Hirschmann Laborgeräte
Sterile Werkbank	W.H. Mahl, Kaarst, Deutschland
CO <sub>2</sub> - Inkubator	SANYO Biomedical Produkte, Bad Nenndorf, Deutschland (Temp. 37°C, 7% CO <sub>2</sub> )
Mixerplatte	IKA-VIBRAX-VXR, electronic Typ VX2; Janke & Kunkel
Zellzähler	Casy Cell Counter; Modell TTC innovatis AG
Assay Reader	Dynatech MR 7000 mit Dynatech REVELATION Software Version G 3.04
Vakuumpumpe	KNF-Vacobox (1000mbar)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Umgang mit Zellkulturen**

#### **2.2.1.1 Wachstumsbedingungen**

Die Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen im Inkubatorschrank in einer kontrollierten, wasserdampfgesättigten Umgebungsatmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, das zusätzlich mit 2 mmol/L L-Glutamin und 10 % fötalem Rinderserum angereichert wurde, gezüchtet.

In Ergänzung zum sterilen Arbeiten wurden dem Nährmedium zur Kontaminationsprävention der Kulturen Antibiotika (10<sup>5</sup> U/L Penicillin, 100 mg/L Streptomycin) und Antimykotika (25 mg/L Amphotericin B) zugesetzt. Um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden die Kulturen in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen untersucht.

Die vier Leukämiezelllinien wuchsen in Suspension, die anderen 14 Zelllinien wuchsen adhärent. Dies war beim Passagieren der Zellen und beim Herstellen der Testansätze sowie bei der Durchführung der MTT-Tests zu beachten.

#### **2.2.1.2 Passagieren**

Zur Versorgung der Zellen mit frischem Medium und zur Gewährleistung eines ungestörten räumlichen Wachstums wurden diese in regelmäßigen Abständen passagiert.

Nach makroskopischer und mikroskopischer Beurteilung des Zellwachstums in der Kulturflasche wurde entschieden, ob der zuvor durchgeführte Teilungsrythmus beibehalten werden konnte. Entsprechend der Wachstumsraten wurden die Zellsuspensionen dann verdünnt und passagiert.

Dazu wurden unter der Werkbank sterile Arbeitsbedingungen geschaffen und der benötigte sterile Einwegbedarf an Pipettiermaterial und Kulturflaschen bereitgestellt. Das frische Nährmedium wurde auf Raumtemperatur erwärmt und der Flaschenhals sowie die Arbeitshandschuhe mit Flächendesinfektionsmittel gereinigt.

Bei den Suspensionszelllinien wurde entsprechend der gewünschten Teilungsrate



(s. Tab. 1) eine definierte Menge an Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und dort auf 5 ml mit frischem Medium aufgefüllt.

Tab.1, Verdünnung Suspensionszellen

Teilungsrate	Zellsuspension in ml	Zell-freies Kulturmedium in ml
1:2	2,5	2,5
1:3	1,7	3,3
1:4	1,25	3,75
1:5	1	4
1:6	0,8	4,2
1:7	0,7	4,3
1:8	0,6	4,4
1:9	0,55	4,45
1:10	0,5	4,5
1:15	0,3	4,7
1:20	0,25	4,75
1:30	0,16	4,84

Bei den adhärennten Zellen mussten diese vor dem eigentlichen Überführen zunächst vom Flaschenboden abgelöst werden. Dazu wurde zunächst das gesamte alte Nährmedium abgesaugt. Dann wurde ca. 300 µl Trypsin auf den Zellrasen pipettiert und geschwenkt, so dass die Zellen komplett benetzt waren. Nach einer Inkubation von ca. 5 Min. lösten sich die Zellen nun vom Flaschenboden ab. Die Zellen wurden nun nach Schema mit frischem Medium resuspendiert und anteilig in eine neue Kulturflasche überführt und dort mit zellfreiem Kulturmedium auf 5 ml aufgefüllt (s. Tab.2).

Tab.2: Verdünnung adhärenter Zellen

Teilungsrate	Zellfreies Kulturmedium in ml	Zellsuspension in ml
1:3	3	1
1:4	4	1
1:5	5	1
1:6	3	0,5
1:7	3,5	0,5
1:8	4	0,5
1:9	4,5	0,5
1:10	5	0,5
1:15	5	0,33
1:20	5	0,25

Die neuen Kulturflaschen wurden verschlossen, beschriftet und in den Inkubator gegeben. Im Inkubator wurden die Flaschenverschlüsse wieder leicht geöffnet, um einen ungehinderten Gasaustausch mit der Inkubatorluft zu ermöglichen.

### 2.2.1.3 Kollagenbeschichtung der Kulturflaschen und Mikrotiterplatten

Die Ewing-Sarkom-Zellen wuchsen nur in vorher mit Kollagen beschichteten Kulturflaschen an. Zu diesem Zweck wurde in 0,1 N Essigsäure im Verhältnis 50:1 gelöstes Kollagen verwendet. Jeweils 1,5 ml dieser Lösung wurden in eine Kulturflasche eingebracht und unter der Werkbank für zwei Tage ruhen gelassen. Überstehende Lösung wurde dann steril abgesaugt und die geöffneten Flaschen wurden über Nacht bei geöffnetem Deckel getrocknet. Die nun mit Kollagen beschichteten Flaschen konnten zur Kultivierung der Ewing Sarkom Zelllinien verwendet werden. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Kollagen wurde in jede Vertiefung 50 µl der Lösung (0,1 N Essigsäure, im Verhältnis 50:1 gelöstes Kollagen) pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht unter einer laufenden Werkbank und mit geöffnetem Deckel getrocknet.

### 2.2.2 Ermittlung der Zellzahl

Vor dem Ausplattieren der Zellen auf den Mikrotiterplatten musste die Konzentration der Zellen einer Zelllinie, die pro Versuchsansatz benötigt wurde, berechnet werden. In jede Vertiefung mussten 100 µl mit 5000 Zellen pipettiert werden. Dazu musste eine Zellsuspension mit einer Zellzahl von 50.000 Zellen pro ml hergestellt werden.

Hierzu wurde, analog dem Vorgehen beim Passagieren, bei adhären wachsenden Zellen der Zellrasen mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst, mit 1 ml frischem Medium pro Kulturflasche resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Tube überführt. Um die Suspensionszellen bei diesem Vorgang mit frischem Medium zu versorgen, wurden diese in einem 15 ml Falcon-Tube zunächst bei 1300 rpm über 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen wurden in 3 ml frischem Medium resuspendiert.

20 µl der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl in eine Messküvette mit 10 ml Casy-Ton™ pipettiert. Durch vorsichtiges Umschwenken wurde die Zellsuspension gemischt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung mit CasyTon™ wurde die Zellzahl der Zellsuspension pro ml Medium mit dem Casy™ Zellzahlmessgerät ermittelt.

### 2.2.3 Aussaat der Zellen

Für ein gutes und gleichmäßiges Zellwachstum sollten pro Vertiefung auf der Mikrotiterplatte 5000 Zellen eingebracht werden. Für die Versuche ergab sich daraus ein Bedarf von 600.000 Zellen pro Versuchsansatz ((96 Wells für eine Mikrotiterplatte + 8 Wells für Tag 0 + 16 Wells Pipettierverlust/Reserve) \* 5000 Zellen/Well = 600.000 Zellen). Die Konzentration der Zellsuspension sollte 100.000 Zellen/ml betragen. Daraus ergab sich ein Volumen von 12 ml Zellsuspension.

Das in einen 50 ml Falcon-Tube zu Überführende Suspensionsvolumen ergab sich wie folgt:

Suspensionsvolumen = 600.000 Zellen/Zellen pro ml der Zellsuspension. Das für das Ausplattieren der Zellen benötigte Suspensionsvolumen betrug 12 ml (100µl pro Well \* 120 Wells = 12 ml). Die in das Falcon-Tube überführten 600.000 Zellen mussten dann noch mit frischem Medium auf 12 ml aufgefüllt werden.

Die Mikrotiterplatten, eine komplette für den späteren Assay und eine mit 8 Wells für die Referenzmessung zum Beginn der Inkubation mit den Testsubstanzen, wurden nun mit 5000 Zellen pro Well (100µl) belegt und anschließend für 72 Std. inkubiert.

#### 2.2.4 Herstellung der Zytostatika-Konzentrationsstufen

Um Aussagen über die konzentrationsabhängige Zytotoxizität der getesteten Substanzen treffen zu können, wurden diese in sieben abgestuften Konzentrationen appliziert. Die gewählten Testkonzentrationen waren substanzabhängig und wurden durch Dilution einer berechneten Substanzmenge (gegebene Konzentration der Substanz und bekanntes Molekulargewicht der Substanz) aus einer Stammlösung und frischem Nährmedium hergestellt (s.Tab.3). Die weiteren absteigenden Konzentrationsstufen wurden dann durch 1:10 bzw. 1:5 Verdünnung mit Zellkulturmedium erzeugt. Die dabei erzielten Konzentrationen mussten doppelt so hoch sein wie die im endgültigen Versuchsansatz, da sie sich bei der Zugabe zu den Zellen mit dem schon vorhandenen Volumen von 100 µl 1:1 vermischten.

Tab.3.: Substanzabhängige Testkonzentrationen

Verdünnungsreihe (V)	Carmustin in µmol/L	Tyrphostin AG1478 in µmol/L	SAHA in µmol/L
1	0,001	0,0001	0,005
2	0,01	0,001	0,01
3	0,1	0,01	0,05
4	1	0,1	0,1
5	10	1	0,5
6	100	10	1
7	1000	100	5

### 2.2.5 Versuchsansatz und Messung Tag 0

Nachdem die mit den Zellen belegten Mikrotiterplatten für 72 Std. inkubiert wurden, wurde mit Hilfe des MTT-Assays die Stoffwechselaktivität der lebenden Zellen auf der mit acht Wells belegten Tag-0-Platte gemessen. Das Ergebnis diene später als Referenz.

Die vollständig belegte 72 Std.-Platte wurde nun nach folgendem Schema mit 100 µl der Testkonzentrationen belegt:

Für die Substanzkombination Carmustin/Tyrphostin AG1478:

Tab.4

K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Car1	Car1	Car1	Car1	Mix1	Mix1	Mix1	Mix1	AG1	AG1	AG1	AG1
Car2	Car2	Car2	Car2	Mix2	Mix2	Mix2	Mix2	AG2	AG2	AG2	AG2
Car3	Car3	Car3	Car3	Mix3	Mix3	Mix3	Mix3	AG3	AG3	AG3	AG3
Car4	Car4	Car4	Car4	Mix4	Mix4	Mix4	Mix4	AG4	AG4	AG4	AG4
Car5	Car5	Car5	Car5	Mix5	Mix5	Mix5	Mix5	AG5	AG5	AG5	AG5
Car6	Car6	Car6	Car6	Mix6	Mix6	Mix6	Mix6	AG6	AG6	AG6	AG6
Car7	Car7	Car7	Car7	Mix7	Mix7	Mix7	Mix7	AG7	AG7	AG7	AG7

- K : Referenz/Kontrolle mit 100µl Medium  
 1-7: Verdünnungsreihen, s. Tab.3  
 Car: Carmustin  
 Mix: Kombination Carmustin/Tyrphostin AG1478  
 AG: Tyrphostin AG1478

Für die Substanzkombination Carmustin/SAHA:

Tab.5

K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Car1	Car1	Car1	Car1	Mix1	Mix1	Mix1	Mix1	SA1	SA1	SA1	SA1
Car2	Car2	Car2	Car2	Mix2	Mix2	Mix2	Mix2	SA2	SA2	SA2	SA2
Car3	Car3	Car3	Car3	Mix3	Mix3	Mix3	Mix3	SA3	SA3	SA3	SA3
Car4	Car4	Car4	Car4	Mix4	Mix4	Mix4	Mix4	SA4	SA4	SA4	SA4
Car5	Car5	Car5	Car5	Mix5	Mix5	Mix5	Mix5	SA5	SA5	SA5	SA5
Car6	Car6	Car6	Car6	Mix6	Mix6	Mix6	Mix6	SA6	SA6	SA6	SA6
Car7	Car7	Car7	Car7	Mix7	Mix7	Mix7	Mix7	SA7	SA7	SA7	SA7

K : Referenz/Kontrolle mit 100µl Medium  
 1-7: Verdünnungsreihen, s. Tab.3  
 Car: Carmustin  
 Mix: Kombination Carmustin/SAHA  
 SA: SAHA

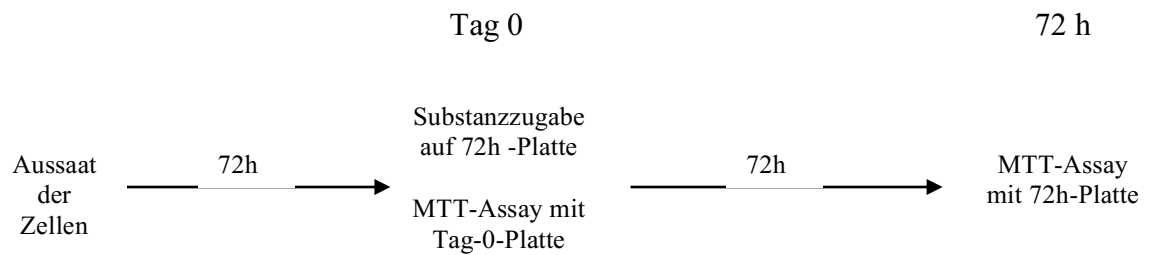
Zu beachten war hierbei die strenge Zugabe der Testsubstanz in aufsteigender Konzentration (V1→V7) und von oben nach unten, um eventuelle Einflüsse hoher Substanzkonzentrationen auf das Wachstum der unbehandelten Zellen, z.B. durch Diffusion der Substanz, möglichst zu minimieren.

### 2.2.6 MTT-Assay

Der MTT-Assay beruht auf der Umsetzung des gelblichen Farbstoffs MTT durch mitochondriale Aldehyhydrogenasen unter NADH- und NADPH-Verbrauch zu wasserunlöslichem violettem Formazan. Zur Durchführung wurden zu den gegebenen Zeitpunkten (Tag 0, 72 Std.) 20 µl MTT-Lösung auf die mit Zellen und Kontroll- oder Testsubstanz belegten Vertiefungen pipettiert (s. Abb.1). Nach 3 Std. Inkubation bei 37 °C wurden die Suspensionszelllinien und SH-SY5Y für 5 Min. bei 1300 rpm. zentrifugiert. Bei den anderen Zelllinien konnte, ohne Beschädigung des am Grund haftenden Zellrasens, der Überstand mittels der Vakuumpumpe abgesaugt werden. Anschließend wurden pro Vertiefung 100 µl Lysepuffer hinzugegeben und der Inhalt der Mikrotiterplatten für 15 Min. mit Hilfe der Rüttlerplatte homogenisiert.

Anschließend wurde die violette Färbung der Lösungen in den Vertiefungen mit dem Ascent Multiscan® Microplate Reader bei 560 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm ausgelesen. Die ermittelten Extinktionen korrelierten dabei mit der Anzahl vitaler, stoffwechselaktiver Zellen.

Abb.1 Schema des zeitlichen Ablaufs der Versuche



### 2.2.7 Wiederholung der Versuche und Reproduzierbarkeit

Während eines Versuchsansatzes wurden 4 Vertiefungen der gleichen Zelllinie mit der gleichen Substanz in gleicher Konzentration belegt. Dieser Versuchsansatz wurde mit zeitlichem Abstand an drei verschiedenen Tagen wiederholt. Bei jeder Testsubstanz und jeder Kombination wurden für jede Konzentrationsstufe somit 12 unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt. Die Auswahl von gut charakterisierten und etablierten Zelllinien lässt die Möglichkeit zu, die Versuche beliebig oft mit einer definierten Zellzahl zu wiederholen und gewährleistet im Zusammenspiel mit der etablierten Methode des MTT-Assays eine hohe Reproduzierbarkeit.

### 2.2.8 Software zur Datenerfassung und Auswertung

Zur Datenerfassung und Auswertung wurden Microsoft Excel (Office 2007 und 2011), Microsoft Word (Office 2007 und 2011) und Sigma Plot (Ver.11.0) verwendet.

### 2.2.9 Definition der GI<sub>50</sub> und der LC<sub>50</sub>

Um Vergleiche über die wachstumshemmende und zelltoxische Wirkung der Substanzen auf die einzelnen Zelllinien anstellen zu können wurden die GI<sub>50</sub> und die LC<sub>50</sub> ermittelt.

Die Berechnung der GI<sub>50</sub> bzw. LC<sub>50</sub> erfolgte zunächst für jeden Einzelversuch separat. Aus diesen Ergebnissen wurde nun ein Mittelwert für alle Einzelversuche einer Zelllinie mit der entsprechenden Substanz oder Substanzkombination errechnet. Dies ermöglicht einen Vergleich der Effekte einer Substanz auf eine Zelllinie mit den Effekten auf eine andere Zelllinie. Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse waren diese errechneten Werte, die ggf. auf Grund der Berechnungsweise und der logarithmischen Darstellung von einem grafisch abgelesenen Wert geringfügig abweichen können. Die grafischen Darstellungen dienen hierbei allein der Visualisierung.

Auch bei Applikation der maximalen Substanzkonzentrationen wurde bei einzelnen Zelllinien die LC<sub>50</sub> nicht erreicht. In diesen Fällen wurde auf der Grundlage der zu Verfügung stehenden Daten und in der Annahme der zu erkennenden sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve extrapoliert.

Die GI<sub>50</sub> ist die Substanzkonzentration, bei der es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zum Ende des Experiments zu einer 50%igen Wachstumsreduktion gekommen ist:

$$(50\% - [\% \text{ vitale Zellen } 72\text{h}(<50\%)]) / ([\% \text{ vitale Zellen } 72\text{h}(>50\%)] - [\% \text{ vitale Zellen } 72\text{h} (<50\%)]) * (\text{Substanzkonzentration } >50\% \text{ vitale Zellen } 72\text{h} - \text{Substanzkonzentration } <50\% \text{ vitale Zellen } 72\text{h}) + (\text{Substanzkonzentration } <50\% \text{ vitale Zellen } 72\text{h}).$$

Die GI<sub>50</sub> stellt eine Kennzahl zur Beurteilung der Wachstumshemmung dar.

Die LC<sub>50</sub> ist definiert als die Substanzkonzentration, bei der es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns zu einer 50-prozentigen Wachstumsreduktion gekommen ist:

$$(50\% - [\% \text{ vitale Zellen Tag0}(<50\%)]) / ([\% \text{ vitale Zellen Tag0}(>50\%)] - [\% \text{ vitale Zellen Tag0} (<50\%)]) * (\text{Substanzkonzentration } >50\% \text{ vitale Zellen Tag0} - \text{Substanzkonzentration } <50\% \text{ vitale Zellen Tag0}) + (\text{Substanzkonzentration } <50\% \text{ vitale Zellen Tag0}).$$

Die LC<sub>50</sub> erlaubt Aussagen über die zytostatische Potenz einer Substanz.



### 2.2.10 Kombinationsindizes

Die Berechnung der Kombinationsindizes erfolgte nach Chou und Talalay (18,19). Ein Kombinationsindex erlaubt Aussagen darüber, ob bei einer Kombination von Substanzen ihrer gemeinsamen Wirkung synergistische oder additive Effekte zu Grunde liegen. Kombinationsindizes stellen hierfür eine anerkannte Methode dar (21). Im konkreten Fall wurde ein Kombinationsindex für jede Substanzkombination bei jeder Zelllinie im Panel berechnet. Hierzu flossen definitionsgemäß die vorher berechneten Werte für die  $GI_{50}$  für die jeweiligen Einzelkonzentrationen als auch die jeweiligen  $GI_{50}$  bei der Kombination der Substanzen ein. So entsprechen  $(D)_1$  bzw.  $(D)_2$  der  $GI_{50}$  von einer der Substanzen in der Kombinationstestung,  $(Dx)_1$  bzw.  $(Dx)_2$  der  $GI_{50}$  der jeweils gleichen Substanz im Einzelversuch. Die Berechnungen wurden tabellarisch dokumentiert. Die Interpretation erfolgte wie üblich: Bei einem Index  $0,9 \leq$  wurden synergistische Effekte der Substanzkombination angenommen, bei einem Index zwischen 0,9 und 1,1 additive Effekte und bei einem Index  $\geq 1,1$  antagonistische Effekte (20).

## 3. Ergebnisse der Toxizitätstest

### 3.1 Einleitende Anmerkungen zu den grafischen Darstellungen

Die in den drei separaten Versuchsansätzen gewonnenen Daten wurden grafisch in Form von dosisabhängigen Wirkungskurven für jede Substanz und jede Zelllinie zur Darstellung gebracht (Abb.3.1 a-f, 3.2 a-f, 3.3 a-f). Dabei wurden die Zelllinien einer gemeinsamen Tumorentität unter dem Einfluss von einer Substanz in einer gemeinsamen Grafik zusammen abgebildet oder zusammengefasst. Dieses ermöglichte eine bessere visuelle Vergleichbarkeit der Unterschiede bezüglich der Sensibilität innerhalb einer Entität. Bezugsgröße für den prozentualen Anteil der lebenden Zellen war die substanzfreie Kontrolle nach 72 Std. Inkubation. Die hierbei ermittelte Extinktion wurde mit 100 % gleichgesetzt. Die grafisch dargestellten prozentualen Anteile der überlebenden Zellen ergaben sich aus den arithmetischen Mittelwerten der drei Versuchsansätze nach 72 Std. Inkubation mit der jeweiligen Substanz in entsprechender Konzentration. Zusätzlich grafisch aufgetragen ist die Standardabweichung.

Es ist zu bemerken, dass im Unterschied zur grafischen Aufbereitung die errechneten  $GI_{50}$  zunächst für jeden Einzelversuch ermittelt und dann weiterverarbeitet wurden. Zur besseren Visualisierung wurde die Gerade, die ein Überleben von 50 % der Zellen anzeigt und die grafische Ermittlung der  $GI_{50}$  erlaubt, hervorgehoben.

Zur Verbesserung der visuellen Vergleichbarkeit wurde eine halblogarithmische Darstellungsweise gewählt.

Die Abbildungen 3.1 g-h, 3.2. g und 3.3 g stellen die  $GI_{50}$  bzw.  $LC_{50}$  der einzelnen Zelllinien des Panels nach 72 Std. Inkubationszeit dar. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Median der  $GI_{50}$  bzw.  $LC_{50}$  aller 18 Zelllinien unter dem jeweiligen Substanzeinfluss und aller drei Versuchsansätze berechnet und aufgetragen. Hierdurch wird eine orientierende und vergleichende Beurteilung der Sensibilität der einzelnen Zelllinien ermöglicht. Liegt die  $GI_{50}$  einer Zelllinie unterhalb des Medians des Gesamtpanels, wird sie als eher sensibel eingestuft. Liegt die  $GI_{50}$  oberhalb des Medians, wird sie als eher resistent eingestuft. Zusätzlich zur jeweiligen mittleren  $GI_{50}$  wurden noch die minimalen bzw. maximalen Werte jeder einzelnen Zelllinie aus den drei Versuchsansätzen dargestellt.

### 3.2 Ergebnisse der Toxizitätstests der Einzelsubstanzen

#### 3.2.1 Carmustin

Abb.3.1-a: Osteosarkome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit Carmustin

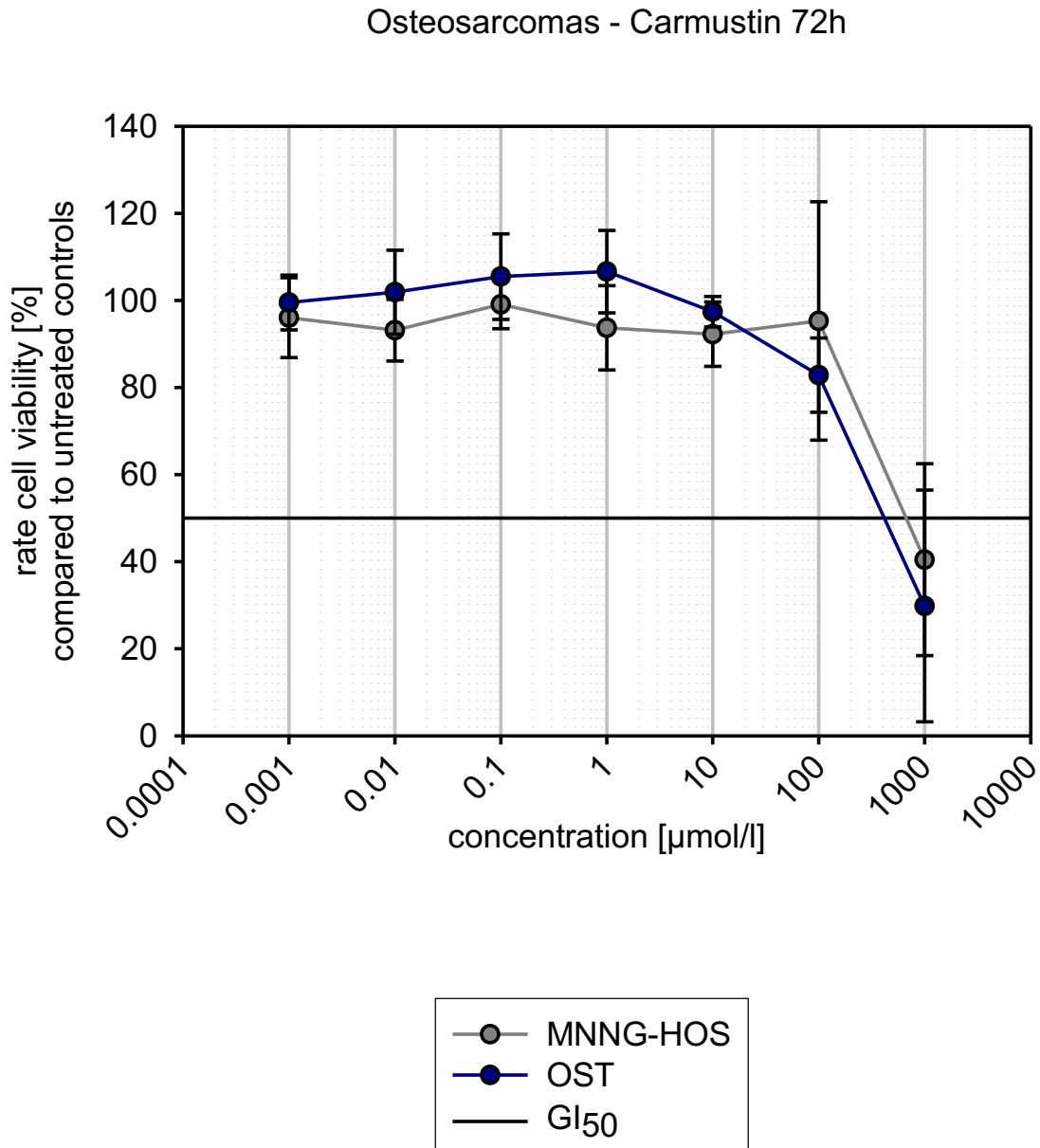


Abb.3.1-b: Medulloblastome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit Carmustin.

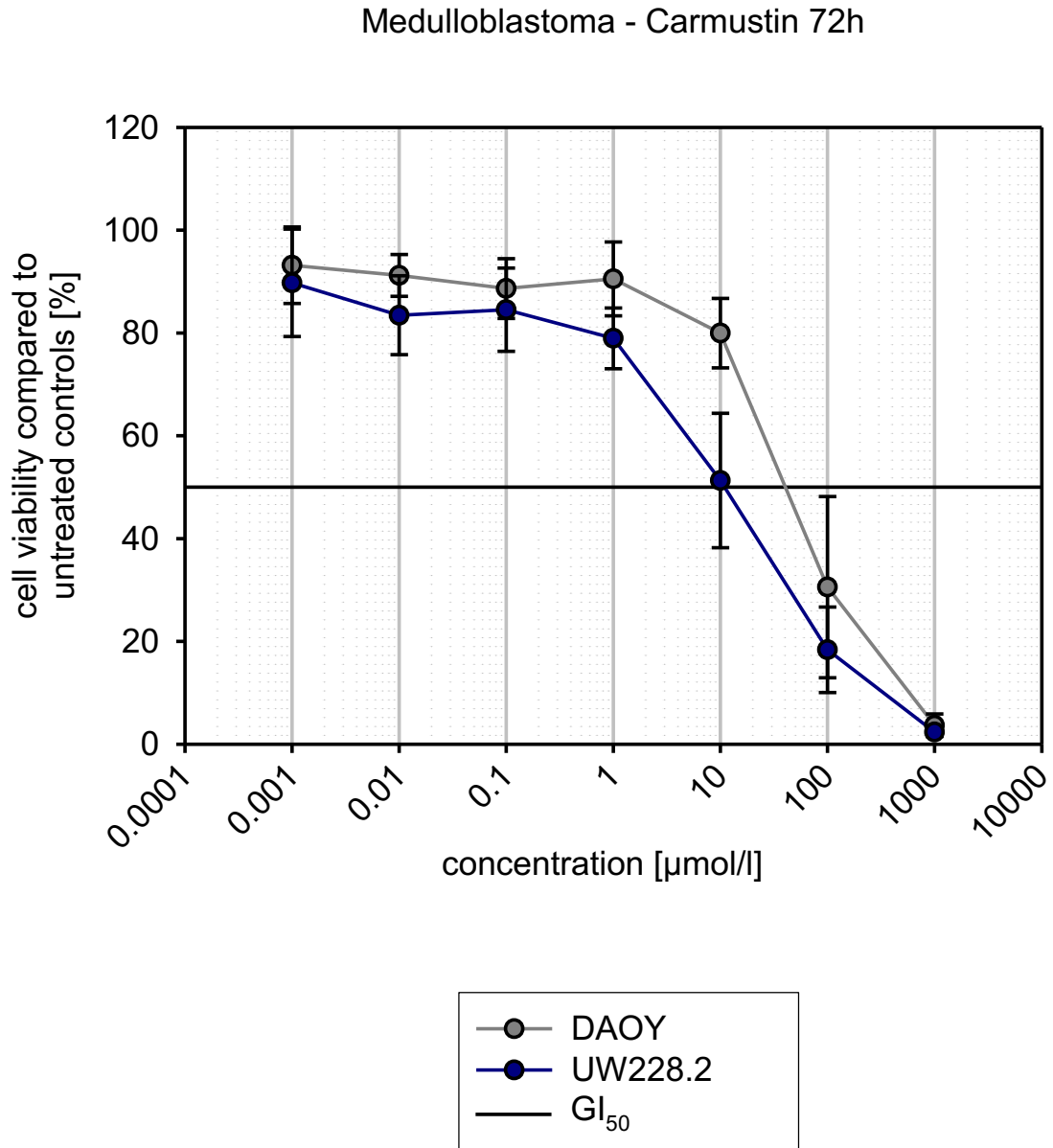


Abb.3.1-c : Ewingsarkome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation

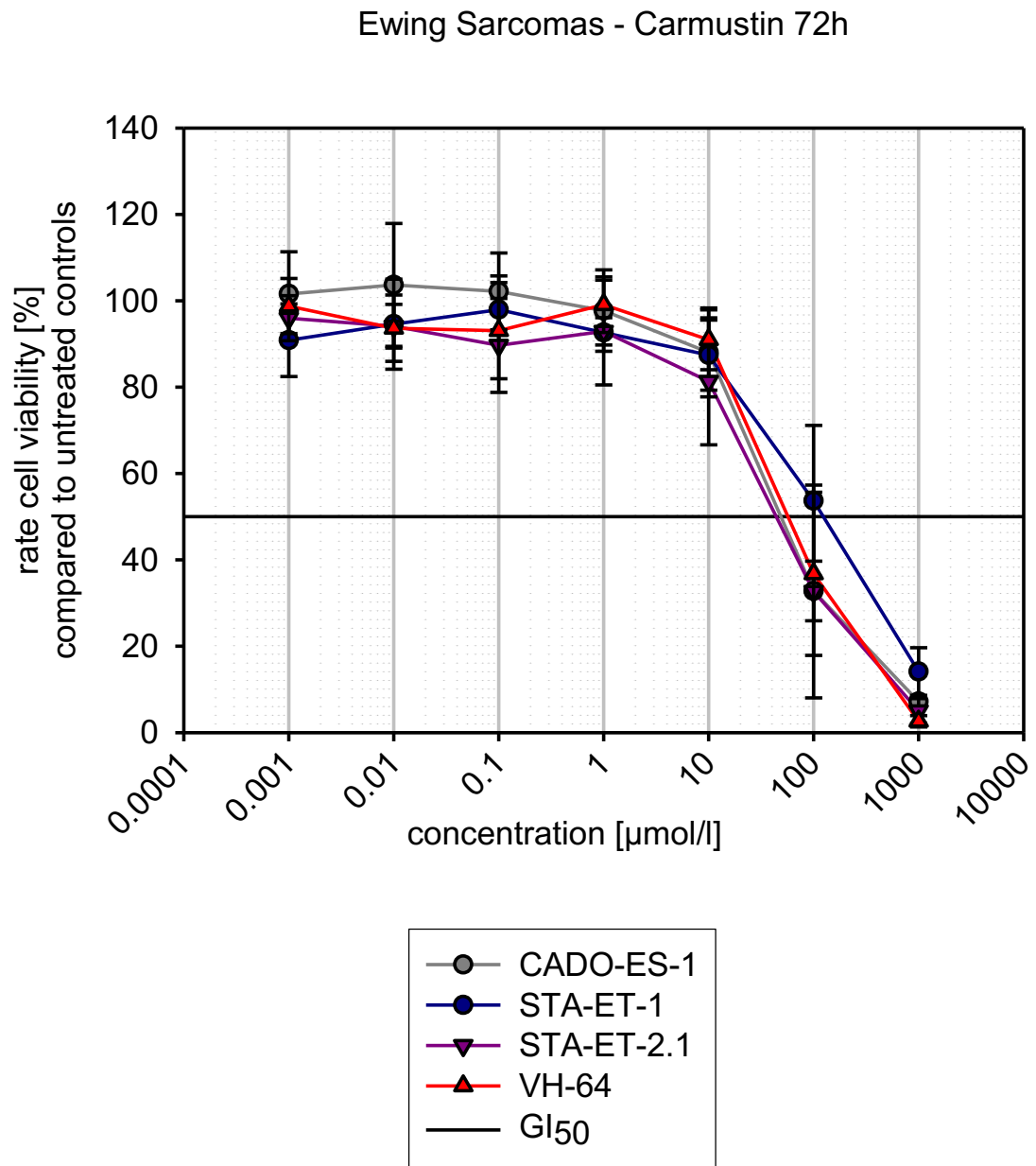


Abb.3.1-d : Leukämien, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation

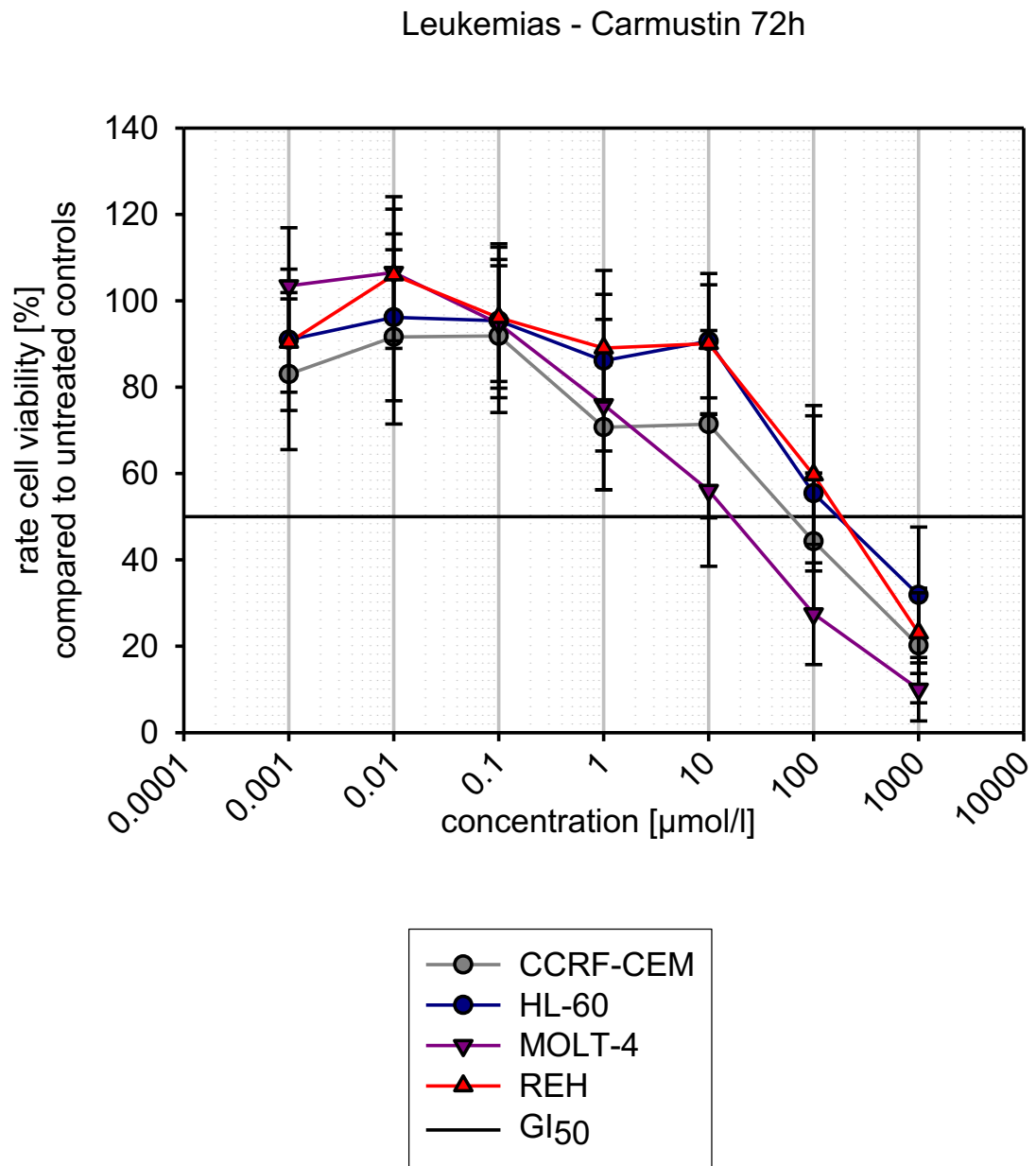


Abb.3.1-e : Neuroblastome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation

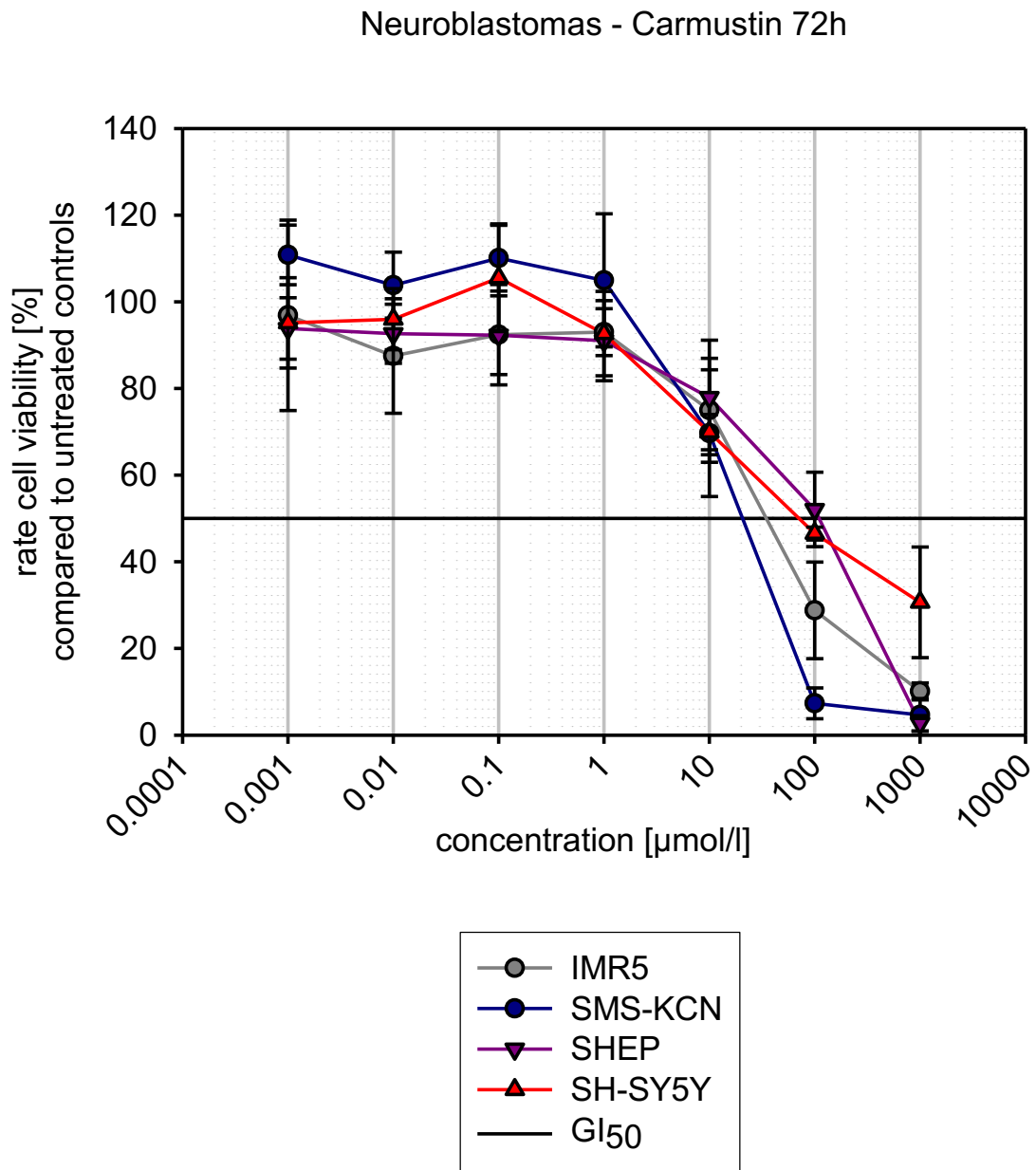


Abb.3.1-f : Rhabdomyosarkome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation

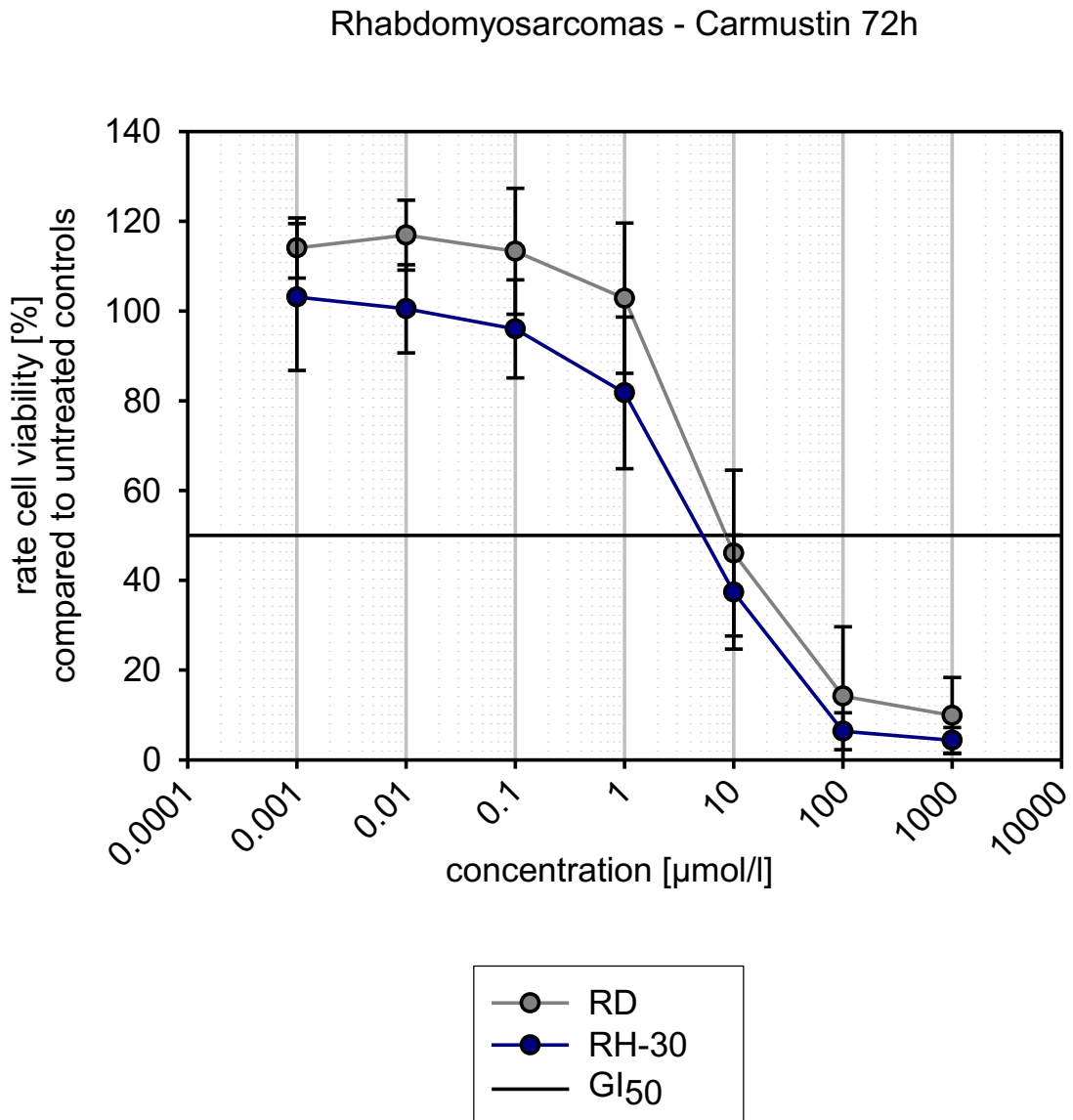
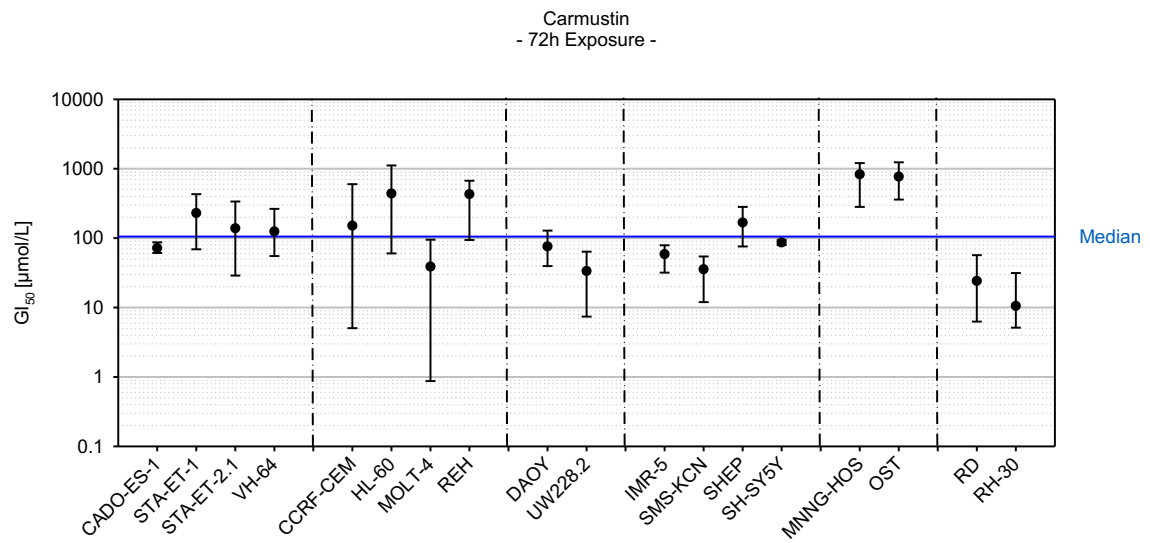
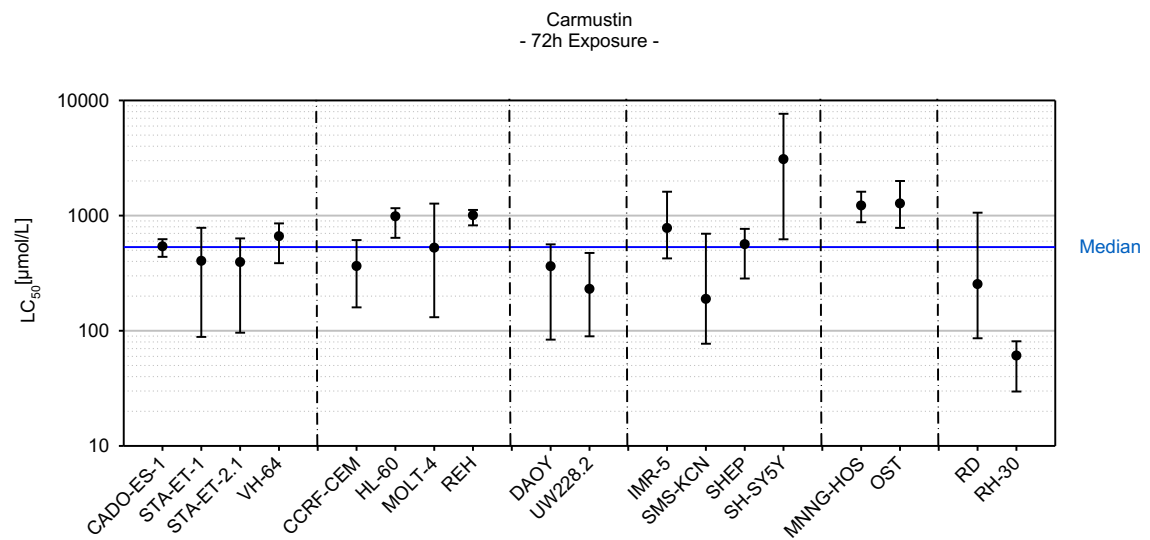




Abb. 3.1-g: GI<sub>50</sub> aller Zelllinien nach Inkubation mit Carmustin für 72 StundenAbb. 3.1-h: LC<sub>50</sub> aller Zelllinien nach Inkubation mit Carmustin für 72 Stunden

Im Folgenden wird die Bezeichnung Mittelwert gleichbedeutend mit dem arithmetischen Mittel verwendet.

Innerhalb des gewählten Konzentrationsspektrums von 0,001  $\mu\text{mol/l}$  bis 1000  $\mu\text{mol/l}$  wirkte Carmustin bei allen 18 Zelllinien wachstumshemmend und es war eine dosisabhängige Zytotoxizität zu beobachten. Die für das Erreichen der  $\text{GI}_{50}$  aus allen sechs Versuchsansätzen benötigte Konzentration lag mit ihrem Mittelwert in einem Bereich zwischen 10,5  $\mu\text{mol/l}$  bei der Rhabdomyosarkom-Zelllinie RH-30 und 829,2  $\mu\text{mol/l}$  bei der Osteosarkom-Zelllinie MNNG-HOS.

Auch zwischen Zelllinien einer gemeinsamen Tumorentität ließen sich Unterschiede bei der Sensibilität auf Carmustin beobachten. Dennoch ergaben sich deutliche entitätsabhängige Tendenzen, die auch schon in Abb. 3.1-g gut zu erkennen sind.

Als sensibel wurden Zelllinien eingeteilt, die innerhalb des hier geprüften Zelllinienpanels eine unterhalb des Medians (105,4  $\mu\text{mol/l}$ ) liegende  $\text{GI}_{50}$  aufwiesen. Zelllinien mit über dem Median liegenden  $\text{GI}_{50}$ -Konzentrationen wurden als resistent eingestuft. Am sensibelsten reagierten die beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien (RH-30,  $\text{GI}_{50}$ : 10,5  $\mu\text{mol/l}$  und RD,  $\text{GI}_{50}$ : 24,1  $\mu\text{mol/l}$ ) auf Carmustin. Der Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  der beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien lag bei 17,3  $\mu\text{mol/l}$ . Deutlich zu erkennen ist bei beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien ein sigmoidaler Verlauf der Dosis-Wirkungskurven.

Ebenfalls sensibel waren die Medulloblastom-Zelllinien (UW228.2,  $\text{GI}_{50}$ : 33,5  $\mu\text{mol/l}$  und DAOY,  $\text{GI}_{50}$ : 75,7  $\mu\text{mol/l}$ ). Bei ihnen lag der Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  beider Zelllinien bei 54,6  $\mu\text{mol/l}$ .

Die vier Neuroblastomzelllinien erwiesen sich als mittelgradig sensibel. Der Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  aller Neuroblastomzelllinien lag bei 87,0  $\mu\text{mol/l}$ . Auffällig ist jedoch der Unterschied der Sensibilität innerhalb der Entität. Die niedrigste  $\text{GI}_{50}$ -Konzentration bei der Zelllinie SMS-KCN lag bei 35,6  $\mu\text{mol/l}$  und die höchste bei der Zelllinie SHEP mit 167,5  $\mu\text{mol/l}$ .

Ein noch heterogeneres Bild der benötigten Konzentration für das Erreichen der  $\text{GI}_{50}$  boten die Leukämien. Als sensible Leukämie-Zelllinie bedurfte es bei MOLT-4 einer  $\text{GI}_{50}$ -Konzentration von 38,8  $\mu\text{mol/l}$ . Die auf Carmustin unempfindlichste Leukämie-Zelllinie war HL-60 mit einer  $\text{GI}_{50}$  von 438,7  $\mu\text{mol/l}$ . Es ergab sich ein Mittelwert der

GI<sub>50</sub> aller Leukämie-Zelllinien von 246,8 µmol/l und die Leukämien waren in der Gesamtbetrachtung der Entität als eher resistent einzustufen.

Als relativ unsensibel auf Carmustin, mit einer geringen Streubreite der GI<sub>50</sub>, stellten sich die Ewing-Sarkom-Zelllinien dar (GI<sub>50</sub> von 71,8 µmol/l (CADO-ES-1) bis 229,6 µmol/l (STA-ET-1)). Der Mittelwert der GI<sub>50</sub> der Ewing-Sarkom-Zelllinien lag bei 141,0 µmol/l.

Als auffallend unsensibel, mit hohen GI<sub>50</sub> (769 µmol/l bei MNNG-HOS und 829,2 µmol/l bei OST) und geringer Streubreite bei den Einzelversuchen stellten sich beide Osteosarkom-Zelllinien dar. Bei ihnen lag der Mittelwert der GI<sub>50</sub> bei 799,4 µmol/l.

### **3.2.2 Tyrphostin AG1478**

In den Abbildungen 3.2 a-f wurden die Dosiswirkungskurven für die einzelnen Zelllinien, zusammengefasst als gemeinsame Tumorentitäten, unter Einfluss von Tyrphostin AG1478 dargestellt.

Die Abbildung 3.2 g stellt orientierend die GI<sub>50</sub> der einzelnen Zelllinien des Panels nach 72 h Inkubationszeit dar. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Median der GI<sub>50</sub> aller 18 Zelllinien aufgetragen.

Abb. 3.2-a: Osteosarkome, Dosis-Wirkungs-Kurve nach 72 Stunden Inkubation mit Tyrphostin

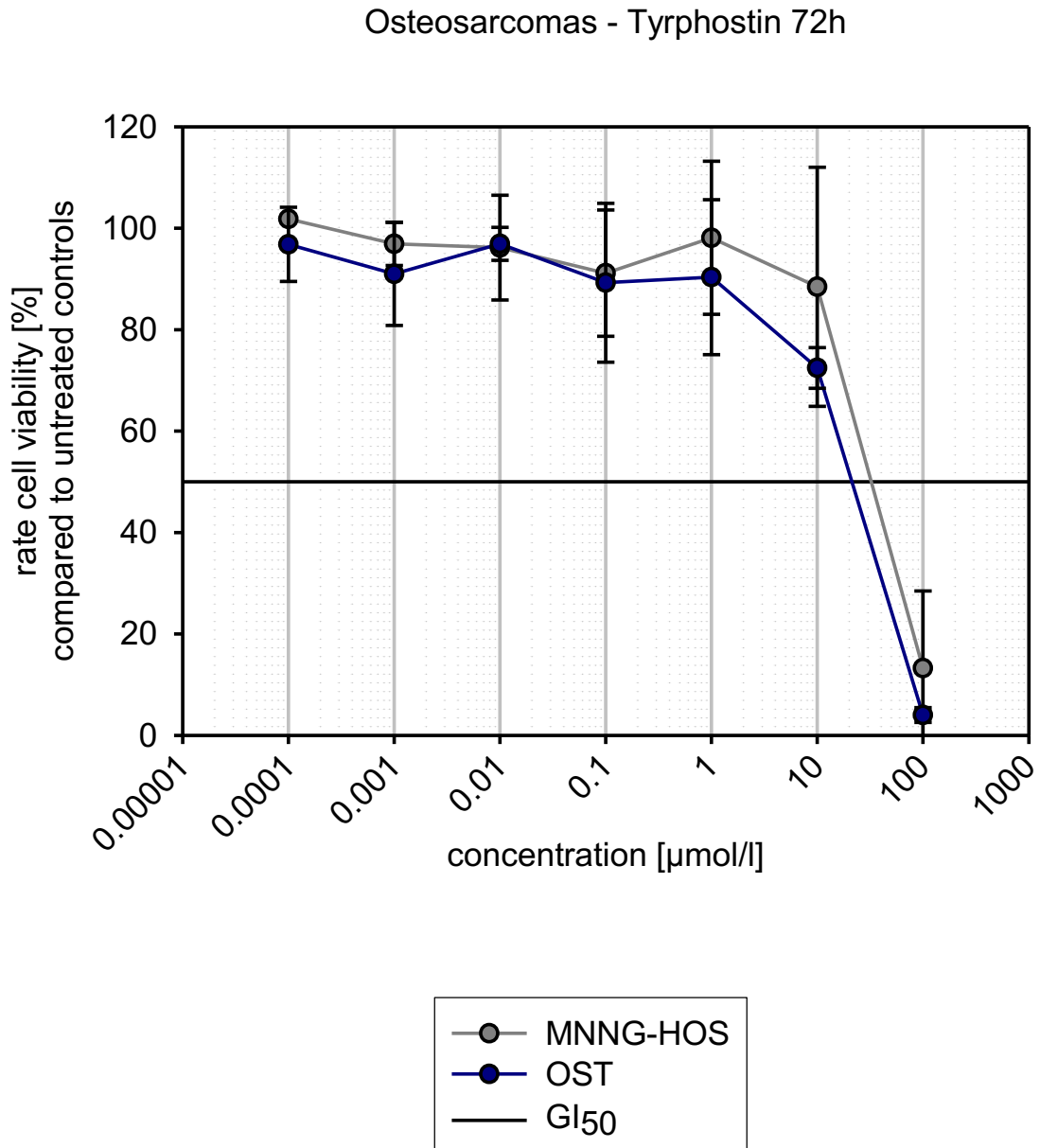


Abb. 3.2-b: Medulloblastome, Dosis-Wirkungs-Kurve nach 72 Stunden Inkubation mit Tyrphostin

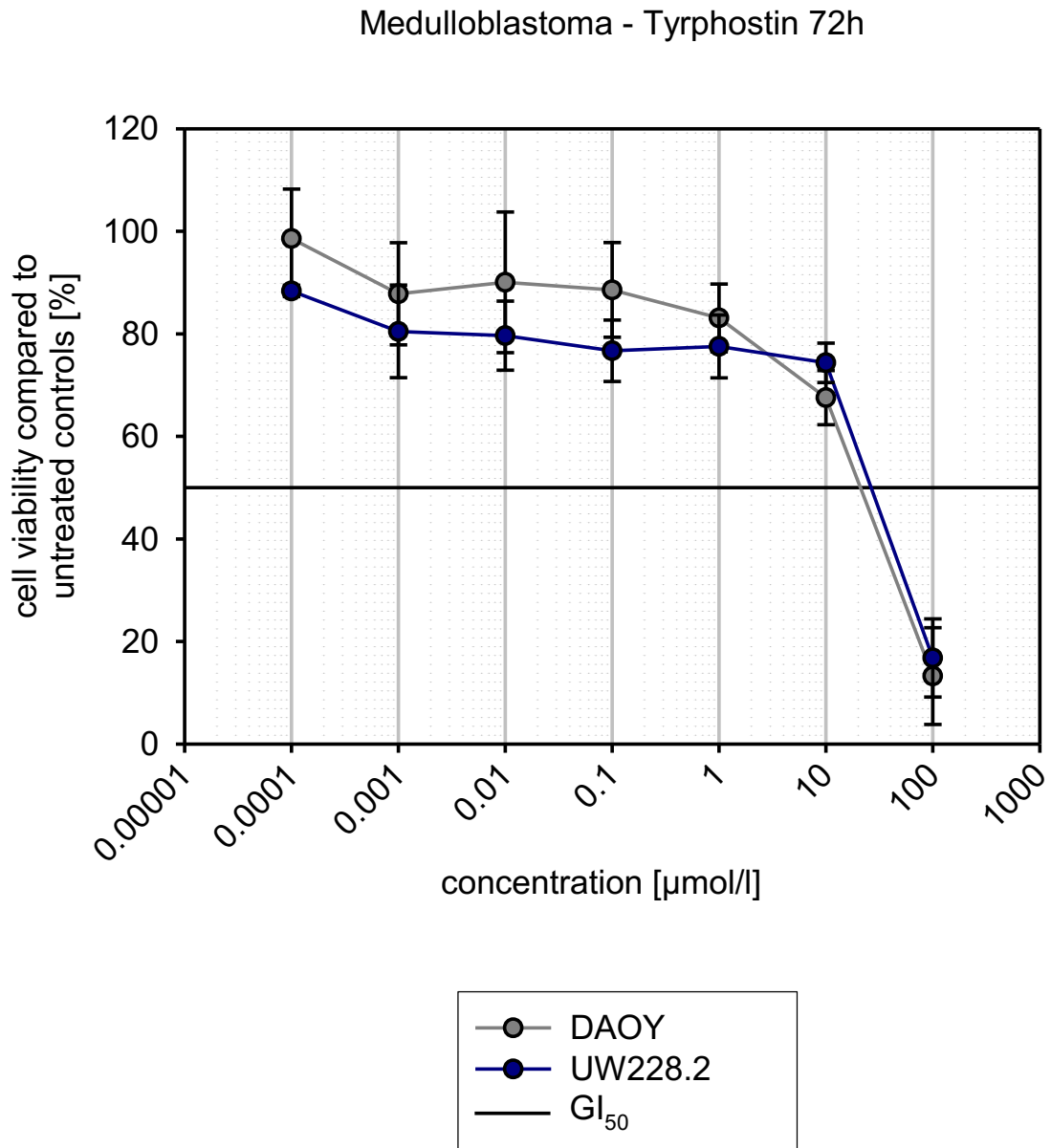


Abb. 3.2-c: Ewingsarkome, Dosis-Wirkungs-Kurve nach 72 Stunden Inkubation mit Tyrphostin

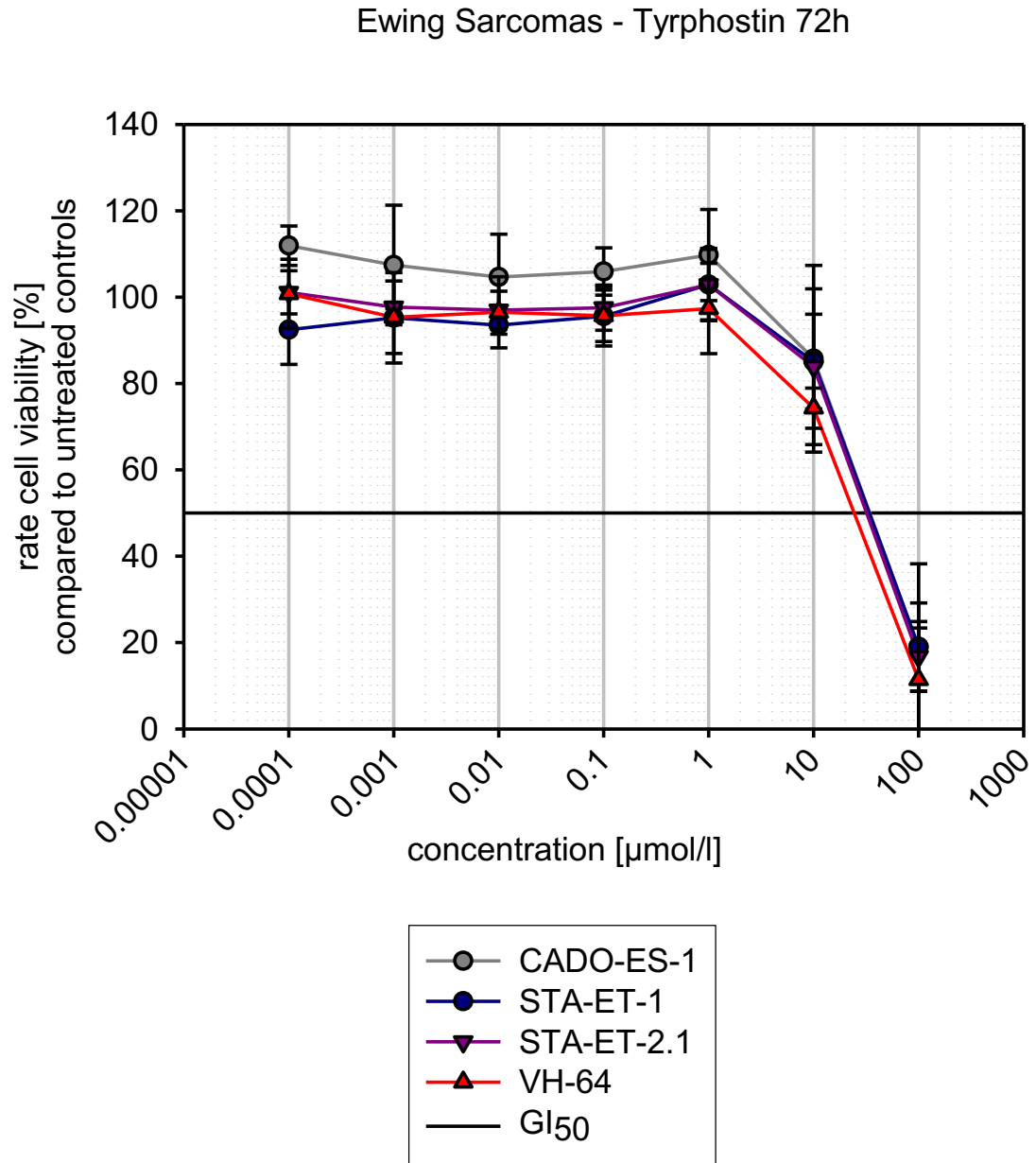


Abb. 3.2-d: Leukämien, Dosis-Wirkungs-Kurve nach 72 Stunden Inkubation mit Tyrphostin

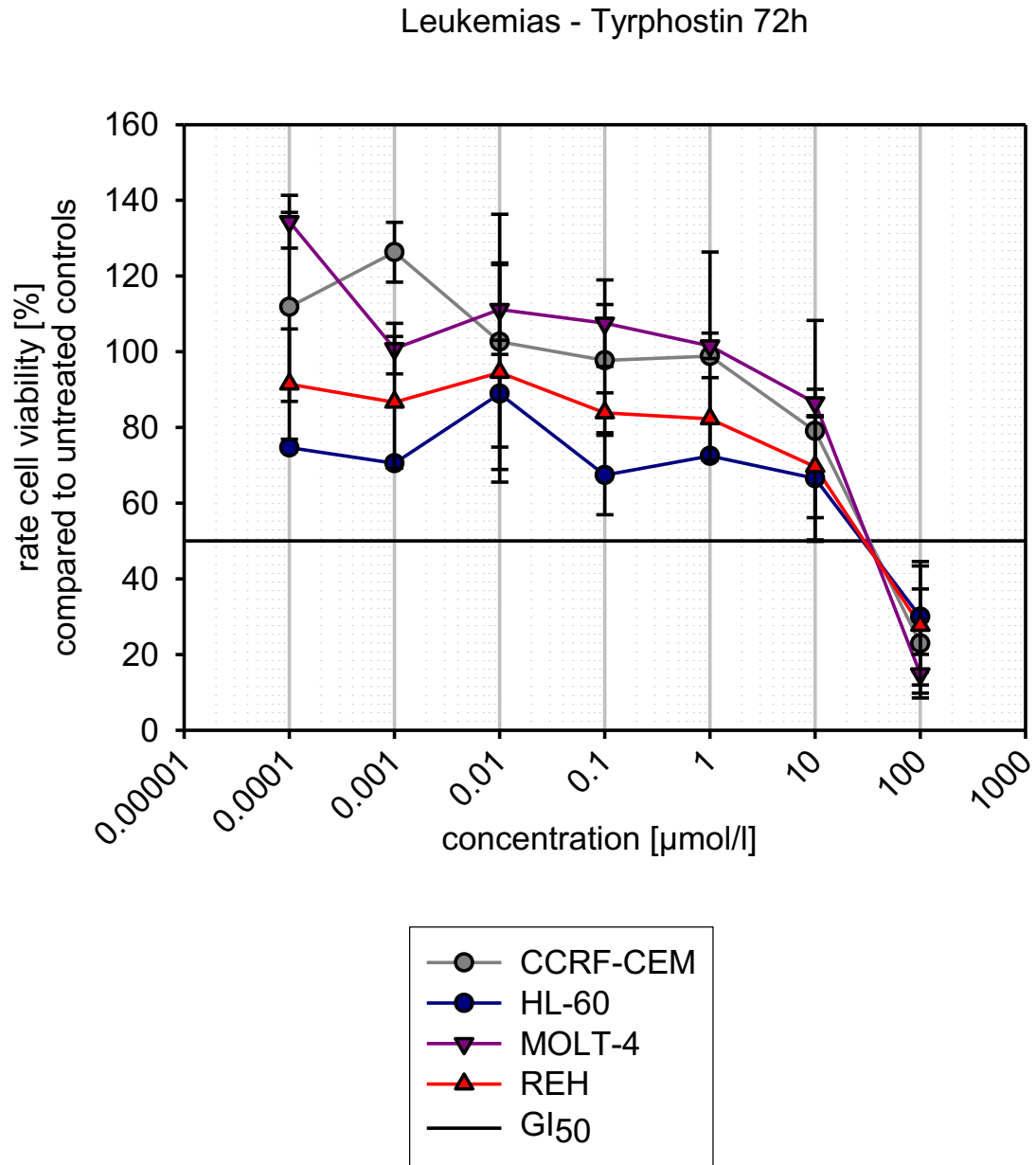


Abb. 3.2-e: Neuroblastome, Dosis-Wirkungs-Kurve nach 72 Stunden Inkubation mit Tyrphostin

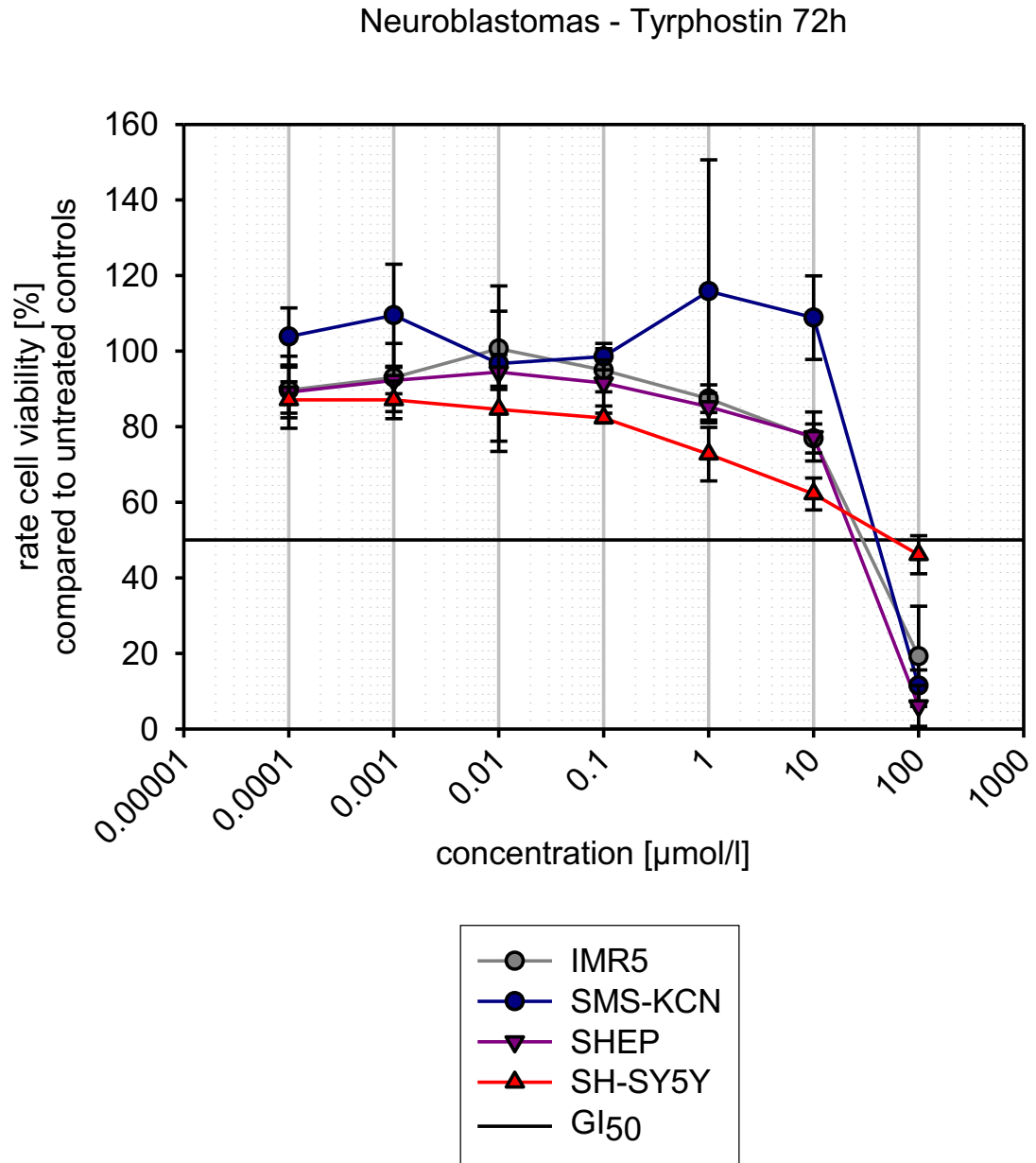




Abb. 3.2-f: Rhabdomyosarkome, Dosis-Wirkungs-Kurve nach 72 Stunden Inkubation mit Tyrphostin

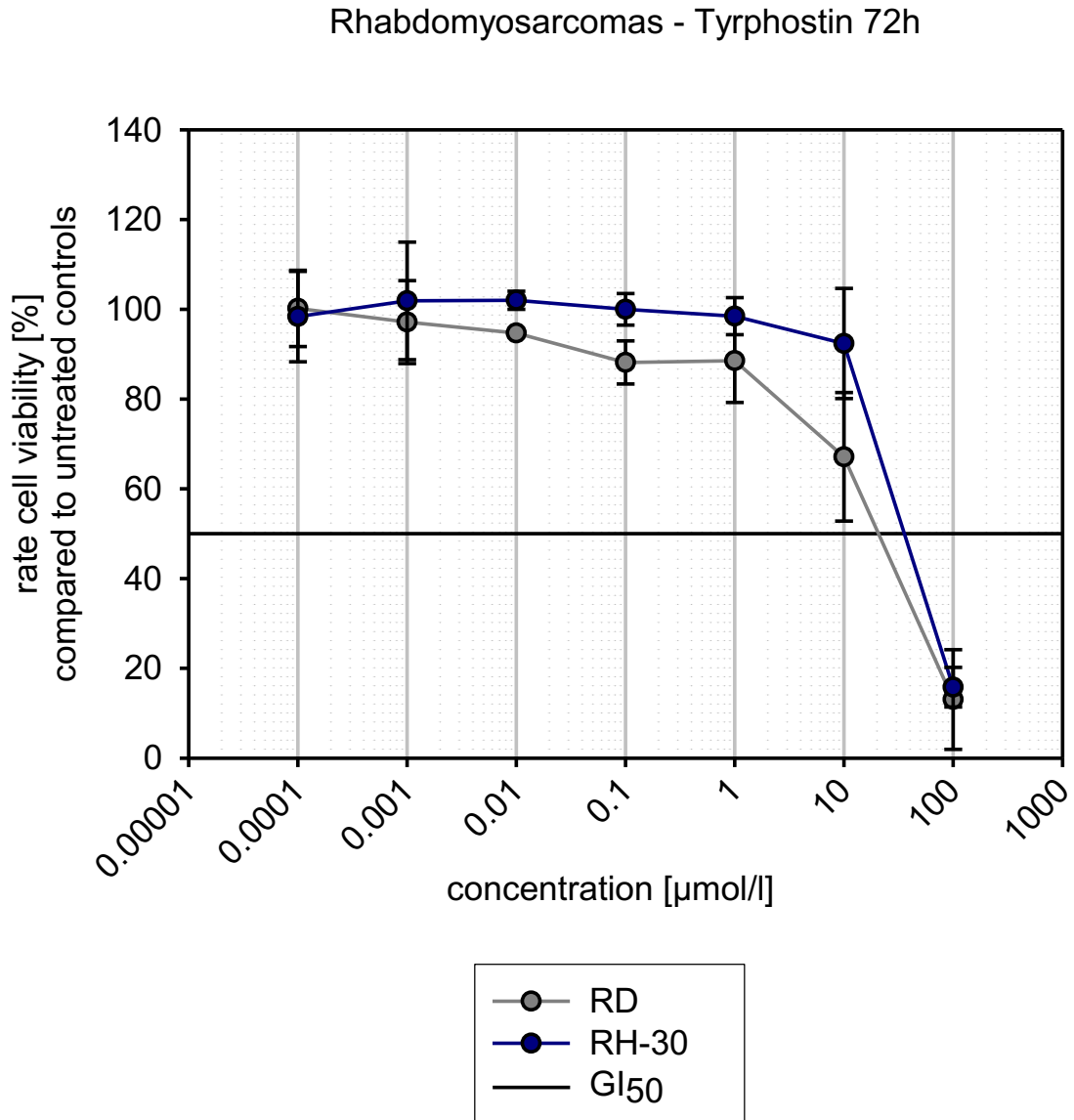
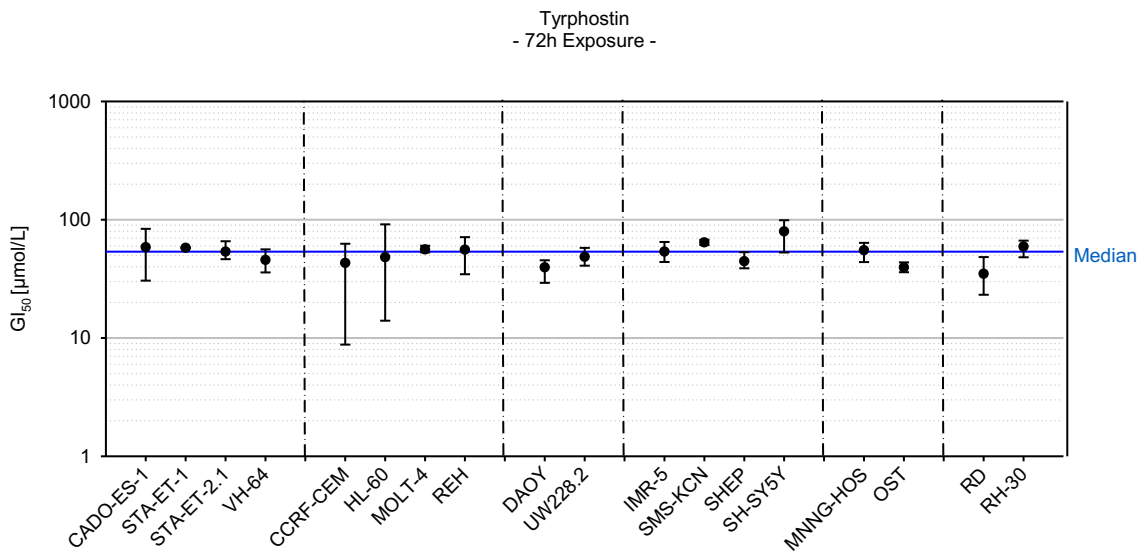


Abb. 3.2-g: GI<sub>50</sub> aller Zelllinien nach Inkubation für 72 Stunden mit Tyrphostin

Auf eine grafische Darstellung der LC<sub>50</sub> wurde verzichtet, da die LC<sub>50</sub> nach Tyrphostin AG1478-Inkubation bei zahlreichen Zelllinien bei der maximal applizierten Substanzkonzentration (100µmol/l) nicht erreicht wurde. Eine tabellarische Aufstellung folgt:

Tab. 3.1: LC<sub>50</sub>-Mittelwerte (in µmol/l) der Zelllinien nach Inkubation mit Tyrphostin AG1478 für 72 Stunden.

Zelllinie	CADO-ES-1	STA-ET-1	STA-ET-2.1	VH-64	RD	RH-30	MOLT-4	CCRF-CEM	REH
LC <sub>50</sub>	>100	79,4	98,8	>100	>100	95,9	97,3	53,5	>100

Zelllinie	HL-60	IMR-5	SMS-KCN	SHEP	SH-SY5Y	DAOY	UW 228.2	MNNG-HOS	OST
LC <sub>50</sub>	>100	>100	99,4	75,1	>100	81,4	>100	62,5	75

Im Folgenden wird die Bezeichnung Mittelwert gleichbedeutend mit dem arithmetischen Mittel verwendet.

Tyrphostin AG1478 wirkte in den getesteten Konzentrationen bei allen 18 Zelllinien wachstumshemmend. Als sensibel wurden Zelllinien eingeteilt, die eine niedrigere  $GI_{50}$  als den Median (53,6  $\mu\text{mol/l}$ ) aller Zelllinien dieses Panels aufwiesen. Zelllinien mit  $GI_{50}$ -Konzentrationen oberhalb des Medians wurden als resistent eingestuft. Die für das Erreichen der  $GI_{50}$  nötigen Konzentrationen lagen in einem Konzentrationsbereich zwischen 34,8  $\mu\text{mol/l}$  bei der sensiblen Rhabdomyosarkom-Zelllinie RD und einer  $GI_{50}$  von 79,5  $\mu\text{mol/l}$  bei der unempfindlichen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y. Wie in Abb. 3-g zu erkennen, war die Streubreite der  $GI_{50}$  der Zelllinien deutlich kleiner, als unter dem Einfluss von Carmustin.

Innerhalb des untersuchten Zelllinienpanels zeigten sich die Medulloblastome, deren  $GI_{50}$  mit 48,4  $\mu\text{mol/l}$  (UW228) und 39,5  $\mu\text{mol/l}$  (DAOY) unter dem Median (53,6  $\mu\text{mol/l}$ ) lagen, als sensibel. Medulloblastome waren mit einem Mittelwert der  $GI_{50}$  von 44,0  $\mu\text{mol/l}$  die sensibelste Entität im Panel.

Als ähnlich sensibel waren die Rhabdomyosarkom-Zelllinien mit einer entitätsbezogenen Mittelwert der  $GI_{50}$  von 47,0  $\mu\text{mol/l}$  einzustufen ( $GI_{50}$  von RD: 34,8  $\mu\text{mol/l}$ ;  $GI_{50}$  RH-30: 59,1  $\mu\text{mol/l}$ ).

Die Osteosarkom-Zelllinien zeigten eine Streuung der  $GI_{50}$  von 39,4  $\mu\text{mol/l}$  (OST) bis 55,1  $\mu\text{mol/l}$  (MNNG-HOS). Ihr Mittelwert der  $GI_{50}$  lag bei 47,3  $\mu\text{mol/l}$ . Sie reagierten somit in Relation zum Median (53,6  $\mu\text{mol/l}$ ) sensibel auf die Applikation von Tyrphostin AG1478.

Die  $GI_{50}$  der mäßig sensiblen Leukämie-Zelllinien lag in einem Bereich von 56,0  $\mu\text{mol/l}$  (MOLT-4) bis 43,0  $\mu\text{mol/l}$  (CCRF-CEM). Insgesamt ergab sich für diese Entität ein Mittelwert der  $GI_{50}$  von 52,5  $\mu\text{mol/l}$ .

Die Ewing-Sarkome lagen mit ihrer  $GI_{50}$  von 58,5  $\mu\text{mol/l}$  (CADO-ES-1) bis 45,6  $\mu\text{mol/l}$  (VH-64) in einem Bereich, der innerhalb des untersuchten Zelllinienpanels als weniger sensibel zu werten ist. Der entitätsspezifische Mittelwert der  $GI_{50}$  lag bei 53,9  $\mu\text{mol/l}$ .

Als auffällig zu beschreiben ist die relative Resistenz der zwei Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und SMS-KCN mit den im Panel höchsten  $GI_{50}$ : 79,5  $\mu\text{mol/l}$  (SH-SY5Y) und

64,1  $\mu\text{mol/l}$  (SMS-KCN). Die beiden anderen Neuroblastom-Zelllinien lagen mit ihren  $\text{GI}_{50}$  jedoch in einem Bereich, der im Vergleich zum Median aller Zelllinien (als intermediär sensibel eingestuft werden kann: 53,6  $\mu\text{mol/l}$  (IMR-5) und 44,5  $\mu\text{mol/l}$  (SHEP). Die gemeinsame Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  aller Neuroblastom-Zelllinien lag bei 60,5  $\mu\text{mol/l}$ .

### 3.2.3 SAHA

In Abb. 3.3 a-f werden die Dosiswirkungskurven unter dem Einfluss von SAHA für die einzelnen Zelllinien dargestellt.

Abb.3.3-a: Osteosarkome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit SAHA

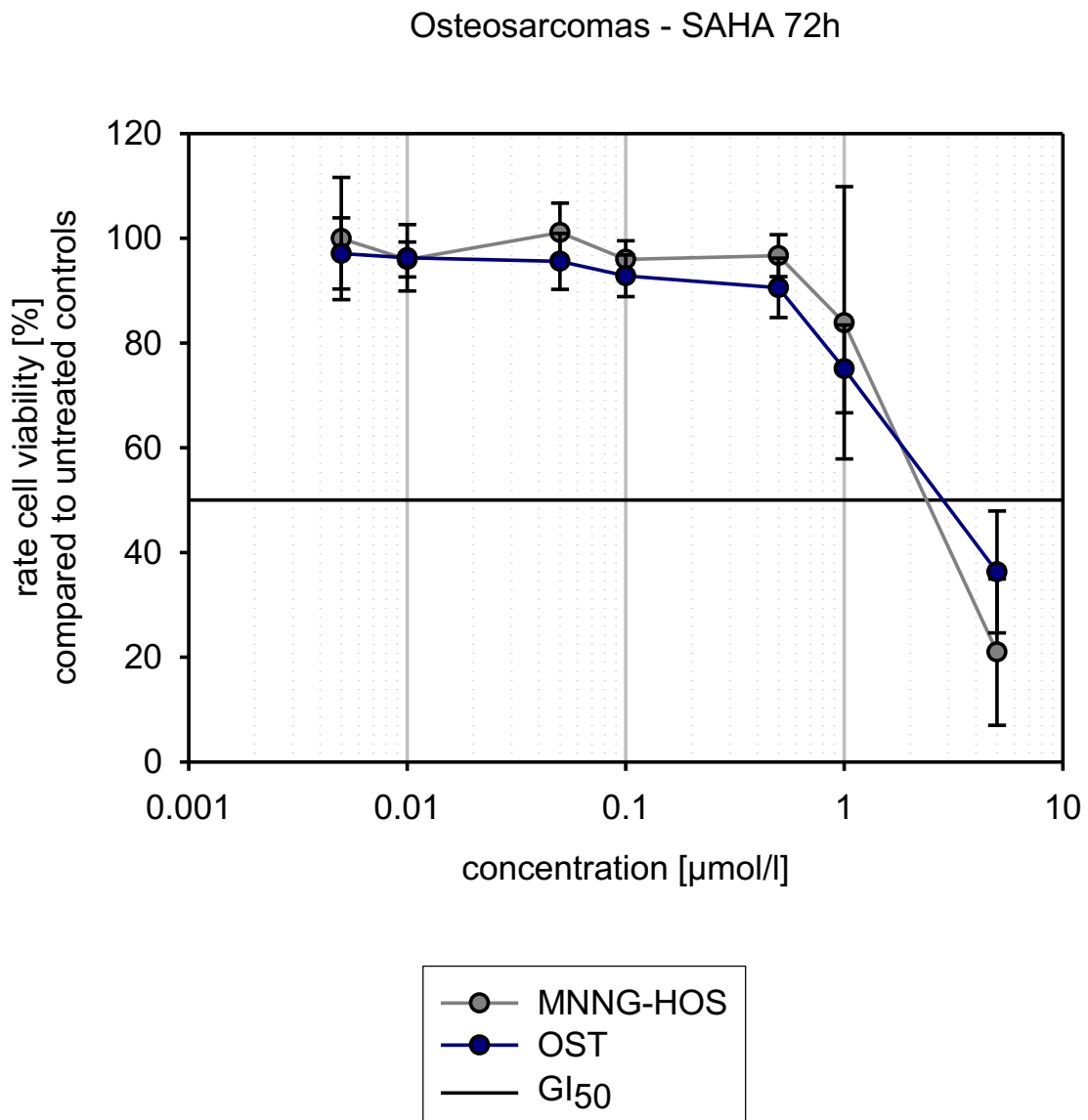


Abb.3.3-b: Medulloblastome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit SAHA

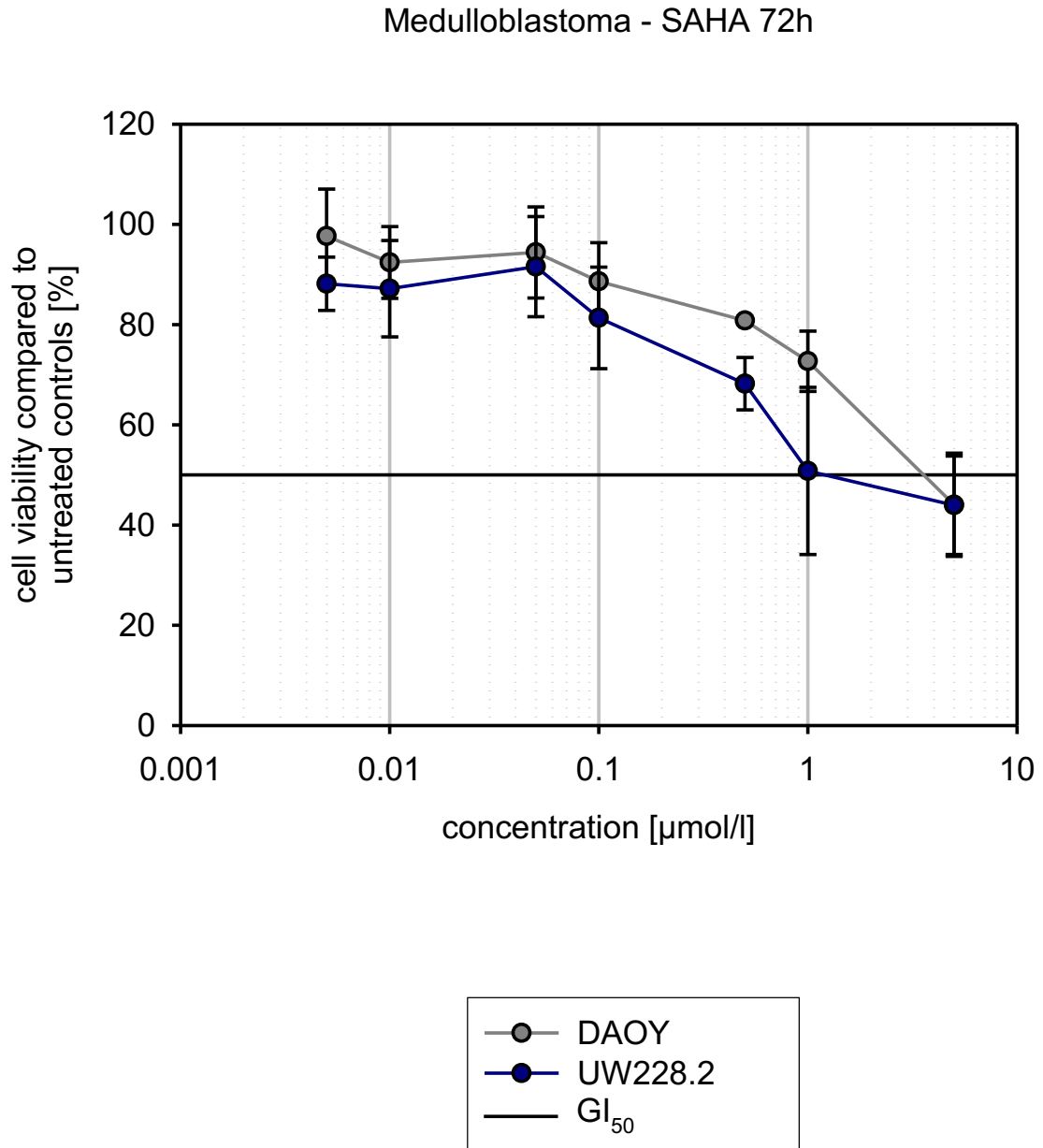


Abb.3.3-c: Ewingsarkome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit SAHA

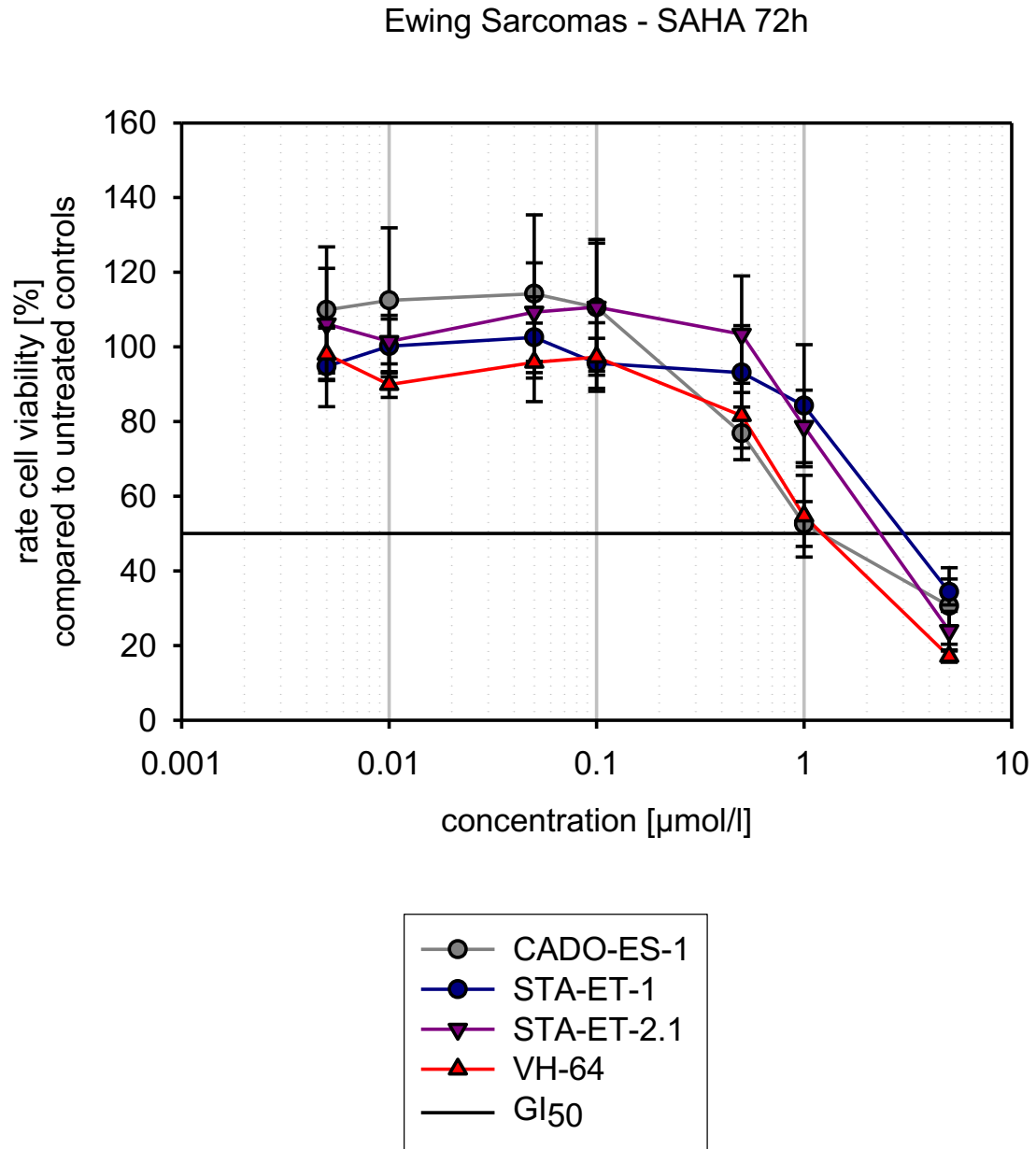


Abb.3.3-d: Leukämien, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit SAHA

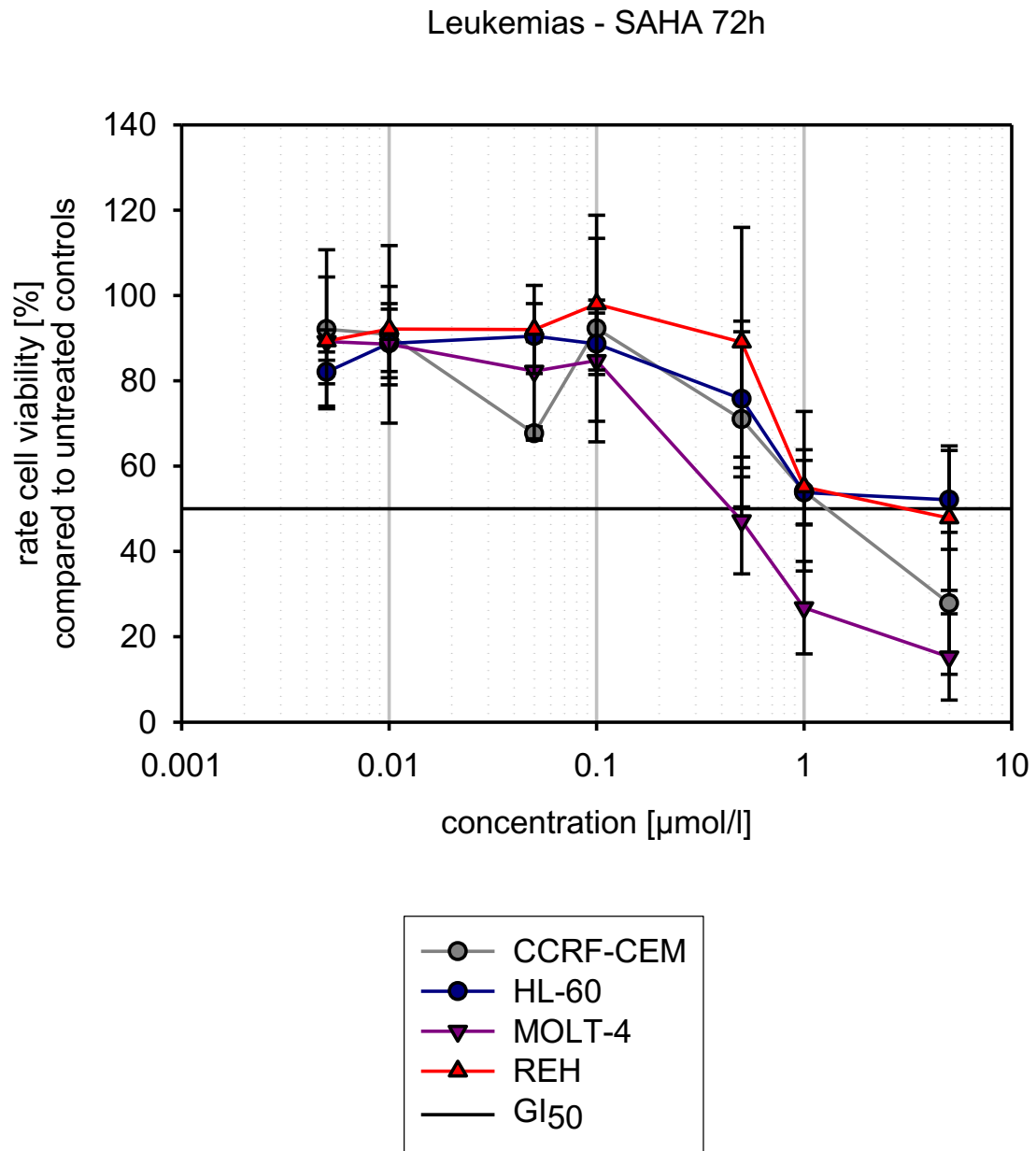




Abb.3.3-e: Neuroblastome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit SAHA

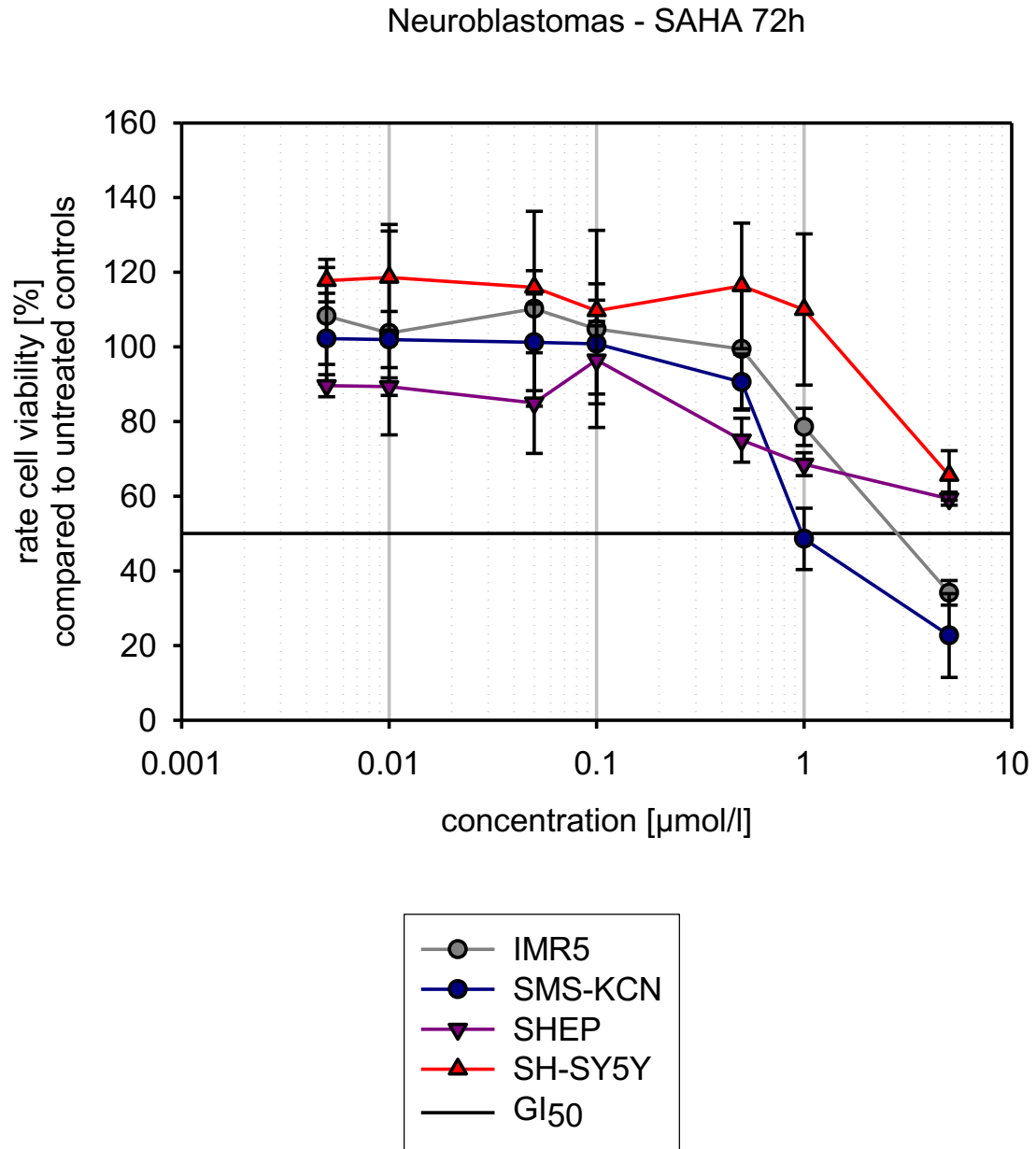


Abb.3.3-f: Rhabdomyosarkome, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 72 Stunden Inkubation mit SAHA

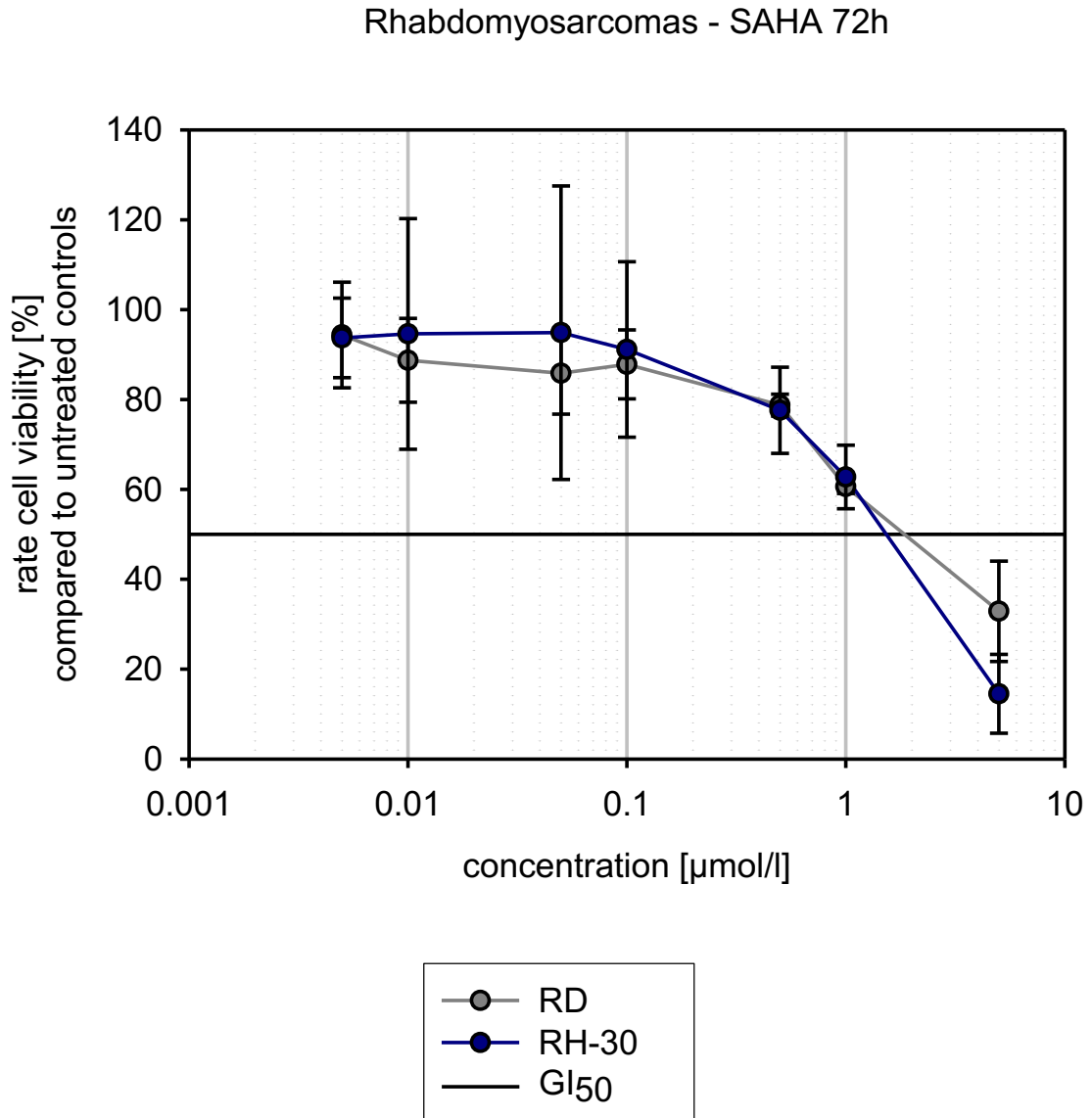
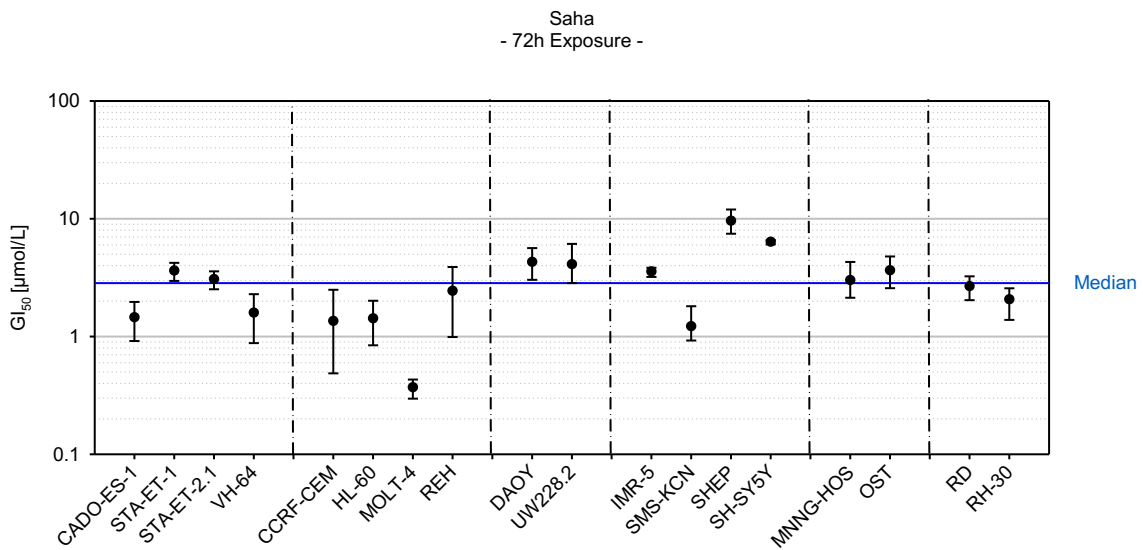


Abb. 3.3-g: GI<sub>50</sub> aller Zelllinien nach Inkubation mit SAHA für 72 Stunden

Auf eine grafische Darstellung der LC<sub>50</sub> wurde verzichtet, da die LC<sub>50</sub> nach SAHA-Inkubation bei der Mehrzahl der Zelllinien über der maximal applizierten Substanzkonzentration (5 µmol/l) lag. Eine tabellarische Aufstellung folgt:

Tab. 3.2: LC<sub>50</sub>-Mittelwerte (in µmol/l) der Zelllinien nach Inkubation mit SAHA für 72 Stunden.

Zelllinie	CADO-ES-1	STA-ET-1	STA-ET-2.1	VH-64	RD	RH-30	MOLT-4	CCRF-CEM	REH
LC <sub>50</sub>	>5	>5	>5	>5	>5	4,98	>5	>5	>5

Zelllinie	HL-60	IMR-5	SMS-KCN	SHEP	SH-SY5Y	DAOY	UW 228.2	MNNG-HOS	OST
LC <sub>50</sub>	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	4,23	>5

Im Folgenden wird die Bezeichnung Mittelwert gleichbedeutend mit dem arithmetischen Mittel verwendet.

Unter dem Einfluss von SAHA, in den getesteten Konzentrationen von 0,005  $\mu\text{mol/l}$  – 5  $\mu\text{mol/l}$ , war bei allen Zelllinien des Panels eine dosisabhängige Wachstumshemmung zu beobachten. Als sensibel wurden Zelllinien eingestuft, die innerhalb des hier geprüften Zelllinienpanels eine im Vergleich zum Median aller Zelllinien (2,84  $\mu\text{mol/l}$ ) niedrige  $\text{GI}_{50}$  aufwiesen. Zelllinien mit im Vergleich zum Median hohen  $\text{GI}_{50}$ -Konzentrationen wurden als resistent eingestuft.

Die zum Erreichen der  $\text{GI}_{50}$  benötigten Konzentrationen lagen im Bereich zwischen 0,4  $\mu\text{mol/l}$  bei der Leukämie-Zelllinie MOLT-4 und 9,6  $\mu\text{mol/l}$  bei der Neuroblastom-Zelllinie SHEP.

Besonders sensibel auf den Einfluss von SAHA zeigten sich die Leukämie-Zelllinien. Ihre  $\text{GI}_{50}$  lagen im Bereich von 0,4  $\mu\text{mol/l}$  bei MOLT-4 bis 2,4  $\mu\text{mol/l}$  bei REH. Der entitätsspezifische Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  lag bei 1,40  $\mu\text{mol/l}$ .

Die Rhabdomyosarkom-Zelllinien waren mittelgradig sensibel mit einer  $\text{GI}_{50}$  im Bereich von 2,1  $\mu\text{mol/l}$  (RH-30) bis 2,7  $\mu\text{mol/l}$  (RD). Ihr Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  lag bei 2,37  $\mu\text{mol/l}$ .

Heterogene Ergebnisse lieferten die Ewing-Sarkome. Zwei Zelllinien (CADO-ES-1,  $\text{GI}_{50}$ : 1,5  $\mu\text{mol/l}$  und VH-64,  $\text{GI}_{50}$ : 1,6  $\mu\text{mol/l}$ ) waren im Vergleich zum Median aller Zelllinien (2,84  $\mu\text{mol/l}$ ) eher sensibel und zwei Zelllinien weniger sensibel auf SAHA (STA-ET2.1,  $\text{GI}_{50}$ : 3,1  $\mu\text{mol/l}$  und STA-ET1,  $\text{GI}_{50}$ : 3,6  $\mu\text{mol/l}$ ). Bei den Ewing-Sarkom-Zelllinien lag der Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  aller Zelllinien bei 2,44  $\mu\text{mol/l}$ . Damit zeigten sie in der Gesamtschau eine relative Sensibilität.

Weniger sensibel zeigten sich die Osteosarkome mit einer  $\text{GI}_{50}$  von 3,0  $\mu\text{mol/l}$  (MNNG-HOS) bis 3,6  $\mu\text{mol/l}$  (OST). Der Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  beider Osteosarkom-Zelllinien betrug 3,33  $\mu\text{mol/l}$ .

Ebenfalls im Vergleich zum Median aller Zelllinien (2,84  $\mu\text{mol/l}$ ) als resistent einzustufen waren die Medulloblastome mit einer  $\text{GI}_{50}$  von 4,1  $\mu\text{mol/l}$  (UW228) bis 4,3  $\mu\text{mol}$  (DAOY). Der entitätsspezifische Mittelwert der  $\text{GI}_{50}$  belief sich hierbei auf 4,20  $\mu\text{mol/l}$ .

Drei der vier Neuroblastom-Zelllinien (SHEP, SH-SY5Y, IMR-5) lagen mit ihrer  $\text{GI}_{50}$  (3,6  $\mu\text{mol/l}$  - 9,6  $\mu\text{mol/l}$ ) im wenig sensiblen Bereich. Auffallend war die Sensibilität

der vierten Neuroblastom-Zelllinie SMS-KCN mit einer  $GI_{50}$  von 1,2  $\mu\text{mol/l}$ . Der Mittelwert der  $GI_{50}$  der Neuroblastom-Zelllinien lag bei 5,19  $\mu\text{mol/l}$ . In der Gesamtbetrachtung waren sie somit als resistent einzustufen.

### **3.3 Ergebnisse der Toxizitätstests der Substanzkombinationen**

Zusätzlich zur Wirkung der Einzelsubstanzen auf das Zellwachstum wurde auch der Effekt der Substanzkombination von Carmustin mit Tyrphostin AG1478 und Carmustin mit SAHA untersucht.

#### **3.3.1 Carmustin in Kombination mit Tyrphostin**

Abbildungen 3.4 a-r zeigen die Überlebensraten der einzelnen Zelllinien nach der Behandlung mit den Einzelsubstanzen und der Kombination von Carmustin und Tyrphostin AG1478 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 72 Std. Inkubationszeit. Die grafisch aufbereiteten Daten ergaben sich aus den Mittelwerten (höchster Punkt des dicken Balkens) der drei (bzw. sechs bei Carmustin) Versuchsansätze und der Kombinationsversuche der entsprechenden Zelllinien. Zusätzlich aufgetragen ist die jeweilige Standardabweichung.

Abb.3.4-a: Überlebensraten der Zelllinie CADO-ES-1

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

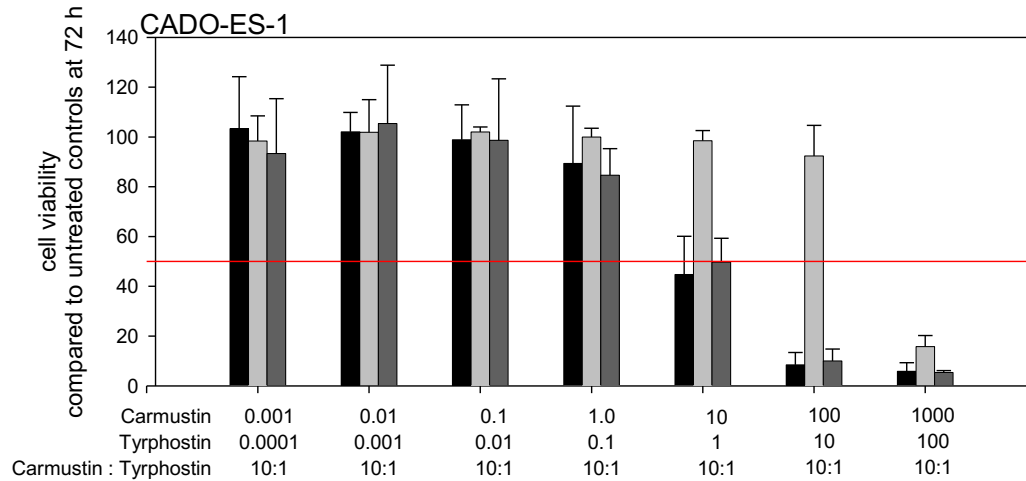


Abb.3.4-b: Überlebensraten der Zelllinie STA-ET-1

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

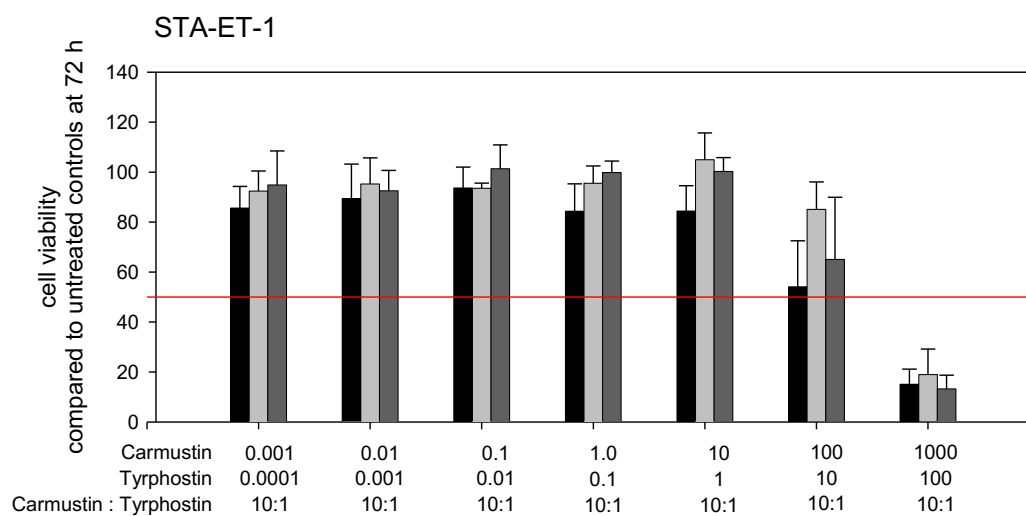


Abb.3.4-c: Überlebensraten der Zelllinie STA-ET-2

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

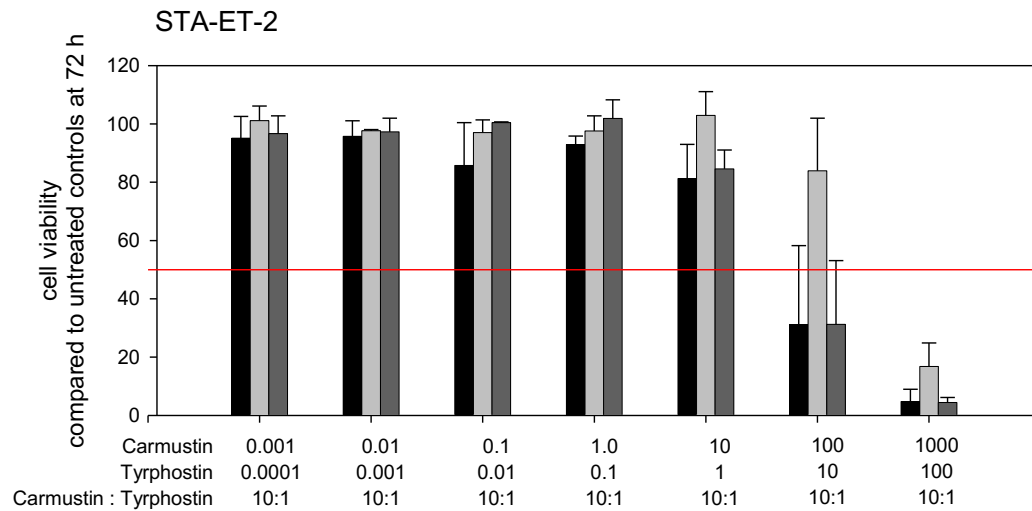


Abb.3.4-d: Überlebensraten der Zelllinie VH-64

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

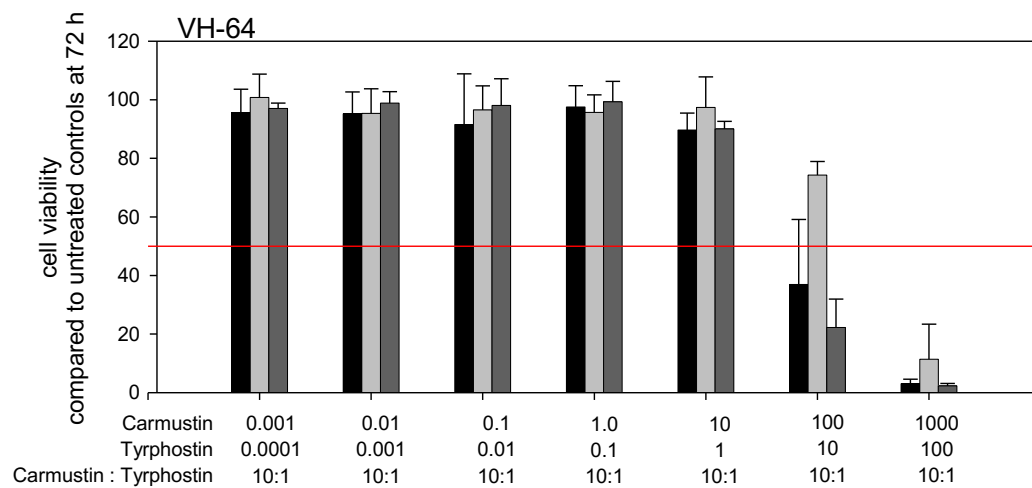


Abb.3.4-e: Überlebensraten der Zelllinie CCRF-CEM

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

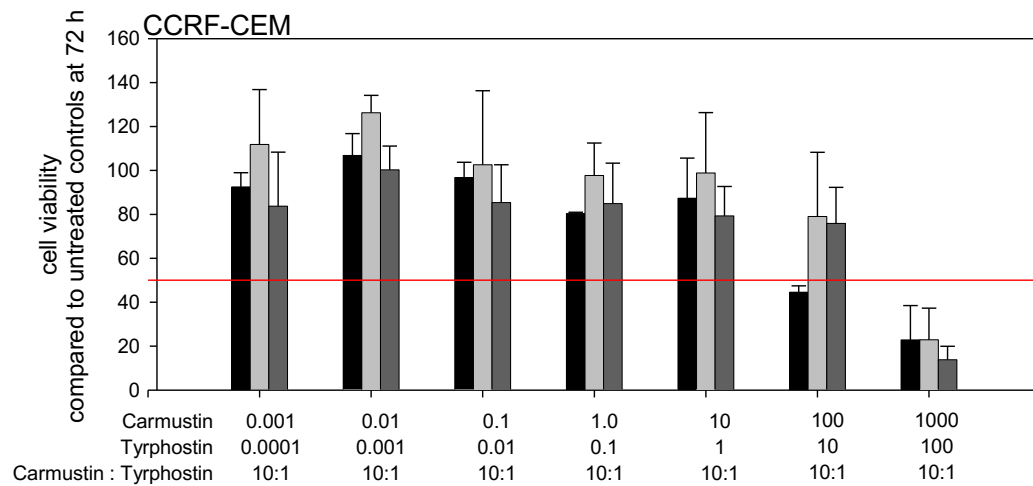
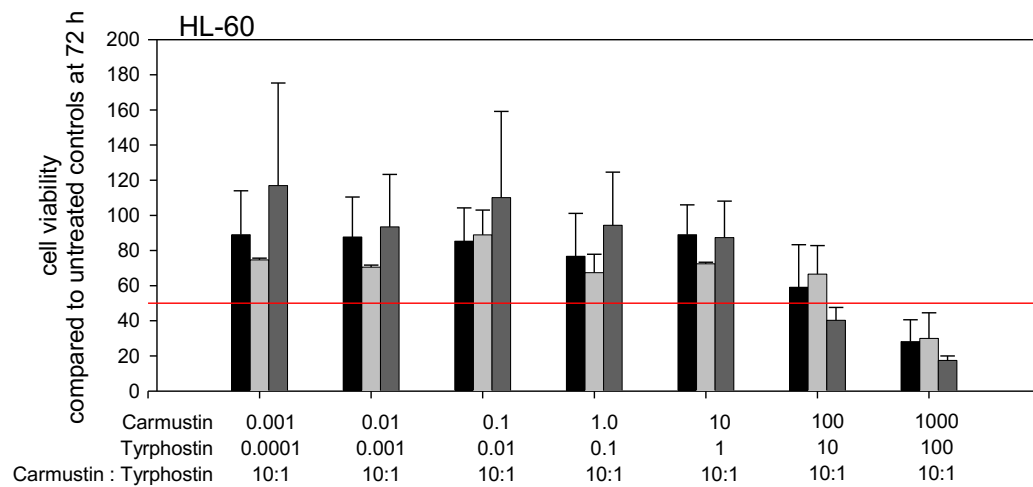


Abb.3.4-f: Überlebensraten der Zelllinie HL-60

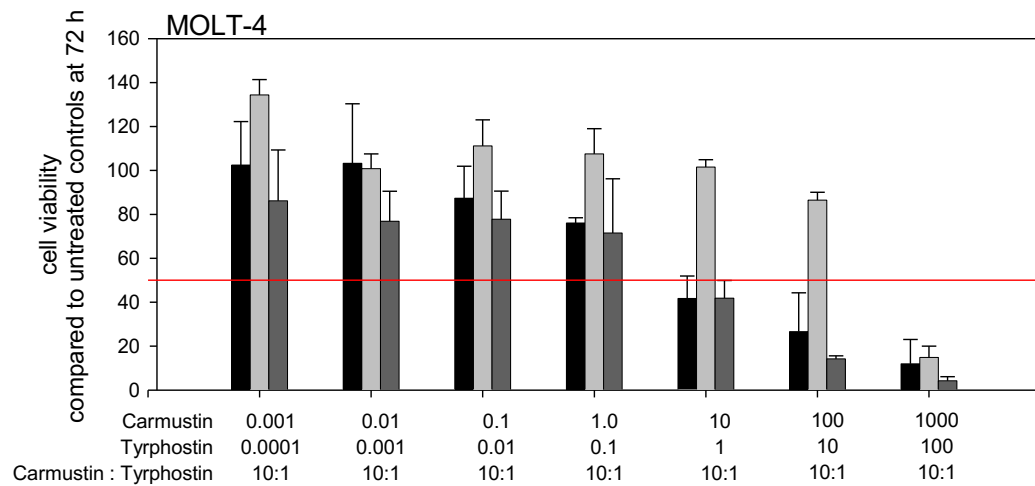
Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.





### Abb.3.4-g: Überlebensraten der Zelllinie MOLT-4

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



### Abb.3.4-h: Überlebensraten der Zelllinie REH

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

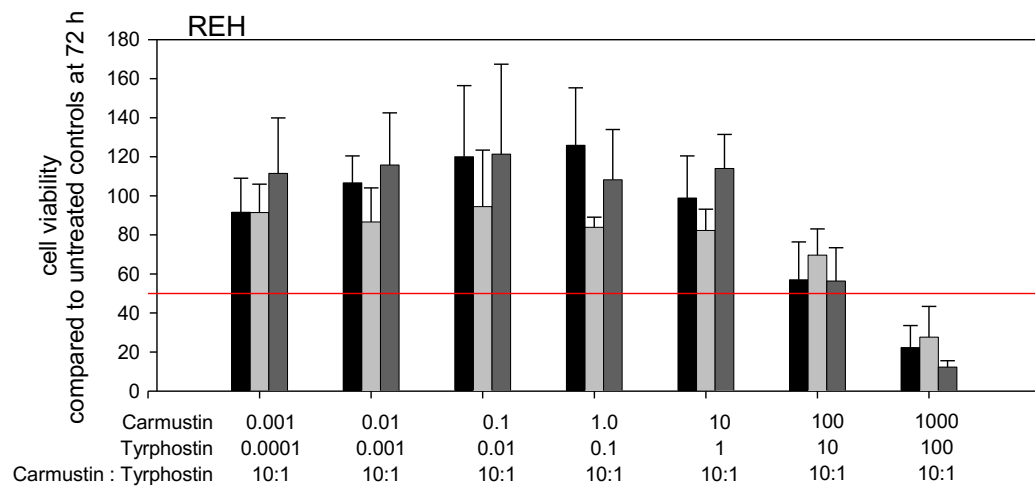


Abb.3.4-i: Überlebensraten der Zelllinie DAOY

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

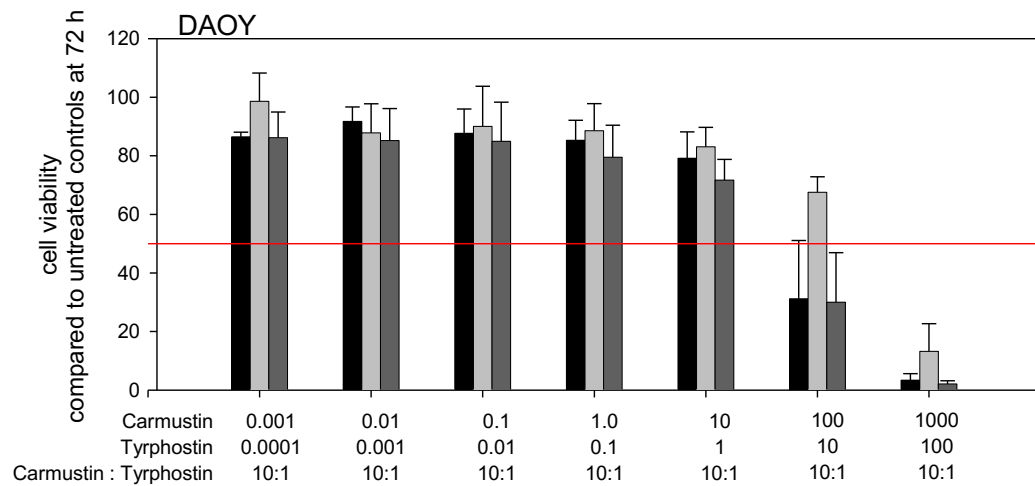
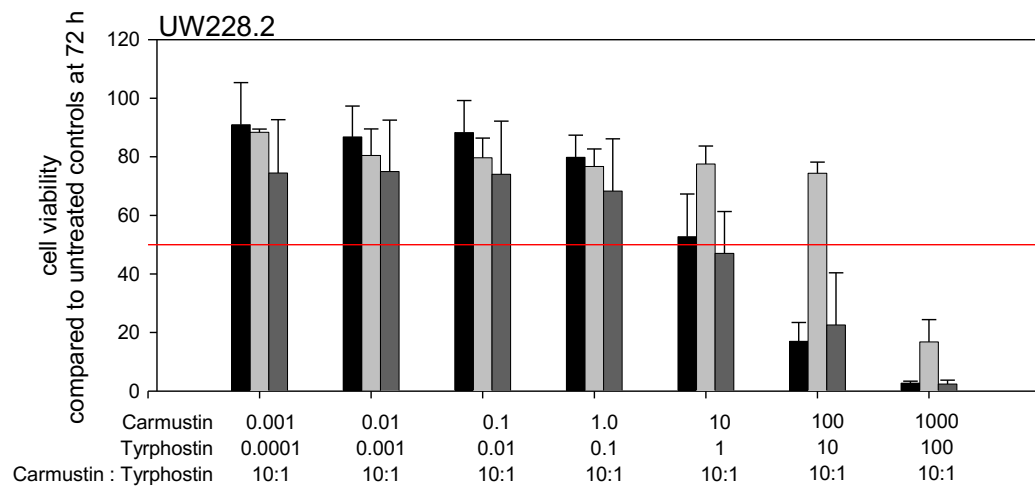


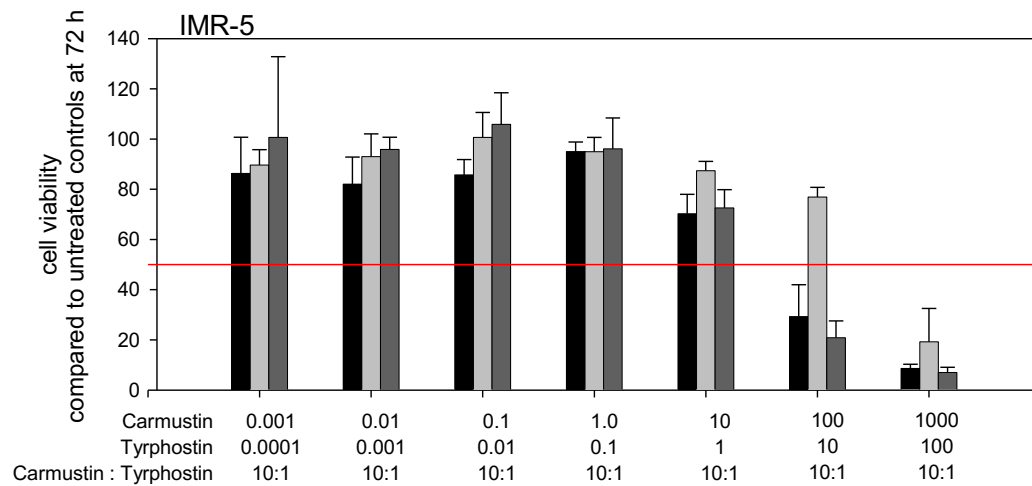
Abb.3.4-j: Überlebensraten der Zelllinie UW228.2

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



### Abb.3.4-k: Überlebensraten der Zelllinie IMR-5

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



### Abb.3.4-l: Überlebensraten der Zelllinie SMS-KCN

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

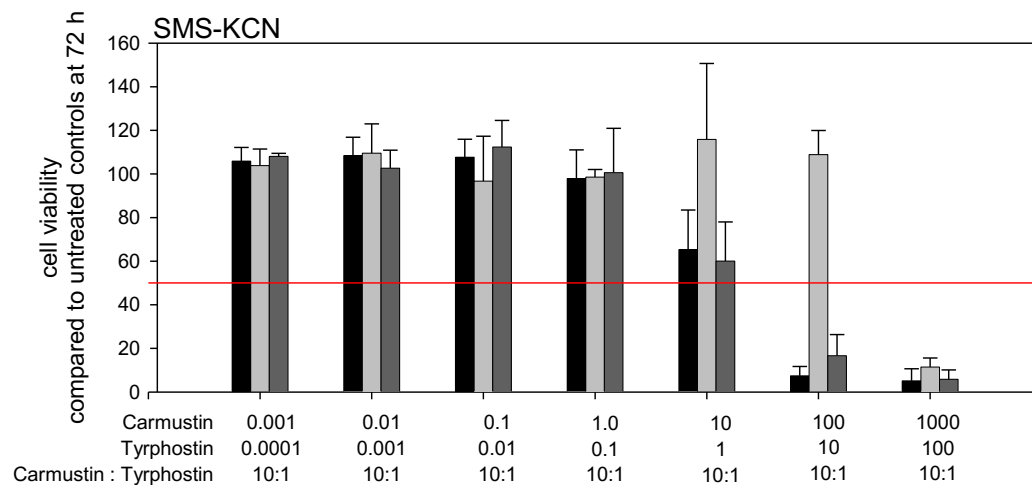


Abb.3.4-m: Überlebensraten der Zelllinie SHEP

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

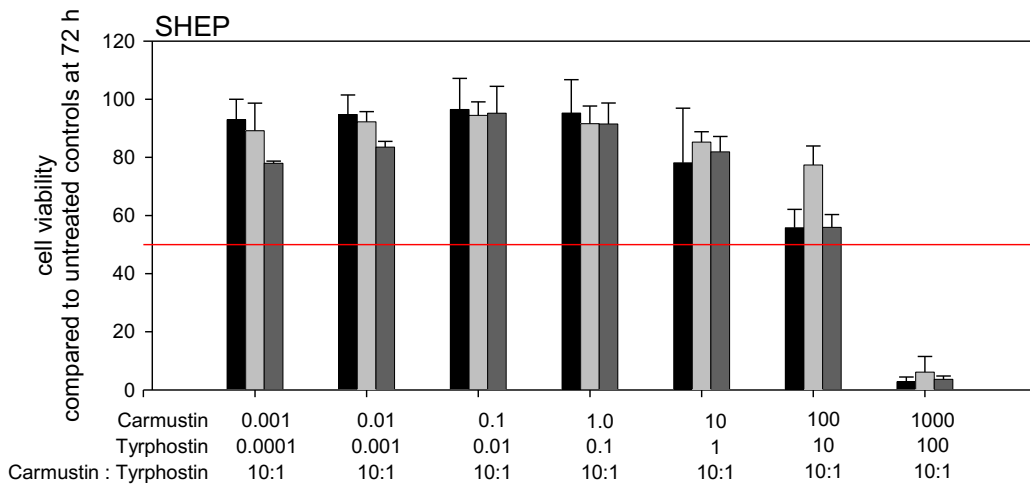
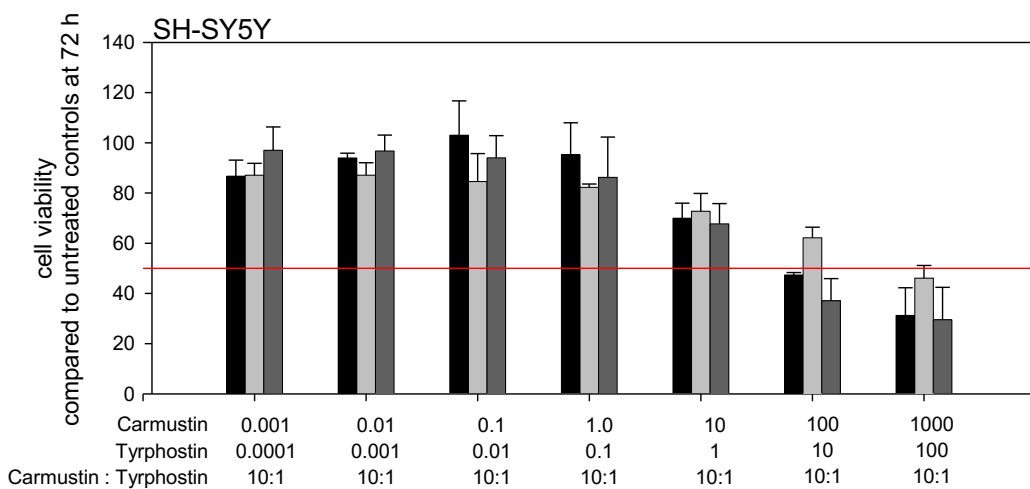


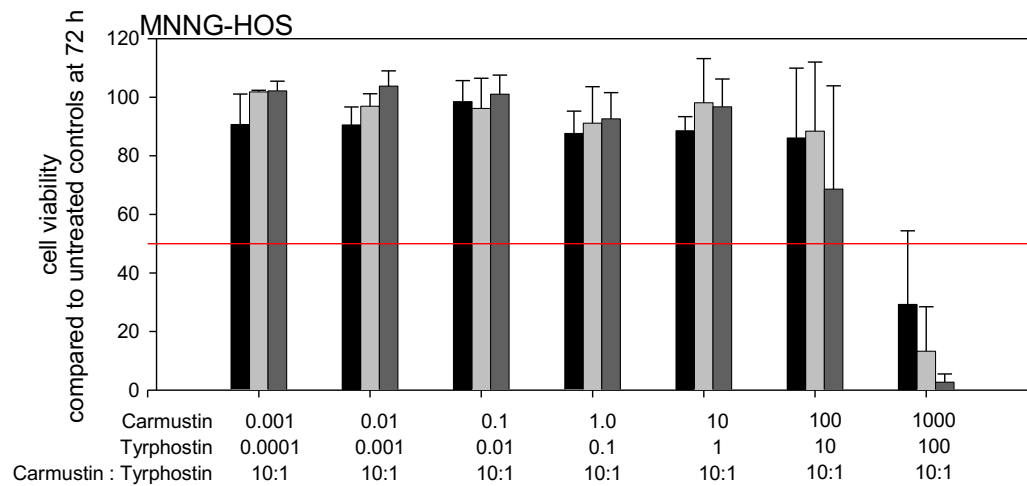
Abb.3.4-n: Überlebensraten der Zelllinie SH-SY5Y

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



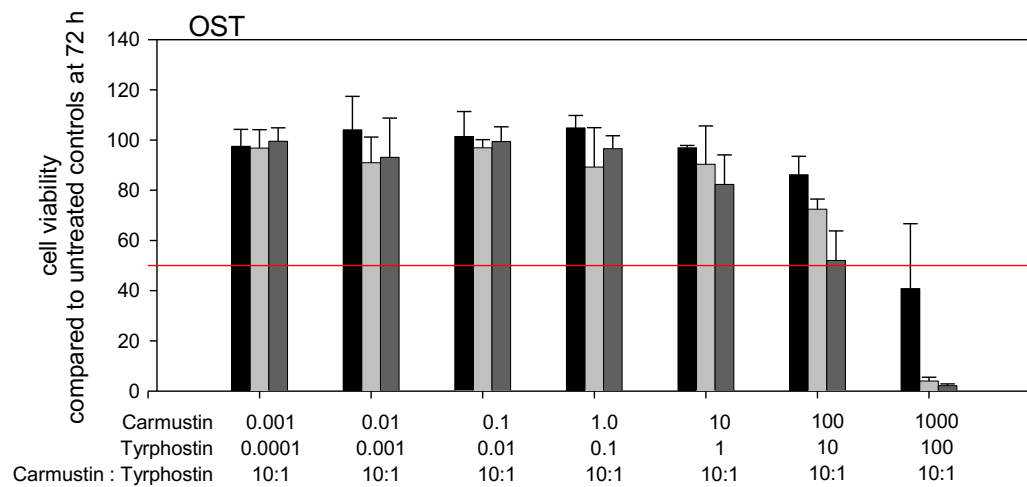
### Abb.3.4-o: Überlebensraten der Zelllinie MNNG-HOS

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



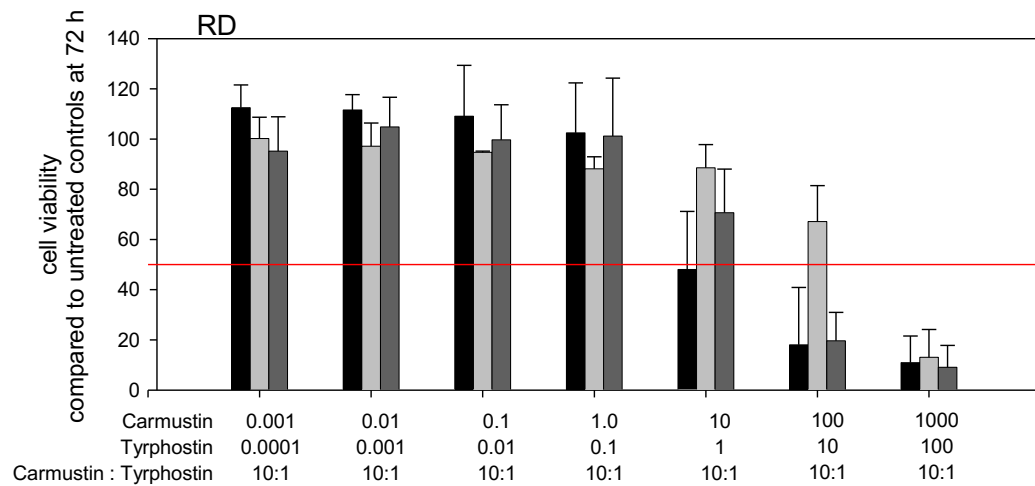
### Abb.3.4-p: Überlebensraten der Zelllinie OST

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



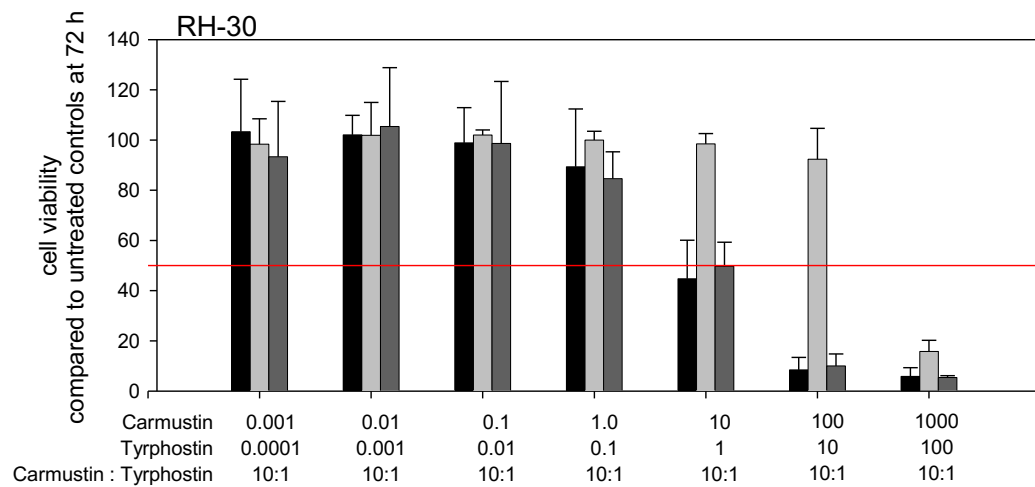
### Abb.3.4-q: Überlebensraten der Zelllinie RD

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



### Abb.3.4-r: Überlebensraten der Zelllinie RH-30

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; Tyrphostin: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



Ein von der alleinigen Applikation von Carmustin abweichendes Wachstumsverhalten zeigte sich bei den Leukämie-Zelllinien, den Osteosarkom-Zelllinien und der Ewing-Sarkom-Zelllinie VH-64.

Bei den übrigen Zelllinien bewirkte eine gleichzeitige Applikation der Substanzen Carmustin und Tyrphostin AG1478 keine nennenswert verstärkte Wachstumshemmung als mit Carmustin allein in entsprechender Konzentration. Es kam jedoch auch nicht zu einer Abschwächung der Wirkung von Carmustin.

Die  $GI_{50}$  der Substanzkombination wurde bei allen Zelllinien zwischen der 4. Konzentrationsstufe ( $1\mu\text{mol/l}$  Carmustin +  $0,1\mu\text{mol/l}$  Tyrphostin AG1478) und der 7. Konzentrationsstufe ( $1000\mu\text{mol/l}$  Carmustin +  $100\mu\text{mol/l}$  Tyrphostin AG1478) erreicht (s.Abb).

Die Leukämie-Zelllinien CCRF-CEM, HL-60, REH und MOLT-4 zeigten in den höheren zytostatischen Konzentrationen (6. und 7. Konzentrationsstufen) synergistische Effekte bei der Kombination der Substanzen im Vergleich zur Einzelsubstanz Carmustin. Diese waren jedoch nicht ausreichend, um die  $GI_{50}$  um eine ganze Konzentrationsstufe zu reduzieren.

Die synergistische Wirkung der Kombination von Carmustin und Tyrphostin AG1478 auf die Wachstumshemmung der Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST war deutlicher ausgeprägt. Dies ließ sich besonders gut in den beiden höchsten Konzentrationsstufen beobachten. Die Wachstumshemmungen der Osteosarkom-Zelllinien durch die beiden Einzelsubstanzen wirkten hier synergistisch. Die schon bei alleiniger Zugabe von Tyrphostin AG1478 relativ gute Wachstumshemmung konnte durch die Kombination mit Carmustin noch verbessert werden.

Ebenfalls synergistische Effekte von Carmustin und Tyrphostin AG1478 zeigten sich bei der Ewing-Sarkom-Zelllinie VH-64 in der 6. und 7. Konzentrationsstufe.

Tab.3.3: GI<sub>50</sub> (in µM) und Kombinationsindex bei Kombination von Carmustin mit Tyrphostin AG1478

Zelllinie	GI <sub>50</sub> Carmustin Einzelversuche	GI <sub>50</sub> Tyrphostin Einzelversuche	GI <sub>50</sub> Carmustin Kombination	GI <sub>50</sub> Tyrphostin Kombination	Komb.- Index	synergistisch(+) additiv(+/-) antagonistisch(-)
MOLT-4	38,85	55,96	6,98	0,70	0,19	+
CCRF-CEM	150,83	43,00	457,14	45,71	7,32	-
REH	358,68	55,62	265,37	26,54	1,57	-
HL-60	438,75	48,09	82,17	8,22	0,39	+
VH-64	124,56	45,62	63,84	6,38	0,72	+
STA-ET-2.1	138,18	53,60	55,85	5,58	0,55	+
STA-ET-1	229,56	57,81	205,13	20,51	1,57	-
CADO-ES-1	71,80	58,45	67,59	6,76	1,17	-
UW228.2	33,52	48,44	13,59	1,36	0,45	+
DAOY	75,72	39,51	64,19	6,42	1,15	-
SMS-SMS- KCN	35,60	64,14	30,34	3,03	0,94	+/-
SHEP	167,56	44,51	198,22	19,82	2,16	-
SH-SY5Y	86,17	79,53	64,23	6,42	0,89	+
IMR-5	58,63	53,63	49,09	4,91	1,01	+/-
OST	769,58	39,41	179,39	17,94	0,79	+
MNNG- HOS	829,20	55,10	281,52	28,15	1,02	+/-
RH-30	10,55	59,13	14,73	1,47	1,46	-
RD	24,12	34,85	42,82	4,28	2,12	-

Augenscheinliche Effekte wie die eben beschriebenen synergistischen Effekte einzelner Zelllinien, insbesondere in den höheren Konzentrationsstufen, lassen sich den grafischen Darstellungen entnehmen.

Eine differenziertere und aussagekräftigere Evaluation bezüglich synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte gelingt mit Hilfe der Kombinationsindizes nach Chou und Talahay (19).



Einschränkend ist zu bemerken, dass für die Berechnung der Indices nur die  $GI_{50}$  der jeweiligen Zelllinien herangezogen wurden. Daraus ergibt sich, dass etwaige Effekte auch nur in diesem Konzentrationsbereich aufgezeigt wurden. In Konzentrationen die höher waren als die  $GI_{50}$  ist es durchaus zu synergistischen Effekten gekommen, auch wenn diese nicht in den Kombinationsindizes zu erkennen sind.

Kombinationsindizes nach Cho und Talahay wurden für jede Zelllinie mit den entsprechenden  $GI_{50}$  berechnet (18). So konnten die gewonnenen Daten kategorisch nach additiven, synergistischen und antagonistischen Effekten der Substanzkombination ausgewertet werden. Bei einem Index  $0,9 \leq$  wurden synergistische Effekte der Substanzkombination angenommen, bei einem Index zwischen 0,9 und 1,1 additive Effekte und bei einem Index  $\geq 1,1$  antagonistische Effekte (20).

Bei der Auswertung der berechneten Kombinationsindizes zeigten sich bemerkenswerte synergistische Effekte der Substanzkombination bei den Leukämiezelllinien MOLT-4 und HL-60. Ebenfalls synergistische Effekte konnten bei den Ewingsarkomzelllinien VH-64 und STA-ET-2.1, der Medulloblastomzelllinie UW228.2, der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und der Osteosarkomzelllinie OST beobachtet werden.

### **3.2.2 Carmustin in Kombination mit SAHA**

Abbildungen 3.5 a-r zeigen die Überlebensraten der einzelnen Zelllinien nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen und der Kombination von Carmustin und SAHA. Die grafisch aufbereiteten Daten ergaben sich aus den Mittelwerten, die bei den drei Kombinationsversuchen berechnet wurden.

Abb.3.5-a: Überlebensraten der Zelllinie CADO-ES-1

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

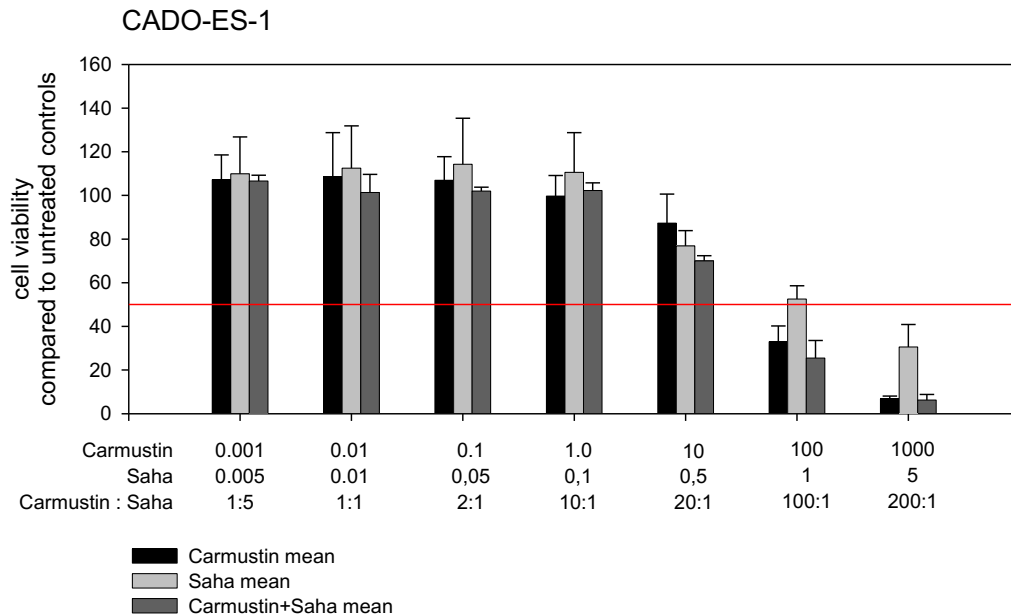


Abb.3.5-b: Überlebensraten der Zelllinie STA-ET-1

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

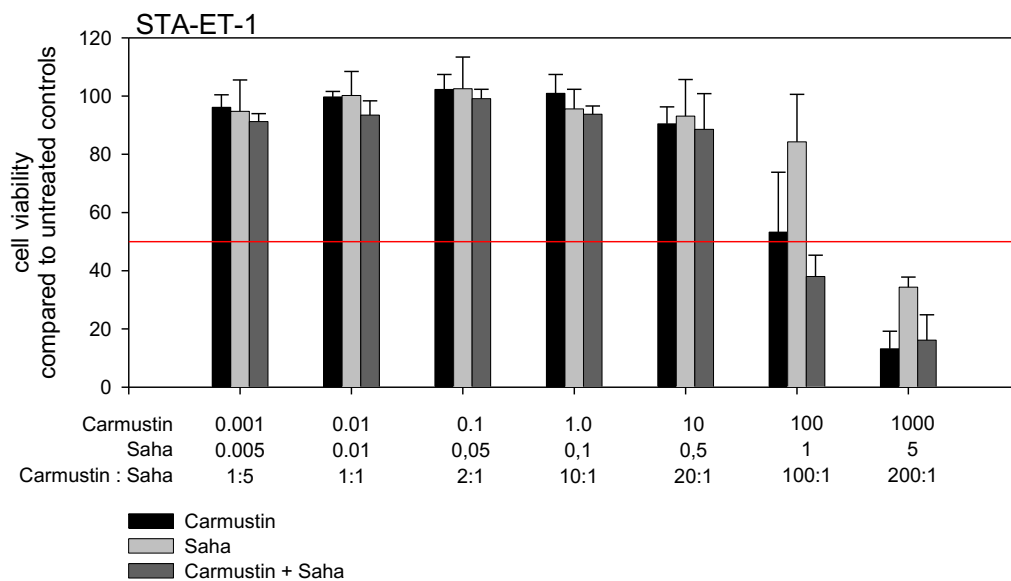


Abb.3.5-c: Überlebensraten der Zelllinie STA-ET-2.1

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

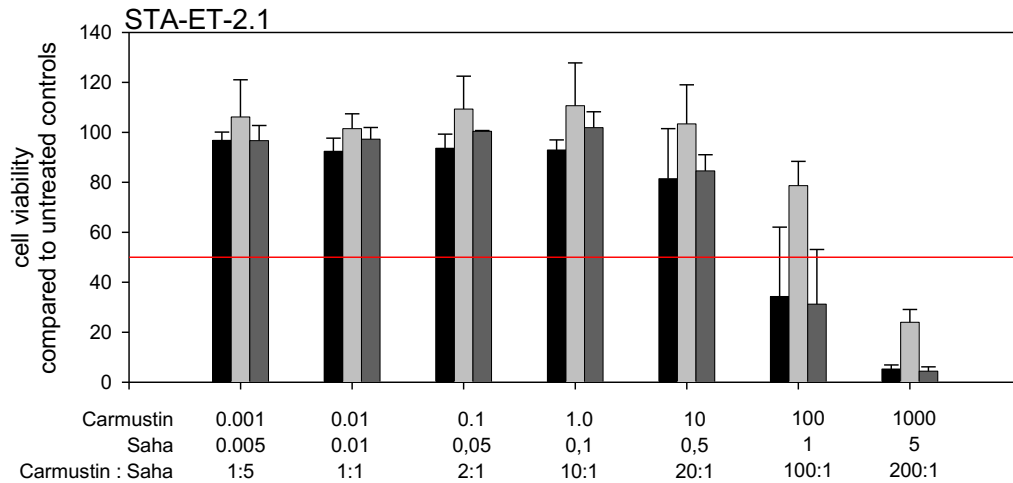
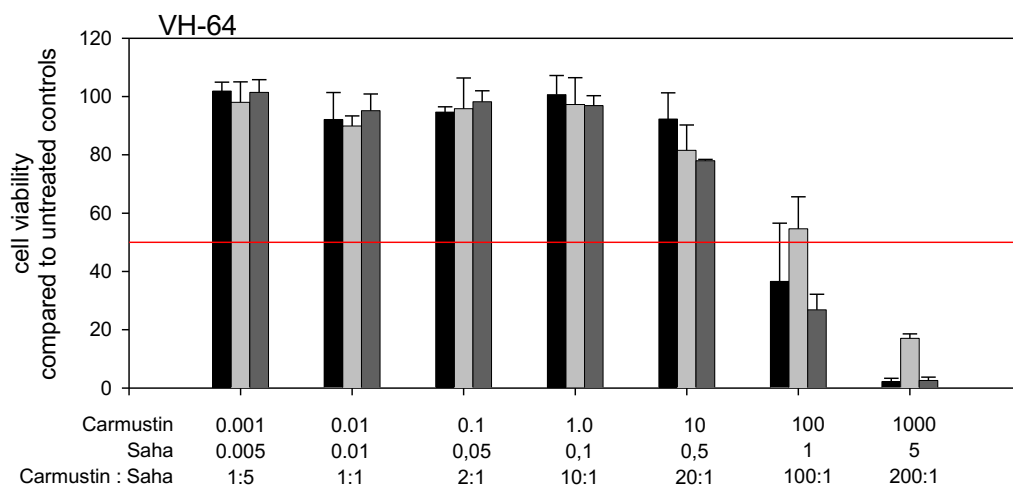


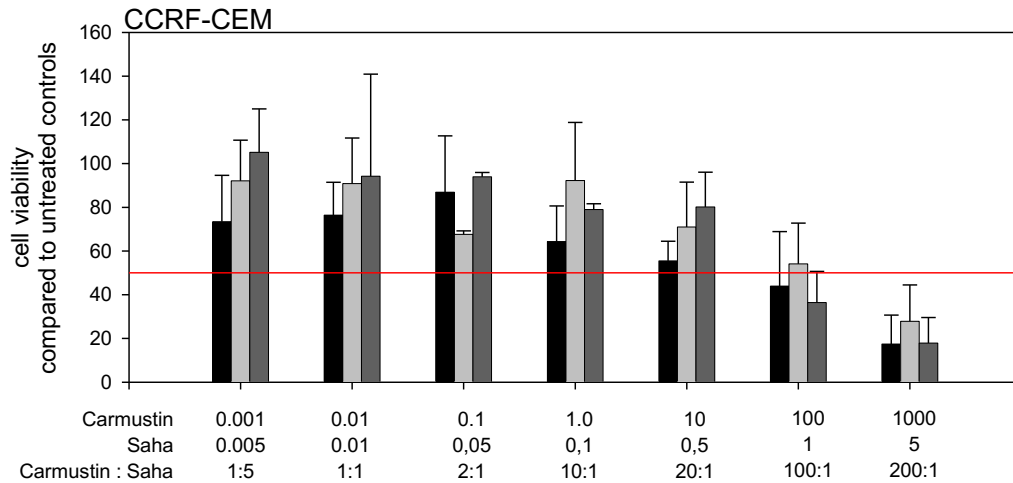
Abb.3.5-d: Überlebensraten der Zelllinie VH-64

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



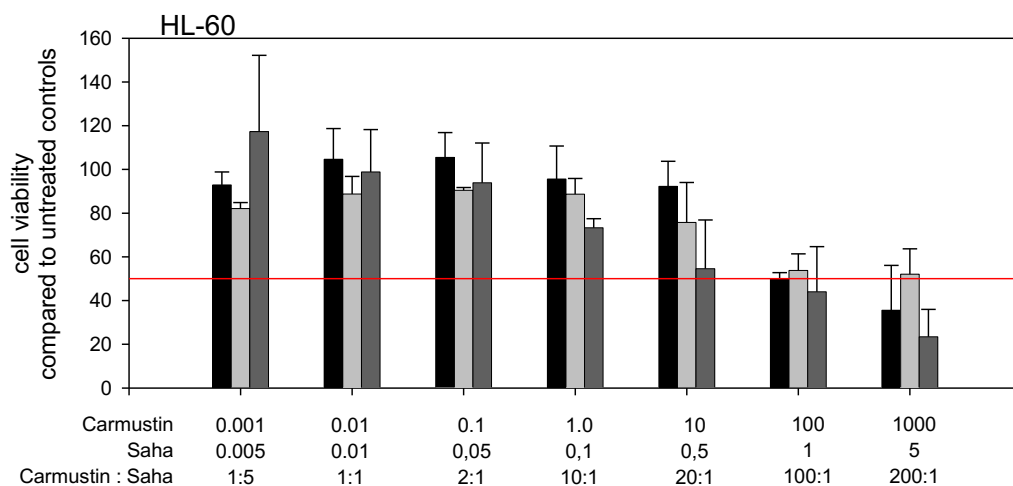
### Abb.3.5-e: Überlebensraten der Zelllinie CCRF-CEM

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen in Prozent und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



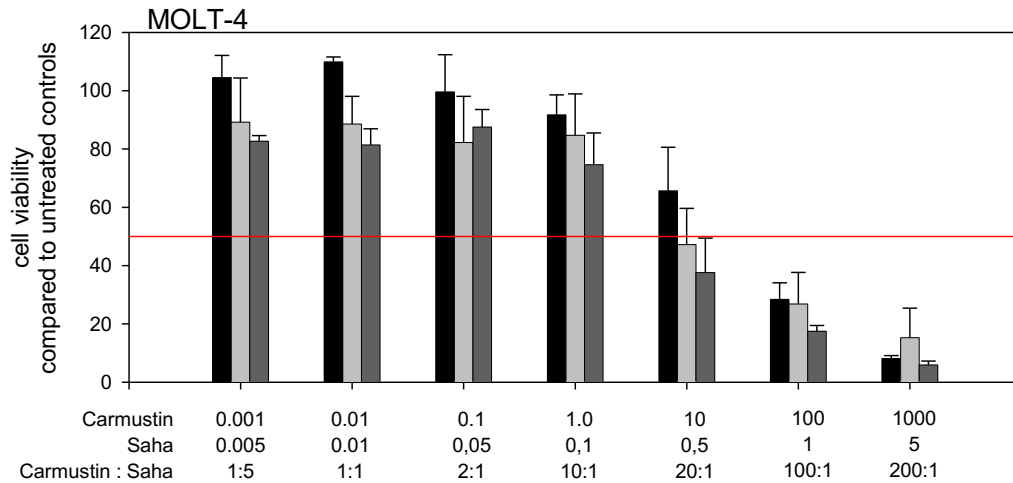
### Abb.3.5-f: Überlebensraten der Zelllinie HL-60

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



### Abb.3.5-g: Überlebensraten der Zelllinie MOLT-4

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



### Abb.3.5-h: Überlebensraten der Zelllinie REH

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

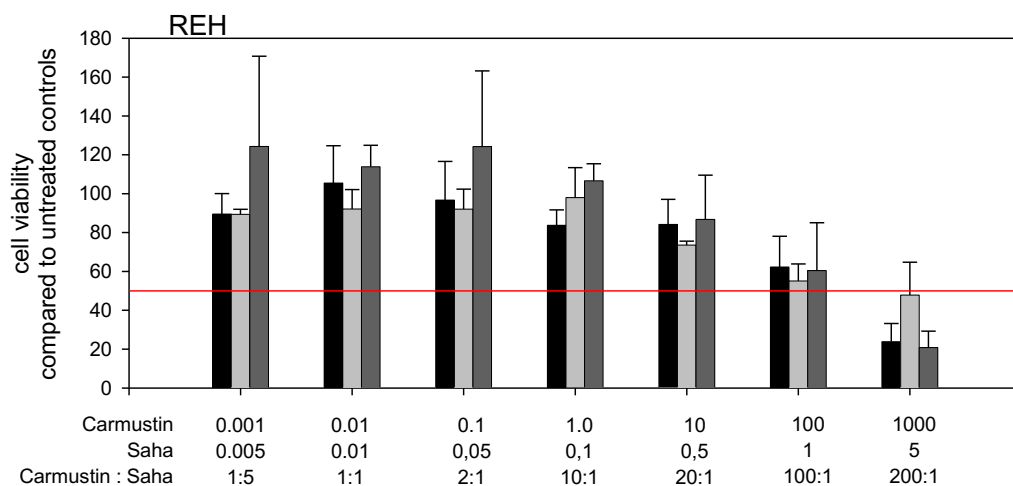


Abb.3.5-i: Überlebensraten der Zelllinie DAOY

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

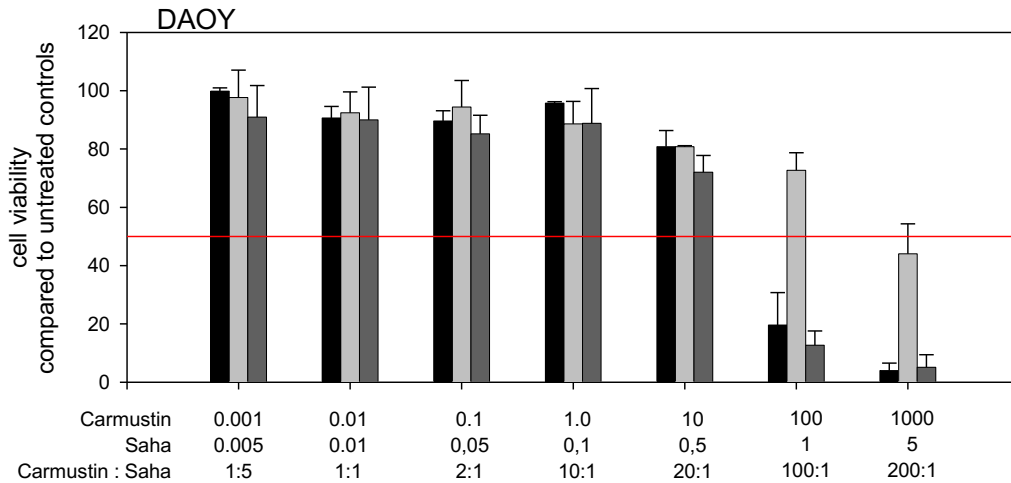


Abb.3.5-j: Überlebensraten der Zelllinie UW228.2

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

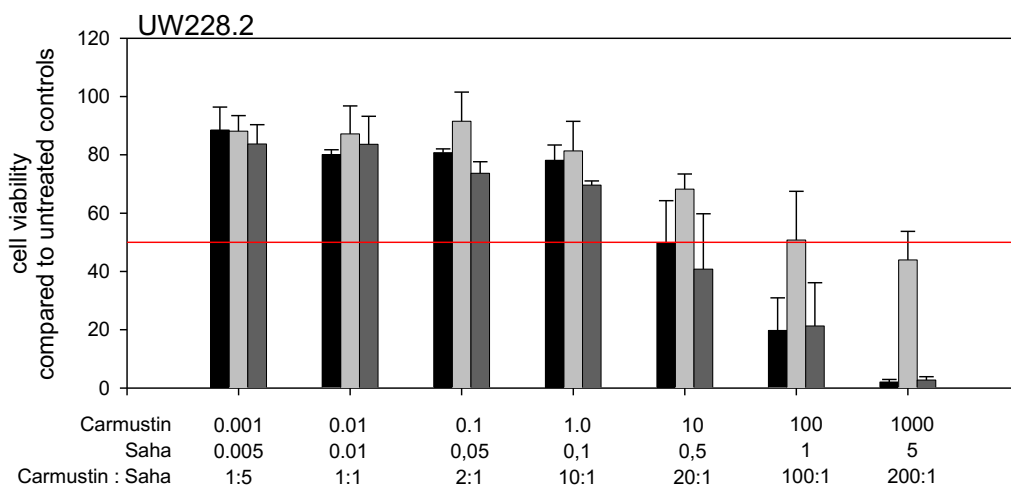


Abb.3.5-k: Überlebensraten der Zelllinie IMR-5

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

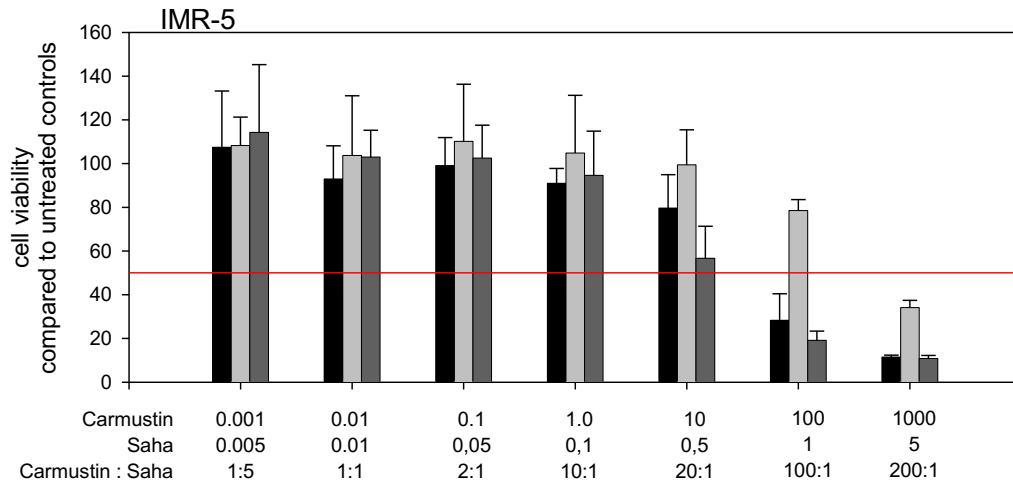


Abb.3.5-l: Überlebensraten der Zelllinie SMS-KCN

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

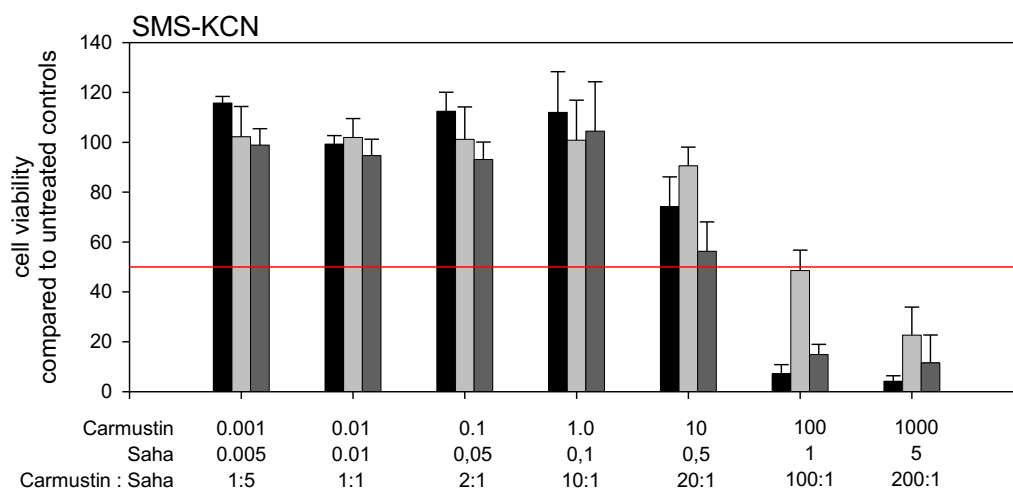


Abb.3.5-m: Überlebensraten der Zelllinie SHEP

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

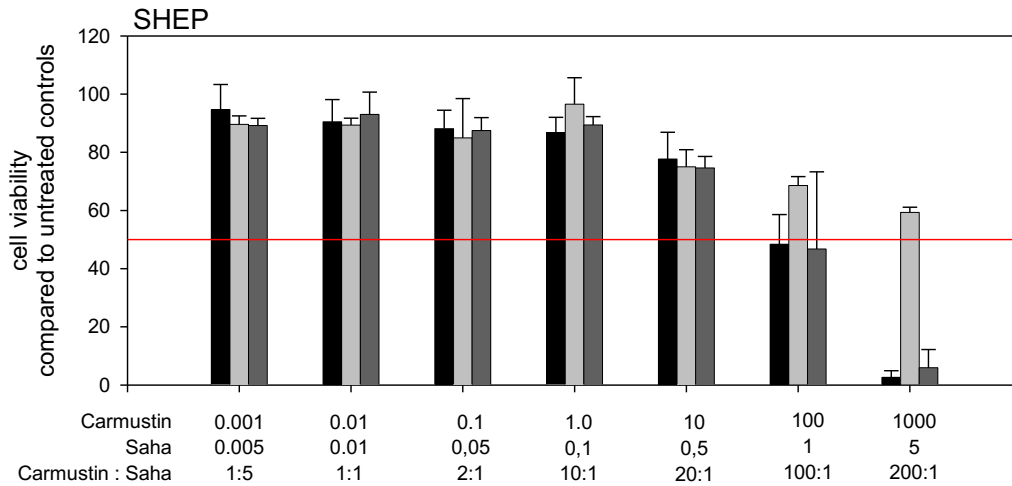


Abb.3.5-n: Überlebensraten der Zelllinie SHSY-5Y

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

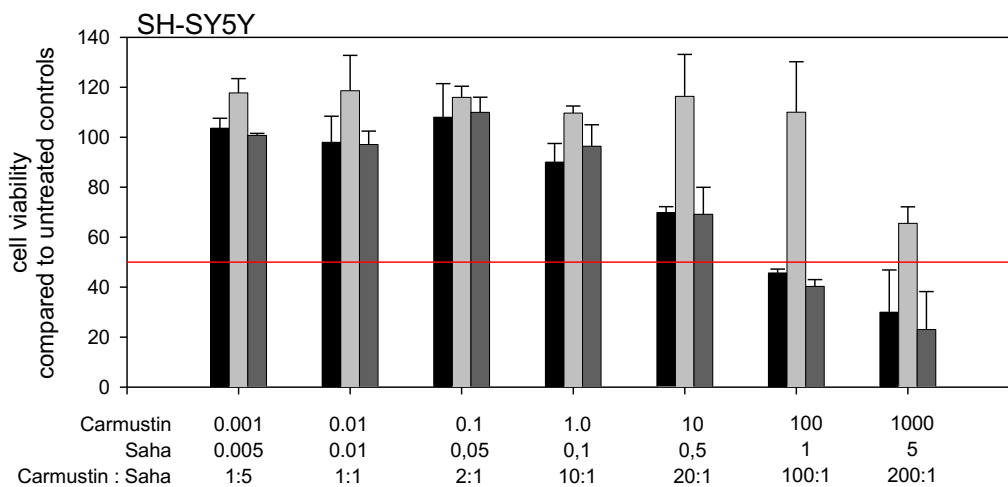




Abb.3.5-o: Überlebensraten der Zelllinie MNNG-HOS

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

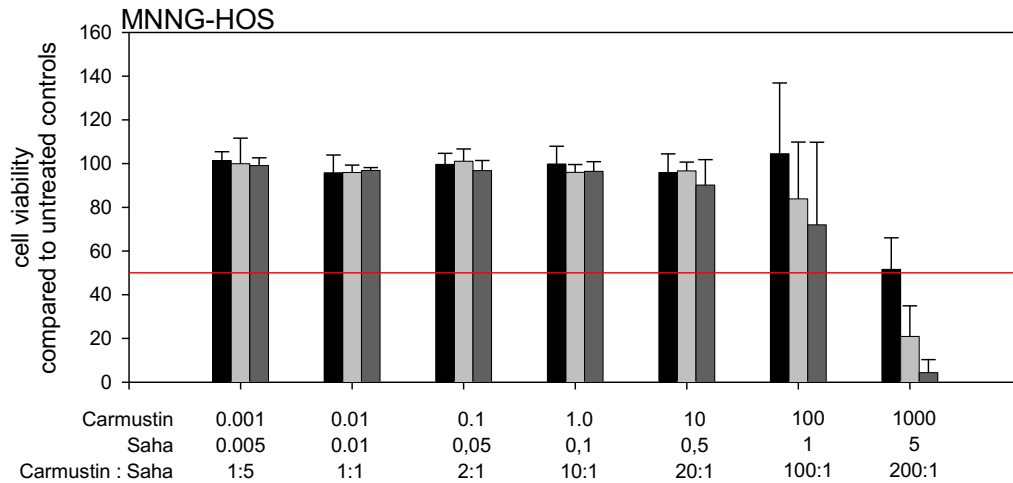


Abb.3.5-p: Überlebensraten der Zelllinie OST

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

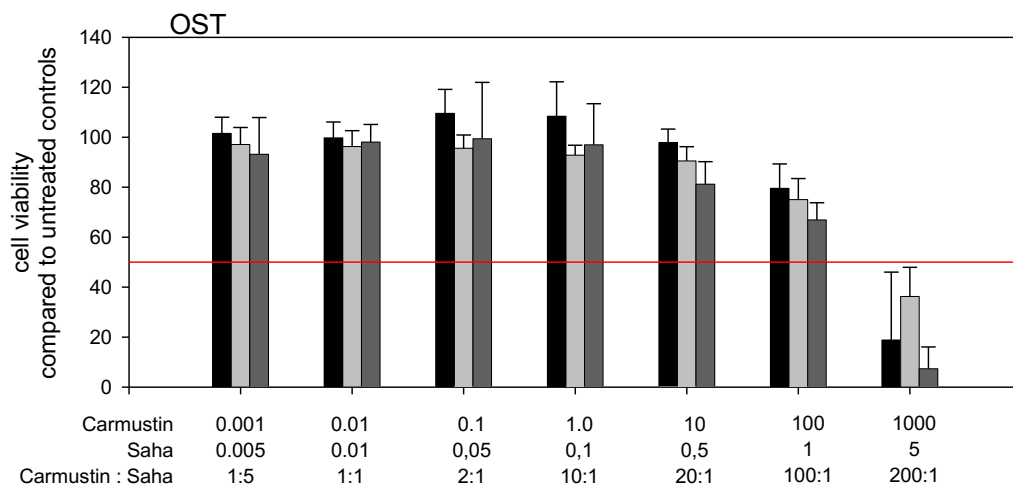


Abb.3.5-q: Überlebensraten der Zelllinie RD

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.

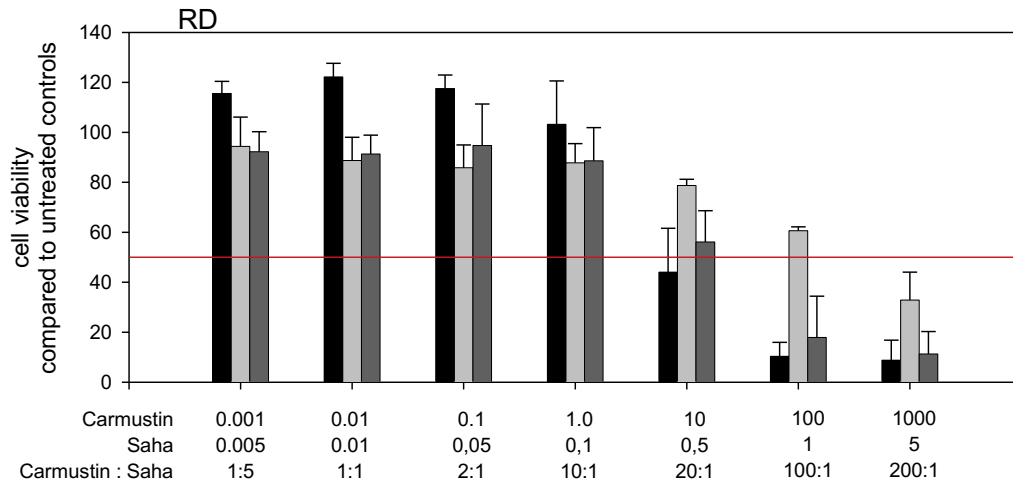
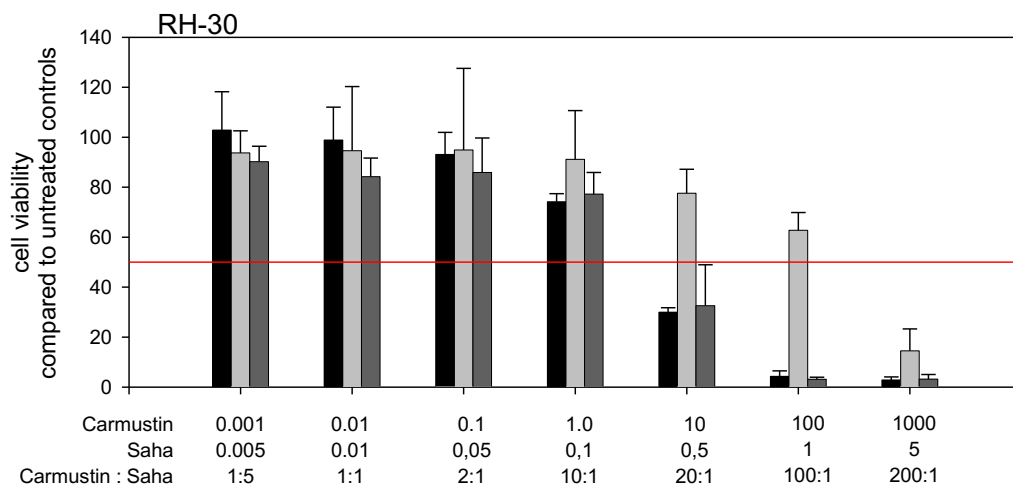


Abb.3.5-r: Überlebensraten der Zelllinie RH-30

Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der überlebenden Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus drei (bzw. sechs) unabhängigen Einzelversuchen und die zugehörige Standardabweichung. Carmustin: schwarz; SAHA: hellgrau; Kombination: dunkelgrau.



Im Vergleich zur getrennten Applikation der Substanzen zeigten sich bei einigen Zelllinien bei der Substanzkombination von Carmustin und SAHA synergistische Effekte, bei Anderen waren diese nicht zu beobachten. Bei einer Zelllinie (SMS-KCN) zeigten sich bei höheren Konzentrationen (6. und 7. Konzentrationsstufe) inhibitorische Effekte. Bei der Osteosarkom-Zelllinie MNNG-HOS zeigte sich eine deutliche Verschiebung der für die Unterschreitung der  $GI_{50}$  benötigten Konzentration im Vergleich zu Carmustin als Einzelsubstanz. Nicht ganz so ausgeprägt, aber dennoch deutlich war dieser Effekt bei der anderen Osteosarkomzelllinie OST.

Die Ewing-Sarkom-Zelllinien CADO-ES-1 und VH-64 zeigten in den höheren Konzentrationsbereichen (5., 6. und 7. Konzentrationsstufe) diskrete synergistische Effekte bei der Substanzkombination. Auch bei den Medulloblastomzelllinien UW228.2 und DAOY konnten aus den grafischen Darstellungen synergistische oder additive Effekte angenommen werden.

Bei den Leukämien und den Neuroblastomen war das Bild geteilt: IMR-5, SHSY-5Y (Neuroblastome) und HL-60, MOLT-4 (Leukämien) zeigten unter Kombinationsapplikation eine stärkere Wachstumshemmung als bei der Applikation der Monosubstanzen, die anderen Zelllinien der jeweiligen Entität nicht.

Tab. 3.4: GI<sub>50</sub> (in µM) und Kombinationsindex bei Kombination von Carmustin mit SAHA

Zelllinie	GI <sub>50</sub> Carmustin Einzelversuche	GI <sub>50</sub> SAHA Einzelversuche	GI <sub>50</sub> Carmustin Kombination	GI <sub>50</sub> SAHA Kombination	Komb.- Index	synergistisch(+) additiv(+/-) antagonistisch(-)
MOLT-4	38,85	0,37	8,09	0,37	1,42	-
CCRF-CEM	150,83	1,36	88,62	0,92	1,66	-
REH	358,68	2,44	379,53	2,22	2,93	-
HL-60	438,75	1,43	210,40	1,38	1,91	-
VH-64	124,56	1,59	59,60	0,81	1,23	-
STA-ET2.1	138,18	3,07	104,98	0,99	1,33	-
STA-ET1	229,56	3,63	78,56	0,88	0,67	+
CADO-ES-1	71,80	1,45	51,31	0,73	1,57	-
UW228.2	33,52	4,11	19,84	0,46	0,77	+
DAOY	75,72	4,30	44,47	0,69	0,84	+
SMS-SMS- KCN	35,60	1,22	25,13	0,57	1,50	-
SHEP	167,56	9,61	217,90	1,50	1,66	-
SH-SY5Y	86,17	6,36	67,21	0,82	1,01	+/-
IMR-5	58,63	3,56	29,78	0,58	0,75	+
OST	769,58	3,65	353,95	2,13	1,31	-
MNNG-HOS	829,20	3,01	293,56	1,86	1,19	-
RH-30	10,55	2,07	6,81	0,36	0,93	+
RD	24,12	2,68	21,34	0,55	1,27	-

Wie bei der Substanzkombination von Carmustin und Tyrphostin wurden zur weiteren Objektivierung der Ergebnisse nicht nur grafische Auswertungen vorgenommen, sondern auch die Kombinationsindizes nach Chou und Talahay berechnet (s. Tab. 3.4). Die Einteilung in synergistische, additive oder antagonistische Effekte erfolgte wie von Chou und Talahay publiziert (18,19). Bei der Auswertung der Kombinationsindizes zeigten sich bemerkenswerte synergistische Effekte bei der Ewingsarkomzelllinie STA-

ET-1, den Medulloblastomzelllinien UW228.2 und DAOY, der Neuroblastomzelllinie IMR-5 und der Rhabdomyosarkomzelllinie RH-30. Außerdem waren die inhibitorischen Effekte bei allen vier Leukämiezelllinien auffällig.

#### **4. Diskussion der Ergebnisse**

##### **4.1 Einordnung der Wertigkeit des In-vitro-Modells**

Trotz der in den letzten Jahrzehnten ausgeprägten Prognoseverbesserung im Bereich der pädiatrischen Neoplasien bleibt es weiterhin ausgesprochen wichtig, die bestehenden Behandlungskonzepte zu hinterfragen und im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien zu verbessern.

Die wichtigste Säule dieser multimodalen Behandlungskonzepte ist, mit deutlichen Unterschieden bei den einzelnen Entitäten, nach wie vor die Chemotherapie. Bei der Optimierung der chemotherapeutischen Behandlung ergeben sich jedoch regelmäßig Probleme, die insbesondere den pädiatrischen Bereich der Onkologie betreffen. Der Anteil pädiatrischer Neoplasien an allen malignen Erkrankungen beträgt nur 0,4 %. Gleichzeitig werden mit den heute üblichen Behandlungsschemata vergleichsweise gute Überlebensraten bei kindlichen Tumorerkrankungen erreicht.

Doch gaben nicht alle pädiatrischen Neoplasien gute Prognosen: Exemplarisch seien die auch in dieser Arbeit vertretenen Ewing-Sarkome und Rhabdomyosarkome zu nennen, die immer noch eine 5-Jahresüberlebensrate von nur ca. 66 % haben (27).

In diesem Zusammenhang sollten auch Besonderheiten der pädiatrischen Onkologie beachtet werden: Kinder zeigen eine andere Pharmakokinetik- und -dynamik als Erwachsene und sie leiden auch in einem anderen Umfang als Erwachsene an den auftretenden Nebenwirkungen der Behandlung. Die Nebenwirkungen können sich in Form von Akut- und Langzeittoxizitäten auch von denen Erwachsener unterscheiden. So sind Kinder nach der Heilung von einem Malignom besonders der Gefahr von Zweitneoplasien ausgesetzt: Nach dem Überleben eines Malignoms (5-Jahres-Überleben) sind Zweitneoplasien in den 25 folgenden Lebensjahren häufiger todesursächlich als alle nicht tumor- oder therapieassoziierten Todesursachen zusammen (91).

Die Forschungsanstrengungen der pharmazeutischen Industrie konzentrieren sich oft auf das Kollektiv der Erwachsenen, wohl auch wegen des zahlenmäßig größeren Kollektivs und der hierdurch zu erwartenden wirtschaftlichen Erlöse.

Neuentwicklungen im Bereich der Chemotherapeutika werden oft, sei es *in vitro* oder *in vivo*, zunächst an Malignomen des Erwachsenenalters getestet. Pädiatrische Entitäten sind häufig ausgeklammert.

Als vielversprechender Ansatz zur Optimierung der Therapie von Neoplasien wird die Erforschung und Entwicklung zielgerichteter Pharmakotherapien angesehen erwiesen. Auch in der pädiatrischen Onkologie könnte sich das Versprechen der zielgerichteten Pharmakotherapie mit mehr Effizienz bei weniger Nebenwirkungen durch die zielgerichtete Adressierung der Tumorzellen bewähren (4,5).

Zwei der hier getesteten Substanzen, Tyrphostin AG1478 und SAHA, fallen in die Medikamentengruppe der sogenannten „*Target-specific-drugs*“.

Für die bessere Planung und Evaluation von neuen Therapeutika in den Optimierungsstudien ist eine sorgfältige Auswahl potentiell wirksamer Verbindungen essentiell. Vor dem Hintergrund geringer Patientenzahlen kommt der Auswahl vielversprechender Substanzen noch mehr Bedeutung zu. Nur Wenige der doch zahlreichen in Betracht kommenden Substanzen können in ethisch vertretbarer Weise auch klinisch an dem zahlenmäßig kleinen Kollektiv untersucht werden. Fundierte präklinische Untersuchungen potentieller Substanzen können bei der Auswahl eine wichtige Hilfestellung leisten.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Testung von Substanzkombinationen erfolgte in Anlehnung an die klinischen Praxis: Polychemotherapien sind klinische Routine und im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien werden diese stetig angepasst. Es ist nicht zu erwarten, dass die hier getesteten oder mit ihnen verwandten Substanzen als Monotherapien in der Klinik eingesetzt werden, sondern dass sie, falls sie sich als ausreichend wirksam erweisen, als Teil einer Polychemotherapie zur Anwendung kommen könnten (10,93).

Zusammenfassend besteht der Vorteil des hier durchgeführten präklinischen Screenings aus folgenden Punkten:

- Mehrere Substanzen können alleine und in Kombination evaluiert werden.
- Ein breites Spektrum an pädiatrischen Malignomen, insgesamt 18 Zelllinien von 6 Entitäten, wird abgedeckt.
- Die standardisierte und etablierte Methode erlaubt einen Vergleich zwischen den getesteten Substanzen und zwischen deren Wirkung *in vitro* auf die verschiedenen Entitäten bei hoher Reproduzierbarkeit, wie aus den Abbildungen und den entsprechenden Standardabweichungen ersichtlich. Die Ergebniskonstanz zwischen den Einzelversuchen (s. Dosis-Wirkungs-Kurven) bestätigt ebenfalls die Reproduzierbarkeit. Sehr gute Möglichkeiten des Vergleichs ergeben sich durch die gleichen Versuchs- und Laborbedingungen für die verschiedenen Entitäten und Substanzen.
- Das breit angelegte Spektrum des Panels ermöglicht eine bessere Erfassung und Bewertung von Signalen im Vergleich mit anderen Studien, die z.B. nur ein oder zwei Zelllinien einer Tumorentität untersuchen.

So ermöglichte das hier verwendete *In-vitro*-Modell folglich ein ressourceneffektives Screening mehrerer Substanzen an vielen Tumorentitäten.

Allerdings ist kritisch zu hinterfragen, inwieweit die hier gewonnenen Erkenntnisse auf die weitergehenden *In-vivo*-Modelle oder die klinische Forschung übertragen werden können. Grundsätzlich besteht bei *In-vitro*-Versuchen das Problem, dass sie nicht abschließend und vollkommen die Gegebenheiten im menschlichen Körper widerspiegeln. So ist das *In-vitro*-Modell unabhängig von der Pharmakodynamik und -kinetik im menschlichen Körper, insbesondere von den dort vorherrschenden maximalen Plasmaspiegeln einer zugeführten Substanz, deren Umverteilung und deren Metabolisierung und Elimination. Des Weiteren ist auch die molekulare Größe und die Membran- und Gewebegängigkeit einer Substanz für ihre Wirkung mitverantwortlich. Die Wirksamkeit einer potentiell antineoplastisch wirksamen Substanz hängt in einigen Fällen nicht nur mit der zytotoxischen oder zytostatischen Potenz einer Substanz zusammen, sondern sie kann sich auch aus anti-angiogenetischen, anti-invasiven und immunmodulatorischen Komponenten zusammensetzen. Diese Effekte können

hauptsächlich für die Wirkung sein. Sie werden häufig vom Stroma des Tumors moduliert und bei den hier durchgeführten Zytotoxizitätstests nicht berücksichtigt.

Anti-angiogenetische und immunmodulatorische Effekte werden z.B. für die Tumorstromawachstum hemmenden Eigenschaften von HDAC-Inhibitoren wie SAHA mitverantwortlich gemacht (10). Es bleibt somit fraglich, ob eine etwaige antineoplastische spezifische Molekülinteraktion von SAHA, wie sie für „*Target-specific-drugs*“ üblich ist, in diesem In-vitro-Setting abgebildet werden konnte.

Durch das starre Applikationsschema und die sich anschließende relativ lange Inkubationszeit von 72 Std. sollte erreicht werden, dass mehrere Zellgenerationen der Substanz gegenüber exponiert waren. So sollten durchaus vorkommende zellzyklusabhängige Wirkunterschiede der einzelnen Substanzen nicht so stark zum Tragen kommen. In der klinischen Realität sind die Applikationszeitpunkte oft sehr wichtig für das Erzielen eines optimalen Effektes, dies gilt in besonderem Maße für die üblichen Schemata der Polychemotherapie.

Vom Applikationszeitpunkt abhängige Wirkunterschiede müssten bei Bedarf auch für SAHA und Tyrphostin AG1478 eingehender untersucht werden.

Die toxischen Effekte einer Therapie auf gesundes Gewebe konnten nicht in den hier durchgeführten Versuchen evaluiert werden und es kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Konzentrationen, die in vitro auf die Zellen wirkten, auch annähernd in vivo erreicht werden können.

Trotz dieser Limitationen ermöglichen die Versuche eine erste Evaluation, ob bestimmte Substanzen oder Substanzkombinationen weitergehend auf ihre Wirksamkeit überprüft werden sollten, oder ob sie bei der Auswahl für nachfolgende In-vivo-Modelle eher nachrangig sind. Insbesondere die Breite des Panels mit verschiedenen Tumorentitäten trug maßgeblich hierzu bei.

Die hier durchgeführten In-vitro-Versuche boten eine gute Möglichkeit, vielversprechende Substanzen aus der Forschung im Bereich der allgemeinen Onkologie auf ihre potentielle Wirksamkeit an pädiatrischen Neoplasien zu testen.

Es muss dabei klar sein, dass die hier gezeigten Ergebnisse eben nicht eins zu eins auf die In-vivo-Situation übertragbar sind, sondern vielmehr ein kleines, bei differenzierter Interpretation aber wertvolles Puzzlestück auf dem Weg zur Therapieoptimierung darstellen können.



Es sollte mit Hilfe der durchgeführten Versuche gezeigt werden, ob eine antiproliferative Wirkung von Carmustin, Tyrphostin AG1478, SAHA und ihrer Kombination auch an diesem Zellpanel reproduzierbar war und ob es Auffälligkeiten bezüglich der Sensibilität oder Resistenz einer Tumorentität gab. Des Weiteren sollten etwaige synergistische Effekte aufgedeckt werden. Schlussendlich sollte die Frage beantwortet werden, ob eine der hier untersuchten Substanzen in weiteren Versuchen allein oder in Kombination mit anderen Substanzen evaluiert werden sollten.

#### **4.2 Übersichtsdarstellung der Ergebnisse**

Die drei verwendeten Substanzen Carmustin, SAHA und Tyrphostin AG1478 wirkten in den hier verwendeten Konzentrationen bei allen Zelllinien des Panels zytostatisch. Die  $GI_{50}$  wurde bei der Applikation der Einzelsubstanzen in den verwendeten Konzentrationsstufen bei fast allen Zelllinien erreicht. Ausnahmen bildeten hier die auf SAHA relativ resistenten Neuroblastom-Zelllinien SHEP und SH-SY5Y.

An dieser Stelle soll kurz zusammengefasst werden, welche Entitäten bzw. Zelllinien im Vergleich innerhalb des untersuchten Zelllinienpanels sensibel oder resistent auf die Applikation der Substanzen reagierten:

Am sensibelsten auf die Applikation von Carmustin reagierten die Rhabdomyosarkom-Zelllinien und die Medulloblastom-Zelllinien. Auffallend unsensibel auf Carmustin waren die Ewingsarkome, Leukämien und Osteosarkome (s. Abb. 3.1-g).

Für die Applikation von Tyrphostin AG1478 galt folgendes: Rhabdomyosarkome, Osteosarkome und Medulloblastome waren als relativ sensibel einzustufen, Ewing-Sarkome und zwei der Neuroblastom-Zelllinien als relativ resistent (s. Abb. 3.2-g).

Auf die Inkubation mit SAHA reagierten die Leukämien sensibel, etwas weniger sensibel die Rhabdomyosarkome und die Ewing-Sarkome. Als relativ resistent erwiesen sich die Neuroblastome und Medulloblastome (s. Abb. 3.3-g).

#### **4.3 Bewertung der Ergebnisse und Einordnung in den Forschungsstand**

Die folgenden Abschnitte sollen die Antwort auf die Frage ermöglichen, ob eine der Substanzen auffällig gute Wirkung bei einer oder mehreren Zelllinien zeigte und deswegen weiter für die klinische Anwendung in der Pädiatrie entwickelt werden sollte.

Die antineoplastische Wirkung der einzelnen Substanzen kann untereinander nicht nur anhand ihrer in dieser Versuchsreihe ermittelten Wirkkonzentration verglichen werden. Zwingend ist eine Einordnung in den Forschungsstand geboten, um eine korrekte Einschätzung der Substanzen zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse werden im Folgenden bewertet und eingeordnet. Zunächst wird der jeweils aktuelle Forschungsstand dargelegt, dann werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit diesen verglichen, um dann zu einer Bewertung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu kommen.

Als Grundlage für Vergleiche interessieren In-vitro-Versuchsreihen mit den in dieser Arbeit verwendeten Substanzen, insbesondere an Zelllinien oder Entitäten, die ebenfalls in diesem Panel vertreten waren. Um eine weitere Einordnung vornehmen zu können, sollen auch In-vivo-Modelle und weiterführende klinische Studien herangezogen werden.

Bei den In-vivo-Versuchen und klinischen Studien interessieren insbesondere maximale Plasmaspiegel bei den Probanden aber auch andere pharmakodynamische- und kinetische Messgrößen. Diese können die Bewertung von in dieser Versuchsreihe applizierten Substanzkonzentrationen erlauben. Gleichzeitig soll auch das toxische Potential der Substanzen beleuchtet werden, denn eine Erhöhung des Plasmaspiegels ist oftmals nicht nur für die verstärkte Wirkung, sondern auch für eine verstärkte unerwünschte Wirkung verantwortlich.

#### **4.3.1 Antineoplastische Wirkung von SAHA in klinischen Studien**

Mehrere klinische Studien der Phase 1 wurden mit SAHA im Bereich hämatologischer Neoplasien durchgeführt (118). Hierbei wurden, in unterschiedlichem Umfang, Patienten mit Hodgkin-Lymphomen, diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen, kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL), fortgeschrittenen Leukämien und Myelodysplastischem Syndrom eingeschlossen (118). Diese und weitere Phase 1 Studien lieferten auch erste Hinweise auf die Aktivität von SAHA gegen Blasenkarzinome, Prostatakarzinome, Mammakarzinome und papilläre Schilddrüsenkarzinome (63,65,86,124,132).

So konnte in der ersten, mit 35 Patienten, durchgeführten Phase 1 Studie bereits ein Tumorrückgang bei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen, diffusen großzelligen B-Zell-

Lymphomen und kutanen T-Zell-Lymphomen beobachtet werden (108). In den sich daran anschließenden Phase 2 Studien konnte die Beobachtung an Patienten mit CTCL mit Remissionsraten von 23 % (30) bzw. 30 % (109) bestätigt werden.

Das in den initial durchgeführten Phase 1 Studien beobachtete sporadische Ansprechen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie auf die Therapie mit SAHA konnte in einer weiteren Phase 1 Studie an Patienten mit fortgeschrittenen Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen erneut beobachtet werden (42,86) ließ sich aber in einer anschließenden Phase 2 Studie nicht bestätigen (136).

Das partielle Ansprechen von soliden Tumoren in Phase 1 Studien hat Erwartungen geweckt, die jedoch durch weitere Phase 2 Studien (24,40,51,70,75,145) größtenteils nicht erfüllt wurden (86).

In den klinischen Studien erreichte Plasmakonzentrationen von SAHA lagen bei 1-2  $\mu\text{mol/l}$  (67,122). Bei Rubin et al. lagen die erreichten maximalen Plasmakonzentrationen bei Erwachsenen bei einer Gabe von 400 mg SAHA pro Tag bei bis zu 1,13  $\mu\text{mol/l}$  im geometrischen Mittel (132).

Ähnliche Werte sind auch bei Kindern und jungen Erwachsenen gemessen worden (Altersrange: 2,6 bis 22 Jahre, Median: 11 Jahre) (37). Die erreichten Plasmakonzentrationen lagen somit im Bereich der hier applizierten Substanzkonzentrationen. Derzeit werden 241 klinische Studien der verschiedenen Phasen mit SAHA als Einzeltherapie oder in Kombination mit verschiedenen anderen Behandlungen bei [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) gelistet (106).

#### **4.3.2 Ergebnisse bisheriger In-vitro-Studien mit SAHA**

Im Bereich der Erwachsenenonkologie konnte in vitro eine antiproliferative Wirkung von SAHA auf Lymphome, Myelome, Leukämien, Mesotheliome, nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Blasenkarzinome, Kolonkarzinome, Schilddrüsenkarzinome, Mammakarzinome, Pankreaskarzinome, Glioblastome, Prostatakarzinome, Ovarialkarzinome, Melanome, Nierenzellkarzinome und Endometriumkarzinome nachgewiesen werden (85,126).

Im Bereich pädiatrisch-onkologischer Neoplasien gibt es eine widersprüchliche Datenlage: Eine Wachstumshemmung durch SAHA wurde in vitro bei

Medulloblastomen (39,140), Neuroblastomen (25,39), Rhabdomyosarkomen (7) und Osteosarkomen (7) beschrieben.

Im Widerspruch zu diesen Arbeiten stehen die Beobachtungen von Keshelava et al. bei der Untersuchung eines breit angelegten pädiatrischen Panels: SAHA löst keine bemerkenswerte Wachstumshemmung bei Rhabdomyosarkomen, Ewingsarkomen, Neuroblastomen und Leukämien aus (67).

Laut Keshelava et al. wirkt SAHA in vitro zwar dosisabhängig zytotoxisch auf Rhabdomyosarkome, Ewingsarkome, Neuroblastome und Leukämien, dennoch werden diese Effekte in Zusammenschau der Ergebnisse nicht als bemerkenswerte Wachstumshemmung durch SAHA als Einzelsubstanz gewertet (67). Die beobachtete Wachstumshemmung sei vielmehr ein Ausdruck unspezifischer Toxizität (67). Es ist hervorzuheben, dass sich bei dem hier untersuchten Panel und dem von Keshelava et al. untersuchten Panel Überschneidungen in Bezug auf einzelne Zelllinien und Entitäten ergeben. In dem Panel dieser Arbeit werden zusätzlich Osteosarkome und Medulloblastome untersucht.

Zur Einordnung der in dieser Arbeit beobachteten Wachstumshemmung bei leukämischen Zelllinien lohnt die Betrachtung der Ergebnisse eines von Sakariji et al. durchgeführten MTT-Assays zur Untersuchung der wachstumshemmenden Wirkung von SAHA auf neoplastische Zelllinien lymphatischen Ursprungs. Die Zelllinien entstammten Burkitt-Lymphomen, B-Zell-ALL, Mantelzell-Lymphomen, diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und T-Zell-ALL. Für eine Wachstumshemmung von 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden Konzentrationen zwischen 0,65  $\mu\text{M}$  und 2,5  $\mu\text{M}$  benötigt (134). Das Panel von Sakariji et al. enthielt, ebenso wie dieses Panel, die B-Zell-Vorläufer-ALL-Zelllinie REH.

In der präklinischen Evaluation bei pädiatrischen Neoplasien ist die Studienlage wie dargelegt dünn und die veröffentlichten Beobachtungen uneinheitlich.

Einen Beitrag zur Klärung der widersprüchlichen Studienlage bei pädiatrischen Neoplasien sollte diese Arbeit mit ihrem breit angelegten Panel leisten.

### 4.3.3 Wirkung von SAHA auf die Tumorzelllinien

Tab. 4.1: Vergleichsgrößen anderer Veröffentlichungen mit gleichen Zelllinien und der alleinigen Inkubation mit SAHA

Zelllinie	Vorliegende Arbeit GI <sub>50</sub> in $\mu\text{M}$	Keshelava et al. (67) IC <sub>50</sub> in $\mu\text{M}$	Sakariji et al. (139) ED <sub>50</sub> in $\mu\text{M}$	Furchert et al. (39) GI <sub>50</sub> in $\mu\text{M}$
RD	2,68	6,06		
RH-30	2,07	1,72		
MOLT-4	0,37	0,68		
CCRF-CEM	1,36	1,30		
REH	2,44		1,6	
DAOY	4,30			35,58
UW228-2	4,11			32,92
IMR-5	3,56			5,88
SHEP-SF	9,61			34,03
SHSY-5Y	6,36			74,51

Tabellarisch aufgeführt sind die entsprechenden Zelllinien der zum Vergleich herangezogenen Veröffentlichungen. Die Daten sind nur in die Tabelle aufgenommen, wenn es sich um die gleiche Zelllinie wie im hier getesteten Panel handelt. Zu beachten sind die unterschiedlichen Kenngrößen (GI<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub>) zur Beurteilung der zytostatischen/zytotoxischen Wirkung. Arbeiten mit nur qualitativer Einordnung der In-vitro-Wirkung sind nicht aufgeführt. Ebenso zu beachten sind die unterschiedlichen Methoden: Keshelava: DIMSCAN; Sakariji, Furchert und die vorliegende Arbeit: MTT-Assay.

Für die Zelllinien dieses Panels lag die für eine vergleichbare Wachstumshemmung benötigte Konzentration von SAHA in einer ähnlichen Größenordnung wie bei diversen Neoplasien des Erwachsenenalters (126) und somit im zu erwartenden Rahmen. Die Versuchsergebnisse dieses Panels sind ebenfalls konkordant mit den Ergebnissen des MTT-Assays von Sakariji et al. (s. Tab. 4.1).

In der für die Interpretation dieser Arbeit wichtigen Veröffentlichung von Keshelava et al. wurden für CCRF-CEM, MOLT-4, RD und Rh30 folgende Konzentrationen für eine Wachstumshemmung um 50 % ermittelt (in Klammern die korrespondierenden GI<sub>50</sub>-Werte aus dieser Arbeit): CCRF-CEM: 1,30  $\mu\text{M}$  (1,36  $\mu\text{M}$ ), MOLT-4: 0,68  $\mu\text{M}$  (0,37  $\mu\text{M}$ ), RD: 6,06  $\mu\text{M}$  (2,68  $\mu\text{M}$ ), Rh30: 1,72  $\mu\text{M}$  (2,07  $\mu\text{M}$ ) (67). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Laborbedingungen, Methoden und anderer Einflussfaktoren lässt sich anhand dieser Werte die Annahme vertreten, dass die in der hier vorgelegten Arbeit gezeigten Ergebnisse denen von Keshelava et al. ähneln (s. Tab. 4.1).

Es bleibt festzuhalten, dass bei allen soliden Tumorentitäten des in dieser Arbeit verwendeten Panels die  $GI_{50}$  in einem engen Konzentrationspektrum von 2,37  $\mu\text{mol/l}$  (Rhabdomyosarkome) bis 5,19  $\mu\text{mol/l}$  (Neuroblastome) lag. Zelllinien mit  $GI_{50}$ -Werte im erwähnten Bereich von 2,37  $\mu\text{mol/l}$  bis 5,19  $\mu\text{mol/l}$  wurden von Keshelava et al. als resistent eingestuft (67). Selbst bei einer Substanzkonzentration von 0,48  $\mu\text{mol/l}$  für eine Wachstumshemmung von 50 % verneinen Keshelava et al. eine ausreichende Wirksamkeit. Begründet wird dies mit der hohen Substanzkonzentration, die für eine Wachstumshemmung um 90 % benötigt wurde und in vivo nicht erreicht werden könne (67). Auch die in dieser Arbeit etwas besser als die soliden Tumoren auf SAHA ansprechenden Leukämien wären anhand ihrer  $GI_{50}$  von Keshelava et al. als nicht ausreichend sensibel eingestuft worden.

Gegen eine relevante Wirksamkeit von SAHA als Einzelsubstanz an dem in dieser Arbeit untersuchten Panel spricht auch die Beobachtung, dass sich die Empfindlichkeit verschiedener Zelllinien einer Entität stark unterschied (z.B. bei Neuroblastomen und Ewingsarkomen, s. Abb. 3-3.g). Eine ähnliche Beobachtung mit großen Wirkunterschieden innerhalb einer Entität wurde schon von Sakariji et al. an Lymphomen gemacht und als Indiz für eine fehlende Wirksamkeit interpretiert (134). Wenn der Großteil der Zelllinien einer Entität ein gutes Ansprechen auf SAHA zeigen würde, wäre dies ein Anhalt für eine Wirksamkeit bei der ganzen Entität. Das in dieser Arbeit gezeigte Ansprechen einzelner Zelllinien auf SAHA spricht eher dafür, dass ggf. Einzelfälle von einer Therapie mit SAHA profitieren könnten. Dafür müssten die zugrunde liegenden Wirk- oder Resistenzmechanismen geklärt werden um diese Patienten zu identifizieren.

In der Gesamtschau muss für diese Arbeit die Relevanz der beobachteten dosisabhängigen Zytotoxizität von SAHA als Monosubstanz verneint werden. Es konnten keine überzeugenden Signale für eine ausgeprägte Wirksamkeit von SAHA bei einer Entität beobachtet werden: Es gibt keinen ausreichenden Anhalt für die Wirksamkeit bei einer Tumorentität generell, sondern nur für einzelne Zelllinien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Ansicht von Keshelava et al. und widersprechen somit teilweise den Erkenntnissen aus anderen In-vitro-Versuchen an Medulloblastomen (39,140), Neuroblastomen (25,39), Rhabdomyosarkomen (7) und Osteosarkomen (7) und entkräften die dort gemachten Beobachtungen.

Tab. 4.2: Aufstellung der Bewertung der Wachstumshemmung durch die Autoren in den jeweiligen Arbeiten bei alleiniger Inkubation mit SAHA (qualitativ, In-vitro-Assays)

Entitäten	Vorliegende Arbeit	Keshelava et al.	Sakariji et al.	Furchert et al.	Sonnemann et al.	De Los Santos et al.	Blattmann et al.
Rhabdomyosarkome	-	-					+/-
Ewingsarkome	-	-					
Neuroblastome	-	-		+		+	
Medulloblastome	-			+	+		
Osteosarkome	-						+/-
Leukämien	-	-	+/-				

Keshelava et al. (67) ; Sakariji et al. (134) ; Furchert et al. (39) ; Sonnemann et al. (140) ; De Los Santos et al. (25) ; Blattmann et al. (7).

+ : ausreichende Wirksamkeit

- : keine ausreichende Wirksamkeit

+/-: keine eindeutige Aussage/unterschiedliche Wertung innerhalb einer Entität

#### 4.3.4 SAHA als Teil einer Polychemotherapie

Der Ansatz einer Substanzkombination mit SAHA wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen verfolgt. So wurden für SAHA in Kombination mit verschiedenen antineoplastischen Substanzen synergistische oder additive Effekte nachgewiesen. Zu diesen Substanzen zählen: Anthrazykline, Fludarabin, Flavopiridol, Imatinib, Bortezomib und antiangiogenetisch wirksame Substanzen (64).

Eine HDAC-Überexpression steht im Verdacht für Tumorwachstum mitverantwortlich zu sein (54) und eine große Anzahl von Tumorzelllinien und Primärtumoren weist, im Gegensatz zu gesunden Zellen, einen veränderten Acetylierungsstatus von Histonen auf (38). Für Neuroblastome ist interessanterweise eine HDAC-Überexpression als ein Mechanismus für die Entwicklung von Multiresistenzen von Neuroblastomzelllinien gegenüber Chemotherapeutika identifiziert, die vorher gezeigte Multiresistenz konnte durch Applikation von HDAC-Inhibitoren überwunden werden (68). Die Kombination von HDAC-Inhibitoren und Retinolsäure zeigte in einer Arbeit von Coffey et al. synergistische wachstumshemmende Effekte bei Neuroblastomzelllinien (22). Die Ergebnisse der Arbeit von Coffey et al. sind interessante Beispiele für die erfolgreiche in-vitro-Kombination von HDAC-Inhibitoren mit üblichen Chemotherapeutika.

Eine Kombination von SAHA mit Carmustin wurde in der hier vorgelegten Arbeit zum ersten Mal getestet.

Als interessante Beobachtung dieser Arbeit sind einige synergistische Effekte von SAHA in Kombination mit Carmustin zu bewerten. So war durch die Berechnung der Kombinationsindizes eine synergistische Wachstumshemmung von SAHA in Kombination mit Carmustin auf beide Medulloblastomzelllinien nachzuweisen (s. Tab. 3.4). Dies erscheint insbesondere unter dem Umstand bemerkenswert, dass sich die Medulloblastomzelllinien mit einer  $GI_{50}$  von 4,11  $\mu\text{M}$  bzw. 4,30  $\mu\text{M}$  als relativ resistent auf die alleinige Applikation von SAHA zeigten. In Kombination mit Carmustin wurde die  $GI_{50}$  schon bei 0,46  $\mu\text{M}$  bzw. 0,69  $\mu\text{M}$  erreicht. Die hier gemachten Beobachtungen können ein weiteres Indiz dafür sein, dass SAHA zwar nicht als alleinige wirksame antineoplastische Substanz etabliert werden kann, jedoch als Ergänzung zu etablierten Polychemotherapieregimen. In Anlehnung an die Erkenntnisse zur Überwindung von Multiresistenzen bei HDAC überexprimierenden Neuroblastomzelllinien durch HDAC-Inhibitoren (68) wäre es anzustreben, weitere multiresistente pädiatrische Zelllinien auf ihre HDAC-Expression und ihr Ansprechen auf eine Kombination mit SAHA zu untersuchen.

Die bei den Medulloblastomen beobachteten Synergismen konnten in geringerem Umfang auch bei Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen gemacht werden. Somit lassen sich die oben getroffenen Schlussfolgerungen auch auf einzelne Zelllinien dieser Entitäten übertragen: Es wäre wünschenswert zu untersuchen, ob bei den Zelllinien, die von einer Kombination mit SAHA profitieren, eine Überexpression von HDAC nachzuweisen wäre und diese eventuell ursächlich für eine Wirkung von SAHA wäre. Es wäre auch ein interessanter Ansatz zu untersuchen, ob die In-vitro-Kombination mit SAHA und den üblichen Chemotherapeutika zur Behandlung von Neuroblastomen, Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen eine Wirkungsverbesserung zeigen würde.

#### **4.3.5 Fazit der Diskussion von SAHA**

Der fehlende Wirksamkeitsnachweis von SAHA als Monosubstanz leistet einen Beitrag zur Klärung der bisherigen In-vitro-Studienlage mit ihren der uneinheitlichen Ergebnissen und Bewertung (s. Tab. 4.2).

Fraglich bleibt aber, ob eine antineoplastische Wirkung von SAHA überhaupt ausreichend in vitro abgebildet werden kann, denn anti-angiogenetische und



immunmodulatorische Effekte werden für die Wirkung von SAHA mitverantwortlich gemacht (13) und wurden in diesem In-vitro-Setting nicht ausreichend simuliert.

Die beobachteten synergistischen Effekte von SAHA und Carmustin bei Medulloblastomen, Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen unterstützen den Ansatz, SAHA mit anderen etablierten Substanzen zu kombinieren. Der hierbei zu Grunde liegende Mechanismus könnte die Beeinflussung von Transkriptionsprozessen durch HDAC-Inhibitoren sein. Die Sensitivität der Zellen gegenüber Carmustin könnte z.B. durch die Förderung von Apoptoseprozessen oder die Abschwächung von Resistenzmechanismen erhöht werden.

In den bisher durchgeführten klinischen Studien war SAHA gut verträglich und die in dieser Arbeit in vitro verwendeten Konzentrationen wurden in vergleichbarer Größenordnung auch im Probandenplasma nachgewiesen (67,122). SAHA ist nicht nur gut verträglich sondern auch oral applizierbar und somit im häuslichen Umfeld und ohne weitere Einschränkungen für den Patienten einzunehmen. Daher könnte SAHA eine Option sein, eine palliative Chemotherapie zu unterstützen.

#### **4.3.6 Ergebnisse anderer Studien mit Tyrphostin AG1478**

Die dosisabhängige Wachstumshemmung durch EGFR-Inhibitoren ist im Rahmen präklinischer Studien an zahlreichen humanen Zelllinien, vornehmlich aus dem Bereich der Erwachsenenonkologie, nachgewiesen worden: Bisher konnte gezeigt werden, dass Tyrphostin AG1478 in vitro auf Zelllinien aus Kolonkarzinomen (112), nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (137), Glioblastomen (100), Karzinomen des Nasopharynx (156), Plattenepithelkarzinomen (3), Mammakarzinomen (154) und Nephroblastomen (101) wachstumshemmend wirkt.

An einem Mausmodell wurde der Einfluss von Tyrphostin AG1478 auf ein subkutan eingebrachtes Glioblastom untersucht. In Kombination mit einem herkömmlichen Chemotherapeutikum konnte Tyrphostin AG1478 die Wachstumsrate reduzieren und die Überlebenszeit verlängern ohne schwerwiegende toxische Effekte zu entwickeln (99).

Eine potentiell wachstumshemmende Wirkung von EGFR-Antagonisten, in diesem Fall Tyrphostin AG1478, wurde bis zu dieser Arbeit noch an keinem breit angelegten Panel pädiatrisch-onkologischer Zelllinien untersucht.

Bereits beschrieben ist jedoch eine Überexpression von EGFR in pädiatrischen Neoplasien. Bei Osteosarkomen ist eine Überexpression und Mutation des EGFR nachgewiesen und es wird vermutet, dass Osteosarkome sensibel auf EGFR-Inhibitoren reagieren könnten (28). Eine EGFR-Überexpression konnte auch bei Ewingsarkom-Zelllinien nachgewiesen werden (2). Ganti et al. konnten eine überproportionale Expression des EGFR beim embryonalen Subtyp von Rhabdomyosarkomen nachweisen (41). Bei Medulloblastomen ist die Überexpression von Rezeptoren der EGFR-Familie wohl mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (9).

Der Nachweis einer Überexpression erlaubt die Vermutung, dass EGFR-Inhibitoren das Wachstum pädiatrischer Neoplasien hemmen könnten.

Klinische Studien mit Tyrphostin AG1478 wurden bisher nicht durchgeführt und werden auch nicht erwartet. Tyrphostin AG1478 soll in dieser Arbeit als Modellsubstanz für EGFR-Inhibitoren betrachtet werden.

Klinische Studien mit Gifitinib und Erlotinib, die mit Tyrphostin AG1478 eng verwandt sind, führten zu deren Zulassung zur Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms in einzelnen Ländern (147).

#### **4.3.7 Wirkung von Tyrphostin AG1478 auf die Tumorzelllinien**

Han et al. untersuchten in ihrer Arbeit über die Wachstumsinhibition durch Tyrphostin AG1478 die Wirkung auf drei humane Glioblastomzelllinien (47). Sie stuften zwei der drei getesteten Zelllinien, mit einer für eine Wachstumshemmung von 50 % benötigten Konzentration von 48,4  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 34,6  $\mu\text{mol/l}$  als resistent ein (47). Als sensibel wurde eine Zelllinie mit einer benötigten Konzentration von 8,7  $\mu\text{mol/l}$  eingestuft (47). Zhou et al. bewerteten die Wirkung von AG1478 als Monosubstanz auf eine Kolonkarzinomzelllinie als unzureichend. Auch bei einer fast vollständigen Unterdrückung der Phosphorylierung des EGFR seien Apoptosevorgänge nicht ausreichend verstärkt worden. Die Einstufung durch Zhou et al. geschah trotz einer, im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, niedrigen Konzentration für eine Wachstumshemmung von 50 % von 15,35  $\mu\text{mol/l}$  (155) .

Es ist somit festzuhalten, dass die  $GI_{50}$ -Werte aller Zelllinien der hier vorliegenden Arbeit in einem Bereich liegen, in dem Zelllinien von Han et al. und Zhou et al. in deren Arbeiten als nicht ausreichend sensibel eingestuft wurden.

Dies trifft auch für die im Panel dieser Arbeit relativ sensiblen Medulloblastome, Rhabdomyosarkome und Osteosarkome zu.

Die Einschätzung, dass in der vorliegenden Arbeit keine vielversprechende In-vitro-Wirksamkeit nachgewiesen wurde, wird auch von der Tatsache unterstützt, dass keine Entität deutlich besser auf Tyrphostin AG1478 ansprach als die Übrigen. Bei einer spezifischen Sensibilität einer Entität wäre ein deutlicher Unterschied zu anderen Tumorentitäten zu erwarten. Die homogene dosisabhängige Wachstumshemmung legt die Vermutung einer „*targetunabhängigen*“ unspezifischen Wachstumshemmung nahe. Die von Levitzki et al. beschriebenen Konzentrationen zur kompletten Inhibition des EGFR (Inhibitionskonstante: 3 nM) wurden bei den in der vorliegenden Arbeit applizierten Substanzkonzentrationen deutlich überschritten (78). Die dosisabhängige Wachstumshemmung wird somit durch eine EGFR-Inhibition alleine unzureichend erklärt. Es ist folglich anzunehmen, dass die in dieser Arbeit beobachtete dosisabhängige Wachstumshemmung nicht durch eine Alteration der EGFR-abhängigen Signalkaskade verursacht wurde. Auch eine andere spezifische wachstumshemmende Wirkung war bei keiner der in diesem Panel getesteten Entitäten zu beobachten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die In-vitro-Studien, in denen nur unspezifische Effekte von selektiven Tyrosinkinase-Inhibitoren an pädiatrisch-onkologischen Entitäten vermutet wurden (2).

Die von anderen Arbeitsgruppen angeführte Vermutung, dass sich z. B. Osteosarkome oder Ewingsarkome wegen ihrer nachgewiesenen Überexpression von EGFR ggf. für eine Behandlung mit EGRF-Inhibitoren empfänglich zeigen könnten (2,28) wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt.

Es bleibt offen, ob für ein Tumorwachstum kausale EGFR-Mutationen bei pädiatrisch-onkologischen Tumorentitäten vorkommen und somit die Inhibition vielversprechendes therapeutisches Ziel ist, oder ob die mehrfach beschriebene EFGR-Überexpression Ausdruck des überschießenden Tumorwachstums ist (130). In Zusammenschau der bisherigen In-vitro-Versuche und der Ergebnisse dieser Arbeit gibt es keinen Hinweis

auf eine ausreichende Wirksamkeit von Tyrphostin AG1478 bei den hier getesteten Entitäten.

#### **4.3.8 Synergistische Effekte von Tyrphostin AG1478 und Carmustin**

Tyrphostin AG1478 kann in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eine verbesserte zytostatische Wirkung zeigen (31).

Nagane et al. konnten bereits an Glioblastomzelllinien (100) und dann an einem Glioblastom-Mausmodell belegen, dass Tyrphostin AG1478 synergistische zytostatische bzw. tumorapoptotische Effekte bei der Kombination mit Cisplatin zeigt (99). Die Substanzkombination von Tyrphostin AG1478 mit Carmustin wurde bis zu dieser Arbeit noch nicht getestet.

In Kombination mit Carmustin zeigte Tyrphostin AG1478 synergistische Effekte bei verschiedenen Zelllinien des Panels. Darunter befanden sich Leukämien, Ewingsarkome, Leukämien, Medulloblastome, Neuroblastome und Osteosarkome (s. Tab. 3.3.).

Die stärksten Synergismen konnten bei den Leukämiezelllinien MOLT-4 und HL-60 nachgewiesen werden. Interessanterweise scheint kein Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit der Zelllinien auf die jeweiligen Einzelsubstanzen und den beobachteten synergistischen Effekten zu bestehen.

Antagonistische Effekte der Substanzkombination konnten ebenfalls beobachtet werden, insbesondere bei den Rhabdomyosarkomen und bei je zwei Leukämien und Ewingsarkomen (s. Tab. 3.3.). Die Ursache für diese antagonistischen Effekte bleibt unklar. Die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Streuung der beobachteten synergistischen und antagonistischen Effekte ist durch die Berechnung der Kombinationsindizes gering, aber theoretisch möglich.

Aus diesen Beobachtungen resultiert die Fragestellung nach den Ursachen dieser synergistischen Effekte und deren Reproduzierbarkeit. Wenn eine zielgerichtete Inhibition des EGFR keine ausreichende Wachstumsinhibition auslöst, wieso wirken EGFR-Inhibitoren dann synergistisch mit anderen Substanzen? Um diese Frage zu beantworten müssten weitere Untersuchungen zur Dysregulation des EGFR in Neoplasien und zur Überexpression von EGFR in neoplastischem Gewebe durchgeführt werden. Interessant wäre es herauszufinden, bei welchen Entitäten und welchen

Substanzkombinationen Synergismen zu beobachten sind. Gibt es z.B. eine Wirkungsverbesserung durch Tyrphostin bei etablierten Chemotherapieeregimen? Was ist die Ursache für das scheinbar selektive Ansprechen von einzelnen Zelllinien auf die Kombination mit Tyrphostin?

#### **4.3.9 Fazit der Diskussion von Tyrphostin AG1478**

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben keinen Hinweis auf die Wirksamkeit von Tyrphostin AG1478 als Monosubstanz.

Eine abschließende Beurteilung der beobachteten synergistischen Effekte von Tyrphostin AG1478 und Carmustin scheint bisher nicht möglich. Zu unklar ist die Wertigkeit der Dysregulation des EGFR bei den in dieser Arbeit untersuchten Entitäten. Offen bleibt auch die Frage, warum die zielgerichtete Hemmung des EGFR durch Rezeptorantagonisten keine Wachstumshemmung bewirkt, aber auch in dieser Arbeit bei einigen Zelllinien Synergismen mit anderen Substanzen nachgewiesen werden konnten.

#### **4.4 Abschlussbetrachtung**

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei dem durchgeführten Screening an dem breitangelegten Panel keine eindrucksvollen Signale für die Wachstumshemmung der hier getesteten „*Target-specific-drugs*“ gefunden werden konnten. Die in der Gesamtbetrachtung geringen Streubreiten der  $GI_{50}$  ließen auf kein für eine Weiterentwicklung motivierendes Ansprechen einzelner Tumorentitäten schließen. Gleichzeitig war das fehlende Erreichen der  $LC_{50}$  bei den applizierten Konzentrationen bei einigen Entitäten ein Hinweis auf eine geringe Zytotoxizität. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass keine ausgeprägte In-vitro-Wachstumshemmung von SAHA und Tyrphostin AG1478 als Monosubstanz bei den hier geprüften Tumorentitäten nachzuweisen ist.

Dennoch sind einige der Versuchsbeobachtungen durchaus bemerkenswert.

Unter Berücksichtigung der bisher zur Verfügung stehenden und teilweise widersprüchlichen Erkenntnisse zur Wachstumshemmung von SAHA und Tyrphostin AG1478 an einigen Tumorentitäten stellen die hier gewonnenen Erkenntnisse einen aufschlussreichen Beitrag dar. In Bezug auf einige pädiatrische Tumorentitäten gibt es

bisher noch keine veröffentlichten Erkenntnisse zur In-vitro-Wachstumshemmung durch SAHA und Tyrphostin AG1478 oder deren Kombination mit anderen Substanzen. Gerade das Fehlen eines ausgeprägten Effektes einer der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen auf eine Tumorentität bestätigt eben die Sinnhaftigkeit des in dieser Arbeit verwendeten Ansatzes: Es gilt, möglichst ressourceneffektiv Substanzen im Bereich der pädiatrischen Onkologie zu screenen. Auch ein Screening mit wenig spektakulären Ergebnissen trägt seinen Teil dazu bei, die Forschungsanstrengungen in die richtige Richtung zu leiten. Es erfüllt somit vollumfänglich seinen Zweck.

Besondere Aufmerksamkeit sollte dem Ansatz der Kombination der hier getesteten „*target-specific-drugs*“ mit bereits etablierten Chemotherapiesubstanzen bei ausgewählten Entitäten gewidmet werden. So könnte die synergistische Wirkung von SAHA und Carmustin auf die Medulloblastome Anlass bieten, weitere eventuelle Synergismen von SAHA mit in den jeweiligen Therapieschemata etablierten Medikamenten zu untersuchen.

In Anlehnung an die Erkenntnisse zur Entwicklung und Überwindung von Multiresistenzen bei Neuroblastomzelllinien wäre es anzustreben, weitere multiresistente pädiatrische Zelllinien auf ihre HDAC-Expression und ihr Ansprechen auf eine Kombination mit SAHA zu untersuchen.

Gegebenenfalls näher zu untersuchen wäre auch der synergistische Effekt von Carmustin und Tyrphostin AG1478 auf verschiedene Entitäten dieses Panels, wie z.B. die Leukämien und Ewingsarkome.

## 5. Literaturverzeichnis

- (1) Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 67 (7): 1886-1893
- (2) Andersson MK, Aman P (2008) Proliferation of Ewing sarcoma cell lines is suppressed by the receptor tyrosine kinase inhibitors gefitinib and vandetanib. *Cancer.Cell.Int.* 8: 1
- (3) Arteaga CL, Ramsey TT, Shawver LK, Guyer CA (1997) Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. *J.Biol.Chem.* 272 (37): 23247
- (4) Barinaga M (1997) From bench top to bedside. *Science* 278 (5340): 1036-1039
- (5) Baselga J, Arteaga CL (2005) Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Journal of Clinical Oncology* 23 (11): 2445
- (6) Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R (2002) Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat.Genet.* 32 (4): 606-613
- (7) Blattmann C, Oertel S, Ehemann V, Thiemann M, Huber PE, Bischof M, et al. (2010) Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics* 78 (1): 237-245
- (8) Bode AM, Dong Z (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 4 (10): 793-805
- (9) Bodey B, Kaiser H, Siegel SE (2005) Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in childhood brain tumors. *In Vivo* 19 (5): 931-941
- (10) Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (9): 769-784
- (11) Bradley D, Rathkopf D, Dunn R, Stadler WM, Liu G, Smith DC, et al. (2009) Vorinostat in advanced prostate cancer patients progressing on prior chemotherapy (National Cancer Institute Trial 6862). *Cancer* 115 (23): 5541-5549
- (12) Bridges A (1999) The rationale and strategy used to develop a series of highly potent, irreversible, inhibitors of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases. *Curr.Med.Chem.* 6 (9): 825-844
- (13) Budiyo A, Bito T, Kunisada M, Ashida M, Ichihashi M, Ueda M (2003) Inhibition of the epidermal growth factor receptor suppresses telomerase activity in HSC-1 human cutaneous squamous cell carcinoma cells. *J.Invest.Dermatol.* 121 (5): 1088-1094

- (14) Burgess AW (2008) EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic targets The EGFR family members regulate the production, survival, movement, and shape of. *Growth Factors* 26 (5): 263-274
- (15) Caillaud A, Prakash A, Smith E, Masumi A, Hovanessian AG, Levy DE, et al. (2002) Acetylation of Interferon Regulatory Factor-7 by p300/CREB-binding Protein (CBP)-associated Factor (PCAF) Impairs its DNA Binding. *J.Biol.Chem.* 277 (51): 49417
- (16) Chen LF, Greene WC (2004) Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (5): 392-401
- (17) Choi J, Kwon HJ, Yoon B, Kim J, Han SU, Joo HJ, et al. (2001) Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Cancer Science* 92 (12): 1300-1304
- (18) Chou T, Talalay P (1983) Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol.Sci.* 4: 450-454
- (19) Chou T, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv.Enzyme Regul.* 22: 27-55
- (20) Chou T (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol.Rev.* 58 (3): 621-681
- (21) Chou T (2010) Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 70 (2): 440-446
- (22) Coffey DC, Kutko MC, Glick RD, Swendeman SL, Butler L, Rifkind R, et al. (2000) Histone deacetylase inhibitors and retinoic acids inhibit growth of human neuroblastoma in vitro. *Med.Pediatr.Oncol.* 35 (6): 577-581
- (23) Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, et al. (2004) Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol.Cell* 13 (5): 627-638
- (24) Crump M, Coiffier B, Jacobsen E, Sun L, Ricker J, Xie H, et al. (2008) Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Annals of oncology*
- (25) De los Santos M, Zambrano A, Aranda A (2007) Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular cancer therapeutics* 6 (4): 1425
- (26) Deininger MW, Goldman JM, Melo JV (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96 (10): 3343-3356
- (27) Deutsches Kinderkrebsregister (2008). Online im Internet: URL: <http://www.unimedizin-mainz.de/fileadmin/kliniken/dkkkr/pdf/jb/jb2008/ta1te1.pdf> [Abrufdatum: 20.12.2013]
- (28) Do S, Jung WW, Kim HS, Park Y (2009) The expression of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling molecules in osteosarcoma. *Int.J.Oncol.* 34 (3): 797



- (29) Douglass E, Valentine M, Etcubanas E, Parham D, Webber B, Houghton P, et al. (1987) A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenetic and Genome Research* 45 (3-4): 148-155
- (30) Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, et al. (2007) Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 109 (1): 31
- (31) Ellis A, Doherty M, Walker F, Weinstock J, Nerrie M, Vitali A, et al. (2006) Preclinical analysis of the analinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase. *Biochem.Pharmacol.* 71 (10): 1422-1434
- (32) Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N.Engl.J.Med.* 358 (11): 1148
- (33) Felix CA, Kappel CC, Mitsudomi T, Nau MM, Tsokos M, Crouch GD, et al. (1992) Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 52 (8): 2243
- (34) Fischer M, Berthold F (2003) Characterization of the gene expression profile of neuroblastoma cell line IMR-5 using serial analysis of gene expression. *Cancer Lett.* 190 (1): 79-87
- (35) Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965) Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 18 (4): 522-529
- (36) Food and Drug Administration (2009) FDA approves vorinostat (Zolinza) for the treatment of cutaneous manifestations of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). Online im Internet: URL: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm094952.htm> [Abrufdatum: 10.01.2014]
- (37) Fouladi M, Park JR, Stewart CF, Gilbertson RJ, Schaiquevich P, Sun J, et al. (2010) Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of vorinostat: a Children's Oncology Group phase I consortium report. *Journal of Clinical Oncology* 28 (22): 3623
- (38) Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat.Genet.* 37 (4): 391-400
- (39) Furchert SE, Lanvers-Kaminsky C, Jürgens H, Jung M, Loidl A, Frühwald MC (2007) Inhibitors of histone deacetylases as potential therapeutic tools for high-risk embryonal tumors of the nervous system of childhood. *International journal of cancer* 120 (8): 1787-1794
- (40) Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, et al. (2009) Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *Journal of Clinical Oncology* 27 (12): 2052
- (41) Ganti R, Skapek SX, Zhang J, Fuller CE, Wu J, Billups CA, et al. (2006) Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Modern pathology* 19 (9): 1213-1220

- (42) Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, et al. (2008) Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 111 (3): 1060
- (43) Giandomenico V, Simonsson M, Gronroos E, Ericsson J (2003) Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol.Cell.Biol.* 23 (7): 2587-2599
- (44) Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK (2003) Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics* 2 (2): 151-163
- (45) Goldstein D, Leavitt J (1985) Expression of neoplasia-related proteins of chemically transformed HuT fibroblasts in human osteosarcoma HOS fibroblasts and modulation of actin expression upon elevation of tumorigenic potential. *Cancer Res.* 45 (7): 3256
- (46) Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN (2004) Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59 (2): 177-189
- (47) Han Y, Caday CG, Nanda A, Cavenee WK, Huang H (1996) Tyrphostin AG 1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.* 56 (17): 3859
- (48) Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1): 57-70
- (49) He X, Skapek SX, Wikstrand CJ, Friedman HS, Trojanowski JQ, Kemshead JT, et al. (1989) Phenotypic analysis of four human medulloblastoma cell lines and transplantable xenografts. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 48 (1): 48
- (50) Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, et al. (2010) Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends. Berlin: Robert Koch-Institut
- (51) Hussain M, Dunn R, Rathkopf D, Stadler W, Wilding G, Smith D, et al. (2007) Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) post chemotherapy in hormone refractory prostate cancer (HRPC) patients (pts): a phase II trial by the Prostate Cancer Clinical Trials Consortium (NCI 6862). 25 (18\_suppl): 5132
- (52) Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 5 (5): 341-354
- (53) Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Carbone R, Pearson M, Pruneri G, et al. (2004) Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *EMBO J.* 23 (5): 1144-1154
- (54) Jacobson S, Pillus L (1999) Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9 (2): 175-184

- (55) Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, et al. (2003) Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG1478. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 (26): 15871
- (56) Johnstone RW (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature reviews drug discovery* 1 (4): 287-299
- (57) Kager L, Langebrake C, Kastner U (2006) Chemotherapie, Polychemotherapie. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, S. 561
- (58) Kager L, Langebrake C, Kastner U (2006) Chemotherapie, Unerwünschte Wirkungen. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, S. 562-563
- (59) Kager L, Langebrake C, Kastner U (2006) Gezielte Therapie. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, S. 572
- (60) Kager L, Langebrake C, Kastner U (2006) Alkylanzien und nicht-klassische alkylierende Substanzen. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, S. 567
- (61) Kari C, Chan TO, Rocha de Quadros M, Rodeck U (2003) Targeting the epidermal growth factor receptor in cancer. *Cancer Res.* 63 (1): 1
- (62) Keles GE, Berger MS, Srinivasan J, Kolstoe DD, Bobola MS, Silber JR (1995) Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. *Oncol.Res.* 7 (10-11): 493
- (63) Kelly WK (2003) Phase I Clinical Trial of Histone Deacetylase Inhibitor: Suberoylanilide Hydroxamic Acid Administered Intravenously. *Clinical Cancer Research* 9 (10): 3578
- (64) Kelly WK, Marks PA (2005) Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nature clinical practice.Oncology* 2 (3): 150
- (65) Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, et al. (2005) Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology* 23 (17): 3923
- (66) Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, et al. (2001) Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 61 (16): 6185
- (67) Keshelava N, Houghton PJ, Morton CL, Lock RB, Carol H, Keir ST, et al. (2009) Initial testing (stage 1) of vorinostat (SAHA) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric blood & cancer* 53 (3): 505-508
- (68) Keshelava N, Davicioni E, Wan Z, Ji L, Sposto R, Triche TJ, et al. (2007) Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *J.Natl.Cancer Inst.* 99 (14): 1107-1119

- (69) Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386 (6627): 761-763
- (70) Kirschbaum M, Zain J, Popplewell L, Pullarkat V, Nademanee A, Delioukina M, et al. (2007) A Phase 2 study of Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in relapsed or refractory indolent non Hodgkin lymphoma. A California Cancer Consortium Study. *Blood* 110 (11): 2568
- (71) Kodama K, Doi O, Higashiyama M, Mori Y, Horai T, Tateishi R, et al. (1991) Establishment and characterization of a new Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet.Cytogenet.* 57 (1): 19-30
- (72) Kodama K, Doi O, Higashiyama M, Yokouchi H, Tateishi R, Mori Y (1994) Differentiation of a Ewing's sarcoma cell line towards neural and mesenchymal cell lineages. *Cancer Science* 85 (4): 335-338
- (73) Kohn KW (1977) Interstrand cross-linking of DNA by 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-haloethyl)-1-nitrosoureas. *Cancer Res.* 37 (5): 1450
- (74) Kovacina KS, Roth RA (1995) Characterization of the endogenous insulin receptor-related receptor in neuroblastomas. *J.Biol.Chem.* 270 (4): 1881-1887
- (75) Lee MJ, Kim YS, Kummar S, Giaccone G, Trepel JB (2008) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Curr.Opin.Oncol.* 20 (6): 639
- (76) Lenferink AE, Simpson JF, Shawver LK, Coffey RJ, Forbes JT, Arteaga CL (2000) Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase suppresses tumorigenesis in MMTV/Neu MMTV/TGF- $\alpha$  bigenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (17): 9609-9614
- (77) Lesser GJ, Grossman SA (1993) The chemotherapy of adult primary brain tumors. *Cancer Treat.Rev.* 19 (3): 261-281
- (78) Levitzki A, Gazit A (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267 (5205): 1782
- (79) Liang D, Kong X, Sang N (2006) Effects of histone deacetylase inhibitors on HIF-1. *Cell Cycle* 5 (21): 2430-2435
- (80) Lichtner RB, Menrad A, Sommer A, Klar U, Schneider MR (2001) Signaling-inactive epidermal growth factor receptor/ligand complexes in intact carcinoma cells by quinazoline tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 61 (15): 5790
- (81) Lilenbaum RC (2014) Systemic therapy for advanced non-small cell lung cancer with an activating mutation in the epidermal growth factor receptor. In: *UpToDate (Hrsg) UpToDate.* UpToDate, Waltham, MA
- (82) Lo H, Hsu S, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, et al. (2005) Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer cell* 7 (6): 575-589

- (83) Lown JW, McLaughlin LW, Chang YM (1978) Mechanism of action of 2-haloethylnitrosoureas on DNA and its relation to their antileukemic properties. *Bioorg.Chem.* 7 (1): 97-110
- (84) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 (5600): 1912
- (85) Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv.Cancer Res.* 91: 137-168
- (86) Marsoni S, Damia G, Camboni G (2008) A work in progress: the clinical development of histone deacetylase inhibitors. *Epigenetics* 3 (3): 164-171
- (87) Mau H (2006) Chirurgische Therapie, Allgemeine Grundsätze. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, S. 595-596
- (88) McAllister RM, Melnyk J, Finklestein JZ, Adams Jr EC, Gardner MB (1969) Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 24 (3): 520-526
- (89) McCarthy RE, Junius V, Farber S, Lazarus H, Foley GE (1965) Cytogenetic analysis of human lymphoblasts in continuous culture. *Exp.Cell Res.* 40 (1): 197-200
- (90) Mendelsohn J (2002) Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 20 (suppl 1): 1-13
- (91) Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, Potter JD, Nesbit ME, Jr, Ruccione K, et al. (2001) Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J.Clin.Oncol.* 19 (13): 3163-3172
- (92) Meyerhardt JA, Mayer RJ (2005) Systemic therapy for colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 352 (5): 476-487
- (93) Milano G, Spano J, Leyland-Jones B (2008) EGFR-targeting drugs in combination with cytotoxic agents: from bench to bedside, a contrasted reality. *Br.J.Cancer* 99 (1): 1-5
- (94) Minowada J, Onuma T, Moore G (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J.Natl.Cancer Inst.* 49 (3): 891
- (95) Minucci S, Nervi C, Lococco F, Pelicci PG (2001) Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* 20 (24): 3110-3115
- (96) Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer* 6 (1): 38-51
- (97) Munshi N, Agaloti T, Lomvardas S, Merika M, Chen G, Thanos D (2001) Coordination of a transcriptional switch by HMG1 (Y) acetylation. *Science* 293 (5532): 1133
- (98) Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M (2008) N-Nitrosoharnstoff-Derivate. In: Mutschler E (Hrsg) *Arzneimittelwirkungen : Lehrbuch der*

Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Stuttgart, 9. Aufl., S. 926

(99) Nagane M, Narita Y, Mishima K, Levitzki A, Burgess AW, Cavenee WK, et al. (2001) Human glioblastoma xenografts overexpressing a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor sensitized to cisplatin by the AG1478 tyrosine kinase inhibitor. *J.Neurosurg.* 95 (3): 472-479

(100) Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HS (1998) Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (10): 5724-5729

(101) Naraghi S, Khoshyomn S, DeMattia JA, Vane DW (2000) Receptor tyrosine kinase inhibition suppresses growth of pediatric renal tumor cells in vitro. *J.Pediatr.Surg.* 35 (6): 884-890

(102) National Cancer Institute, NCI (2012) Targeted Cancer Therapies; 1.What are targeted cancer therapies?. Online im Internet: URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted> [Abrufdatum: 28.12.2013]

(103) National Cancer Institute, NCI (2012) Targeted Cancer Therapies; 7.Where can I find information about clinical trials of targeted therapies?. Online im Internet: URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted> [Abrufdatum: 28.12.2013]

(104) National Cancer Institute, NCI (2013) Cancer Drug Information, FDA Approval for Cetuximab. Online im Internet: URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-cetuximab> [Abrufdatum: 10.01.2014]

(105) National Cancer Institute, NCI (2013) Cancer Drug Information, FDA Approval for Panitumumab. Online im Internet: URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-panitumumab> [Abrufdatum: 10.01.2014]

(106) National Library of Medicine at the National Institutes of Health (2013). Online im Internet: URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=saha&Search=Search> [Abrufdatum: 7.3.13]

(107) Normanno N, De Luca A, Maiello MR, Mancino M, D'Antonio A, Macaluso M, et al. (2005) Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: current status and future development. *Front.Biosci.* 10: 2611-2617

(108) O'Connor OA, Heaney ML, Schwartz L, Richardson S, Willim R, MacGregor-Cortelli B, et al. (2006) Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 24 (1): 166

(109) Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, et al. (2007) Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 25 (21): 3109

- (110) Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, et al. (2010) Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: A trans European EuroBoNet effort. *Genes, Chromosomes and Cancer* 49 (1): 40-51
- (111) Park M, Testa JR, Blair DG, Parsa NZ, Vande Woude GF (1988) Two rearranged MET alleles in MNNG-HOS cells reveal the orientation of MET on chromosome 7 to other markers tightly linked to the cystic fibrosis locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (8): 2667
- (112) Partik G, Hochegger K, Schörkhuber M, Marian B (1999) Inhibition of epidermal-growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrphostins A25 and AG1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumor cells in vitro. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 125 (7): 379-388
- (113) Pastuszko A, Yee DK, Nelson D, Wilson DF (1988) Calcium dependent regulation of catecholamine and serotonin metabolism in human neuroblastoma cells. *Cancer Biochem.Biophys.* 10 (1): 67-76
- (114) Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, et al. (2005) Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102 (10): 3697-3702
- (115) Pötter R, Dieckmann K (2006) Strahlentherapie, Einleitung. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer DE, S. 578-579
- (116) Pötter R, Dieckmann K (2006) Kombination von Radiotherapie und medikamentöser Therapie. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, S. 584-585
- (117) Pötter R, Dieckmann K (2006) Kombination von Radiotherapie und Operation. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, S. 585
- (118) Prince HM, Bishton MJ, Harrison SJ (2009) Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clinical Cancer Research* 15 (12): 3958
- (119) Pritchard CC, Grady WM (2011) Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 60 (1): 116-129
- (120) Pritchard K (2013) Endocrine therapy: is the first generation of targeted drugs the last? *J.Intern.Med.* 274 (2): 144-152
- (121) Raffel C, Thomas GA, Tishler DM, Lassoff S, Allen JC (1993) Absence of p53 mutations in childhood central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Neurosurgery* 33 (2): 301
- (122) Ramalingam SS, Parise RA, Ramanathan RK, Lagattuta TF, Musguire LA, Stoller RG, et al. (2007) Phase I and pharmacokinetic study of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in combination with carboplatin and paclitaxel for advanced solid malignancies. *Clinical cancer research* 13 (12): 3605

- (123) Reynolds C, Biedler J, Spengler B, Reynolds D, Ross R, Frenkel E, et al. (1986) Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J.Natl.Cancer Inst.* 76 (3): 375
- (124) Richardson P, Schlossman RL, Mitsiades CS, Munshi NC, Colson K, Doss D, et al. (2004) Phase I Clinical Trial of Oral Administration of the Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood* 104 (11): 1503-1503
- (125) Richmond TJ, Davey CA (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423 (6936): 145-150
- (126) Richon V (2006) Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. *Br.J.Cancer* 95: S2-S6
- (127) Robinson DR, Wu YM, Lin SF (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Biomed.Sci.* 19: 5548-5557
- (128) Rosenfeld C, Goutner A, Choquet C, Venuat A, Kayibanda B, Pico J, et al. (1977) Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* 267 (5614): 841-843
- (129) Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 71 (4): 741
- (130) Rossler J, Georger B, Taylor M, Vassal G (2008) Small molecule tyrosine kinase inhibitors: potential role in pediatric malignant solid tumors. *Current Cancer Drug Targets* 8 (1): 76-85
- (131) Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone Acetyltransferases. *Annu.Rev.Biochem.* 70 (1): 81-120
- (132) Rubin EH, Agrawal NGB, Friedman EJ, Scott P, Mazina KE, Sun L, et al. (2006) A study to determine the effects of food and multiple dosing on the pharmacokinetics of vorinostat given orally to patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research* 12 (23): 7039
- (133) Sadee W, Yu V, Richards M, Preis P, Schwab M, Brodsky F, et al. (1987) Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 47 (19): 5207
- (134) Sakajiri S, Kumagai T, Kawamata N, Saitoh T, Said JW, Koeffler HP (2005) Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp.Hematol.* 33 (1): 53-61
- (135) Schabel FM,Jr (1976) Nitrosoureas: a review of experimental antitumor activity. *Cancer Treat.Rep.* 60 (6): 665-698
- (136) Schaefer EW, Loaiza-Bonilla A, Juckett M, DiPersio JF, Roy V, Slack J, et al. (2009) A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 94 (10): 1375-1382



- (137) Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, et al. (2009) MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106 (29): 12085-12090
- (138) Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31 (1): 27
- (139) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N.Engl.J.Med.* 344 (11): 783-792
- (140) Sonnemann J, Kumar KS, Heesch S, Müller C, Hartwig C, Maass M, et al. (2006) Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. *Int.J.Oncol.* 28 (3): 755
- (141) Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, et al. (1997) All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 337 (15): 1021-1028
- (142) Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 983 (1): 84-100
- (143) Tomita K, Tsuchiya H (1989) Enhancement of cytotoxic and antitumor effect of cisplatin by caffeine in human osteosarcoma. *Clin.Ther.* 11 (1): 43-52
- (144) Torres J, Regan PL, Edo R, Leonhardt P, Jeng EI, Rappaport EF, et al. (2010) Biological effects of induced MYCN hyper-expression in MYCN-amplified neuroblastomas. *Int.J.Oncol.* 37 (4): 983
- (145) Traynor AM, Dubey S, Eickhoff JC, Kolesar JM, Schell K, Huie MS, et al. (2009) Vorinostat (NSC# 701852) in patients with relapsed non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network phase II study. *Journal of thoracic oncology* 4 (4): 522
- (146) Van Valen F, Winkelmann W, Jürgens H (1992) Type I and type II insulin-like growth factor receptors and their function in human Ewing's sarcoma cells. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 118 (4): 269-275
- (147) Vivanco I, Mellinghoff IK (2010) Epidermal growth factor receptor inhibitors in oncology. *Curr.Opin.Oncol.* 22 (6): 573
- (148) Weiss RB, Issell BF (1982) The nitrosoureas: carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). *Cancer Treat.Rev.* 9 (4): 313-330
- (149) Weiss RB, Poster DS, Penta JS (1981) The nitrosoureas and pulmonary toxicity. *Cancer Treat.Rev.* 8 (2): 111-125
- (150) Wessalowski R, Göbel U (2006) Hyperthermie, Indikationen bei Kindern und Jugendlichen. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeier C (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, Heidelberg, S. 609-610

- (151) Wilson AJ, Byun D, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, et al. (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J.Biol.Chem.* 281 (19): 13548-13558
- (152) Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (2): 127-137
- (153) Yen L, Benlimame N, Nie Z, Xiao D, Wang T, Al Moustafa A, et al. (2002) Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo-and heterodimers. *Mol.Biol.Cell* 13 (11): 4029-4044
- (154) Zhang Y, Du Q, Fang W, Jin M, Tian X (2008) Tyrphostin AG1478 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Int.J.Oncol.* 33 (3): 595-602
- (155) Zhou Y, Brattain MG (2005) Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis. *Cancer Res.* 65 (13): 5848
- (156) Zhu XF, Liu ZC, Xie BF, Li ZM, Feng GK, Yang D, et al. (2001) EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett.* 169 (1): 27-32
- (157) Zirlik K, Nashan D, Veelken H (2010) Vorinostat in der Behandlung kutaner T-Zell-Lymphome. Therapie mit Histon-Desacetylase-Inhibitoren. *Pharm.Unserer Zeit* 39 (3): 190-196

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
CI	Kombinationsindex nach Chou und Talalay
CTCL	Kutanen T-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ErbB	Gensymbol für vier strukturverwandte humane Rezeptor Tyrosinkinasen , benannt nach einem homologen viralen Onkogen
FDA	Food and Drug Administration
GI <sub>50</sub>	Die benötigte Konzentration um das Wachstum der behandelten Zellen auf die Hälfte des Wachstums der Unbehandelten zu reduzieren
HAT	Histon Acetyltransferase
HDAC	Histon Deacetylase
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IC <sub>50</sub>	Konzentration eines Inhibitors bei der eine halbmaximale Inhibition zu beobachten ist
LC <sub>50</sub>	Die Konzentration, bei der die Hälfte der behandelten Zellen abgetötet werden
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MTT	Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Reduzierte Form von NAD
NADPH	Reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCI	National Cancer Institute
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
STAT	Signal transducer and activator of transcription
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

**7. Lebenslauf**

## **8. Danksagung**

Bei Prof. Dr. J. Boos bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die freundliche und hilfreiche Unterstützung, insbesondere in der Endphase meiner Promotionsbemühungen. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. C. Lanvers-Kaminsky für die geduldige Einarbeitung, die Hilfestellung bei aufkommenden Fragen und für ihr immer offenes Ohr bei Problemen. Ich möchte mich auch bei Frau S. Schulz und Frau P. Schulze-Westhoff dafür bedanken, dass sie mich in ihrem Labor so freundlich aufgenommen haben und technische Hilfestellung geleistet haben.

Dank gilt auch meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin für die stetige Unterstützung und das Mitfiebern.