

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens -

Präklinische Evaluation des Telomeraseinhibitors BRACO 20  
an Neuroblastomzelllinien

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Dullat, Julia Ariane  
aus Lüdenscheid

2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Boos

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. B. Greve

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Boos

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. B. Greve

## ZUSAMMENFASSUNG

### Präklinische Evaluation des Telomeraseinhibitors BRACO 20 an Neuroblastomzelllinien

Dullat, Julia Ariane

**Hintergrund:** Trotz der Behandlungserfolge mit den „klassischen“ Heilverfahren, wie Operation, zytotoxischer Chemotherapie und Strahlentherapie, konnten in den vergangenen Jahren bei der Behandlung fortgeschrittener und metastasierter Tumorerkrankungen keine wesentlichen Fortschritte erzielt werden. Das Enzym Telomerase befähigt Tumorzellen durch Erhalt chromosomenendständiger DNA-Sequenzen (Telomeren) zu unbegrenzter Teilungsfähigkeit, ist im Gegensatz zum Normalgewebe in vielen Tumoren hochexprimiert und stellt damit ein vielversprechendes selektives Target in der Tumorthherapie dar. Insbesondere weisen Neuroblastome mit einer schlechten Prognose häufig eine hohe Telomeraseaktivität auf und kommen deshalb für die Behandlung mit einem Telomeraseinhibitor in Frage. Besonders die Kombination solcher Wirkstoffe mit in der Therapie bereits etablierten Zytostatika wie zum Beispiel Cisplatin könnte einen neuen Behandlungsansatz darstellen. Bislang existiert jedoch noch kein Telomerasehemmer, der für die Tumorbehandlung zugelassen ist.

**Methoden:** Mittels Zytotoxizitätstests wurde untersucht, ob die kombinierte Behandlung des neuen Telomeraseinhibitors BRACO 20 zusammen mit Cisplatin zu synergistischen Effekten an verschiedenen Neuroblastomzelllinien in vitro führt. Zudem wurden nach unterschiedlichen Behandlungszeiten mit BRACO 20 die Telomeraseaktivität und die Telomerlängen bestimmt. Hierbei wurde auch ein neues Verfahren zur Messung der Telomeraseaktivität etabliert.

**Ergebnisse:** BRACO 20 hemmte im Zellfreien Versuch die Telomerase und reduzierte das Zellwachstum in Abhängigkeit von der Konzentration und der Behandlungsdauer. Jedoch führte eine Vorbehandlung der Zellen mit BRACO 20 nicht zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber Cisplatin. Darüber hinaus konnte für BRACO 20 weder eine Reduktion der Telomeraseaktivität noch eine Verkürzung der Telomeren festgestellt werden.

**Schlussfolgerung:** Die Ursache für die fehlenden Effekte von BRACO 20 auf die Telomeraseaktivität war offenbar in der fehlenden in-vitro Stabilität der Substanz begründet. Auch wenn der verwendete Wirkstoff BRACO 20 nicht die erhofften Effekte gezeigt hat, so stellt die Hemmung der Telomerase weiterhin eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit von Tumoren dar. Es sollte deshalb weiter nach Telomeraseinhibitoren gesucht werden, um die Krebstherapie zu verbessern.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2011

## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:  
„Präklinische Evaluation des Telomeraseinhibitors BRACO 20  
an Neuroblastomzelllinien“

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und  
Onkologie

unter der Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

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.

Münster, den 27.12.11

Ort, Datum



Unterschrift

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Neuroblastom</b>	<b>4</b>
1.1.1	Definition	4
1.1.2	Stadieneinteilung	4
1.1.3	Epidemiologie	7
1.1.4	Therapie	8
	Operation	8
	Radiotherapie	8
	<sup>131</sup> I-MIBG Therapie	9
	Chemotherapie	10
	13-cis-Retinsäure	10
	Antikörpertherapie	10
1.1.5	Therapieplanung	11
1.1.6	Prognose	13
1.1.7	Genetische und molekularbiologische Eigenschaften des Neuroblastoms	16
	MYCN-Amplifikation	16
	1p – Deletion	17
	Telomeraseaktivität	18
<b>1.2</b>	<b>DNA-Replikation und das End-Replikations-Problem</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Telomere</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>Telomerase</b>	<b>24</b>
<b>1.5</b>	<b>Cisplatin</b>	<b>26</b>
<b>1.6</b>	<b>Die Testsubstanz BRACO 20</b>	<b>28</b>
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung und Fragestellung der Doktorarbeit</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Zelllinien</b>	<b>32</b>
2.1.1	SHEP-SF	32
2.1.2	KCN	32
<b>2.2</b>	<b>Weiteres Verbrauchsmaterial und Geräte</b>	<b>32</b>

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>46</b>
3.1	Zellkultivierung	46
3.2	Bestimmung der Zellzahl	47
3.3	MTT oder Zytotoxizitäts-Test	48
3.4	Bestimmung der GI <sub>50</sub> und LC <sub>50</sub>	51
3.5	Asservierung von Zellmaterial zur DNA und Proteinisolierung	51
3.6	DNA-Isolation	52
3.7	Messung der DNA-Konzentration	53
3.8	Proteinisolierung	53
3.9	Messung der Proteinkonzentration	53
3.10	DNA-Gel-Elektrophorese	54
3.11	TRAP-Assay	55
3.12	Telomeraseaktivitätsmessung am TaqMan <sup>®</sup>	57
3.13	Southern Blot (Dig-labelling)	59
3.13.1	Restriktionsverdau	59
3.13.2	Fällung	59
3.13.3	Transfer	60
3.13.4	Hybridisierung	62
3.13.5	Detektion	62
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
4.1	Die unterschiedlichen Versuchsanordnungen	64
4.2	Ergebnisse MTT-Tests	64
4.2.1	Zytotoxizität von BRACO 20 an den Zelllinien KCN und SHEP-SF	65
4.3	Wachstumsverhalten der Zelllinien KCN und SHEP-SF unter Zugabe von Cisplatin	68
4.3.1	MTT KCN mit Cisplatin und 0,5 µM BRACO 20 - Kurzzeitexposition	68
4.3.2	KCN mit Cisplatin und 2,5 µM BRACO 20 - Kurzzeitexposition	70
4.3.3	SHEP-SF mit Cisplatin und 0,5 µM BRACO 20 – Kurzzeitexposition	73
4.3.4	MTT SHEP-SF 2,5 µM BRACO 20 - Kurzzeitexposition	75
4.3.5	MTT KCN 0,5 µM Langzeitversuch	77

4.3.6	MTT KCN 2,5 $\mu$ M Langzeitversuch .....	79
4.3.7	MTT SHEP-SF LZ 0,5 $\mu$ M .....	81
4.3.8	MTT SHEP-SF LZ 2,5 $\mu$ M .....	83
<b>4.4</b>	<b>Wachstum der Zellen ohne Zugabe von Cisplatin .....</b>	<b>85</b>
<b>4.5</b>	<b>Telomeraseaktivität .....</b>	<b>88</b>
4.5.1	Telomeraseaktivität KCN 0,5 $\mu$ M BRACO 20 .....	89
4.5.2	Telomeraseaktivität KCN 2,5 $\mu$ M BRACO 20 .....	91
4.5.3	Telomeraseaktivität SHEP-SF 0,5 $\mu$ M BRACO 20 .....	92
4.5.4	Telomeraseaktivität SHEP-SF 2,5 $\mu$ M BRACO 20 .....	93
4.5.5	Methodenvergleich Taqman vs konventioneller TRAP-Assay mit Fragmentanalyse .....	94
<b>4.6</b>	<b>Southern-Blots .....</b>	<b>97</b>
4.6.1	KCN 0,5 $\mu$ M BRACO20.....	97
4.6.2	SHEP-SF 0,5 $\mu$ M BRACO20 .....	97
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>100</b>
<b>5.1</b>	<b>Warum Telomeraseinhibition bei der Behandlung des Neuroblastoms? .....</b>	<b>100</b>
	Exposition von KCN mit BRACO 20 .....	103
	Exposition von SHEP-SF mit BRACO 20.....	104
<b>5.2</b>	<b>Abschließende Überlegungen.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>Quellenangaben .....</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Neuroblastom

### 1.1.1 Definition

Das Neuroblastom (NB) ist ein maligner Tumor, der durch seine Ähnlichkeit zu embryonalen sympathischen Neuroblasten charakterisiert ist. Am häufigsten geht der Tumor vom Nebennierenmark aus, kann aber grundsätzlich überall aus Zellen des sympathischen Nervensystems entstehen. 50% bis 70% der Tumore sind primär intraabdominell lokalisiert<sup>37</sup>. Weitere typische Entstehungsorte sind der Kopf-Hals-Bereich und das Becken<sup>37</sup>. Der überwiegende Teil der Neuroblastome ist neuroendokrin aktiv. Typisch für das Neuroblastom ist ein heterogenes Verhalten. So kommen neben schnell progredienten Fällen durchaus auch Spontanremissionen vor<sup>37</sup>. Somit variieren sowohl die Prognose als auch das Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen erheblich<sup>27,31</sup>

### 1.1.2 Stadieneinteilung

Die Stadien des NBs können sowohl nach Evans et al.<sup>30</sup> als auch nach dem „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS)<sup>15</sup> eingeteilt werden (vgl. Tab.: 1 und 2). Da in Deutschland die meisten Patienten innerhalb der Neuroblastomstudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) (derzeit NB 2004) behandelt werden, ist eher die dort verwendete Klassifikation nach dem INSS-System üblich. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, ist dann die Stadieneinteilung erst postoperativ möglich, da die Resektabilität des Tumors Einfluss auf das Stadium hat.

Stadium	Eigenschaften
I	Der Tumor ist auf das Ausgangsorgan begrenzt.
II	Der Tumor breitet sich per continuitatem über das Ausgangsorgan hinaus aus, überschreitet jedoch nicht die Mittellinie, evtl. ipsilateraler Lymphknotenbefall.
III	Der Tumor breitet sich per continuitatem über das Ausgangsorgan hinaus aus, mit Mittellinienüberschreitung, evtl. contralateraler Lymphknotenbefall.
IV	Metastasierung in den Knochen oder in andere Organe;
IV S	lokaler Primärtumor (wie I oder II) mit isolierter Metastasierung in einem oder mehreren folgender Organe: Leber, Haut oder Knochenmark;

Tab. 1: Klinische Stadieneinteilung des NBs nach Evans et al.<sup>30</sup>

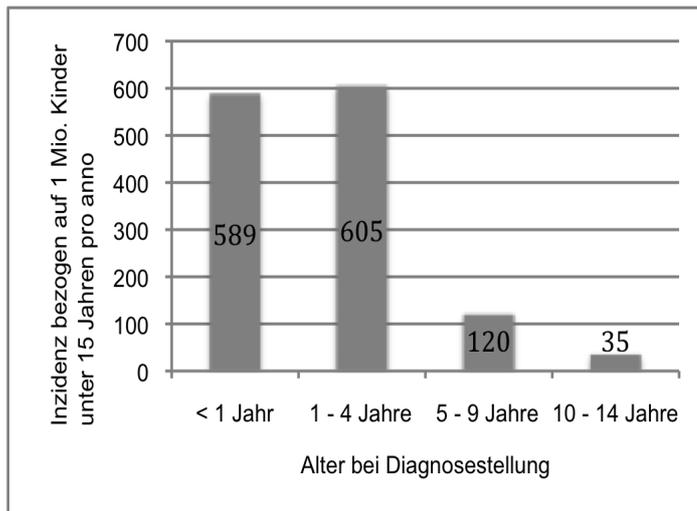
Stadium	Befunde
1	Lokal begrenzter Primärtumor, komplette Entfernung mit oder ohne mikroskopischen Residualtumor, Lymphknoten mikroskopisch negativ
2A	Lokal begrenzter Primärtumor, makroskopisch inkomplette Entfernung, ipsilaterale Lymphknoten mikroskopisch negativ
2B	Lokal begrenzter Primärtumor, makroskopisch sowohl komplette als auch inkomplette Entfernung, ipsilaterale regionale Lymphknoten positiv, kontralaterale Lymphknoten mikroskopisch negativ
3	Inoperabler Tumor mit Mittellinienüberschreitung bilateral mit oder auch ohne regionale Lymphknotenbeteiligung, ODER Tumor unilateral mit kontralateraler Lymphknotenbeteiligung, ODER Mittellinientumor mit bilateraler Lymphknotenbeteiligung
4	Metastasierung in entfernte Lymphknoten, Skelett, Knochenmark, Leber und / oder andere Organe (außer Definition nach Stadium 4S)
4S	Lokalisierter Primärtumor entsprechend Stadium 1 oder 2 mit isolierter Metastasierung in Leber, Haut und / oder Knochenmark (nur bei Kindern < 1 Jahr)

Tab. 2: Internationale Stadieneinteilung für Neuroblastome, INSS (gemäß der Vorgaben aus der Neuroblastomstudie NB 2004)

### 1.1.3 Epidemiologie

Mit einer Häufigkeit von 7,4% aller Malignome im Kindesalter stellt das NB den häufigsten soliden extrakraniellen malignen Tumor in der Kindheit dar.<sup>52</sup>

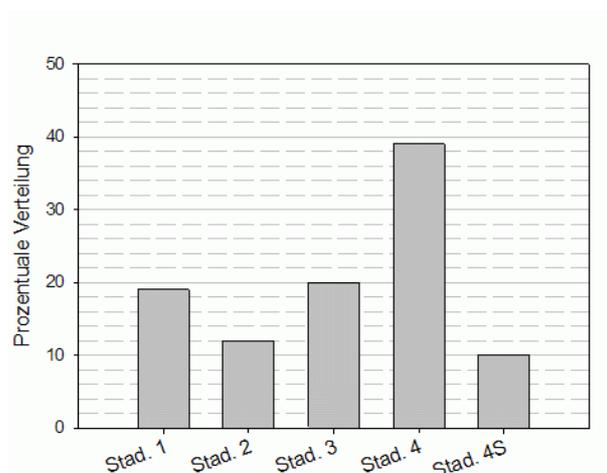
Abb. 1: Inzidenz nach dem deutschen Kinderkrebsregister (Zeitraum 1999 bis 2008) n = 1349



In Deutschland werden 89% aller Erkrankungen in den ersten fünf Lebensjahren diagnostiziert<sup>52</sup>. Das mittlere Lebensalter bei Diagnosestellung beträgt ca. 1 1/2 Jahre. Die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit liegt bei 79%. Die Inzidenz lag nach dem deutschen Kinderkrebsregister zwischen 2003 und 2007 bei 1,2/100.000 pro Jahr (bezogen auf Kinder < 15 Jahren), ist jedoch extrem abhängig vom Alter des Patienten bei Diagnosestellung (vgl. auch Abb.1).

Die meisten Kinder mit einem Neuroblastom befinden sich bereits bei der Diagnosestellung im ungünstigen Stadium 4 (vgl. Abb.: 2).

Abb. 2: Prozentuale Stadienverteilung nach INSS, Behandlung gemäß NB90 (n=843)



#### 1.1.4 Therapie

Da in Deutschland die meisten Patienten innerhalb der Neuroblastomstudie (derzeit NB 2004) behandelt werden, lehnt sich dieses Kapitel zum Großteil an die dortigen Therapieempfehlungen an.

##### **Operation**

Die Operation ist der zentrale Bestandteil bei der Behandlung des Neuroblastoms. Sie dient nicht nur der Diagnosesicherung und ermöglicht eine genaue Festlegung des Stadiums, sondern stellt in einigen Fällen auch eine kurative Therapieoption dar (INSS Stadium 1). Allerdings sind nicht alle Neuroblastome gleich gut operabel; während Tumoren der Nebenniere meist gut abgegrenzt sind, so dass keine Nephrektomie erforderlich ist, sind Geschwülste des Grenzstranges, von Ganglien u.ä. oft schlecht resektabel<sup>37</sup>.

##### **Radiotherapie**

Die Bestrahlung verliert immer mehr an Bedeutung für die Therapie des Neuroblastoms, da zunehmend die Behandlungsoptionen mit Zytostatika an Einfluss gewinnen. In der Neuroblastomstudie NB 2004 ist die Bestrahlung nur noch vorgesehen, wenn in der Hochrisikogruppe oder der Standardrisikogruppe nach operativer Resektion und Induktionschemotherapie noch aktive Reste

verblieben sind. „Aktiv“ bedeutet dabei, dass der Tumorrest eine MIBG Aufnahme, Octreotid Aufnahme oder im MRT eine eindeutige Kontrastmittelaufnahme aufweist. Bei der Bestrahlung ist dann eine Dosis von 36 Gy bis 40 Gy in 5 Fraktionen pro Woche mit einer Einzeldosis von 1,6 Gy bis 2,0 Gy vorgesehen. Überdies ist die Radiatio in Notfallsituationen, wie z. B. bei intraspinalen Tumoren mit drohender Rückenmarkskompression oft unerlässlich. Es werden dann Dosen zwischen 7,5 Gy und 30 Gy verabreicht. Auch eine intraoperative Bestrahlung kann im Einzelfall zum Einsatz kommen. Ferner ist auch für den Fall einer Knochenmarktransplantation die Konditionierung im Sinne einer Ganzkörperbestrahlung mit 7,5 Gy – 12 Gy Bestandteil der Behandlung<sup>38</sup>. Darüber hinaus kommt die Bestrahlung auch in der palliativen Situation z.B. bei der lokalen Behandlung von schmerzhaften oder frakturgefährdeten Knochenmetastasen zum Einsatz.

#### **<sup>131</sup>I-MIBG Therapie**

MIBG (Metaiodbenzylguanidin) ist ein Molekül, welches strukturell dem Noradrenalin ähnelt und in neuroendokrine Zellen aufgenommen wird. Es wird radioaktiv mit Iod <sup>131</sup>I markiert und findet dann Verwendung in der nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie. Eine Aufnahme von <sup>131</sup>I-MIBG ist spezifisch für NBe, Ganglioneurome und Phäochromozytome. Da etwa 80% der NBe positiv für <sup>131</sup>I-MIBG sind, macht man sich diese Form der Diagnostik und Therapie zu Nutzen<sup>38</sup>. Hierfür wird zunächst eine <sup>131</sup>I-MIBG-Szintigrafie durchgeführt, bei der überprüft wird, ob der Tumor die Substanz überhaupt aufnimmt. Ist dies der Fall, ist die Untersuchung für die spätere Verlaufskontrolle und zur Beurteilung des Therapieansprechens geeignet. Im Rahmen der NB2004 Studie kommt <sup>131</sup>I-MIBG in stärkerer Dosierung auch für die Behandlung in Frage (vergleichbar mit der Schilddrüsenszintigrafie als Untersuchungsmethode und der Radiojodtherapie als therapeutische Variante). Die <sup>131</sup>I-MIBG-Therapie kommt bei Hochrisikopatienten zum Einsatz, die am Ende der Induktionstherapie noch einen <sup>131</sup>I-MIBG-positiven Residualtumor aufweisen (bei initial ebenfalls <sup>131</sup>I-MIBG-positiven Tumor). Im Rahmen der <sup>131</sup>I-MIBG-Therapie wird eine Ganzkörperdosis von ca. 2 Gy erreicht, da innerhalb

der NB2004 Studie jedoch eine autologe Stammzelltransplantation folgt, ist die Myelotoxizität zu vernachlässigen<sup>38</sup>.

### **Chemotherapie**

Neben der Operation stellt die Chemotherapie ein weiteres wichtiges Standbein in der Behandlung des Neuroblastoms dar. Üblich ist dabei eine Polychemotherapie (vgl. z.B. Abb.: 4 bis 7) die in verschiedenen Blöcke eingeteilt wird. Ein Block hat dabei eine Dauer von ca. 7 bis 10 Tagen. Es kommen unterschiedliche Zytostatika, wie z.B. Cisplatin oder Etoposid zum Einsatz. Insgesamt handelt es sich bei der Chemotherapie um eine sehr langwierige Behandlung über eine Dauer von mehreren Monaten.

### **13-cis-Retinsäure**

Auch das Vitamin A Derivat 13-cis-Retinsäure findet in der Behandlung des NBs Verwendung. Nachdem in in-vitro<sup>88,89</sup> und in-vivo<sup>1</sup> Versuchen festgestellt wurde, daß 13-cis-Retinsäure sich negativ auf die Proliferation von verschiedenen NB-Zelllinien auswirkte, wurde das Medikament auch bei Patienten mit NB angewendet. In unterschiedlichen Studien wurde ermittelt, daß lediglich eine hochdosierte Behandlung mit 160mg /m<sup>2</sup>/d einen Effekt erzielte<sup>61</sup>.

Innerhalb der NB 2004 Studie werden Standardrisikopatienten im Anschluß an die Erhaltungstherapie mit Retinsäure behandelt (vgl. Abb.: 5). Bei den Hochrisikopatienten wird der Wirkstoff nach der Hochdosischemotherapie, bzw. bei Resttumor, nach der Bestrahlung gegeben (vgl. Abb.: 6).

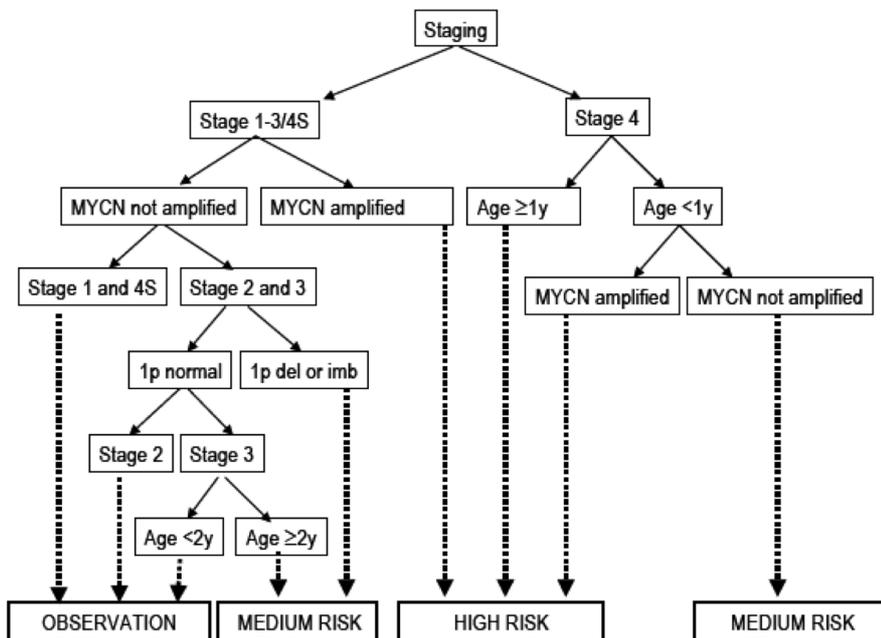
### **Antikörpertherapie**

Wie bei anderen Krebserkrankungen auch, wird auch beim NB ständig nach neuen und anderweitigen Behandlungsansätzen gesucht. So wurde z. B. in der Neuroblastomstudie NB97 die Behandlung der Hochrisikopatienten durch Applikation des Anti-GD2-Antikörpers ch14.18 ergänzt. Da sich kein positiver Effekt auf das ereignisfreie Überleben ausmachen lies, wurde in der Studie NB2004 auf die Antikörpertherapie verzichtet<sup>80,81</sup>.

### 1.1.5 Therapieplanung

In Deutschland erfolgt die Therapie in der Regel standardisiert anhand des jeweils aktuellen Studienprotokolls der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) (aktuell nach der Neuroblastomstudie NB 2004)<sup>38</sup>. Die Therapie erfolgt risiko- und stadienadaptiert, wobei die Grundlage der Behandlung die Operation darstellt. Erst postoperativ ist das endgültige Staging nach INSS möglich. Es erfolgt abhängig von histologischen Befunden sowie der Resektabilität. Darüber hinaus wird das Tumormaterial auf einige molekulargenetische Risikofaktoren, wie z.B. 1p-Deletion oder MYCN-Amplifikation (vgl. „1.1.7 Genetische und molekulare Eigenschaften“), hin untersucht. Abhängig von diesen Befunden werden die Patienten dann in *Beobachtungs-, Standardrisiko- und Hochrisikopatienten* eingeteilt (nach NB 2004) (siehe Abb. 3).

Abb. 3: Patienteneinteilung gemäß dem Protokoll der NB2004 Studie<sup>38</sup>



Die Behandlung des NB erfolgt dann, je nach Risikogruppe, nach unterschiedlichen Regimen. Hierbei kommen diverse Chemotherapieblöcke zum Einsatz, bei denen Cisplatin als Chemotherapeutikum bei der Behandlung von Standardrisiko und Hochrisikopatienten im Block N5 eine wichtige Rolle

einnimmt (vgl. Abb.: 7). Die unterschiedlichen Behandlungsoptionen gemäß NB2004 sind in den Abb. 4 bis 6 dargestellt.

Abb. 4: Therapie der Beobachtungspatienten gemäß dem Protokoll der NB2004 Studie<sup>38</sup>

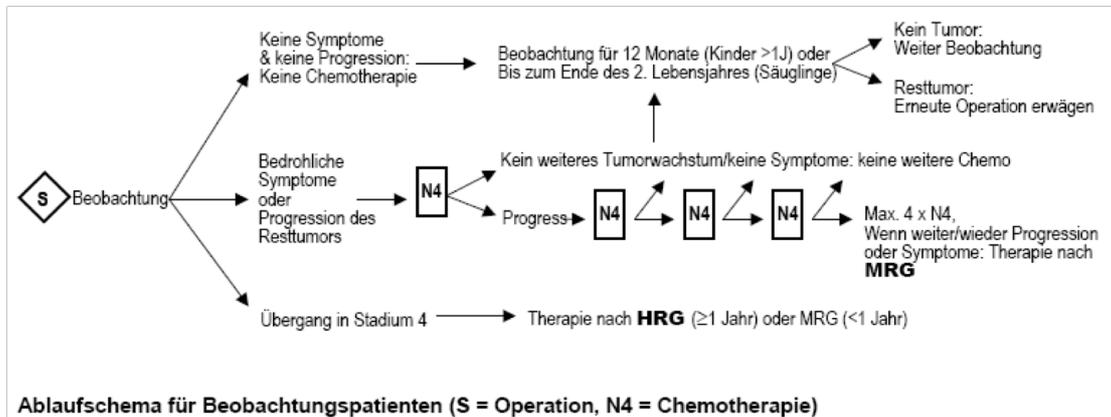
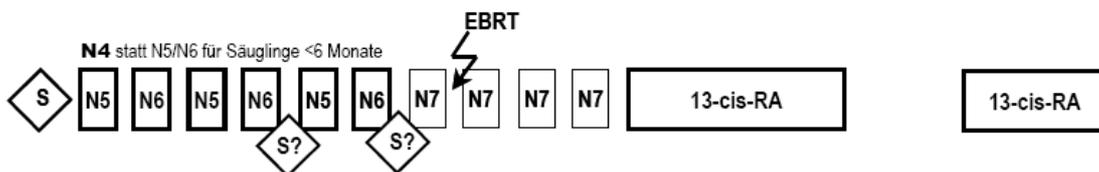


Abb. 5: Therapie der Standardrisikopatienten gemäß dem Protokoll der NB2004 Studie<sup>38</sup>



Übersicht über die Therapie der mittleren Risikogruppe (S = Operation, N4, N5, N6 = Chemotherapieblöcke, N7 = Erhaltungstherapieblöcke, EBRT = Strahlentherapie bei aktivem Resttumor, 13-cis-RA = Retinsäurebehandlung über 6 und 3 Monate)

Abb. 6: Therapie der Hochrisikopatienten gemäß dem Protokoll der NB2004 Studie<sup>38</sup>

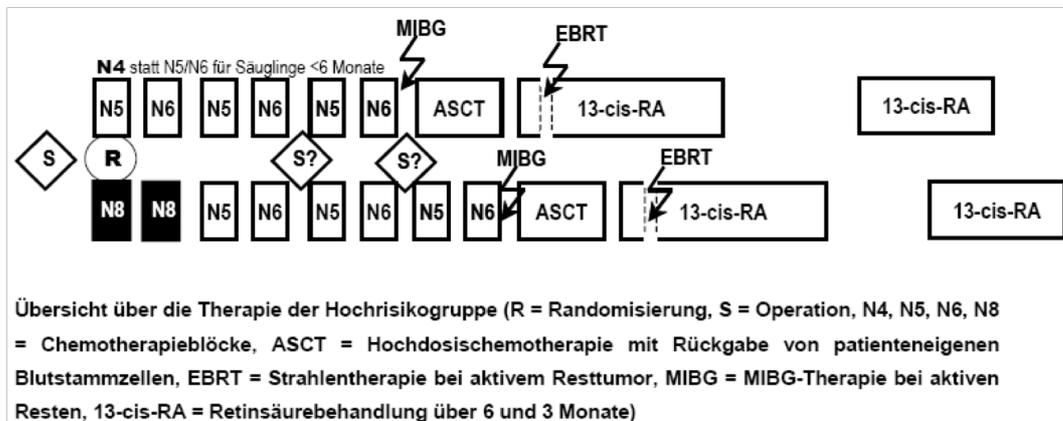


Abb. 7: Chemotherapieplan Block N5 gemäß dem Protokoll der NB2004 Studie<sup>38</sup>

	Cisplatin	40 mg/m <sup>2</sup> xd	d 1 to 4	96 hrs
	Etoposide	100 mg/m <sup>2</sup> xd	d 1 to 4	96 hrs
	Vindesine	3 mg/m <sup>2</sup> xd (maximum 6 mg)	d 1	1 hr
	G-CSF	5 µg/kgxd s.c. 10 µg/kgxd for stem cell mobilization	≥d 9 until WBC >10/nl	
	Hydration	3000 ml/m <sup>2</sup> xd	day 1 to 6	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 days

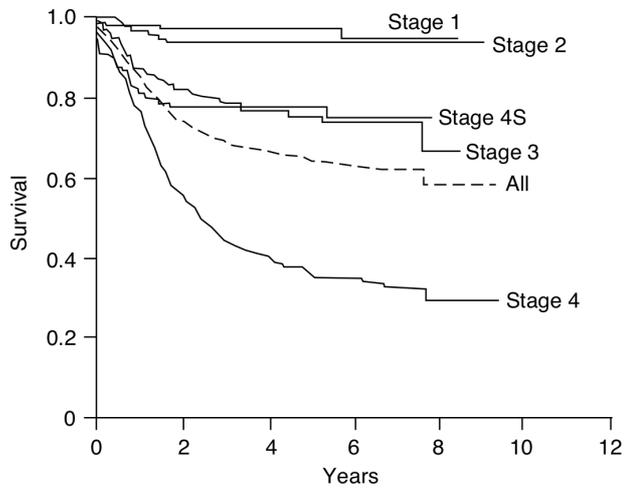
doses for children ≥1 year, for infants see text

### 1.1.6 Prognose

Die Prognose ist von mehreren Faktoren abhängig, so spielt neben dem Stadium auch das Alter bei Diagnosestellung und molekularbiologische Eigenschaften, wie der MYCN-Status und 1p-Deletion eine große Rolle.

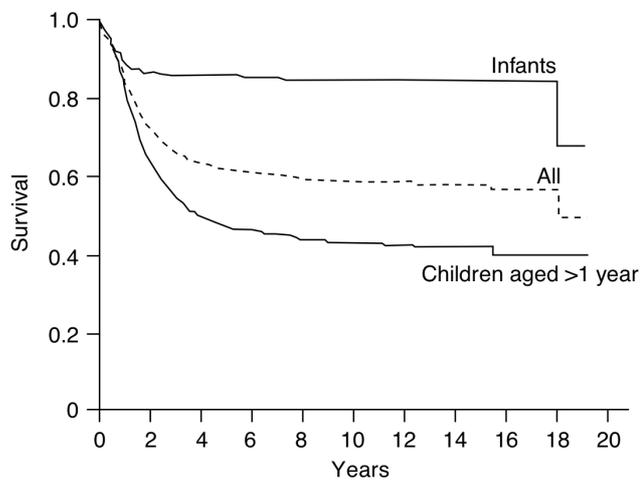
Insgesamt lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei Kindern, die in der Studie NB90 behandelt wurden, bei 67% und war je nach Stadium unterschiedlich (vgl. Abb.: 8)<sup>7</sup>. Das deutsche Kinderkrebsregister gibt für die Patienten, die zwischen 1989 und 1998 erstdiagnostiziert wurden, eine 5-Jahres-Überlebensrate von 79% an<sup>52</sup>.

Abb. 8: Stadienabhängiges Gesamtüberleben von 923 Patienten, Studie NB90<sup>7</sup>



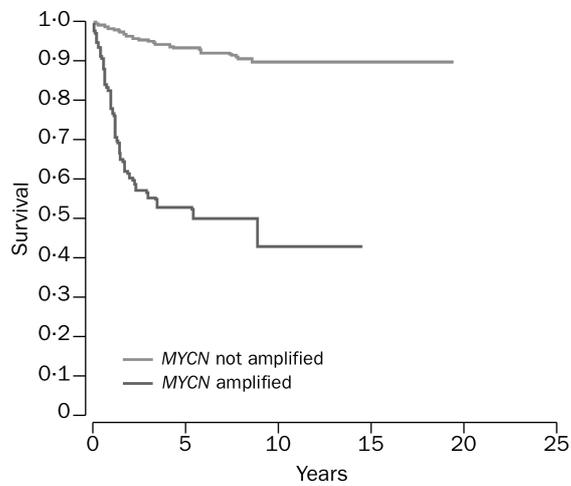
Überdies wurden Daten von 2151 Patienten veröffentlicht, die eindrucksvoll zeigen, welche wichtige Rolle das Alter bei Diagnosestellung für das Überleben spielt (vgl. Abb.: 9)<sup>7</sup>.

Abb. 9: Gesamtüberleben abhängig vom Alter bei Diagnosestellung (n=2151)<sup>7</sup>



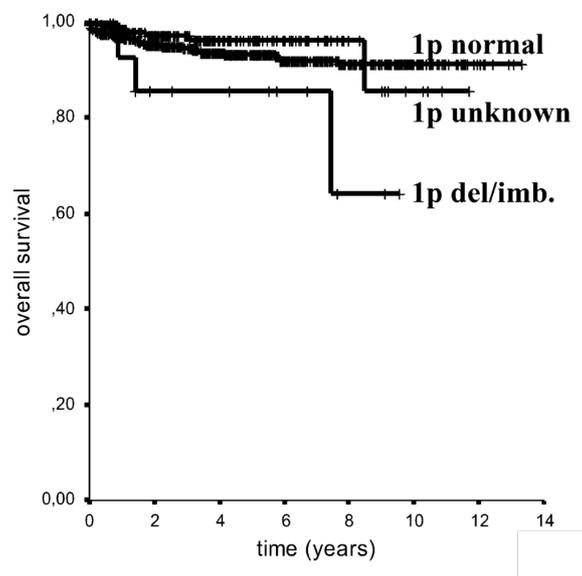
Des weiteren ist für die Prognose auch der MYCN Status ausschlaggebend. So haben Patienten, die eine MYCN-Amplifikation aufweisen eine schlechtere Prognose als Patienten ohne MYCN-Amplifikation (vgl. Abb.: 10)

Abb. 10: Gesamtüberleben für das Stadium 1-3 mit und ohne MYCN-Amplifikation<sup>77</sup>



Ebenfalls prognostisch relevant ist das Fehlen oder Vorhandensein einer 1p-Deletion. Hier haben die Patienten mit vorhandener 1p-Deletion eine schlechtere Prognose (vgl. Abb.: 11).

Abb. 11: Gesamtüberleben für das Stadium 1-3 und 4S ohne MYCN-Amplifikation in Abhängigkeit vom 1p-Deletionsstatus (n=908)<sup>82</sup>



### 1.1.7 Genetische und molekularbiologische Eigenschaften des Neuroblastoms

Beim NB handelt es sich um einen Tumor mit einem äußerst heterogenen klinischen Verhalten. So kommen neben früher Metastasierung auch Spontanregressionen vor<sup>37</sup>. Dies erschwert die Abschätzung der Prognose, weshalb Faktoren, die diesbezüglich eine zusätzliche Bewertung erlauben, von großer Bedeutung sind. Beim NB sind unterschiedliche genetische und molekularbiologische Eigenschaften für die Prognose und für die Auswahl der geeigneten Therapie relevant. Im Folgenden wird hierauf näher eingegangen.

#### **MYCN-Amplifikation**

Bei dem MYCN-Gen handelt es sich um ein Protoonkogen, welches in normalen Zellen in einfacher Kopie auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert ist<sup>76</sup>. Bei einem Teil der Neuroblastome liegt dieses Protoonkogen aber 3- bis 300fach amplifiziert vor<sup>16,59</sup> und ist nicht an das Chromosom 2 gebunden, sondern taucht an vielen unterschiedlichen Genorten auf<sup>76</sup>. Generell scheint der MYCN-Status eine stabile und dauerhafte Eigenschaft des NB-Genoms zu sein, und die Anzahl der MYCN-Gen-Kopien, ob nun amplifiziert oder nicht, verändert sich im Verlauf der Tumorentwicklung nicht. So wurde herausgefunden, dass die Anzahl der MYCN-Kopien innerhalb verschiedener Areale derselben Tumormasse, aber auch zwischen dem Primärtumor und ihren entsprechenden Metastasen in der Regel übereinstimmen und eine Heterogenität selten ist<sup>14,87</sup>.

Bereits sehr früh fand man heraus, dass eine Amplifikation von MYCN mit einem fortgeschrittenen Stadium korreliert<sup>16</sup> und mit einem schnellen Fortschreiten der Erkrankung sowie einer schlechten Prognose assoziiert ist<sup>78</sup>. So hatten in einer Erhebung von Seeger et al. die Patienten, deren Tumoren einen normalen MYCN-Status aufwiesen, ein 18-monatiges progressionsfreies Überleben von 70% verglichen mit 30% bzw. 5% bei Patienten mit Tumoren, die 3-10 bzw. mehr als 10 Kopien des Protoonkogens aufwiesen<sup>78</sup>. Diese Entdeckungen konnten auch durch neuere Untersuchungen bestätigt werden, z.B. durch Auswertungen der deutschen Neuroblastomstudien NB79, NB82,

NB85 und NB90<sup>8</sup>, der französischen Neuroblastomstudie NBL90<sup>75</sup> und weiteren Publikationen<sup>3,20,77</sup>. Somit gilt die MYCN-Amplifikation als starker Risikofaktor, der beispielsweise in der aktuellen Studie NB2004 ausreicht, um einen Patienten in die Hochrisikogruppe einzuordnen.

Zusammenfassend tritt eine MYCN-Amplifikation in fortgeschrittenen Stadien häufiger auf als in frühen Stadien, aber auch stadienunabhängig zeigt sich, dass Patienten mit einer MYCN-Amplifikation eine schlechtere Prognose aufweisen als Patienten ohne MYCN-Amplifikation (vgl. auch Kapitel „Prognose“ und Abb.: 10)<sup>77,78</sup>.

### **1p – Deletion**

Bei einer 1p-Deletion handelt es sich um den Verlust des kurzen Armes des ersten Chromosoms. In den siebziger und achtziger Jahren wurde in NBen eine Häufung von 1p-Deletionen festgestellt<sup>17,34</sup>. Bald legten weitere Untersuchungen nahe, dass diese Eigenschaft mit einer schlechten Prognose und fortgeschrittenem Tumorstadium korreliert<sup>23,24,33,82</sup>. Anhand von Auswertungen unterschiedlicher Studien und Erhebungen konnten diese Beobachtungen bestätigt werden, und es wurde festgestellt dass der Verlust von 1p, unabhängig von Alter oder Stadium, mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist<sup>2,21,74</sup>. Überdies ist eine 1p-Deletion assoziiert mit einem verminderten ereignisfreien Überleben<sup>60,82</sup>. So wurde beispielsweise bei Patienten im Stadium I, II oder IVS die durchschnittliche 3 Jahres- EFÜ (Ereignisfreies Überleben) mit 100% angegeben, wenn kein Allelverlust von auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p Deletion) vorlag, im Gegensatz zu einem 3-Jahres -EFÜ von 34±15% bei 1p-Deletion. Im Stadium III und IV lagen die 3-Jahres - EFÜ bei 53±10% (ohne 1p Deletion) bzw. 0% (mit 1p Deletion)<sup>21,60</sup>. In wie fern auch das Gesamtüberleben negativ beeinflusst wird, wird kontrovers beurteilt<sup>60,82,83</sup>. In einer Auswertung von 233 Patienten (keine MYCN-Amplifikation, Stadium 1-3 und 4S), die innerhalb der Studien NB90, NB95 und NB97 behandelt wurden, zeigte sich bei den Patienten ohne 1p-Deletion ein 3-Jahres-Gesamtüberleben von 97,3+/-1,2%. Bei den Patienten mit 1p-Deletion lag die 3-Jahres-Gesamtüberlebens-Rate jedoch nur bei 85,7+/-

9,4%, der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant ( $p=0,027$ )<sup>82</sup>. In der Neuroblastomstudie NB2004 spielt die 1p-Deletion als Risikofaktor in den Stadien 2 und 3 eine Rolle (vgl. Abb.: 3).

#### **Telomeraseaktivität**

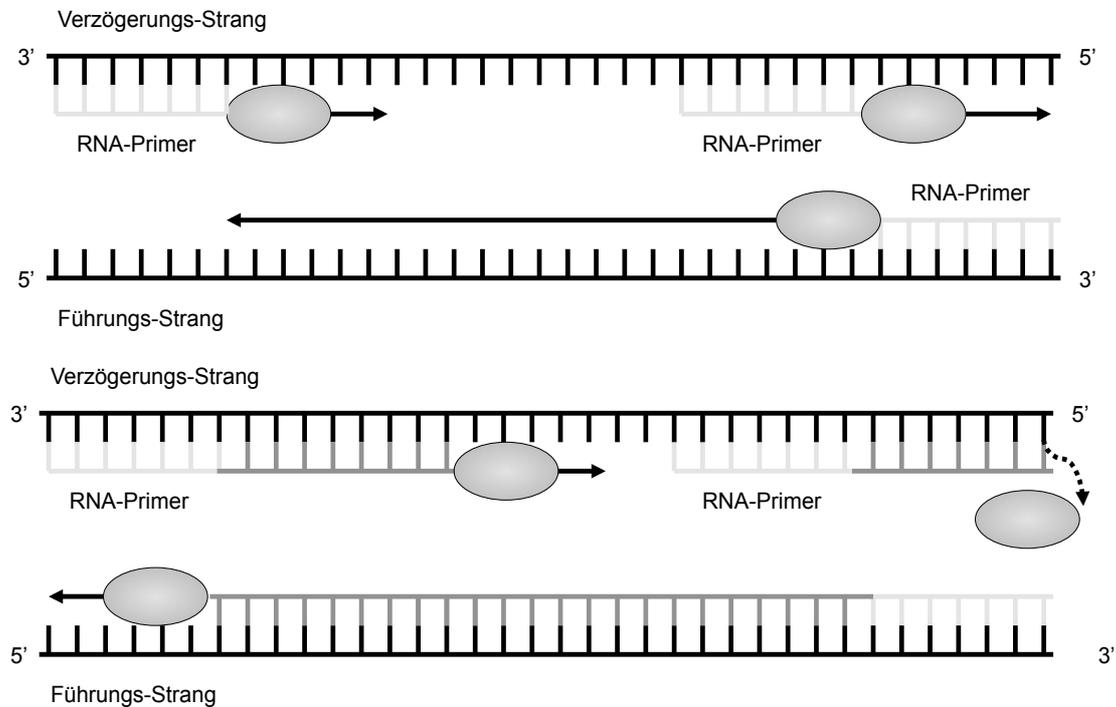
Die Telomerase ist ein Enzym, welches essentiell für die Chromosomenintegrität proliferierender Zellen und in vielen Tumoren aktiv ist.<sup>50,79</sup> Einzelheiten zur Funktion dieses Enzym sind in dem Kapitel 1.4 Telomerase aufgeführt. Auch in NBen konnte vielfach eine erhöhte Telomeraseaktivität (TA) nachgewiesen werden<sup>44</sup>, wobei eine hohe TA in einigen Studien mit einer ungünstigen Prognose assoziiert werden konnte<sup>44,72</sup>. Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine erhöhte TA einen stadienunabhängigen Risikofaktor darstellt, der mit einem ungünstigen Verlauf vergesellschaftet ist<sup>53,71</sup>. So wurden z.B. in Tumoren von 133 Patienten die TA bestimmt, und es zeigte sich ein 5-Jahres-Ereignisfreies Überleben von 86+/-4% bei TA negativen Tumoren gegenüber 25+/-8% bei TA positiven Tumoren ( $p < 0.0001$ ). Auch das 5-Jahres-Gesamtüberleben war bei den TA negativen Tumoren besser als bei den TA positiven NBen: 93+/-3% und 34+/-9% ( $p < 0,0001$ )<sup>71</sup>.

Somit stellt die TA einen unabhängigen Risikofaktor beim NB dar, der, vergleichbar mit der MYCN-Amplifikation oder der 1p-Deletion, eine Aussage über den Krankheitsverlauf erlaubt. Ganz besonders interessant ist diese Eigenschaft auch hinsichtlich eines potentiellen Behandlungsansatzes, so könnte eine Hemmung der TA eventuell den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen.

### **1.2 DNA-Replikation und das End-Replikations-Problem**

Die Replikation beginnt an vielen verschiedenen Orten der DNA-Doppelhelix gleichzeitig. Diese Startorte werden Origins genannt. Hier setzen bestimmte Proteinkomplexe an, die zunächst die DNA-Doppelstränge entwinden und die beiden Einzelstränge voneinander trennen. Die Entwindungsstelle wird als Replikationsgabel bezeichnet.

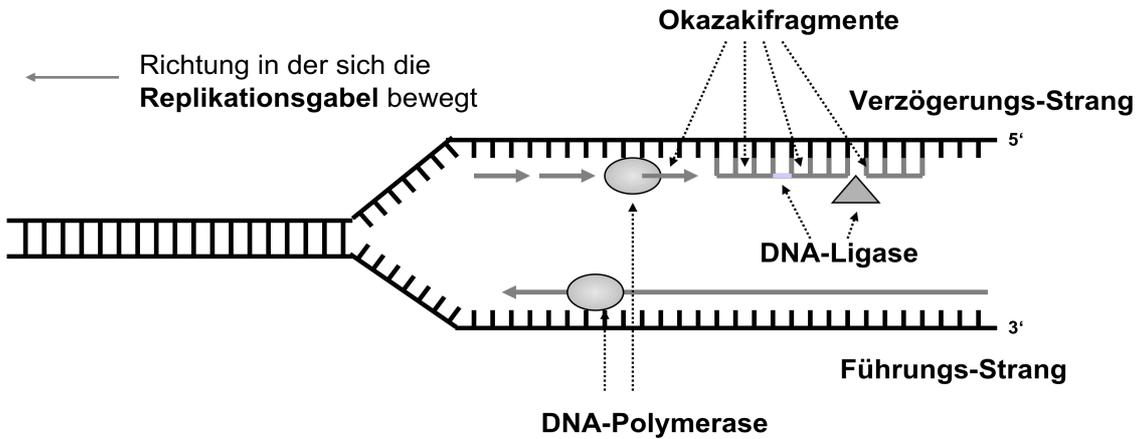
Abb. 12: Replikation



Die eigentliche DNA-Replikation startet mit der Synthese eines RNA-Primers, da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, sich an das freie 3'-Ende des Einzelstranges anzuheften. Des Weiteren wird zwischen Führungsstrang und Verzögerungsstrang unterschieden, da die DNA-Polymerase nur an das freie 3'-Ende in 5'→3'-Richtung die Basen anknüpfen kann. Als Führungsstrang wird nun der Strang bezeichnet, an dem in einem Stück in Laufrichtung der DNA-Polymerase der neue DNA-Strang synthetisiert werden kann. Der Verzögerungsstrang wird diskontinuierlich kopiert, indem sich an der wandernden Replikationsgabel immer wieder neue RNA-Primer anheften, so dass die DNA-Polymerase „rückwärts“ (in 5'→3'-Richtung) bis zum vorherigen RNA-Primer den komplementären Strang synthetisieren kann.

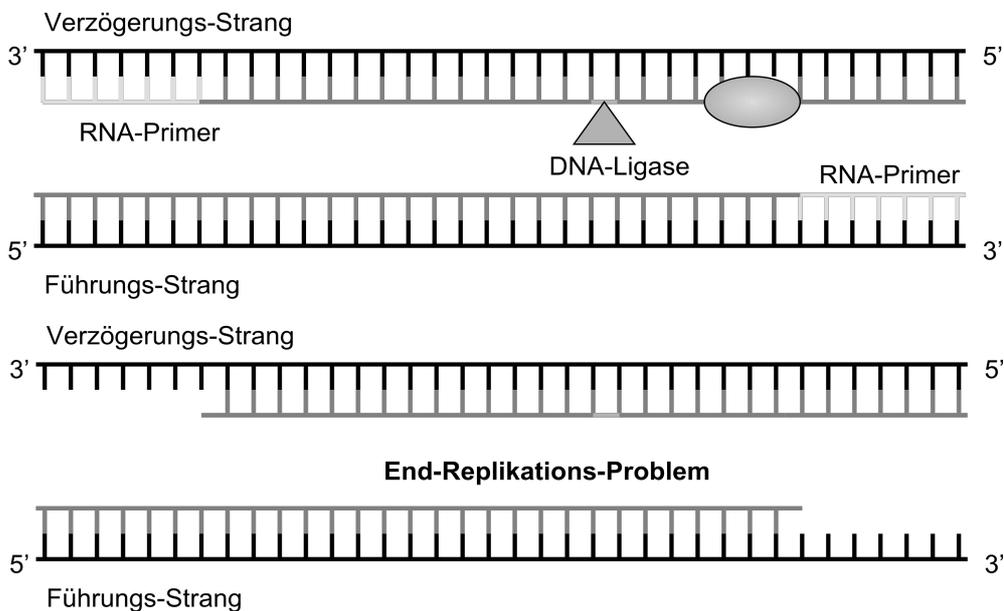
Diese Replikationsstücke werden als Okazaki-Fragmente bezeichnet. Im nächsten Schritt werden die RNA-Primer der Okazaki-Fragmente entfernt, die Lücken mit Hilfe der DNA-Polymerase aufgefüllt und mittels einer DNA-Ligase zu einem kontinuierlichen Strang verknüpft (siehe Abb. 12 und 13).

Abb. 13: Replikationsgabel und Okazakifragmente



Das End-Replikationsproblem liegt nun darin begründet, dass die 3'-Enden der DNA-Stränge nicht vollständig repliziert werden können. Hier ist zum Start der Replikation der RNA-Primer notwendig, der aber unmittelbar nach der Synthese entfernt wird und eine Lücke hinterlässt, da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, diese Lücke aufzufüllen. Somit gehen bei jeder Zellteilung Basen an den Chromosomenden verloren (siehe Abb. 12 und 14).

Abb. 14: Das „End-Replikations-Problem“



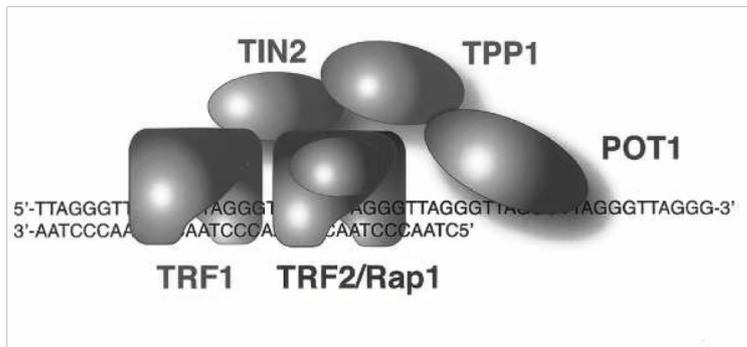
### **1.3 Telomere**

Telomere sind spezielle DNA/Protein-Komplexe, die als schützende Kappen an den Chromosomenenden fungieren und so Chromosome z.B. vor End-zu-End-Fusionen bewahren und Chromosomenenden von Doppelstrangbrüchen unterscheiden<sup>11,28</sup>. Somit verhindern Telomere auch die Entstehung von dizentrischen Chromosomen, „non-homologous end joining“ (das ist eine Bestimmte Art von Doppelstrangbruchreparatur) und die Zerstörung durch endogene Exonukleasen<sup>11,28</sup>.

Die telomerische DNA besteht aus aufeinanderfolgenden Wiederholungen von nicht kodierenden, guaninreichen Sequenzen<sup>66</sup>. In Wirbeltieren, Pflanzen, einigen Schimmelpilzen sowie einigen Protozoen handelt es sich dabei um exakte Wiederholungen einer speziellen Sequenz (beim Menschen TTAGGG<sup>64</sup>), während in Hefen sowie in einigen Protozoen dagegen unregelmäßige Wiederholungen vorherrschen (z.B. in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*)<sup>25</sup>.

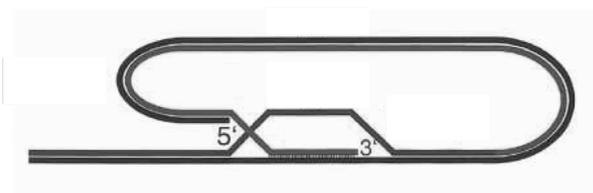
Eine weitere Besonderheit von telomerischer DNA in Eukaryonten ist, dass das absolute Ende der telomerischen DNA typischerweise einen einzelsträngigen G-reichen 3'-Überhang bildet, der eine Länge von 100-200 Basen aufweist<sup>41,62,97</sup>. Dieser 3'-Überhang ist mit verschiedenen Proteinen assoziiert. So ist die Telomer-DNA in Säugetieren insbesondere an die „telomeric-repeat-binding-factors“ TRF1 und TRF2 gebunden<sup>9,13,22</sup>. Insgesamt scheinen beim Menschen sechs Proteine bei der Regulation der Telomerlängen zusammen zu wirken: TRF1, TRF2, Pot1, TIN2, Rap1 und TPP1. Dieser Proteinkomplex wird als „Shelterin“ bezeichnet (vgl. auch Abb.: 15)<sup>28</sup>. Shelterin ist involviert in die Ausbildung der terminalen Struktur am Chromosomende, in die Bildung von sogenannten T-Loops und in die Kontrolle der Synthese telomerischer DNA durch das Enzym Telomerase<sup>28</sup>. Dabei haben die unterschiedlichen Bausteine des Shelterins verschiedene Aufgaben.

Abb. 15: Der telomerassoziierte Proteinkomplex Shelterin<sup>28</sup>



TRF2 spielt eine Schlüsselrolle beim Schutz der Telomersequenzen. Ein Verlust der TRF2-Funktion hat beispielsweise End-zu-End Fusionen von Chromosomen<sup>48,91</sup> zur Folge. Ferner führt die Expression von dominant-negativem TRF2 zu einem Wachstumsstopp und Seneszenz<sup>91</sup>. Überdies haben elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt, dass humanes TRF2 an TTAGGG DNA-Sequenzen mit einem G-Reichen 3'-Überhang in-vitro die Ausbildung von sogenannte T-Loops ermöglicht<sup>36</sup>. Außerdem wurde festgestellt, dass die Größe dieser T-Loops mit der Länge der Telomeren korreliert<sup>36</sup>. Weitere Versuche legten nahe, dass die T-Loops durch Einbinden des einzelsträngigen 3'-Überhangs in den Doppelsträngigen Bereich der Telomere entstehen (vgl. auch Abb.: 16), dabei wird vermutet, dass TRF2 diesen Vorgang unterstützt<sup>36</sup>.

Abb. 16: T-Loop<sup>28</sup>



TRF1 ist ein Protein, welches an doppelsträngiger telomerischer DNA bindet<sup>22,36</sup>. Es scheint eine Rolle bei der Kontrolle der Telomerlängen zu spielen, so führte eine Überexpression des Proteins in Tumorzellen zur Telomerenverkürzung und die Expression einer dominant negativen Form zur Telomerverlängerung<sup>90</sup>.

TIN2 bindet TPP1/Pot1 an TRF1 und TRF2 und verbindet auch TRF1 mit TRF2

(vgl. Abb.: 15)<sup>28,57,99</sup>. TIN2 fungiert dabei als Mediator von TRF1 und unterstützt dessen Auswirkung auf die Länge der Telomeren<sup>51</sup>.

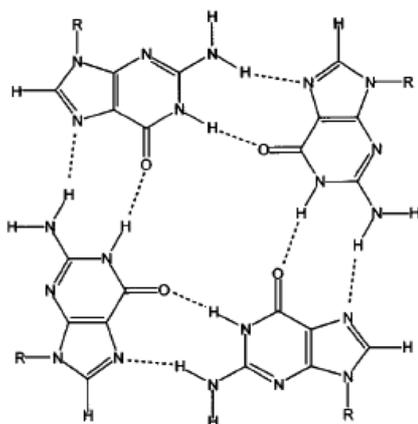
Rap1 wiederum interagiert mit TRF2<sup>56</sup> und das Ausschalten führte zu einer Verlängerung der Telomeren<sup>67</sup>.

Auch Pot1 (**p**rotection **o**f **t**elomeres) ist relevant für die Regulation der Telomerlängen<sup>5</sup>. Pot1 bindet an das G-reiche einzelsträngige 3'Ende des Telomers<sup>4</sup> (vgl. Abb.: 15) und scheint ein telomeraseabhängiger Regulator der Telomerlänge zu sein<sup>26,55</sup>. So trat in vitro nur dann eine Verlängerung der Telomeren in Zelllinien ein, wenn diese Telomeraseaktivität aufwiesen<sup>26</sup>. Weitere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass Pot1 sogar die Aktivität der Telomerase reguliert<sup>55</sup>, so schien das Protein ein Inhibitor der Telomerase zu sein, wenn es an die 3' endständige Sequenz gebunden war und 6 oder weniger Basen am Ende frei lies<sup>55</sup>. Wenn am 3'Ende 8 Basen oder mehr frei blieben wurden die Telomeren, wie üblich, von der Telomerase verlängert<sup>55</sup>.

TPP1 (früher auch PTOP, PIP1 oder TINT1 genannt) interagiert mit TIN2 und POT1<sup>100</sup> und reguliert die Lokalisation von POT1 am Telomer<sup>58</sup>. Dadurch reguliert auch TPP1 indirekt die Telomerlänge<sup>58,100</sup>. Dabei ist die Funktion von POT1 nur gewährleistet, wenn es an TPP1 gebunden ist<sup>45</sup>.

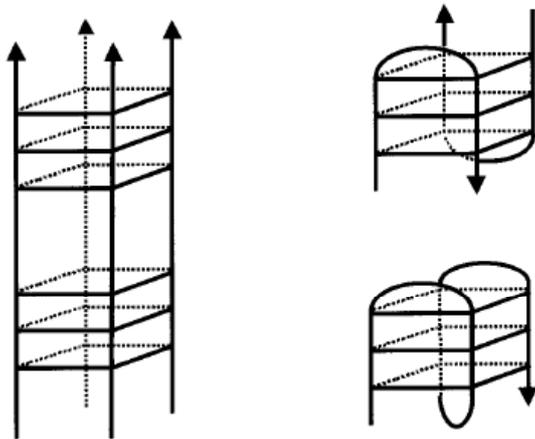
TIN2 verbindet TRF1 mit TRF2<sup>99</sup> und TPP1<sup>47</sup> und moduliert somit ebenfalls die Telomerlänge über Telomerase<sup>98</sup>.

Abb. 17: Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen guaninreicher DNA<sup>6</sup>



Eine weitere Besonderheit der Telomeren besteht im Reichtum an Guanin. Die DNA ordnet sich dann durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in Form sogenannter G-Quadruplexstrukturen an (siehe Abb. 17). Werden diese G-Quadruplexe, die sich im Übrigen auch innerhalb des Genoms finden, stabilisiert, hat die Telomerase (s.u.) keine Möglichkeit mehr, sich an die Telomerenden zu binden, um sie zu verlängern<sup>102</sup>. Dies ist auch der Ansatz, den viele Telomeraseinhibitoren sich zu Nutze machen. Insbesondere Acridinderivate wirken durch eine Stabilisierung der G-Quadruplexstrukturen (vgl. auch 1.6 „Die Testsubstanz BRACO 20“<sup>66</sup>).

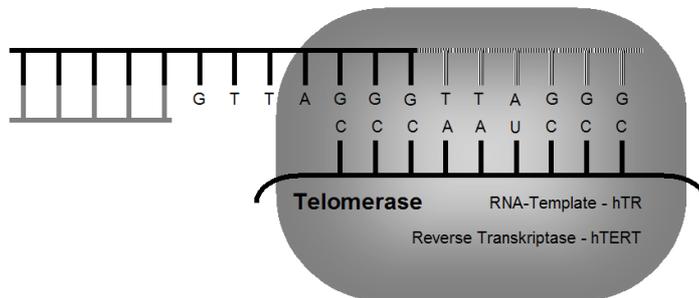
Abb. 18: Schematische Darstellung unterschiedlicher Faltungen der G-Quadruplexstrukturen<sup>6</sup>



## **1.4 Telomerase**

Die Telomerase bildet einen Ribonukleinkomplex<sup>39</sup>, welcher sich aus zwei essenziellen Komponenten zusammensetzt<sup>94</sup>: Zum einen der human katalytischen Untereinheit hTERT (*humane telomerase reverse transcriptase*)<sup>49,65</sup> und zum anderen einem internen RNA Strang (*human telomerase RNA = hTR*)<sup>12,32,101</sup> (vgl. Abb.: 19).

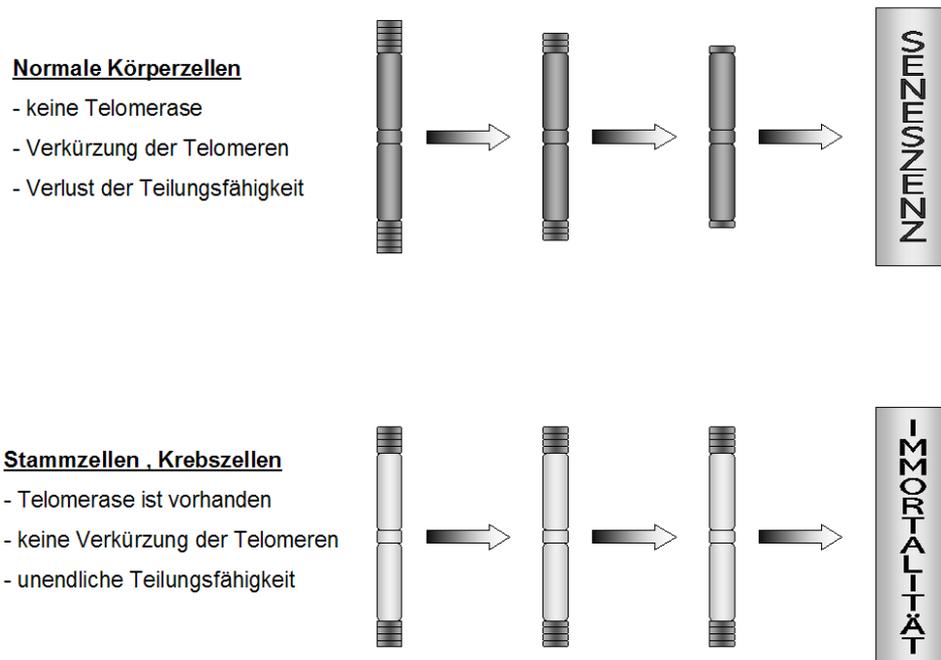
Abb. 19: Schematische Darstellung der Telomerase



Dieser Ribonukleinsäurekomplex stabilisiert die Länge der Telomeren in menschlichen Stammzellen, reproduktiven Zellen<sup>96</sup> und in den meisten Tumoren<sup>50,63</sup>, indem es Wiederholungen der Sequenz TTAGGG an die Telomeren anknüpft. Dafür dient die interne RNA-Komponente hTR als Vorlage für die reverse Transkription<sup>32</sup>. Diese „Schablonen“-Region von hTR umfasst 11 Nukleotide (5'-CUAACCCUAAC) komplementär zu der menschlichen Telomersequenz (TTAGGG)<sub>n</sub><sup>32</sup>.

Expirmieren Zellen Telomerase, so sind sie in der Lage, den bei jeder Zellteilung unweigerlich stattfindenden Telomerenverlust auszugleichen und haben damit unendliches Replikationspotential. Während der Differenzierung verlieren die Zellen jedoch ihre Telomerase-Aktivität und mit jeder Zellteilung kommt es zu einer Verkürzung der Telomeren. Erreichen die Telomeren eine kritische Länge tritt die Zelle in ein Stadium der Seneszenz ein und die Zelle verliert ihre Fähigkeit zur Teilung (vgl. Abb.: 20).

Abb. 20: Auswirkungen der Telomerase auf die Telomerlänge



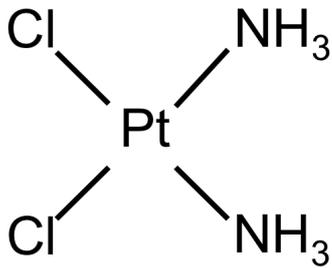
Während der malignen Transformation reaktivieren die meisten Tumorzellen die Telomerase und erhalten damit wieder die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation.

Die Expression von hTR und hTERT ist in fast allen menschlichen malignen Tumoren hochreguliert, nicht jedoch in benignen Tumoren und Normalgeweben mit Ausnahme von Keimzellen, proliferierenden Stammzellen, aktivierten Lymphozyten und einigen bestimmten benignen Tumoren<sup>50,63,96</sup>. Bei manchen Tumorarten, wie beispielsweise auch dem NB ist eine erhöhte Telomeraseaktivität mit einer schlechten Prognose assoziiert<sup>72</sup> (vgl. auch Kapitel 1.1.7 „Prognose“).

### **1.5 Cisplatin**

Cisplatin ist eines der gebräuchlichsten Zytostatika überhaupt. Es handelt sich um ein planares Molekül, welches zweiwertiges Platin und zwei cis-ständige Chlorid- und cis-ständige Ammonium-Liganden enthält (vgl. Abb.: 21).

Abb. 21: Chemische Formel von Cisplatin (eigene Abbildung)

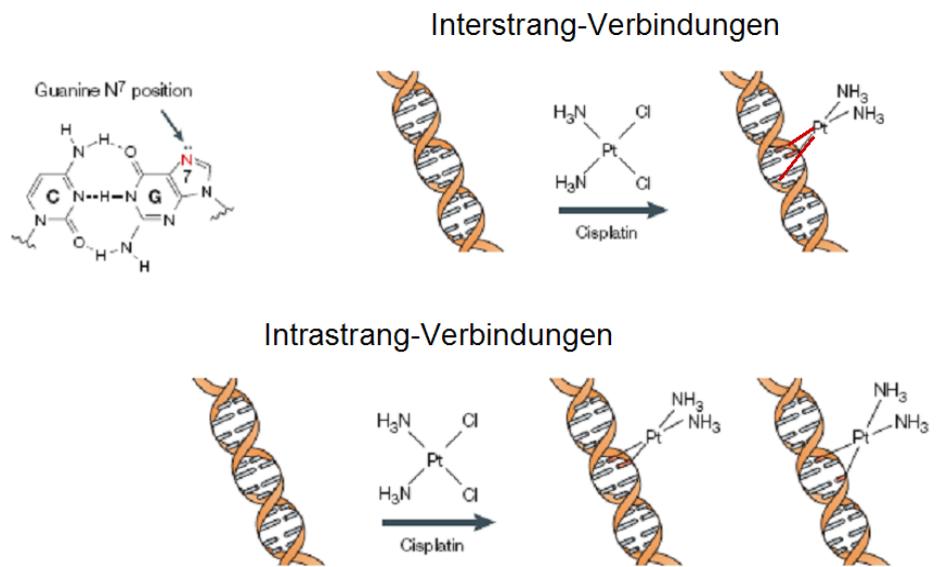


Es gilt als eines der wichtigsten und wirksamsten Medikamente bei der Behandlung des Neuroblastoms und wird bei der Behandlung von Standardrisiko und Hochrisikopatienten im Therapieblock N5 eingesetzt (vgl. „1.1.4 Therapie“ und „1.1.5 Therapieplanung“). Dabei wird Cisplatin

intravenös als Dauerinfusion über 96h verabreicht. Als häufige Nebenwirkung kommt es zu zentral ausgelöster Übelkeit, die heute dank moderner Antiemetika wie z.B. Ondansetron gut beherrschbar ist. Ansonsten ist die Nephrotoxizität zu beachten, die durch ausreichende Hydrierung weitestgehend reduziert werden kann. Insbesondere aber bei Kindern kann es durch Cisplatin zu einer Innenohrschädigung kommen, die sich als Hochtonschwerhörigkeit manifestiert und bis zur Taubheit führen kann, weshalb vor der Therapie eine Bestimmung von Nierenfunktion und die Durchführung eines Audiogramms unerlässlich sind.

Die Wirkung des Cisplatins ist ähnlich wie die alkylierender Zytostatika. Cisplatin bindet dabei als nukleophiles Agens vor allem an das Stickstoffatom an Position 7 des Guaninmoleküls. Da pro Cisplatinmolekül zwei Chloratome substituierbar sind, können hieraus inter- und intrastrang-Verbindungen resultieren (siehe Abb.: 22). Für die im Folgenden dargelegten Untersuchungen ist dabei spannend, dass insbesondere im Bereich der Quadruplexstrukturen und der Telomeren am Chromosomenende guaninreiche Sequenzen enthalten sind. Gerade diese Eigenschaft machte die Substanz interessant, da genau dort auch die Telomerase angreift und so die Wirkung der Telomerase negativ beeinflusst werden kann. So ist auch bereits nachgewiesen, dass in einigen Tumoren die Telomeraseaktivität durch Cisplatin reduziert wurde<sup>19</sup>.

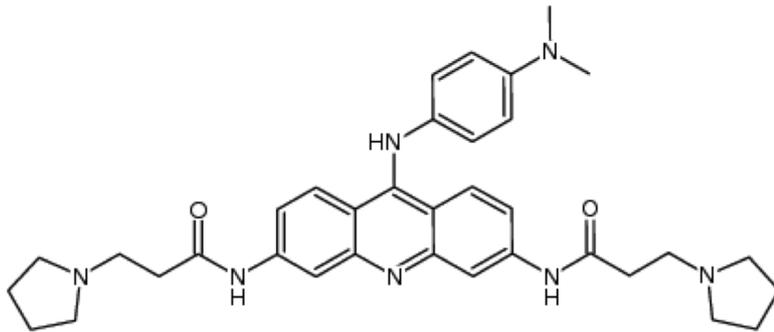
Abb. 22: Cisplatininduzierte DNA-Strang-Verbindungen<sup>93</sup>



### **1.6 Die Testsubstanz BRACO 20**

Der getestete Wirkstoff BRACO 20 wurde freundlicherweise von Prof. S. Neidle (The School of Pharmacy, London, UK) zur Verfügung gestellt. Prof. Neidle befasst sich u.a. mit der Entwicklung von Telomerase-Inhibitoren, und hat bereits bei der Synthese unterschiedlicher Wirkstoffe mitgewirkt, die in in-vitro-Versuchen eine Hemmung der Telomerase bewirkten<sup>35,73</sup>. Unser Interesse an BRACO 20 war insbesondere deshalb so groß, da der strukturähnliche Vorgänger BRACO 19 gute Ergebnisse in in-vitro- und in-vivo-Versuchen erbracht hat<sup>35</sup>.

Abb. 23: Strukturformel von BRACO 19<sup>35</sup>

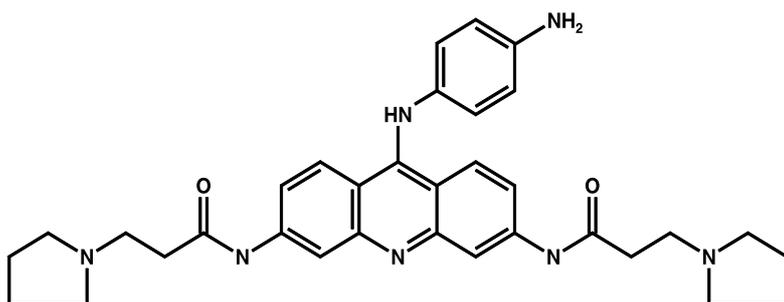


Sowohl bei BRACO 19 als auch bei BRACO 20 handelt es sich um computer-designte Acridinderivate, welche mit G-Quadruplex-Strukturen, wie sie u.a. von telomerischer DNA gebildet werden, interagieren und sie stabilisieren<sup>35</sup>. Hierdurch wird die Anlagerung der Telomerase an die Telomeren unterbunden und so die Verlängerung der Telomeren durch die Telomerase verhindert.

Im zellfreien Versuch zeigte BRACO 19 eine Hemmung der Telomerase um 50% bei Konzentrationen von  $115 \pm 18$  nM. Die nur virtuell ermittelbare Konzentration für eine 100%ige Hemmung betrug 500nM. In der Zellkultur lag die  $LC_{50}$  für unterschiedliche Zelllinien zwischen 10 und 13  $\mu$ M (im Mittel  $10,6 \pm 0,7$   $\mu$ M)<sup>35</sup>. Somit lagen die Konzentrationen zur Telomerasehemmung weit unterhalb der Konzentrationen, die eine akute toxische Wirkung hervorriefen. Dies stellte eine Besonderheit von BRACO 19 dar. Alle anderen bis dato getesteten Agenzien, die mit Quadruplex-Strukturen interagierten, hemmten die Telomerase erst in äußerst hohen Konzentrationen. Dosierungen in diesen Bereichen hatten dann meistens auch unspezifische toxische Wirkungen auf die Zellen. In den Zellversuchen, die von Gowan et al. zur Testung von BRACO 19 durchgeführt wurden, konnte bei einigen Zelllinien eine deutliche Wachstumsreduktion bei gleichzeitigem Rückgang der Telomeraseaktivität festgestellt werden. Darüber hinaus wurden auch Versuche an Mäusen durchgeführt, die den Vulvatumor A431 ausbildeten. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine alleinige peritoneale Verabreichung von BRACO 19 kein verändertes Wachstumsverhalten des Tumors zur Folge hatte. Wurden die Mäuse jedoch zuvor mit Paclitaxel behandelt, so verringerte sich das

Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit Paclitaxel behandelt wurde<sup>35</sup>. Spätere Versuche mit Uteruskarzinomzelllinien zeigten sogar durch die alleinige Behandlung mit BRACO 19 sowohl in vitro als auch in vivo eine Verminderung der Telomeraseaktivität und ein vermindertes Tumorwachstum<sup>18</sup>.

Abb. 24: Strukturformel von BRACO 20 (Abbildung bereitgestellt von Prof. Neidle)



Am isolierten Enzym hatte BRACO 20 eine noch bessere hemmende Wirkung als BRACO 19. So hemmte es im zellfreien Versuch die Telomerase bereits bei einer Konzentration von 74 nM. Darüber hinaus zeigte sich eine akute Toxizität auf Tumorzellen adulter Tumoren erst in sehr hohen Konzentrationen. (Angaben von Prof. Neidle : IC<sub>50</sub> 25µM). BRACO 20 erschien damit ein vielversprechender Versuchswirkstoff für eine Hemmung der Telomerase im Zellversuch zu sein.

### **1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Doktorarbeit**

Die Telomerase als Target für eine Antitumorthherapie ist aus unterschiedlichen Gründen interessant; so wirkt sich eine Hemmung der Telomerase vor allem auf Tumorzellen aus, da differenzierte Körperzellen keine aktivierte Telomerase enthalten<sup>50</sup>. Somit können therapiespezifische Nebenwirkungen theoretisch sehr gering gehalten werden. Im Vergleich dazu wirken sich die gängigen Zytostatika allgemein auf schnell teilende Zellen aus. Deshalb sind bei vielen dieser Medikamente auch Nebenwirkungen wie Haarausfall oder Blutbildungsstörungen nicht vermeidbar. Auch Stammzellen enthalten zwar Telomerase, jedoch sind die Telomeren in diesen wesentlich länger als die in

Tumorzellen, so dass sich eine Telomerasehemmung zuerst auf die malignen Zellen auswirken würde<sup>40,66,68</sup>.

Für die Behandlung des Neuroblastoms wäre eine Hemmung der Telomerase insbesondere deshalb ein wichtiger Ansatz, da vor allem die NBe bei Patienten mit einer schlechten Prognose in den meisten Fällen telomerasepositiv sind. Gerade diese Patienten würden von einem neuen Therapieansatz profitieren, da die bislang verfügbaren Therapieoptionen häufig leider nicht ausreichend wirksam sind.

Eine Hemmung der Telomerase wird erst nach einer Latenzzeit von mehreren Wochen zu einem eingeschränkten Tumorwachstum bzw. Tumorgrößenreduktion führen, da eine erhebliche Anzahl an Zellzyklen durchlaufen werden muss, bis eine kritische Telomerlänge erreicht ist und damit die Seneszenz einleitet. Aus diesem Grund ist auch eine Monotherapie mit einem Hemmstoff des Enzyms nicht denkbar, da es der Zwischenzeit zu einer fatalen Zunahme der Tumormasse kommen könnte. Realistisch wäre die Kombination mit Behandlungsregimen, die bisher auch zum Einsatz kommen.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Telomeraseinhibitors BRACO 20 auf Neuroblastomzelllinien in Kombination mit Cisplatin untersucht. Die Wahl des Chemotherapeutikums fiel auf Cisplatin, da dies ein Zytostatikum ist, welches heute standardmäßig bei der Behandlung des NBs zum Einsatz kommt. Es wird hierbei bei der Therapie von Standardrisiko- und Hochrisikopatienten verwendet, also bei den Patienten, bei denen der Tumor in den meisten Fällen eine hohe TA aufweist. Darüber hinaus bindet Cisplatin bevorzugt an guaninreiche DNA und somit auch im Bereich von G-Quadruplexstrukturen und Telomeren.

Folgende Fragen sollten mit Hilfe dieser Arbeit beantwortet werden:

- Ruft eine adjuvante Behandlung von Neuroblastomzellen mit BRACO 20 in der Zellkultur eine Änderung der Toxizität von Cisplatin hervor?
- Welche Auswirkungen hat BRACO 20 auf die Telomeraseaktivität in der Zellkultur von Neuroblastomen?
- Ergibt sich durch die Behandlung von NB-Zelllinien mit BRACO 20 eine Änderung der Telomerlängen?

## 2 Material

### 2.1 Die Zelllinien

#### 2.1.1 SHEP-SF

Hierbei handelt es sich um einen Subklon der Zelllinie SK-N-SH. Die Zellen weisen eine 1p-Deletion, aber keine MYCN-Amplifikation auf. Die Telomeraseaktivität ist hoch.

#### 2.1.2 KCN

Die Zellen wurden aus dem Tumor eines männlichen Patienten gewonnen. Es liegt eine 1p-Deletion und eine 100fache MYCN-Amplifikation vor. Auch diese Zelllinie weist eine hohe Telomeraseaktivität auf.

### 2.2 Weiteres Verbrauchsmaterial und Geräte

Material	Firma	Produktname	Cat. No./ Order No.
50 x dNTP's	Chemicon	TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	S7700
1000 Rox	GeneScan/ appliedbiosystems	GeneScan 1000 ROX size standarde	401098
10 x TRAP Reaction Buffer	Chemicon	TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	S7700
Agarose	Invitrogen	Agarose	15510-127
Blocking Reagent	Roche	Blocking Reagent	1096176
Cell Lysis Solution	Qiagen	Genra Puregene Cell Kit	158722

Tab. 3: Reagenzien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>	<b>Produktname</b>	<b>Cat. No./ Order No.</b>
Chaps Lysis-Buffer	Chemicon	TRAPeze® telomerase detection kit	S7700
Collagen	Sigma	Collagen from rat tail	27666
DC Reagenz B	Bio-Rad	RC DC Protein Assay	500-0120
DIG-markierter Standard	Roche	DNA Molecular weight marker III Dig-labeled 0.12 – 21.2 kb	1218603
DMSO	Sigma	Cell Freezing Medium-DMSO 1×	C6164
DNA Hydration Solution	Qiagen	Gentra Puregene Cell Kit	158722
EDTA-Lösung			
Eisessig	Sigma	Glacial acetic acid	A9967
Ethanol	Sigma	Ethanol absolute	24102
Ethidiumbromid	Sigma / BioChemika	Ethidium bromide	46065
FAM-Primer Mix (15 µM)	Chemicon	TRAPeze® telomerase detection kit	S7700
FCS	Sigma	Bovine Calf Serum	12133C

Fortsetzung Tab. 3: Reagenzien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>	<b>Produktname</b>	<b>Cat. No./ Order No.</b>
Gentra Puregene Cell Kit	Qiagen	Gentra Puregene Cell Kit	158722
Hinf I Restriktions-Enzym	Promega	Hinf I (10 U/μl)	R6201
Isopropanol	Hausapotheke		
Maleinsäure	Sigma	Maleinsäure	M-0375
MTT	Sigma		M2128
PBS-Puffer	PH 7 steril Apotheke		
Protein Precipitation Solution	Qiagen	Gentra Puregene Cell Kit	158722
Primer Mix	Chemicon	TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	S7700
RC DC Protein Assay	Bio-Rad	RC DC Protein Assay	500-0120
RPMI-Medium	Qiagen	Gentra Puregene Cell Kit	158722
Rsa I Restriktions-Enzym	Promega	Rsa I (10 U/μl)	R6371
Sonde 79/96 10 pmol/ml	Qiagen	Telo	Für uns hergestellt
SYBR <sup>®</sup> green	Invitrogen		
Taq	Chemicon	TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	S7700

Fortsetzung Tab. 3: Reagenzien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>	<b>Produktname</b>	<b>Cat. No./ Order No.</b>
TE-Puffer			
TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	Chemicon	TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	S7700
TRAP-Primer Mix	Chemicon	TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	S7700
TS Primer	Chemicon	TRAPeze <sup>®</sup> telomerase detection kit	S7700

**Fortsetzung Tab. 3: Reagenzien**

<b>Material</b>	<b>Firma</b>	<b>Produktname</b>	<b>Cat. No./ Order No.</b>
Combitips	Eppendorf	Combitips 2,5 ml	0030 069.447
Eppendorf-Gefäß (1,5 ml)		Reaktionsgefäß 3810	0030 102.002
Handschuhe	MaiMed medical	Latex	74425
Kulturplatten 96- Loch	Falcon, BD Biosciences	96-well Microplate	353072
Nylon Membran	Fluka	Blotting-Nylon membranes	15356
Pipettenspitzen 10µl	Eppendorf	Ep T.I.P.S. Reloads 0,5- 20µl L	0030 073.401
Pipettenspitzen 100µl	Eppendorf	Ep T.I.P.S. Reloads 2- 200µl	0030 073.428
Pipettenspitzen 500µl	Eppendorf	Ep T.I.P.S Reloads 50- 1000µl	0030 073.460
Pipettenspitzen steril 10ml	Falcon	Serological Pipets, 10ml	356551
Pipettenspitzen steril 2ml	Falcon	Serological Pipets, 2ml	357507
Pipettenspitzen steril 25 ml	Falcon	Serological Pipets, 25ml	356525
Pipettenspitzen steril 5 ml	Falcon	Serological Pipets, 5ml	356543
Taqman PCR Platte	Applied Biosystems	MicroAmp Optical 96- well Reaction plate	403012

Tab. 4: Einmal-Laborbedarf

<b>Material</b>	<b>Firma</b>	<b>Produktname</b>	<b>Cat. No./ Order No.</b>
Taqman PCR Strips	Appliedbiosystems	MircoAmp Optical 8-Cap Strip	N8016535
Tubes 15 ml steril	Falcon Necton dickinson	Blue Max Jr. 15ml Propypropylene	352096
Tubes 50 ml	falcon	Polypropylene Conical Centrifuge Tubes, 50 ml	352070
Zellkulturflaschen 50 ml	Greiner Bio-one	Cell star	690160

**Fortsetzung Tab. 4: Einmal-Laborbedarf**

<b>Material</b>	<b>Firma</b>	<b>Produktname</b>	<b>Cat. No./ Order No.</b>
ABI 3700	Applied Biosystems	ABI PRISM® 3700	Aktuell nicht mehr im Programm
Blot-Kammer			
Brutschrank	Heraeus	Function Line Typ : BB16CU	51008333
Eismaschine		Eismaschine ZBE 70-100 Ziegra	
Elektrophorese-Kammer	PEQLAB Biotechnologie	Model 40-6(0)911	
Heizblock	Eppendorf	Thermomixer 5436	
Mikroskop	Leitz	Labovert Ser. No: 072196	Ident: 112222
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik	Nerubauer improved bright line	
Photometer	Eppendorf	BioPhotometer	6131 000.012
Pipettierhilfe	Hirschmann	Pipetus-akku Pipetus-classic	
PH-Meter	Knick	PH Meter 766 Callimatic	
Rüttler			
Rühr-Heizblock	Ikamag Ret	Typ RET	Nr. 212620
TaqMan®	Cobas/Roche	COBAS® TaqMan®	

Tab. 5: Geräte

<b>Material</b>	<b>Firma</b>	<b>Produktname</b>	<b>Cat. No./ Order No.</b>
Transformator	Renner GmbH Dannstadt		
Vortexer	Scientific Industries	Vortex Genie 2 Model G-560E	64648
Werkbank	Heraeus	Hera safe Type HS 12	51012283 ser no 97110798
Zentrifuge groß	Heraeus (z.B.bei labmarket.com)	Megafuge 1. OR	75003060
Pipetten 0,5-10 µl	Eppendorf	Reference, variabel	4910 000.018
Pipetten 100- 1.000 µl	Eppendorf	Reference, variabel	4910 000.069
Pipetten 10-100 µ	Eppendorf	Reference, variabel	4910 000.042
Zentrifuge klein	Heraeus (z.B. bei labmarket .com)	Biofuge pico	75003235

**Fortsetzung Tab. 5: Geräte**

Reagenz	Zubereitung
20 x SSC	175,32 g NaCl und 88,23 g Tri-Natriumcitrat auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen. Im Anschluss mit 1N HCl -denden pH-Wert auf 7,0 einstellen. Diese Lösung enthält 3M NaCl und 30 mM Tri-Natriumcitrat. Aufbewahrung bei RT.
0,1 x SSC/SDS Lösung	1,5 ml 20x SSC und 3 ml 10% SDS auf 300ml mit Aqua bidest. auffüllen (WICHTIG: erst Aqua dest. vorlegen, dann SSC und dann SDS dazu, zum Schluss auf 300 ml auffüllen, weil die Lösung sonst ausfällt). Keine Lagerung, jedes Mal frisch herstellen.
10% SDS	5g SDS in 45ml Aqua dest. lösen. Löst sich nur schwer, also Geduld. Aufbewahrung bei RT.
10 x Detektionspuffer	60,57 g Tris + 29,22 g NaCl auf 500ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 9,5 mit HCl einstellen. Die Lösung enthält 1M NaCl und 1M Tris. Aufbewahrung bei RT.
10 x Puffer für Restriktionsverdau	100µl Tris HCl pH 7,9 (1M) und 100µl MgCl <sub>2</sub> (1M) und 500 µl NaCl (1M) auf 1000µl mit Aqua dest. auffüllen und gut mischen. Aufbewahrung – 20°C.
1 x Mix für Restriktionsverdau	10µl 10x Puffer + 1,2µl Hinf I (10u/µl) + 1,2µl Rsa I (10u/µl) + 2µl DTT (50µM) + 75,6µl Aqua dest.. Dieser Mix ergibt genau 90µl. Das reicht um genau eine DNA Probe zu zerschneiden. Keine Lagerung! Immer frisch!

Tab. 6: Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel

<b>Reagenz</b>	<b>Zubereitung</b>
1M Tris pH 7,5	121,14 g Tris (entspricht 1 mol) auf ca.650ml mit Aqua dest. auffüllen. Mit leicht verdünnter rauchender HCl auf pH 7,5 titrieren. Dann mit Aqua dest. Auf fast 1000ml auffüllen und den pH dann nochmals nachkorrigieren. Aufbewahrung bei RT.
2 x SSC/SDS Lösung	20ml 20x SSC und 2ml 10% SDS auf 200ml mit Aqua bidest. auffüllen (WICHTIG: erst Aqua dest. vorlegen, dann SSC und dann SDS dazu, zum Schluss auf 200 ml auffüllen, weil die Lösung sonst ausfällt). Keine Lagerung, jedes Mal frisch herstellen.
5 M NaCl	14,61 g NaCl mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen. Aufbewahrung bei RT.
50 x TAE	121 g Tris-Base und 28,6 ml Eisessig und 50 ml EDTA ( 0,5 M pH 8) auf 500 ml mit Aqua dest auffüllen. Diese Lösung enthält 2 M Tris-Base, 1M Essigsäure und 0,1 M EDTA. Aufbewahrung bei RT
Anti-DIG-Lösung	Anti Digoxigenin AP Fab Fragment 5min bei 13.000 x g zentrifugieren, dann 4 µl mit 40 ml Puffer 2 mischen

Fortsetzung Tab. 6: Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel

Reagenz	Zubereitung
Agarosegel	<p>0,8 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer geben und in einer Mikrowelle mehrfach aufkochen. Zwischendurch kurz schwenken bis das Agarose-Pulver vollständig gelöst ist. Nun die Lösung mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und gut vermischen. Unter einem Abzug 20 µl Ethidiumbromid zugeben und durch Schwenken gut mischen. Sofort im Anschluss, immer noch unter dem Abzug, wird das Gel gegossen. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden.</p> <p>Als Form verwendet man die Elektrophoresekammer und setzt je nach Anzahl der aufzutrennenden Proben den passenden Kamm ein. Nach ca. 30 min ist das Gel erstarrt, und der Kamm kann vorsichtig entfernt werden.</p>
Beschichtung von 96-Loch-Platten	<p>Unter sterilen Bedingungen werden mittels einer Multipette 50 µl Collagen-Essigsäure pro Loch auf die Platten pipettiert. Die offenen Platten werden dann über Nacht unter laufender Werkbank getrocknet.</p>

Fortsetzung Tab. 6: Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel

Reagenz	Zubereitung
Beschichtung von Kulturflaschen mit Collagen	Unter einer Werkbank befüllt man zuerst die Flaschen mit 1,5 ml Collagen – Essigsäure und verschließt sie. Die Flaschen bleiben dann zwei Tage mit der zu beschichtenden Seite nach unten stehen. Dann kann die Collagen-Essigsäure abgesaugt werden. Die Flaschen werden dann über Nacht offen gelassen und unter der Werkbank getrocknet. Selbstverständlich müssen alle Arbeitsschritte unter der sterilen Werkbank erfolgen.
Blocking 10%	1,7 g Blocking Reagent in 17 ml Maleinsäurepuffer unter Erhitzen (100°C) lösen. Diese Lösung hat eine trübe gelbliche Farbe und muss immer frisch hergestellt werden.
Collagen-Essigsäure	Unter sterilen Bedingungen werden 45 ml 0,1 N Essigsäure und 2,2 ml Kollagen S Typ I (6 mg/ml) mischen. Keine Lagerung, jedes Mal frische Herstellung.
Denaturationslösung	10g NaOH Plätzchen und 43,8 g NaCl auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen oder 43,8 g NaCl mit 0,5 M NaOH auf 500 ml auffüllen. Diese Lösung enthält 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl. Aufbewahrung bei RT.

Fortsetzung Tab. 6: Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel

Reagenz	Zubereitung
GBX–Gel loading Buffer	Endkonz.: 30 % Glycerol in Wasser 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 10 ml Ansatz: 25 mg BPB 25 mg XC 3,5 ml Glycerol auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen.
Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb)	Granulat nach Anleitung in Aqua dest. bei 37°C auflösen. Die Lösung ist bei RT für 3 Monate haltbar.
Maleinsäurepuffer	23,2 g Maleinsäure und 17,6 g NaCl auf 2000ml mit Aqua dest. auffüllen. Im Anschluss den pH-Wert auf 7.5 mit NaOH Plätzchen (ca. 6g pro Liter) einstellen. Die Lösung enthält 0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl. Aufbewahrung bei RT. Ggf. vor Weiterverwendung kurz aufkochen und filtern.
MTT-Lösung	50 mg MTT in 10 ml PBS lösen und vortexen, dann steril filtrieren (Durchlässigkeit des Filters 0,2 µm). Lagerung bei 4°C im licht- und luftdurchlässigen Gefäßen.
Neutralisationslösung	60,57 g Tris und 43,8 g NaCl in ca. 400 ml H <sup>2</sup> O geben und auf pH 7,5 einstellen (mit recht gut konzentrierter HCl). Im Anschluss auf 500 ml mit H <sup>2</sup> O auffüllen. Diese Lösung enthält 1M Tris und 1,5 M NaCl. Aufbewahrung bei RT.

Fortsetzung Tab. 6: Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel

<b>Reagenz</b>	<b>Zubereitung</b>
Puffer 1	300 ml Maleinsäurepuffer + 3 ml Tween 20 immer so mischen, dass Tween 20 in der Mischung 1%ig ist. Herstellung immer frisch.
Puffer 2	90 VT Maleinsäure + 10 VT Blocking 10%. Herstellung immer frisch.
Puffer 3	10 x Detektionspuffer 1:10 verdünnen.
Depurinationslösung = 0,2N HCl – Lösung	14,6 ml 25% Salzsäure (HCl) auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen. bzw. 9,9 ml 37% Salzsäure (HCl) auf 500 ml mit Aqua dest auffüllen. oder 200 ml 1 M HCL auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.
Zellkulturmedium	RPMI 1640 wird zu 10% FCS versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

**Fortsetzung Tab. 6: Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel**

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultivierung

Vorweg sollte kurz erwähnt werden, dass das Arbeiten mit lebendigem Zellmaterial unter sterilen Bedingungen erfolgen muss. So ist es notwendig, dass alle Schritte, bei denen Zellen unmittelbar umgebender Luft ausgesetzt sind, unter einer sterilen Werkbank durchgeführt werden. Selbstverständlich dürfen die Zellen nur mit sterilen Materialien und Medien in Kontakt kommen, um jegliche Kontamination, z. B. durch Bakterien oder Hefen, zu vermeiden.

Alle verwendeten Zelllinien wurden in 50 ml-Zellkulturflaschen gezüchtet. Da es sich allesamt um adhärend wachsende Zellen handelte, mussten die Flaschen vorher mit Collagen beschichtet werden (siehe „Tab.: 6 *Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel*“). Zur Kultivierung wurden die Flaschen bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank verwahrt. Der im Medium enthaltene Indikator Phenolrot zeigte durch einen Farbumschlag von rot nach gelb bei pH < 6.4 einen Verbrauch der Nährstoffe an. War dies der Fall, ohne dass der Flaschenboden lückenlos mit Zellen bewachsen war, wurde das alte Medium durch etwa 6ml frisches Medium ersetzt. War die Flasche dagegen voll bewachsen, mussten die Zellen geteilt werden. Hierzu wurde zuerst das Medium komplett abgesaugt und verworfen. Um im nächsten Schritt die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurde ca. 1 ml Trypsin in die Flasche gegeben und die Flasche so geschwenkt, dass der gesamte Boden benetzt wurde. Sofort im Anschluss wurde das Trypsin wieder abgesaugt und die Flasche einige Minuten in den Brutschrank gestellt. Durch kräftiges Klopfen wurde geprüft, ob sich die Zellen lösten. Nun wurden die Zellen je nach Bedarf in 3 bis 7 ml neuem Medium resuspendiert. In wie vielen Millilitern Medium resuspendiert wurde, richtete sich zum einen nach der Proliferationsrate der Zelllinie und zum anderen danach, wann die Zelllinie das nächste Mal geteilt werden sollte. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml abgenommen und in eine neue, mit 6 ml Medium gefüllte Flasche überführt. Anschließend wurde der Schraubverschluss um eine halbe Drehung geöffnet, um zu gewährleisten, dass ein ausreichender Gasaustausch stattfinden konnte,

und das Gefäß in den Brutschrank gestellt (siehe Tab.7).

Zelllinie	Teilungsverhältnis für vier Tage	Teilungsverhältnis für drei Tage
SHEP-SF	1:7	1:5
KCN	1:4	1:3

Tab. 7: Teilungsverhältnisse der Zelllinien KCN und SHEP-SF

### **3.2 Bestimmung der Zellzahl**

Für viele Versuche war es nötig, die Zellzahl zu bestimmen. Folgendes Vorgehen hatte sich bewährt: Zuerst wurden die Zellen mittels Trypsin vom Flaschenboden gelöst (siehe unter 3.1) und in 5 ml Medium resuspendiert. Oft war der Inhalt von mehreren Flaschen für einen Versuch notwendig, um eine ausreichend hohe Zellkonzentration für die Versuche zu erhalten. 100 µl dieser konzentrierten Zellsuspension wurden vorsichtig (steril!) in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Im nächsten Schritt wurden 10µl dieser Zellsuspension und 90 µl Trypan blau (0,4%) in einem weiteren Eppendorf-Gefäß gut gemischt. 10µl dieser Lösung wurden dann in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Mit Hilfe eines Mikroskops konnten jetzt die Zellzahlen in den 4 Zählkammern bestimmt werden. Mit der folgenden Formel konnte dann die Zellkonzentration (Zellen/ml) berechnet werden:

$$\frac{n \times 10.000 \times f}{X}$$

dabei gilt:

n	= Anzahl der gezählten Zellen
10.000	= Faktor der Neubauer-Kammer
f	= Verdünnungsfaktor
X	= Anzahl der ausgezählten Kammern

Als Beispiel:

n = 103 (es wurden in den 4 Zählkammern insgesamt 103 Zellen gezählt)

f = 10 da die Zellsuspension mit dem Trypan blau um den Faktor 10 verdünnt wurde

X = 4 da insgesamt 4 Kammern ausgezählt wurden.

Daraus ergibt sich:  $\frac{103 \times 10.000 \times 10}{4} = 2.575.000$  Zellen / ml

### **3.3 MTT oder Zytotoxizitäts-Test**

Dieser Test wurde mit Hilfe von Collagen-beschichteten 96-Lochplatten durchgeführt. Vor Testbeginn wurde festgelegt, wie viele Zellen pro Vertiefung auf die Platten gegeben werden sollten. Daraufhin wurde die für die Versuchsdurchführung *insgesamt benötigte Zellzahl* berechnet:

Gewünschte Zellzahl pro Vertiefung x Anzahl der Vertiefungen pro Platte (+ 2 als Sicherheitszuschlag) x Anzahl der 96-Lochplatten = die für den Versuch insgesamt benötigte Zellzahl

Für die Untersuchung hat sich für die verwendeten Zelllinien KCN und SHEP-SF eine Zellzahl von 4000 Zellen pro Vertiefung als optimal erwiesen.

Die Zellen wurden als 100 µl -Suspension in die Vertiefungen gegeben. Daher ergab sich das für den Versuch insgesamt benötigte *Volumen an Zellsuspension*:

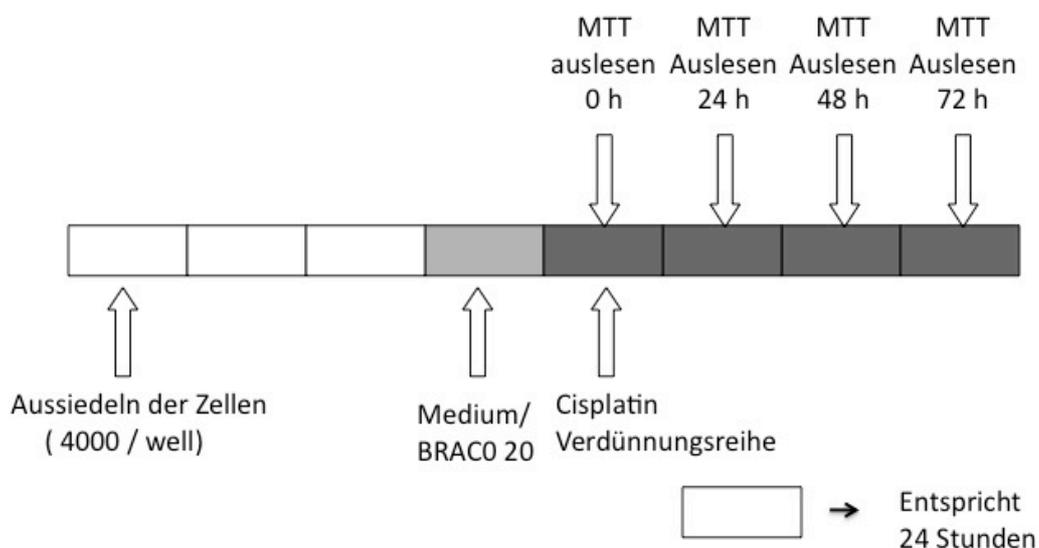
Anzahl der Vertiefungen pro Platte (+2 Sicherheit) x Anzahl der Platten x 0,1 ml = für den Versuch insgesamt benötigtes Volumen an Zellsuspension

Um nun die benötigte Zellsuspension herzustellen, wurden die Zellen aus mehreren Flaschen (3 Flaschen waren i. d. R. ausreichend) in 5 ml Medium resuspendiert (= Zellsuspension A) und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration bestimmt. Das notwendige Volumen dieser Suspension, aus das für den Versuch benötigte Volumen der Zellsuspension hergestellt werden soll, wurde wie folgt berechnet:

<u>Gewünschte Zellzahl für den Versuch x für den Versuch benötigtes Volumen</u> Konzentration der Zellsuspension A
---

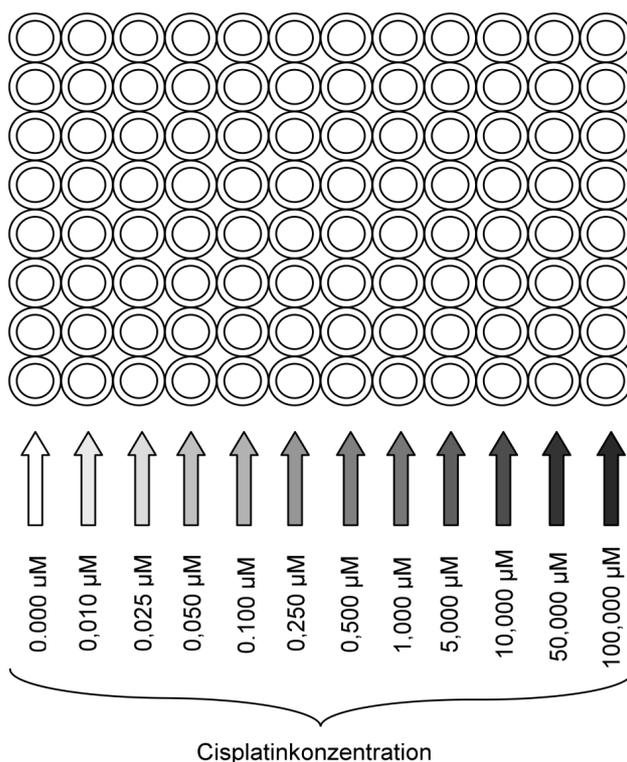
Das errechnete Volumen an Zellsuspension A wurde in ein steriles 50-ml-Gefäß gegeben und mit Medium auf das insgesamt benötigte Volumen aufgefüllt. In jede Vertiefung der beschichteten 96-Loch-Platten wurden nun mit einer Multipipette 100 µl dieser Zellsuspension gegeben und die Zellen anschließend für drei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um eine ausreichende Adhäsion der Zellen und den Übergang in die Proliferationsphase zu gewährleisten. Im Anschluss wurde entweder BRACO 20 (0,5 µM bzw. 2,5 µM Endkonzentration auf der Platte) oder Medium auf die Platten gegeben. Hier hat sich ein Volumen von 25 µl pro Loch bewährt. Nach weiteren 24 Stunden wurde Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen (0 bis 100 µM Endkonzentration auf der Platte, 50 µl pro Loch), sowie nochmals 25 µl Medium oder Medium/BRACO 20 Suspension aufgebracht (Abb.: 26). Nach Inkubation von weiteren 0, 24, 48 und 72 Stunden wurde dann die Vitalität der Zellen untersucht (Abb.25). Sowohl die entsprechenden BRACO 20 als auch die Cisplatinkonzentrationen wurden durch Verdünnung mit Medium erreicht.

Abb. 25: Versuchsablauf



Zum Nachweis der Zellvitalität wurde am jeweiligen Tag zunächst 10 µl MTT-Lösung in jedes Loch pipettiert und die Platten für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Der gelbe MTT-Farbstoff wurde dabei durch mitochondriale Aldehyddehydrogenase in den vitalen Zellen zum blauen Formazan reduziert, welches in den Zellen dann auskristallisierte. Anschließend wurde der Überstand mittels einer Kanüle und einer Unterdruck-Pumpe vorsichtig abgesaugt und anschließend in jede Vertiefung 100 µl Lyse-Reagenz gegeben. Die Platten wurden mit Hilfe eines Rüttlers vorsichtig horizontal bewegt und so die gebildeten Kristalle aufgelöst. Nachdem alle Kristalle gelöst waren, wurde die Extinktion der Farbstofflösung photometrisch bestimmt. Die gemessene optische Dichte korrelierte mit der Menge an gebildetem Formazan, welches wiederum direkt mit der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen in Zusammenhang stand.

Abb. 26: Dosisverteilung von Cisplatin auf der 96-well-Platte



Insgesamt wurden pro Versuchsansatz immer 4 Vertiefungen mit jeweils identischen Wirkstoffkonzentrationen und Zellzahlen beladen, um so bereits der

Versuch pro Ansatz quasi vierfach wiederholt. Zusätzlich wurde davon völlig unabhängig eine komplette Wiederholung der Versuche (wieder mit n=4) durchgeführt um eine ausreichende Aussagekraft zu erreichen.

### **3.4 Bestimmung der GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub>**

Ausgehend von den gemessenen Extinktionen wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen in der Behandlungsgruppe einmal im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle und einmal im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns ermittelt. Die Anteile vitaler Zellen wurden graphisch in Abhängigkeit von den eingesetzten Testkonzentrationen dargestellt. Die Werte wurden mit Hilfe von Sigma Plot 9.0® einer Regressionsanalyse nach Hillslope unterzogen. Aus den ermittelten Parametern wurden durch Umformung der Hillslope-Gleichung die GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> berechnet.

Die GI<sub>50</sub> ist die Substanzkonzentration, die das Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle um 50% reduzierte. Die LC<sub>50</sub> ist die Substanzkonzentration, die den Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu den initial eingesetzten vitalen Zellen um 50% reduzierte. Hier wurde die Vitalität der behandelten Zellen im Vergleich zur Vitalität der Zellen zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns verglichen.

Abb. 27: Hillslope Gleichung

$$Y = \text{Min}_{\text{Effect}} + \frac{(\text{Max}_{\text{Effect}} - \text{Min}_{\text{Effect}})}{1 + 10^{(X - \text{LogEC}_{50}) \cdot \text{Hillslope}}}$$

### **3.5 Asservierung von Zellmaterial zur DNA und Proteinisolierung**

Zunächst wurde dazu aus den Zellkulturflaschen das alte Medium abgesaugt und in jedes Fläschchen 5 ml EDTA-Lösung gegeben. Nach einer kurzen Verweildauer im Brutschrank konnten die Zellen durch Anschlagen der Flaschen vom Flaschenboden abgelöst und in der EDTA-Lösung resuspendiert werden. Diese Suspension wurde in 10-ml- Röhrchen überführt, welche bei 1.200 x g für 5 min zentrifugiert wurden. Danach musste der Überstand

abgegossen werden. Das im Röhrchen verbliebene Zellpellet wurde wiederum gut resuspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß (1,5ml) überführt und nochmals 3 Minuten bei 2.000 x g zentrifugiert. Der jetzt noch verbliebene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Pellets wurden bei -80 °C gelagert.

### **3.6 DNA-Isolation**

Die DNA wurde aus den Zellpellets gewonnen, die wie unter 3.5 beschrieben, eingefroren und gelagert worden sind. Verwendet wurde der „Purogene DNA Isolierungskit GW“, der heute unter dem Namen „Gentra Puregene Cell Kit“ erhältlich ist. Um das Zellmaterial aufzulösen, gab man 600 µl „Cell Lysis Solution“ hinzu und mischte gut, bis eine homogene Lösung entstand. Falls sich Zellklumpen ausbildeten, musste bei 37°C inkubiert werden, bis die Lösung homogen war. Im nächsten Schritt wurden 3 µl „RNase A Solution“ zu dem Zellysate pipettiert, das Eppendorf-Reaktionsgefäß 25 mal geschwenkt und schließlich 15 - 60 min bei 37°C inkubiert. Zum weiteren Vorgehen musste die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Dann wurden 200 µl „Protein Precipitation Solution“ hinzupipettiert, um die Proteine auszufällen. Um die Lösungen ausreichend zu mischen, wurde 20 Sekunden vorsichtig gevortext. Damit sich die ausgefällten Proteine am Boden des Gefäßes sammelten, wurde für 3 min bei 13.000 – 16.000 x g zentrifugiert. In der Zwischenzeit sollten 600 µl Isopropanol (100%) in einem sauberen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt werden, in welches dann der Überstand, der die DNA enthält, überführt wurde. Man musste beim Abpipettieren des Überstandes darauf achten, dass nichts von dem Protein-Pellet mitüberführt wurde. Nun wurde das Gefäß 50-mal geschwenkt, bis ein weißer DNA-Faden sichtbar wurde. Im Anschluss wurde dann für eine weitere Minute bei 13.000 – 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand schließlich verworfen. Um die DNA zu waschen, resuspendierte man das Pellet in 600 µl Ethanol (70%) und zentrifugierte nochmals für 1 min bei 13.000 – 16.000 x g. Zum Trocknen verwarf man den Überstand und pipettierte so viel Flüssigkeit wie möglich ab. Das Pellet musste dann für etwa 15 min unter dem Abzug trocknen. Im letzten Schritt wurde 50

– 100 µl „DNA Hydration Solution“ hinzugegeben, um das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur oder für eine Stunde bei 65°C aufzulösen. Die DNA konnte dann bei 2 – 8°C oder bei –20°C gelagert werden. Während des Transportes und der Durchführung weiterer experimenteller Arbeiten musste die DNA auf Eis gelagert werden.

### **3.7 Messung der DNA-Konzentration**

Ein µl der DNA-Lösung (vgl. 3.6) wurde mit 99 µl PCR-Wasser gut gemischt. Mittels eines Photometers wurde die DNA-Konzentration ermittelt. Es wurden zwei Messungen pro Probe durchgeführt und der Mittelwert aus diesen Messungen bestimmt.

### **3.8 Proteinisolation**

Alle Arbeiten mit Proteinen wurden soweit möglich auf Eis durchgeführt, da Proteine sehr temperaturempfindlich sind. Es wurde auch vermieden, das Proteinmaterial oft aufzutauen und einzufrieren.

Zur Isolation wurde das Zellpellet als erstes, je nach Größe, in 50 – 150 µl Chaps-Puffer gelöst und dann für 30 min auf Eis gestellt. Während dessen wurde die Zentrifuge bereits auf 4°C vorgekühlt. Die Proben wurden dann für 30 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun das Proteinmaterial und wurde in ein neues RNase- freies 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Pellet enthielt nur Zellschutt und konnte verworfen werden. Die Proteine wurden auf Eis gestellt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C gelagert.

### **3.9 Messung der Proteinkonzentration**

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mit dem „RC DC Protein Assay“ der Firma Bio-Rad durchgeführt. Hierzu wurden 25 µl Reagenz I in geeigneten Gefäßen vorgelegt (z.B. RNase freie Eppendorf Reaktionsgefäße). Dann gab man 5 µl Probe bzw. Standard zu, vortexte kurz und ließ das Gemisch etwa eine Minute bei Raumtemperatur stehen. In den meisten Fällen musste man die Proben vorher verdünnen und setzte dann 5 µl der Verdünnung für die

Messung ein. Bei den hier verwendeten Proben hatte sich eine Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:5 bewährt. Im nächsten Schritt wurden 25 µl vom Reagenz II zugegeben, das Gemisch wieder kurz gevortext und dann für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Man verwarf dann den Überstand und gab 25,4 µl vom Reagenz A´ zu, mischte gut und wartete etwa 5 Minuten, bis alle Präzipitate in Lösung gegangen waren. Dann wurden 200 µl DC Reagenz B zugegeben und schließlich 200 µl dieser Mischung in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Platte musste dann noch 15 Minuten bei Raumtemperatur ruhen und wurde anschließend mittels eines ELISA – Readers (Filter bei 655 nm Wellenlänge) ausgelesen. Der Ansatz war für etwa eine Stunde stabil.

### **3.10 DNA-Gel-Elektrophorese**

Mittels der Gel-Elektrophorese kann DNA auf einem Gel aufgetrennt werden, und zwar abhängig von der Ladung und der Größe des DNA-Fragments.

Hierzu wurde zuerst ein Agarose-Gel mit einem Agaroseanteil von 0,8 % hergestellt (Tab.: 6 *Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel*). Im Anschluss wurde die Elektrophorese-Kammer mit 1xTAE als Laufpuffer bis zur Markierung aufgefüllt. Die aufzutrennende DNA wurde nun jeweils in einem Eppendorf-Gefäß mit GBX im Verhältnis 1:3 gemischt (z. B. 2 µl GBX+ 6 µl DNA). Auch die Standards wurden so vorbereitet. Es war nötig, zwei Standards zu verwenden: einmal den Dig-markierten Standard M6, der auf dem Röntgenfilm sichtbar wurde. Dieser Standard gab auf dem Film ein sehr starkes Signal, sodass er 1:5 verdünnt werden musste. Leider war dann die enthaltene DNA-Konzentration so niedrig, dass dieser Standard auf dem Foto des Gels im UV-Licht nicht sichtbar war. Deshalb wurde der Standard auch noch in unmarkierter Form auf das Gel gegeben, und zwar in einer Verdünnung von 1:10. Die mit GBX gemischte DNA konnte nun vorsichtig in die Schlitze des Gels pipettiert werden. Dabei hatte es sich bewährt, die äußeren Schlitze möglichst frei zu lassen, um einen ausreichenden Sicherheitsabstand zum Rand zu gewährleisten. Als nächstes wurde der Transformator angeschlossen, und zwar so, dass die Schlitze mit der DNA an der Anode liegen und das gegenüberliegende Ende an die Kathode angeschlossen wurde. Bei 5 Volt pro

cm Gellänge konnte das Gel dann nach etwa 3 Stunden vorsichtig entnommen werden. Unter UV-Licht wurde das in der DNA gebundene Ethidiumbromid zum Leuchten angeregt und machte die DNA sichtbar.

### **3.11 TRAP-Assay**

Der TRAP-Assay (telomeric repeat amplification) war die bisher übliche Methode, die Aktivität des Enzyms Telomerase zu bestimmen. Hierfür wurde zunächst eine spezielle PCR durchgeführt, deren Produkte dann mit Hilfe einer Fragmentanalyse z.B. am ABI 3700 ausgelesen wurden.

Bei der PCR fügt die Telomerase aus dem Zellmaterial zunächst an den FAM-Primer die typische Sequenzfolge TTAGGG an. Je höher die Telomeraseaktivität bzw. je höher die Enzym-Konzentration, desto größer ist schließlich die Zahl an angehängten TTAGG-Sequenzen. Nach der Primer Verlängerung wird die Telomerase durch Temperaturerhöhung denaturiert. Im nächsten Schritt bindet der TRAP-Primer, der komplementär zu den Telomerasequenzen ist, an diese, und die Taq-Polymerase kann den komplementären Strang synthetisieren. Während der PCR werden die so gebildeten Doppelstränge immer wieder denaturiert, so dass sich der TRAP-Primer erneut an die Einzelstränge binden kann, die dann wiederum durch die Taq-Polymerase zu Doppelsträngen ergänzt werden. Nach jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich also die Anzahl der Telomerase-spezifischen Sequenzen. Wie viele dieser Sequenzen am Ende der PCR vorliegen ist abhängig von der Menge der Sequenzen zu Beginn der PCR, und somit von der Telomeraseaktivität bzw. der Enzymkonzentration. Der PCR-Reaktion war außerdem noch ein interner Standard zugesetzt, der letztendlich dann die semiquantitative Auswertung der Telomeraseaktivität ermöglichte. Die Menge an Telomeraseprodukt wurde zur Menge des internen Standard ins Verhältnis gesetzt.

Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte nun die Fragmentanalyse mit Hilfe des ABI PRISM 3700 DNA Analyser. Die Durchführung wurde nach entsprechender Vorbereitung der Proben durch das hiesige Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster übernommen. Hierbei handelt es sich um eine

Kapillarelektrophorese, bei der fluoreszenzmarkierte DNA Fragmente nachgewiesen werden können. Im vorliegenden Fall wurde die Markierung mittels eines 6FAM markierten Oligonukleotids vorgenommen, welches komplementär zur telomerase-spezifischen Sequenz vorlag. Als internen Standard wurde in jeder Reaktion der ROX 1000 Standard mitgeführt. Das Prinzip der Kapillarelektrophorese beinhaltet, dass kürzere Fragmente schneller wandern als längere. Zur Messung wurden die Marker mit einem Laser zum Fluoreszieren gebracht und die Extinktion der Probe ausgemessen. Die Intensität der Extinktion ist proportional zur Menge von markiertem Oligonukleotid. Schließlich erhielt man ein Elektropherogramm, welches die relative Konzentration des Markers (y-Achse) gegen die Anzahl der Basenpaare (x-Achse) darstellt. Jeder Peak gab dabei ein einzelnes Fragment wieder. Der Rox 1000 Standard markierte hierbei eine Basenpaaranzahl von ca. 30 bp, während sich der erste Telomeren-Peak bei ca 46 bp zeigte. Es folgten noch weitere Telomeren-peaks mit jeweils geringerer Extinktion, also auch geringerer Menge bei größerer Anzahl an angehängten TTAGGG-Sequenzen. Zur Abschätzung der Telomeraseaktivität der Probe, wurde nun die Peakfläche des kürzesten amplifizierten Telomerfragments bestimmt. Da es sich immer um einen Vergleich mit dem internen Standard handelte, erhielt man auch lediglich eine semiquantitative Aussage zur Telomeraseaktivität.

Für die PCR wurde das TRAPeZe<sup>®</sup> Telomerase Detection Kit der Firma Chemicon verwendet. Hierbei musste als erstes das aus den Zellen isolierte Proteinmaterial mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt werden. Darüber hinaus wurde pro Ansatz eine Negativkontrolle (CHAPS Puffer statt Proteinmaterial) und hitzedeaktiviertes Proteinmaterial mitgeführt.

Der PCR-Mix wurde wie folgt in ausreichender Menge hergestellt.

10 x TRAP – Puffer	2,5 µl
10 x dNTP´s	2,5 µl
FAM-Primer Mix (15 µM)	0,25 µl
TRAP-Primer Mix	0,5 µl
Aqua dest.	17,05 µl
Taq	0,2µl

Tab. 8: **Zubereitung für eine Reaktion:**

Zu je 23 µl dieser PCR-Mixtur wurden dann 2 µl der Proteinlösung (5 µg/ml) gegeben und dieses Flüssigkeitsgemisch abschließend mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Dieses Reaktionsgemisch wurde dann in einem Thermocycler wie folgt inkubiert:

Schritt 1:	3 min	37°C
Schritt 2:	30 min	30°C
Schritt 3:	5 min	94°C
Schritt 4:	30 s	94°C
Schritt 5:	45 s	55°C
Schritt 6:	45 s	72°C

Die Schritte 4 bis 6 wurden insgesamt 36 -mal wiederholt.

Die PCR konnte ohne Weiteres über Nacht durchgeführt werden, jedoch sollte die darauf folgende Fragmentanalyse nicht später als 24 h nach der PCR gemacht und die PCR-Produkte bis dahin bei 4 °C gelagert werden. So sind auch alle im Folgenden beschriebenen Pipettierarbeiten auf Eis durchgeführt worden. Für die Fragmentanalyse wurden 2 µl des PCR-Produktes zusammen mit 20 µl H<sub>2</sub>O und 0,5 µl 1000 Rox als Standard gemischt. Die Proben wurden in spezielle 96-Loch-PCR-Reaktions-Platten pipettiert und mit einer Spezialfolie zugeklebt. Es wurde dann sofort die Fragmentanalyse durch das Zentrallabor vorgenommen.

### **3.12 Telomeraseaktivitätsmessung am TaqMan®**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich zum Trap-Assay zur

Telomeraseaktivitätsmessung eine weitere Methode etabliert, die so in der Form bisher nicht üblich gewesen war. Dazu wurde die Technik der Quantitativen Real Time PCR genutzt, um so genauer, schneller und kostengünstiger Aussagen über die Enzymaktivität der Telomerase treffen zu können. Für dieses Vorgehen wurde eine Proteinkonzentration der Proben von 25 µg/ml benötigt.

Der PCR-Mix für die Reaktionen am TaqMan<sup>®</sup> setzte sich wie in Tab. 9 angegeben zusammen.

SYBR green	25 µl
Primer TS	0,2 µl
Primer ACX	0,1 µl
H <sub>2</sub> O	14,7 µl

Tab. 9: Angaben beziehen sich auf eine Reaktion

40 µl dieser Mischung wurden in den Vertiefungen einer Spezial-PCR-Platte vorgelegt und dann werden jeweils 10 µl des zu testenden Proteinmaterials (25 µg/ml) dazu pipettiert. Die Öffnungen der Reaktionsvertiefungen wurden im Anschluss mit Spezialstrips verschlossen und die PCR nach folgendem Temperaturschema durchgeführt:

Schritt 1:	20 min	25°C
Schritt 2:	10 min	95°C
Schritt 3:	20 s	95°C
Schritt 4:	30 s	50°C
Schritt 5:	1 min 30 s	72°C

Die Schritte 3 bis 5 wurden insgesamt 40-mal wiederholt.

### **3.13 Southern Blot (Dig-labelling)**

Der Southern Blot ist eine Methode, um bestimmte DNA-Sequenzen nachzuweisen. In diesem Fall sollen die Telomeren sichtbar gemacht werden. Der Ablauf wird nun im Folgenden erläutert.

#### **3.13.1 Restriktionsverdau**

Zuerst wurde die DNA, die aus den Zellen isoliert worden ist, mittels der Restriktionsenzyme Hinf I und Rsa I in kleinere Fragmente zerschnitten.

Als Erstes wurde ein Mix für den Verdau hergestellt. Dieser musste jedes Mal frisch angesetzt werden (vgl. Tab. 10).

10 x Puffer	10 µl
Hinf I (10 U/µl)	1,2 µl
Rsa I (10 U/µl)	1,2 µl
DTT (50 mM)	2 µl

Tab. 10: **Zusammensetzung für eine Reaktion**

Pro Ansatz sollten etwa 5 µg DNA verdaut werden. Wie unter 3.6 beschrieben, wurde im Vorfeld die DNA-Konzentration der Proben bestimmt. Zum Restriktionsverdau wurde das benötigte Probenvolumen mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 86,6 µl aufgefüllt und zu dem Mix mit den Restriktionsenzymen gegeben.

Beispiel: Wenn bei der Bestimmung des DNA-Gehaltes eine Konzentration von 5 µg DNA in 12,5 µl Probe gemessen wurde, dann setzte man 12,6 µl DNA und 74 µl Wasser ein. Schließlich pipettierte man 14,4 µl des 1 x Mix und die 86,6 µl DNA -Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und inkubierte diese Mischung über Nacht bei 37°C.

#### **3.13.2 Fällung**

Am nächsten Tag wurde die DNA zuerst aus dem Restriktions-Gemisch gefällt. Dazu gab man zuerst 5% des Gesamtvolumens an 5 M NaCl zu (entspricht in diesem Fall das 5 µl) und dann zweimal das Volumen an 100%igem kaltem

Ethanol (in diesem Fall waren das 210 µl). Diese Lösung wurde dann für etwa vier Stunden auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Im Anschluss wurden die Proben bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min bei 14.000 UpM zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die DNA mit 200 µl 70%igem kaltem Ethanol gewaschen, d.h., es wurden die 200 µl Ethanol auf das Pellet pipettiert und dann 5 min bei 14.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die Proben für etwa 15 min zum Trocknen unter den Abzug gestellt. Es war wichtig, dass sich wirklich das gesamte Ethanol verflüchtigt hatte! Zum Schluss wurde die DNA in 15 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen und die Proben zum Lösen bei etwa  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die Proben konnten danach bis zum weiteren Vorgehen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 3.13.3 Transfer

Als erstes trennte man die Proben auf einem 0,8%igem Agarosegel auf (wie unter 3.10 *DNA-Gel-Elektrophorese* beschrieben). Zusammen mit den Proben wurden auch ein Dig-markierter Standard und ein unmarkierter Standard mitgeführt.

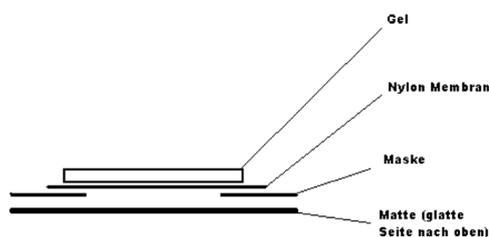
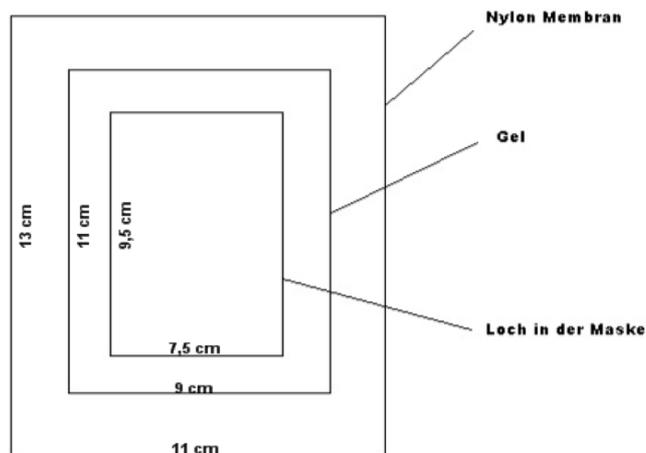
Vor dem Transfer musste das Gel noch durch verschiedene Waschungen vorbereitet werden. Diese Vorgänge wurden mit Hilfe eines Rüttlers und einer geeigneten flachen Wanne durchgeführt. Wichtig war, dass das Gel die ganze Zeit von Flüssigkeit umspült wurde und niemals austrocknete.

Zunächst wusch man das Gel für 10 min mit 0,2 M HCl. Damit wurde depuriniert und die untere blaue Bande des GBX-Markers färbte sich gelb.

Im Anschluss spülte man das Gel kurz und vorsichtig mit Wasser ab und denaturierte es dann 20 min mittels einer Denaturationslösung, deren Herstellung unter *Tab.: 6 Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel* beschrieben ist. Dabei färbte sich die gelbe Bande wieder blau. Es folgte eine weitere Spülung mit Wasser und eine letzte Behandlung für 20 min mit einer Neutralisationslösung (Herstellung siehe unter *Tab.: 6 Zubereitung der Reagenzien und Hilfsmittel*). Für den Transfer bedurfte es aber vorher noch einiger Vorbereitung. So musste die Maske der Kammer auf die richtige Größe zurechtgeschnitten werden. Sie musste etwas kleiner als das Gel sein (etwa 5

bis 10 mm pro Seite). Auch die Nylon- Membran musste angepasst werden, sie sollte etwa 10 mm pro Seite größer als das Gel sein (vgl. Abb.28). Dann musste noch die Matte der Kammer für 10 min gewässert werden und auch die Nylon-Membran wurde erst kurz in Wasser gelegt und dann für 10 min in Neutralisationslösung gewaschen.

Abb. 28: Aufbau von Maske, Nylon-Membran und Gel



Nun folgte der Transfer. Dazu wurde in die mittlere Vertiefung der Kammer etwas Wasser gegeben und als Erstes die gewässerte Matte mit der glatten Seite nach oben aufgelegt. Darüber legte man die Maske und auf den Ausschnitt die feuchte Membran. Die Klammern der Kammer wurden so geschlossen, dass die Maske keine Falten mehr warf. Nun wurde das Gel so aufgelegt, dass die Slots knapp innerhalb des Maskenausschnitts lagen. Um die Kammer auf Dichtigkeit zu überprüfen, wurde kurz die angeschlossene Vakuumpumpe angestellt (55 mbar). Wenn der Druck nicht stabil gehalten wurde, musste man auf undichte Stellen prüfen. Wichtig war auch, dass sich keine Luftblasen unter dem Gel befanden. Um die DNA auf die Membran zu

bringen, musste für 90 Minuten ein Druck von 55 mbar aufrechterhalten werden. Darüber hinaus musste die Geloberfläche stetig mit 20 x SSC benetzt werden, ohne dass die Lösung an den Seiten des Geles herunterlief und unter die Maske gesogen wurde. Zur Überprüfung, ob der Transfer erfolgreich war, konnten das Gel und die Membran noch einmal unter UV-Licht auf DNA überprüft werden. War das Gel frei von DNA und auf der Membran ein Leuchten zu sehen, dann war der Transfer erfolgreich. Die DNA musste jetzt noch fest an die Membran gebunden werden. Dazu wurde die Membran auf Whatmann-Papier gelegt und für zwei Minuten bei 750 Watt in der Mikrowelle gebacken.

#### 3.13.4 Hybridisierung

Die Membran musste jetzt eine Stunde prähybridisiert werden. Das geschah am besten in sogenannten Hybridisierungsröhren, in die die Membran und 10 ml Hybridisierungslösung (Dig Easy Hyb) gegeben wurden. Diese Röhren wurden dann bei 45°C unter stetiger Bewegung für eine Stunde aufgewärmt. Im nächsten Schritt wurden in einem gesonderten Gefäß 10 µl der Sonde (79/96) und 10 ml frische Hybridisierungslösung gemischt und dann die alte Lösung durch die neue ersetzt. So wurden die Röhren jetzt über Nacht im Ofen belassen.

#### 3.13.5 Detektion

Am nächsten Tag musste die Membran mehrmals gewaschen werden: Zuerst zweimal bei Raumtemperatur mit frisch hergestellter 2 x SSC/SDS-Solution für jeweils 5 Minuten, dann dreimal bei 37 °C für jeweils 20 min mit 0,1 x SSC/SDS-Solution. Alle Waschschrte wurden mit jeweils 100 ml Lösung auf einem Rüttler vorgenommen. Nachdem die letzte Waschung mit 0,1 x SSC/SDS erfolgt war, wurde die Membran kurz in Puffer 1 (Waschpuffer) und dann für 30 min in Puffer 2 auf einen Rüttler gelegt. Im nächsten Schritt folgte die Anlagerung des Anti-Digoxigenin-Fab-Fragments, die Herstellung der etwa 40 ml Anti-Dig-Lösung wird in Tab. 6 näher erläutert. Die Behandlung mit dieser Lösung erfolgte über 30 min. Dann wurde die Membran erneut zweimal jeweils

30 min in Waschpuffer gelegt und schließlich zweimal für 5 min mit Puffer 3 (Detektionspuffer) behandelt. Im Anschluss daran wurde die Membran zusammen mit einer Lösung eingeschweißt, die zu 1% aus CSPD und zu 99% aus Puffer 3 bestand. Es hatte sich bewährt, 1980 µl Puffer 3 und 20 µl CSPD zu verwenden. In den nächsten 5 min musste die Flüssigkeit in der Folie stetig mit der Hand verteilt werden, um die gesamte Membran ausreichend zu benetzen. Dann schnitt man die Folie wieder auf, legte die Membran kurz auf Whatmann-Papier und schweißte die noch feuchte Membran erneut in dünne Klarsichtfolie ein. Die so eingeschweißte Membran ließ man dann für etwa 15 min im Brutschrank bei 37°C präinkubieren. Anschließend wurde sie in einer Dunkelkammer mit Tesafilm auf einen Röntgenfilm geklebt und beides in einer Röntgenkassette lichtgeschützt verschlossen. Die Belichtungszeit lag bei etwa 6 h, dann musste die Membran aus der Röntgenkassette entfernt werden, um eine Überlichtung des Films zu vermeiden. Der Film konnte nun entwickelt werden.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Die unterschiedlichen Versuchsanordnungen**

In dieser Arbeit sollten sowohl das Verhalten von unterschiedlichen Neuroblastomzelllinien als auch die Wirkung von unterschiedlichen BRACO 20 Konzentrationen untersucht werden. Als Zelllinien wurden KCN und SHEP-SF verwendet, die bereits unter *2.1 Die Zelllinien* näher beschrieben worden sind. Als BRACO 20 Konzentrationen kamen 0,5  $\mu\text{M}$  und 2,5  $\mu\text{M}$  zum Einsatz. Diese Wirkstoffkonzentrationen wurden gewählt, da sie zum einen, laut Hersteller, sicher oberhalb der Konzentration lagen, die die Telomerase zu 50% hemmt (74 nM) und auf der anderen Seite deutlich unter den Konzentrationen lag, die in einem durchgeführten Vorversuch zu einem Absterben der Zellen führten (vgl. Tab. 11: GI 50 und LC 50 Werte von BRACO 20 bei den Zelllinien KCN und SHEP-SF). Somit lag die gewählte BRACO 20 Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$ , um den Faktor 6,5 niedriger als die  $\text{GI}_{50}$  für KCN nach 96 h, und um den Faktor 25,8 niedriger als die  $\text{GI}_{50}$  für SHEP-SF nach 96 h. Von großem Interesse war nun nicht nur das unmittelbare Verhalten der Zellen auf eine Behandlung mit BRACO 20, sondern insbesondere das Wachstumsverhalten nach mehrwöchiger Inkubation mit dem Telomeraseinhibitor.

Diese als „Langzeitversuche“ (= LZ) bezeichneten MTT-Tests wurden nach 5- bis 10-wöchiger Inkubation mit BRACO 20 in den oben angegebenen Konzentrationen durchgeführt.

### **4.2 Ergebnisse MTT-Tests**

Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde untersucht, wie die beiden Zelllinien auf BRACO 20 reagierten. Dazu wurden die Zellen jeweils einer steigenden Konzentration der Testsubstanz ausgesetzt.

#### 4.2.1 Zytotoxizität von BRACO 20 an den Zelllinien KCN und SHEP-SF

	KCN		SHEP-SF	
	GI <sub>50</sub> [µM]	LC <sub>50</sub> [µM]	GI <sub>50</sub> [µM]	LC <sub>50</sub> [µM]
24h	52,6	501	96,0	460
48h	37,8	283	43,4	151
72h	17,8	99,3	51,2	112
96h	16,8	88,5	64,6	108

Tab. 11: GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> Werte von BRACO20 bei den Zelllinien KCN und SHEP-SF

Wie aus Tab. 11 und Abb. 29 und 30 ersichtlich, kam es bei der Zelllinie KCN zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellvitalität.

Nach 72 h kam es allerdings bei beiden Zelllinien keiner wesentlichen Steigerung der Toxizität mehr.

Abb. 29: Zellwachstum der Zelllinie KCN unter Behandlung mit BRACO 20 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

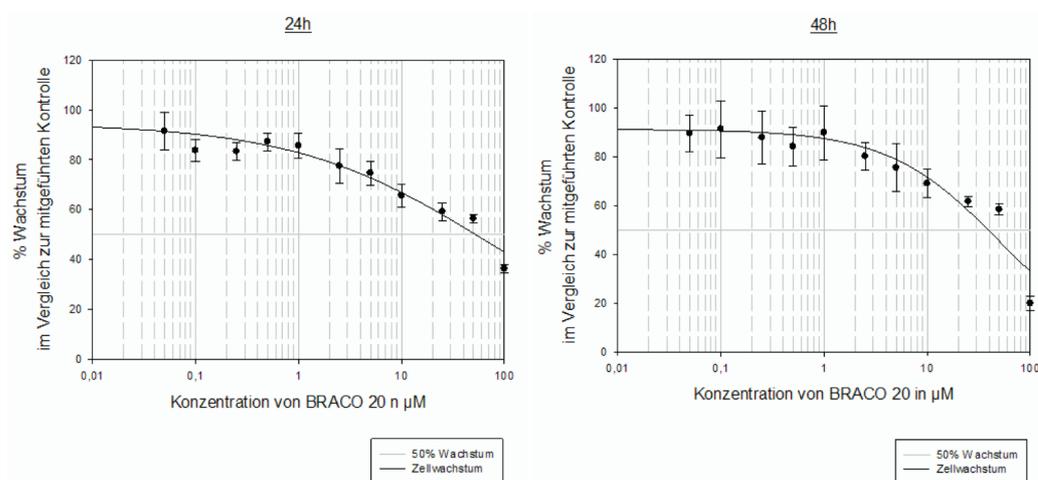
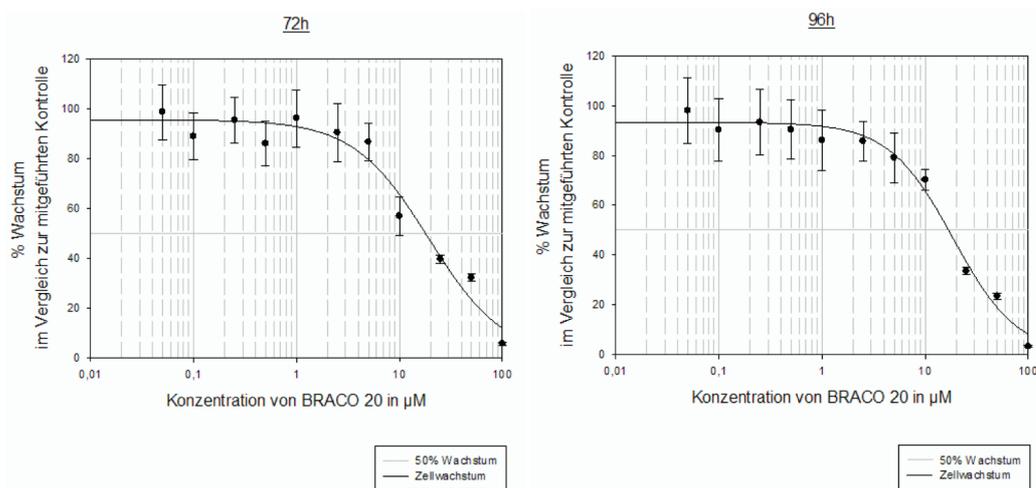
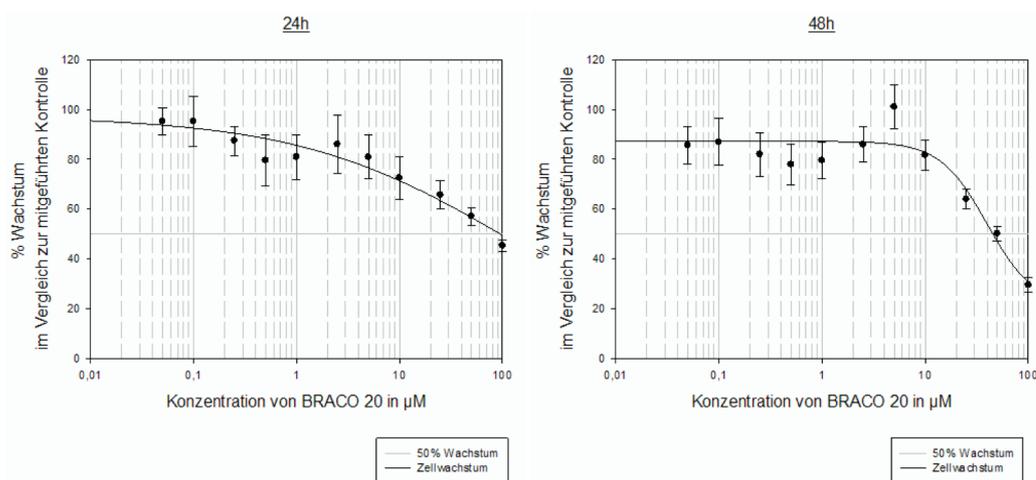


Abb. 30: Zellwachstum der Zelllinie KCN unter Behandlung mit BRACO 20 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



Auch für SHEP-SF war eine zeit- und dosisabhängige Zytotoxizität zu beobachten.

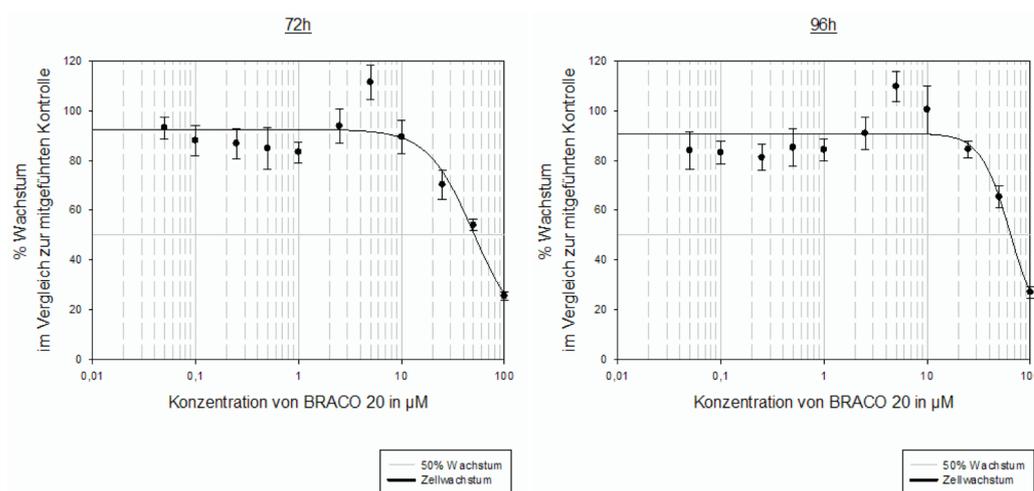
Abb. 31: Zellwachstum der Zelllinie SHEP-SF unter Behandlung mit BRACO 20 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



Nach 24 h war das Zellwachstum bereits bei recht niedrigen BRACO 20-Konzentrationen eingeschränkt. Die  $GI_{50}$  von SHEP-SF betrug 96  $\mu\text{M}$  und war

somit deutlich höher als die  $GI_{50}$  der Zelllinie KCN mit  $52,6 \mu\text{M}$ . Die  $LC_{50}$  war mit  $460 \mu\text{M}$  mit der  $LC_{50}$  von KCN vergleichbar ( $510 \mu\text{M}$ ) (vgl. Tab.: 11).

Abb. 32: Zellwachstum der Zelllinie SHEP-SF unter Behandlung mit BRACO 20 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



Nach 72 h reduzierte sich das Zellwachstum bei der Zelllinie SHEP-SF ab einer BRACO 20- Konzentration von etwa  $10 \mu\text{M}$ . Die  $GI_{50}$  betrug  $51,2 \mu\text{M}$  und lag damit deutlich höher als die  $GI_{50}$  der Zelllinie KCN ( $17,8 \mu\text{M}$ ). Die  $LC_{50}$  dagegen war mit  $112 \mu\text{M}$  vergleichbar mit der  $LC_{50}$  der Zelllinie KCN ( $99,3 \mu\text{M}$ ). Nach 96 h reduzierte sich das Wachstum ab einer BRACO 20 - Konzentration von etwa  $20 \mu\text{M}$ . Die  $GI_{50}$  betrug  $64,6 \mu\text{M}$  und lag somit deutlich höher als bei KCN ( $16,8 \mu\text{M}$ ). Die  $LC_{50}$  war mit  $108 \mu\text{M}$  auch etwas höher als bei KCN ( $88,5 \mu\text{M}$ ).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zelllinie SHEP-SF weniger sensibel auf BRACO 20 reagierte als die Zelllinie KCN. Die  $GI_{50}$  lag nach 96 Stunden für SHEP-SF um den Faktor 3,8 und die  $LC_{50}$  um den Faktor 1,2 höher als für die Zelllinie KCN.

Ferner ist aus Tab. 11 und Abb. 29 bis 32 ersichtlich, dass die Wachstumshemmung und Zytotoxizität von BRACO 20 auf die verwendeten Zelllinien erst bei Konzentrationen einsetzte, die weit oberhalb der Konzentration lag, die gemäß dem Hersteller das isolierte Telomeraseenzym hemmte (Angaben von Prof. Neidle :  $74 \text{ nM}$ ).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nicht an isolierten Enzymen

sondern mit Zellkultursystemen gearbeitet wurde, wurden für die geplanten Koinkubationen dann BRACO20 Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  und 2,5  $\mu\text{M}$  gewählt. Beide Konzentrationen lagen nicht im akut zytotoxischen Konzentrationsbereich von BRACO20, waren aber deutlich über der  $\text{IC}_{50}$  am isolierten Enzym, so dass unter Zellkulturbedingungen eine Hemmung der Telomeraseaktivität wahrscheinlich war.

### **4.3 Wachstumsverhalten der Zelllinien KCN und SHEP-SF unter Zugabe von Cisplatin**

In Tab. 12 sind die  $\text{GI}_{50}$  und  $\text{LC}_{50}$  der beiden Zelllinien für die Behandlung mit Cisplatin dargestellt. Eine  $\text{GI}_{50}$  ließ sich erst für eine Inkubation nach 48 und 72 Stunden erheben. Letztendlich lies sich erwartungsgemäß eine konzentrations- und dosisabhängige Zytotoxizität gegenüber Cisplatin belegen. Es zeigte sich überdies, dass auch bezüglich einer Inkubation mit Cisplatin, die Zelllinie SHEP-SF resistenter war.

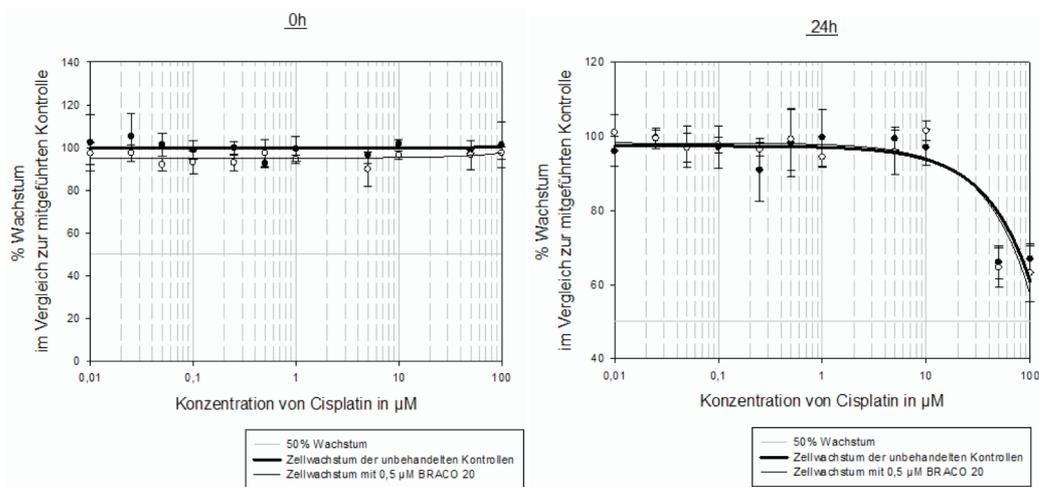
	KCN		SHEP-SF	
	$\text{GI}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\text{LC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\text{GI}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\text{LC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
48h	6,3	21,5	10,6	44,8
72h	4,0	10,6	7,8	16,5

Tab. 12:  $\text{GI}_{50}$  und  $\text{LC}_{50}$  Werte von Cisplatin bei den Zelllinien KCN und SHEP-SF

#### **4.3.1 MTT KCN mit Cisplatin und 0,5 $\mu\text{M}$ BRACO 20 - Kurzzeitexposition**

Bei diesem Experiment wurde das Medium der Versuchsgruppe nach jeder Passage mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 versetzt, während die Zellen der zugehörigen Kontrollgruppe nur mit Medium kultiviert wurden. Sowohl die mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 behandelten wie auch die unbehandelten Zellen wurden auf ihre Sensitivität gegenüber Cisplatin im MTT-Test untersucht. Nachstehend werden die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt und beschrieben. Das Wachstum der Zellen wurde jeweils auf die nicht mit Cisplatin behandelten Zellen bezogen.

Abb. 33: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration

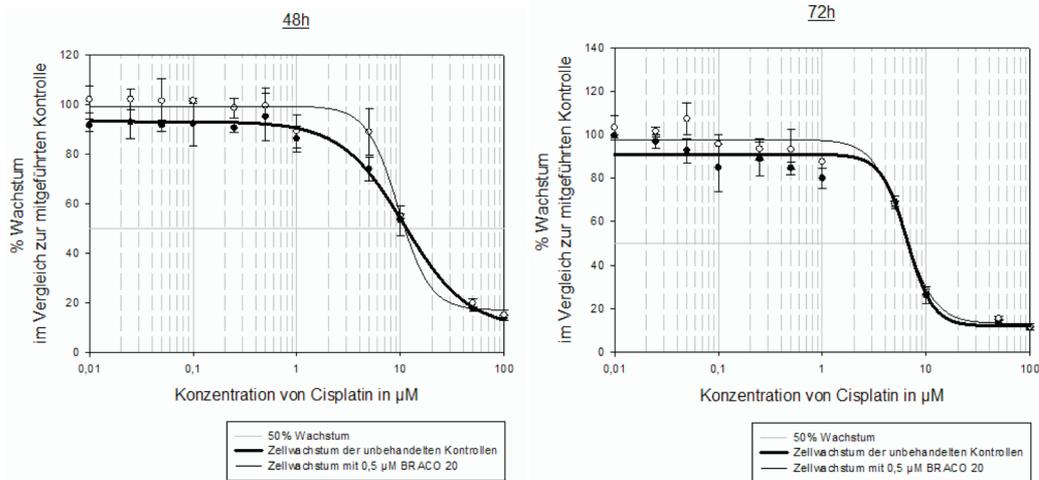


Zu Versuchsbeginn, also unmittelbar nach Aufbringen der Cisplatinlösungen, zeigte sich ein Wachstum, was sich definitionsgemäß um jeweils 100 % bewegte (siehe Abb. 33).

Nach 24 h verringerte sich das Zellwachstum ab einer Cisplatinkonzentration von etwa 10  $\mu\text{M}$ . Dabei zeigten die Kurven der Kontrollzellen und die der mit BRACO 20 behandelten Zellen einen nahezu identischen Verlauf (siehe Abb. 33).

Nach 48 h zeigte sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiges Wachstumsgefälle bei analogem Verlauf der Kontroll- und Versuchskurve. Die Wachstumsreduktion begann bei einer Cisplatinkonzentration von ca. 3  $\mu\text{M}$  (siehe Abb. 34). Nach 72 h präsentierten die beiden Wachstumskurven auch einen analogen Verlauf, vergleichbar mit dem Kurvenverlauf nach 48 h, wobei hier eine Reduktion des Wachstums etwas früher einsetzte ( bei ca. 2  $\mu\text{M}$ ).

Abb. 34: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



	GI <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]		LC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	6,6	5,1	11,7	5,9
BRACO 20	6,6	4,9	12,1	5,7
GI <sub>50</sub> -BRACO20 / GI <sub>50</sub> -Kontrolle bzw. LC <sub>50</sub> -BRACO20 / LC <sub>50</sub> -Kontrolle	0,9	0,9	1,0	0,9

Tab. 13: GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> für Cisplatin nach 72h Exposition von KCN mit und ohne Vorbehandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20

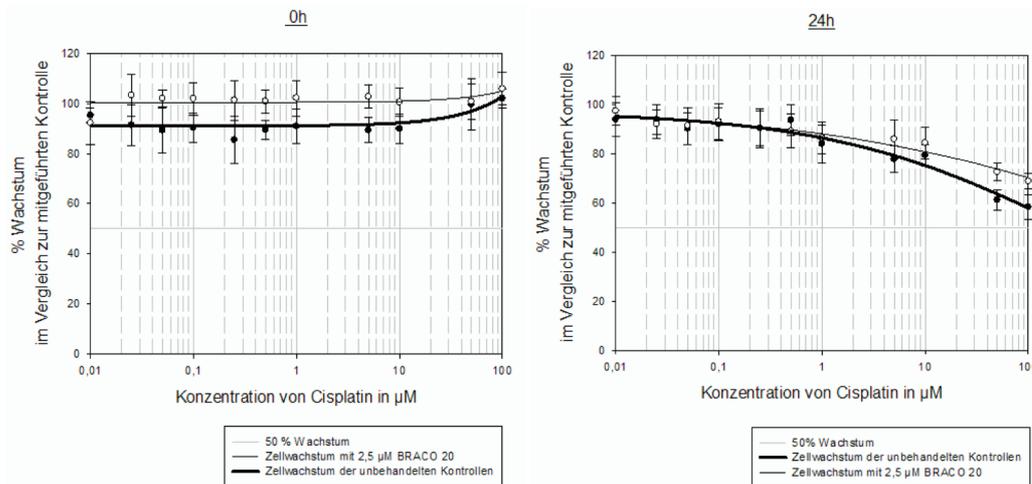
Wie aus Tab. 13 ersichtlich, ergibt sich kein wesentlicher Unterschied für die Zytotoxizität von Cisplatin, unabhängig davon, ob zusätzlich mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 inkubiert wurde oder nicht. Die Kurvenverläufe der mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 behandelten Zellen und der nicht behandelten Kontrolle sind so gut wie kongruent (vgl. Abb. 33 und 34)

#### 4.3.2 KCN mit Cisplatin und 2,5 $\mu\text{M}$ BRACO 20 - Kurzzeitexposition

Zum Beginn des Versuches lag das Zellwachstum definitionsgemäß um 100% (da dies selbstverständlich immer der Fall war, soll auf diese Abbildung im

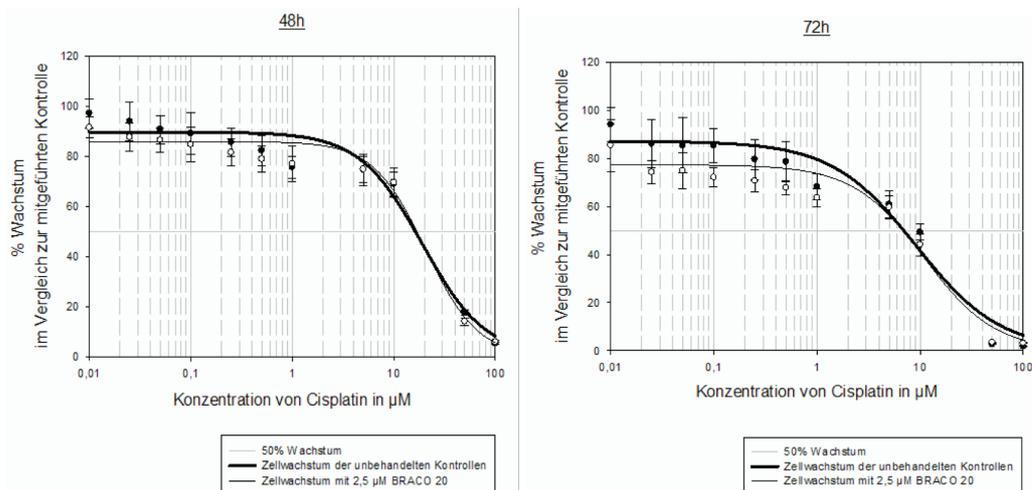
Folgenden verzichtet werden).

Abb. 35: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Nach 24 h fiel das Zellwachstum bei der Kontrollgruppe, die zusätzlich mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt worden sind, auf ca. 58% und in der Gruppe mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 im Medium nur auf ca. 69% ab.

Abb. 36: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Nach 48-stündiger Exposition war das Wachstum mit oder ohne 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 nahezu gleich. Mit steigender Cisplatinkonzentration nahm die Anzahl vitaler Zellen ab, dabei war das Wachstum der unbehandelten Kontrollen und der Zellen, die mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO20 behandelt wurden, fast identisch. Bei

niedrigen Cisplatin-Konzentrationen lag das durchschnittliche Wachstum der mit BRACO 20 behandelten Zellen leicht unter dem Durchschnittswachstum der Kontrollgruppe.

	GI <sub>50</sub> [µM]		LC <sub>50</sub> [µM]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	6,9	4,3	21,7	18,0
BRACO 20	6,7	6,0	15,6	8,0
GI <sub>50</sub> -BRACO20 / GI <sub>50</sub> -Kontrolle bzw. LC <sub>50</sub> -BRACO20 / LC <sub>50</sub> -Kontrolle	0,9	1,4	0,7	0,4

Tab. 14: GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> für Cisplatin nach 72h Exposition von KCN mit und ohne Vorbehandlung mit 2,5 µM BRACO 20

Im ersten Versuch wurden nach 72 h, wie im Versuch mit 0,5 µM BRACO 20, wieder fast identische GI<sub>50</sub>-Konzentrationen für Cisplatin in der Kontrollgruppe und den Zellen, die mit 2,5 µM BRACO 20 behandelt worden sind (Kontrollen: 6,9 µM Cisplatin, 2,5 µM BRACO 20: 6,7 µM Cisplatin) ermittelt. Im zweiten Versuchansatz differierten die GI<sub>50</sub>-Konzentrationen, so waren die Kontrollzellen um den Faktor 1,4 sensibler gegenüber Cisplatin als die mit 2,5 µM BRACO 20 behandelten Zellen. Fasst man die GI<sub>50</sub>-Werte für Cisplatin aus den vier GI<sub>50</sub>-Werten für Cisplatin, die mit aus den Kontrollversuchen ermittelt wurden (Kontrollversuche 1 und 2 aus der Reihe mit 0,5 µM BRACO 20 und Kontrollversuche 1 und 2 aus der Reihe mit 2,5 µM BRACO 20) zusammen, errechnet sich für Cisplatin eine mittlere GI<sub>50</sub> von 5,73 ± 1,23 µM (Range: 2,6 µM). Der beobachtete Unterschied hinsichtlich der GI<sub>50</sub> im 2. Versuchansatz (Tabelle 14) liegt damit innerhalb der Testvarianz.

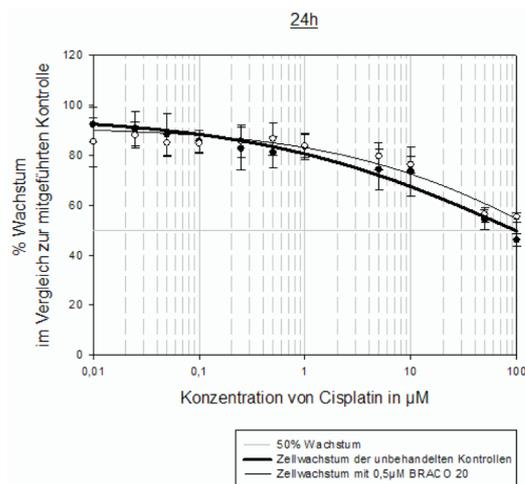
Bei der LC<sub>50</sub> wurde in beiden Versuchansätzen ein deutlicher Unterschied erkennbar. Insgesamt zeigten sich die mit 2,5 µM behandelten BRACO 20 Zellen sensibler gegenüber Cisplatin als die nicht mit BRACO 20 behandelte Kontrollgruppe. Allerdings unterlag die LC<sub>50</sub> für Cisplatin auch deutlicheren Schwankungen. Aus den vier Versuchsreihen (Versuch 1+2 der Reihe mit 0,5 µM BRACO 20 und Versuch 1+2 der Reihe mit 2,5 µM BRACO 20) ergab sich

für die nur mit Cisplatin behandelten Kontrollgruppen eine mittlere  $LC_{50}$  von  $14,3 \pm 6,98$  (Range:  $15,8 \mu\text{M}$ ). Die beobachteten Veränderungen lagen damit, auch wenn sich ein Trend zur Sensibilisierung gegenüber Cisplatin durch die Vorbehandlung mit BRACO 20 abzeichnete, noch innerhalb der Testvariabilität. Dies und die Tatsache, dass bei der Wachstumshemmung ( $GI_{50}$ ) ein entsprechender Trend zur Steigerung der Sensitivität gegenüber Cisplatin durch die Behandlung mit BRACO 20 nicht beobachtet werden konnte, legen nahe, dass durch die Behandlung mit dem G-Quadruplex-Stabilisator BRACO 20 die Sensitivität der Zelllinie KCN nicht signifikant beeinflusst wurde.

#### 4.3.3 SHEP-SF mit Cisplatin und $0,5 \mu\text{M}$ BRACO 20 – Kurzzeitexposition

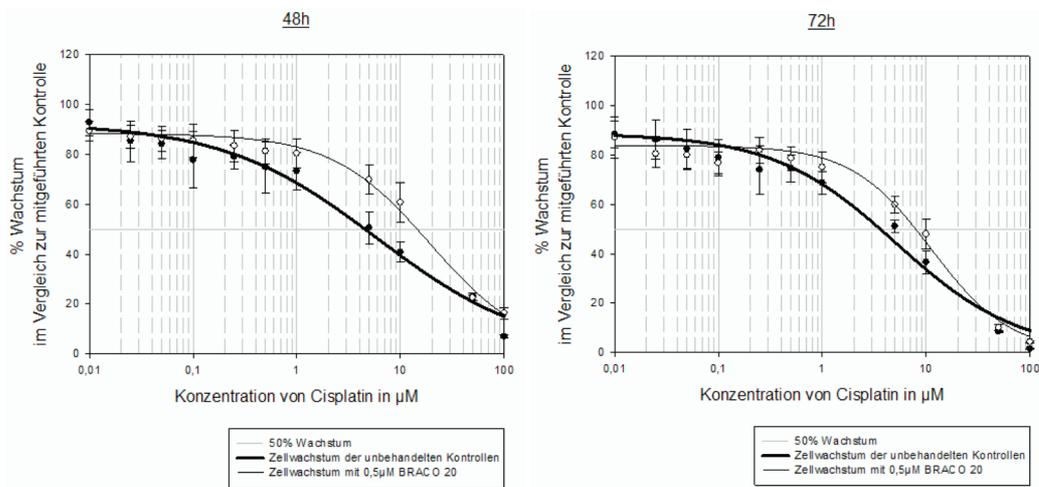
Das Vorgehen bei diesem Experiment war identisch mit dem vom Versuch, der unter 4.3.1 beschrieben ist. Der einzige Unterschied bestand in der Auswahl der Zelllinie. Dabei handelte es sich hier um SHEP-SF.

Abb. 37: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF mit und ohne  $0,5 \mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



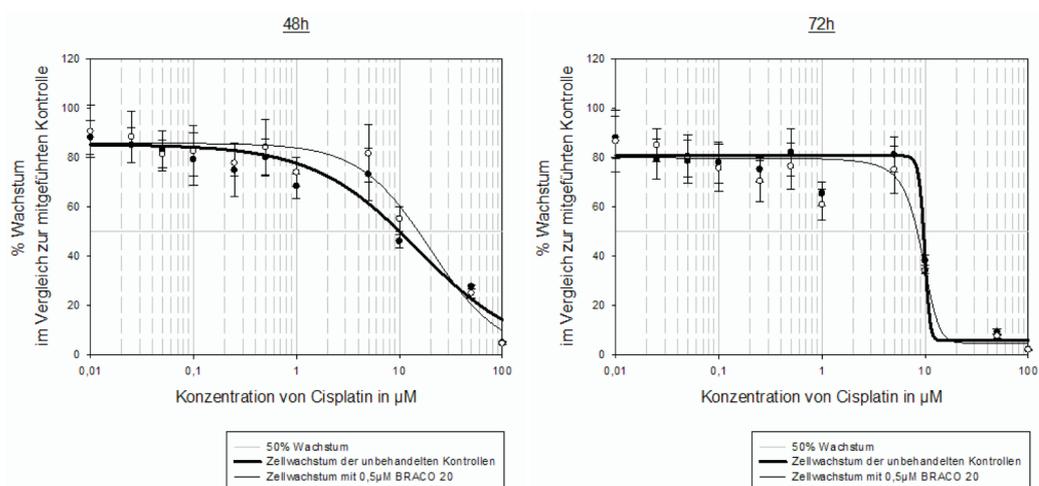
Nach 24 h nahm die Vitalität der Zellen proportional zur Cisplatinkonzentration ab, und zwar sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Versuchsgruppe im selben Maße.

Abb. 38: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF mit und ohne 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Im ersten Versuch reagierten die mit BRACO 20 behandelten Zellen weniger sensibel auf die Behandlung mit Cisplatin als die nicht mit BRACO 20 behandelten Zellen. Nach 48h und nach 72h waren die Dosis-Wirkungskurven der mit BRACO 20 vorbehandelten Zellen gegenüber den nicht behandelten Zellen deutlich nach rechts verschoben (Abb. 38). Dieser Effekt konnte im Wiederholungsversuch allerdings nach 48h und 72h nicht reproduziert werden (Abb. 39; Tabelle 15).

Abb. 39: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF mit und ohne 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



	GI <sub>50</sub> [µM]		LC <sub>50</sub> [µM]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	3,5	11,1	14,1	10,0
BRACO 20	7,9	10,6	22,	9,8
GI <sub>50</sub> -BRACO20 / GI <sub>50</sub> -Kontrolle bzw. LC <sub>50</sub> -BRACO20 / LC <sub>50</sub> -Kontrolle	2,2	0,9	1,6	0,9

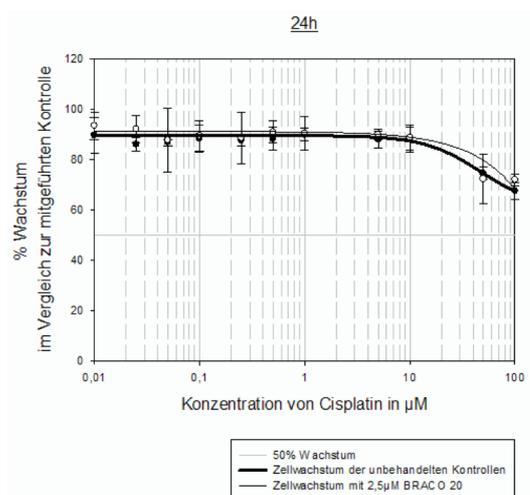
Tab. 15: GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> für Cisplatin nach 72h Exposition von SHEP-SF mit und ohne Vorbehandlung mit 0,5 µM BRACO 20

Analog zur Wachstumshemmung (GI<sub>50</sub>) konnten für die Zytotoxizität (LC<sub>50</sub>) ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Im ersten Versuchsansatz lagen die LC<sub>50</sub>s der mit BRACO 20 vorbehandelten Zellen um den Faktor 1,6 über denen der unbehandelten Zellen und waren demnach weniger sensibel gegenüber Cisplatin. Der Wiederholungsversuch konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen.

#### 4.3.4 MTT SHEP-SF 2,5 µM BRACO 20 - Kurzzeitexposition

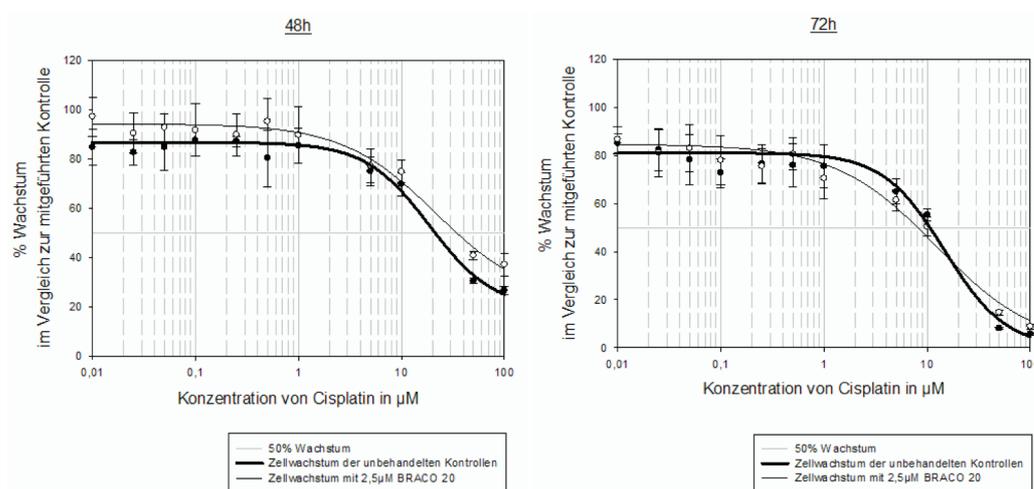
Hier wurde die Konzentration von BRACO 20, welches nach jeder Passage dem Zellkulturmedium wieder zugesetzt wurde, auf 2,5 µM erhöht.

Abb. 40: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF mit und ohne 2,5 µM BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Nach 24 h zeichnete sich bei hohen Cisplatinkonzentrationen eine Minderung der Zellvitalität ab.

Abb. 41: Wachstum der Zelllinie Shep-SF mit und ohne 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Nach 48 h trat die Wachstumshemmung bereits bei niedrigeren Cisplatin-Konzentrationen ein, wobei hier die Kontrollzellen und die BRACO 20 behandelten Zellen ähnlich reagierten. Nach 72 h zeigte die Cisplatin-induzierte Wachstumsreduktion zwischen den Kontrollen und der Versuchsgruppe auch keine wesentlichen Unterschiede auf.

	$\text{GI}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]		$\text{LC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	10,6	4,3	24,3	30,5
BRACO 20	8,0	4,5	30,2	25,6
$\text{GI}_{50}\text{-BRACO20} / \text{GI}_{50}\text{-Kontrolle}$ bzw. $\text{LC}_{50}\text{-BRACO20} / \text{LC}_{50}\text{-Kontrolle}$	0,7	1,0	1,2	0,8

Tab. 16:  $\text{GI}_{50}$  und  $\text{LC}_{50}$  für Cisplatin nach 72h Exposition von SHEP-SF mit und ohne Vorbehandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20

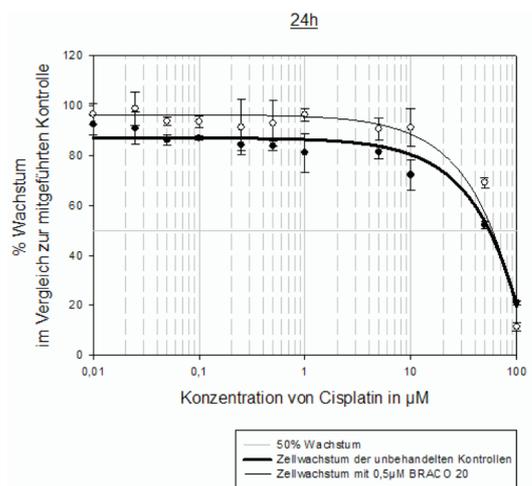
Wie aus Tab. 16 ersichtlich, hatte die Behandlung von SHEP-SF mit BRACO 20

keinen signifikanten Einfluss auf die Sensitivität der Zelllinie gegenüber Cisplatin.

#### 4.3.5 MTT KCN 0,5 $\mu$ M Langzeitversuch

Bei den Langzeitversuchen wurden die MTT-Tests durchgeführt, nachdem die Zellen für mehrere Wochen ununterbrochen mit BRACO 20 behandelt worden waren. In diesem Fall wurden die Zellen der Versuchsgruppe für 5 Wochen nach jeder Passage erneut einer BRACO 20-Konzentration von 0,5  $\mu$ M ausgesetzt.

Abb. 42: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 0,5  $\mu$ M BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration

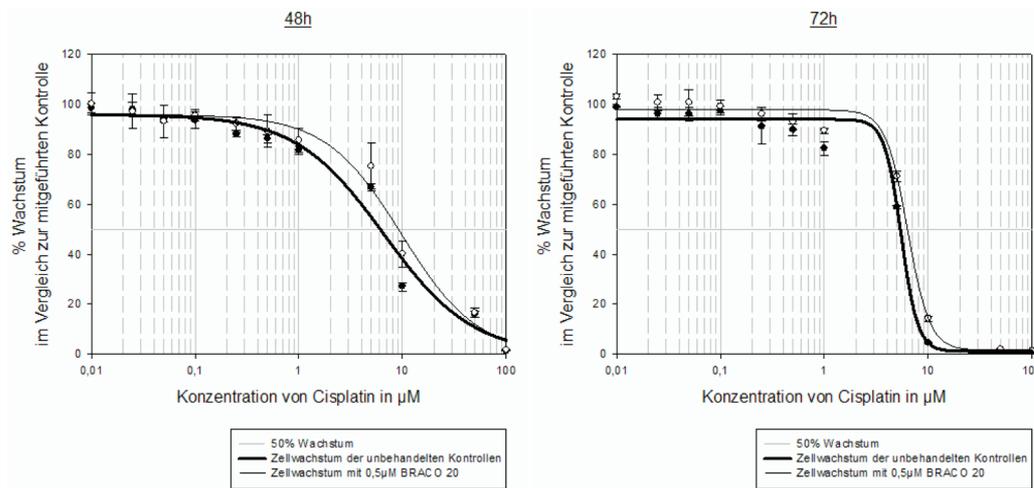


Nach einem Tag zeigte sich ein deutlich vermindertes Wachstum ab Cisplatinkonzentrationen von ca. 10  $\mu$ M. Die Kontrollzellen zeigten dabei eine vergleichbare Sensitivität gegenüber Cisplatin, wie die Zellen, die mit BRACO 20 behandelt worden sind (Abb. 42).

Nach zwei Tagen nahm das Zellwachstum bereits bei einer Cisplatinkonzentration von ca. 1  $\mu$ M Cisplatin ab, wobei auch hier die Versuchsgruppe sich analog zur Kontrollgruppe verhielt, zudem waren auch bei hohen Cisplatinkonzentrationen von 100  $\mu$ M immer noch vitale Zellen messbar. Nach drei Tagen jedoch war die Konzentration, ab der sich die Zellzahl reduzierte, zwar vergleichbar mit der nach zwei Tagen, es waren aber bei hohen Konzentrationen ab ca. 10  $\mu$ M Cisplatin kaum noch vitale Zellen

detektierbar (Abb. 43).

Abb. 43: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



	GI <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]		LC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	5,3	0,4	7,1	k. A.*
BRACO 20	6,3	5,4	7,5	2,9
GI <sub>50</sub> -BRACO20 / GI <sub>50</sub> -Kontrolle bzw. LC <sub>50</sub> -BRACO20 / LC <sub>50</sub> -Kontrolle	1,1	11,5	1,0	k. A.

\* k.A. – LC<sub>50</sub> wurde nicht erreicht (>100  $\mu\text{M}$ )

Tab. 17: GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> für Cisplatin nach 72h Exposition von KCN mit und ohne Vorbehandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20

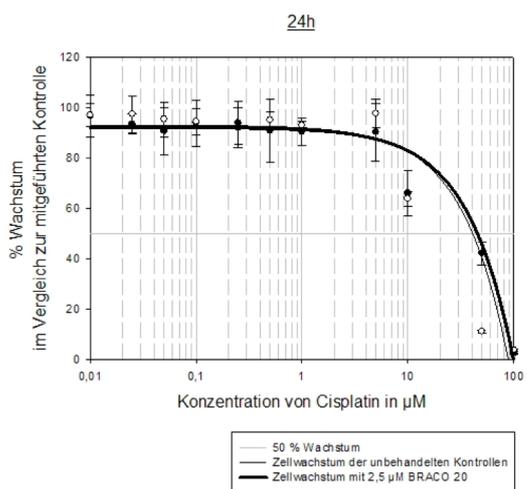
Im ersten Versuch zeigten sich bei der GI<sub>50</sub> und der LC<sub>50</sub> keine Unterschiede zwischen den mit BRACO 20 vorbehandelten und den nicht-vorbehandelten Zellen. In der zweiten Versuchsreihe reagierten die unbehandelten Zellen im Hinblick auf die GI<sub>50</sub> empfindlicher auf Cisplatin als die BRACO 20 behandelten Zellen. Im Hinblick auf die LC<sub>50</sub> mussten die mit BRACO 20 vorbehandelten Zellen als sensitiver gegenüber Cisplatin eingestuft werden, da die LC<sub>50</sub> bei

den unbehandelten Kontrollzellen im Wiederholungsversuch nicht erreicht wurde (k.A.).

#### 4.3.6 MTT KCN 2,5 $\mu$ M Langzeitversuch

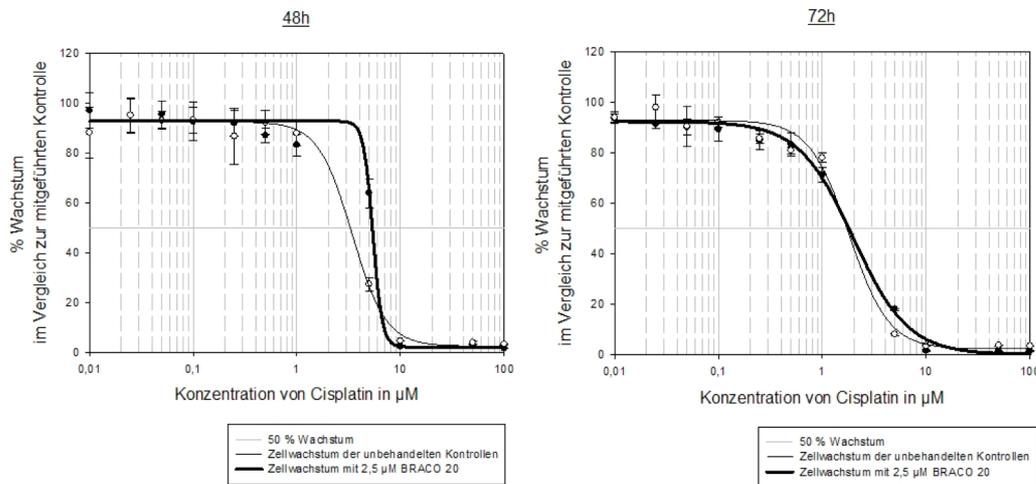
Bei diesem Versuchsansatz konnten die Zellen nur zwei Wochen lang einer BRACO 20 Konzentration von 2,5  $\mu$ M ausgesetzt werden. Eine Kultivierung über zwei Wochen hinaus war nicht möglich, da die Zellen mit zunehmender Versuchsdauer die Fähigkeit zur Teilung verloren hatten. Die nachfolgende Auswertung zeigt das Zellwachstum nach insgesamt zweiwöchiger Inkubation mit 2,5  $\mu$ M BRACO 20.

Abb. 44: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 2,5  $\mu$ M BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Zu Beginn der Versuchsreihe zeigte sich der übliche Kurvenverlauf. Nach 24 h fiel der Anteil an vitalen Zellen ab einer Cisplatinkonzentration von etwa 5  $\mu$ M ab (Abb. 44).

Abb. 45: Wachstum der Zelllinie KCN mit und ohne 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Nach 48h sank der Anteil vitaler Zellen bei Cisplatinkonzentrationen von über 5  $\mu\text{M}$  auf nahezu 0 % ab. Nach 72h fiel die Zahl der vitalen bereits Zellen ab einer Konzentration von etwa 1  $\mu\text{M}$  ab, so dass ab 10  $\mu\text{M}$  nahezu keine vitalen Zellen mehr detektierbar waren (Abb. 45).

	$GI_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]		$LC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	1,7	1,7	4,0	2,5
BRACO 20	1,7	1,4	1,8	2,1
$GI_{50}\text{-BRACO20} / GI_{50}\text{-Kontrolle}$ bzw. $LC_{50}\text{-BRACO20} / LC_{50}\text{-Kontrolle}$	0,9	0,8	0,4	0,8

Tab. 18:  $GI_{50}$  und  $LC_{50}$  für Cisplatin nach 72h Exposition von KCN mit und ohne Vorbehandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20

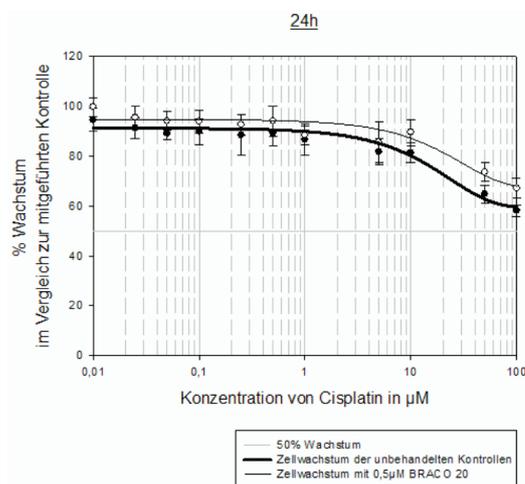
Im ersten Versuch zeigte im Hinblick auf die  $GI_{50}$  die Behandlung mit BRACO 20 keinen Effekt auf Sensitivität der Zellen. Bei den behandelten Zellen wurde allerdings im ersten Versuch bei den mit BRACO 20 behandelten Zellen eine niedrigere  $LC_{50}$  ermittelt. Im Wiederholungsversuch konnte dies allerdings nicht in der Ausprägung bestätigt werden. Hier lagen  $GI_{50}$  und  $LC_{50}$  der behandelten

Zellen um 20% niedriger als die unbehandelten Zellen. Fasst man die  $GI_{50}$  und  $LC_{50}$  Konzentrationen für Cisplatin aus den Versuchen mit den unbehandelten Kontrollen der Langzeitversuche zusammen, dann ergibt sich eine mittlere  $GI_{50}$  von  $2,28 \pm 2,11 \mu\text{M}$  und eine mittlere  $LC_{50}$  von  $4,53 \pm 2,35 \mu\text{M}$ , wobei die  $LC_{50} > 100 \mu\text{M}$  in dem Mittelwert nicht berücksichtigt wurde. Aufgrund der Variabilität und der inkonsistenten Effekte auf  $GI_{50}$  und  $LC_{50}$  in den jeweiligen Versuchsreihen lässt sich eine systematische Beeinflussung der Zytotoxizität des Cisplatins durch BRACO 20 selbst nach einer zweiwöchigen Exposition mit  $2,5 \mu\text{M}$  BRACO 20 ausschließen.

#### 4.3.7 MTT SHEP-SF LZ 0,5 $\mu\text{M}$

Bei diesem Versuch sind die Zellen der Versuchsgruppe nach jeder Passage über 10 Wochen mit  $0,5 \mu\text{M}$  BRACO 20 behandelt worden, bevor sie diesem MTT-Test zugeführt wurden.

Abb. 46: Wachstum der Zelllinie Shep-SF mit und ohne  $0,5 \mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration

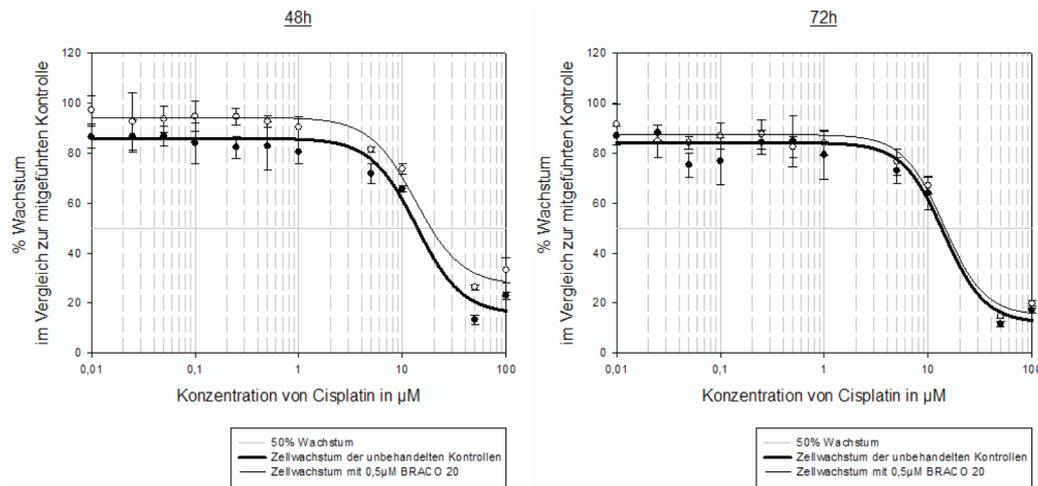


Nach 24 h reagierten diese Zelllinie nicht so stark auf das Cisplatin wie die Zelllinie KCN, bei der bereits ein stark eingeschränktes Zellwachstum zu verzeichnen war. SHEP-SF jedoch reagierte nur mit einer moderaten Abnahme der vitalen Zellen, auch bei hohen Cisplatinkonzentrationen (Abb. 46).

Die Dosis-Wirkungsbeziehungen nach 48h und 72h zeigten vergleichbare

Kurvenverläufe. In beiden Fällen sank der Anteil an vitalen Zellen bei der Höchstkonzentration von Cisplatin (100  $\mu\text{M}$ ) nicht auf 0 % ab, sondern lag etwa bei 20 % (Abb. 47).

Abb. 47: Wachstum der Zelllinie Shep-SF mit und ohne 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



	GI <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]		LC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	13,4	14,7	20,3	18,8
BRACO 20	14,5	13,7	20,0	17,6
GI <sub>50</sub> -BRACO20 / GI <sub>50</sub> -Kontrolle bzw. LC <sub>50</sub> -BRACO20 / LC <sub>50</sub> -Kontrolle	1,0	0,9	0,9	0,9

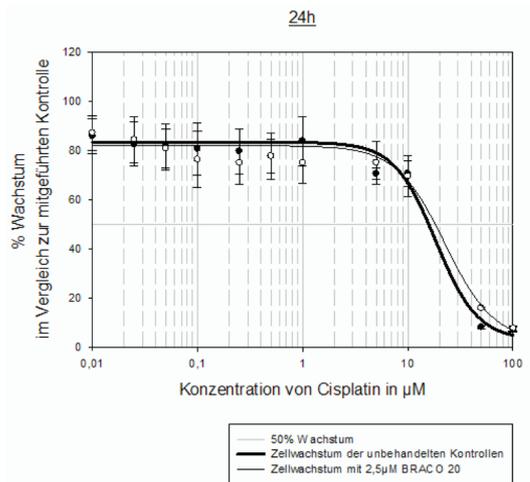
Tab. 19: GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> für Cisplatin nach 72h Exposition von SHEP-SF mit und ohne Vorbehandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20

Hier waren die LC<sub>50</sub> und GI<sub>50</sub> zwischen den mit BRACO 20 behandelten Zellen und den Kontrollzellen in beiden Versuchsreihen vergleichbar, so dass keine Beeinflussung der Toxizität des Cisplatins durch die Vorbehandlung mit Cisplatin ausgemacht werden konnte.

#### 4.3.8 MTT SHEP-SF LZ 2,5 $\mu\text{M}$

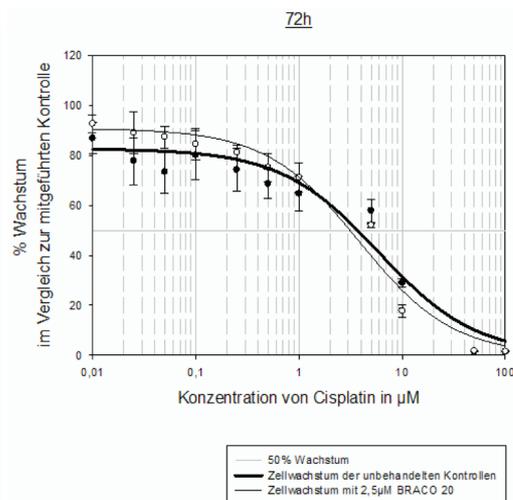
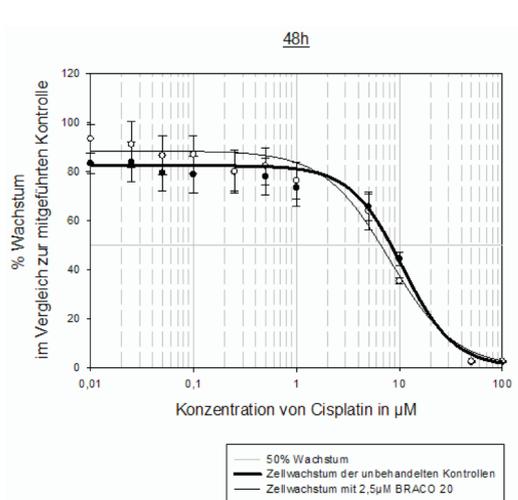
Hierbei wurden die Zellen für eine Woche mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 vorbehandelt, bevor man diese Messungen durchgeführt hat.

Abb. 48: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF mit und ohne 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Nach 24 h reagierten die Zellen, welche mit BRACO 20 vorbehandelt wurden genauso, wie die unbehandelten Zellen. Etwa ab einer Cisplatinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  fiel der Anteil der vitalen Zellen ab, jedoch waren auch bei einer Cisplatinkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  noch ca 7% der Zellen lebensfähig (Abb. 48).

Abb. 49: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF mit und ohne 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 und einer steigenden Cisplatinkonzentration



Der Verläufe der Dosis-Wirkungskurven der unbehandelten und der mit BRACO 20 behandelten Zellen waren nach 48 h und nach 72 h ähnlich. Ab einer Cisplatinkonzentration von etwa 5  $\mu\text{M}$  schränkte sich nach 48 h die Zellvitalität deutlich ein und sank auf ca. 2 % bei 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin. Nach 72 h reagierten die Zellen bereits bei geringeren Cisplatinkonzentrationen um etwa 1  $\mu\text{M}$  mit einem eingeschränkten Zellwachstum. Hier lag der Anteil vitaler Zellen bei 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin um ca. 2%.

	GI <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]		LC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	1,6	3,7	3,2	10,7
BRACO 20	5,4	3,1	5,9	6,5
GI <sub>50</sub> -BRACO20 / GI <sub>50</sub> -Kontrolle bzw. LC <sub>50</sub> -BRACO20 / LC <sub>50</sub> -Kontrolle	3,4	0,8	1,8	0,6

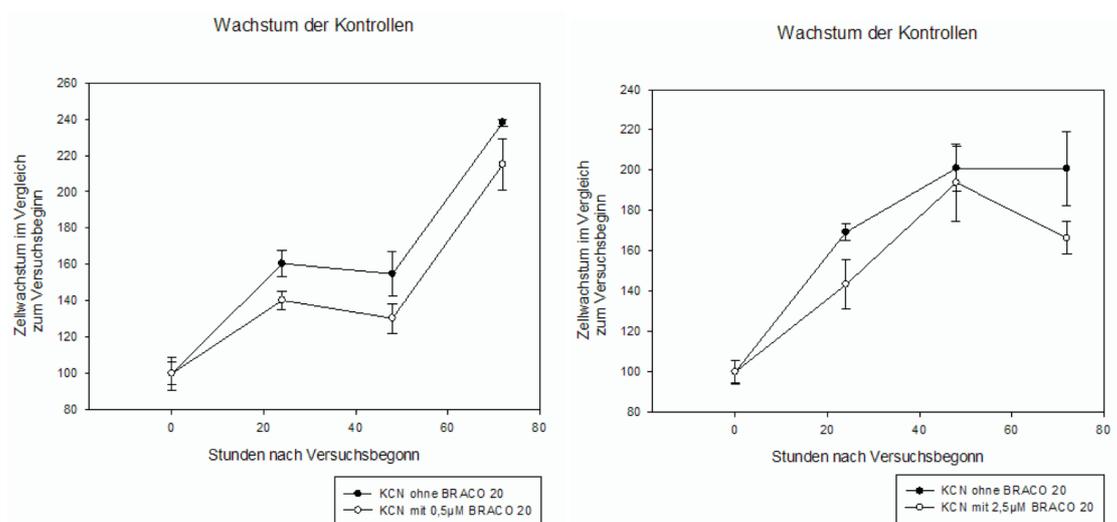
Tab. 20: GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> für Cisplatin nach 72h Exposition von SHEP-SF mit und ohne Vorbehandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20

Im ersten Versuch waren die mit BRACO 20 vorbehandelten Zellen gegenüber Cisplatin deutlich weniger sensibel. Im zweiten Versuch konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden. Die GI<sub>50</sub> der mit BRACO behandelten Zellen war um 20% und die LC<sub>50</sub> um 40% geringer als die der unbehandelten Zellen. Insgesamt lagen im zweiten Versuch GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> für Cisplatin sowohl bei den behandelten als auch bei den unbehandelten Zellen höher. Fasst man die GI<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> Konzentrationen für Cisplatin aus den Versuchen mit den unbehandelten Kontrollen der Langzeitversuche zusammen, dann ergibt sich eine mittlere GI<sub>50</sub> von  $8,35 \pm 6,66 \mu\text{M}$  und eine mittlere LC<sub>50</sub> von  $13,3 \pm 7,92 \mu\text{M}$ . Dies und die inkonsistenten Effekte zwischen der 1. und der 2. Versuchsreihe lassen eine systematische Beeinflussung der Zytotoxizität des Cisplatins durch BRACO 20 nach einer längeren Exposition von SHEP-SF mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 ausschließen.

#### **4.4 Wachstum der Zellen ohne Zugabe von Cisplatin**

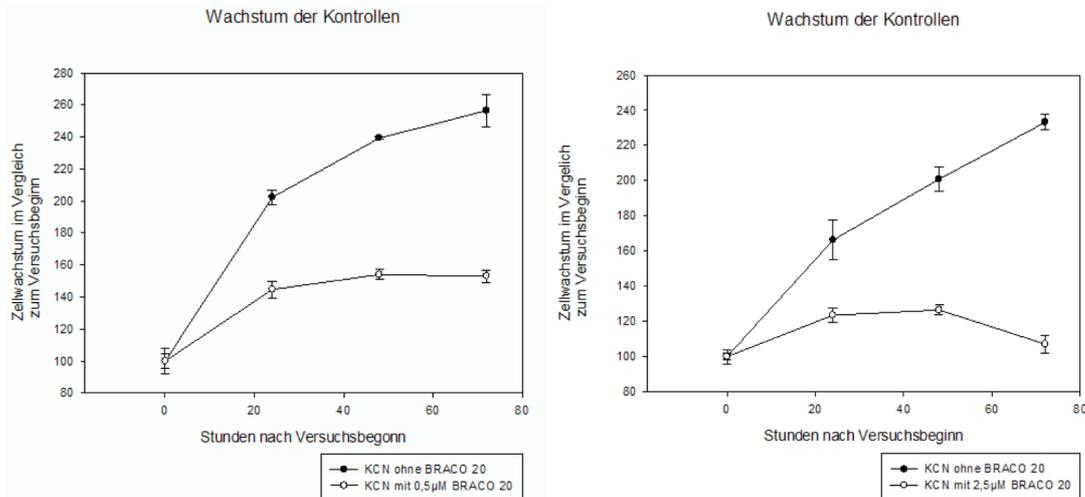
Im Folgenden ist das Wachstum der Zellen der beiden untersuchten Zelllinien dargestellt, welches sich ohne Zugabe von Cisplatin ergab. Dafür wurden jeweils die mitgeführten Kontrollgruppen analysiert, die mit 0  $\mu\text{M}$  Cisplatin zusätzlich behandelt wurden. Die Zelllinien KCN und SHEP-SF sind dabei aber jeweils mit 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 inkubiert worden.

Abb. 50: Wachstum der Zelllinie KCN ohne und mit BRACO 20 (0,5 $\mu\text{M}$  bzw. 2,5 $\mu\text{M}$ )



Wie in der Abb. 50 zu sehen ist, war das Wachstum der Zellen der Zelllinie KCN vermindert, die mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 behandelt worden sind. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich nach einer Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20. Die Hemmung des Wachstumverhalten war allerdings deutlich geringer ausgeprägt als nach einer Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 über 5 Wochen bzw. mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 über 2 Wochen (Abb. 51).

Abb. 51: Wachstum der Zelllinie KCN ohne und mit BRACO 20 nach 5-wöchiger Behandlung mit 0,5µM BRACO 20 bzw. einwöchiger Behandlung mit 2,5µM BRACO 20



Die mit 0,5 µM BRACO 20 behandelten Zellen wiesen dabei ein deutlich vermindertes Wachstum verglichen mit den unbehandelten Zellen auf. Auch die Zellen, die mit 2,5 µM BRACO 20 behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen eine Reduktion des Zellwachstums. Während die Kontrollzellen über 72h unvermindert weiterwuchsen, war bei den mit BRACO 20 behandelten Zellen nur innerhalb der ersten 24h noch Zellwachstum zu beobachten. Bei den mit 0,5 µM BRACO 20 behandelten Zellen stagnierte danach das Zellwachstum bis 72h, während in den mit 2,5 µM behandelten Zellen die Zellzahl nach 48h Stunden sogar abnahm.

Die Zelllinie SHEP-SF reagierte insgesamt unempfindlicher auf BRACO 20. Sowohl eine Behandlung mit 0,5 µM als auch die Behandlung mit 2,5 µM BRACO 20 hatte nach einer Woche keine Veränderung des Wachstumsverhaltens gegenüber der mitgeführten Kontrolle zur Folge (vgl. Abb. 52).

Abb. 52: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF ohne und mit BRACO 20 (0,5µM bzw. 2,5µM)

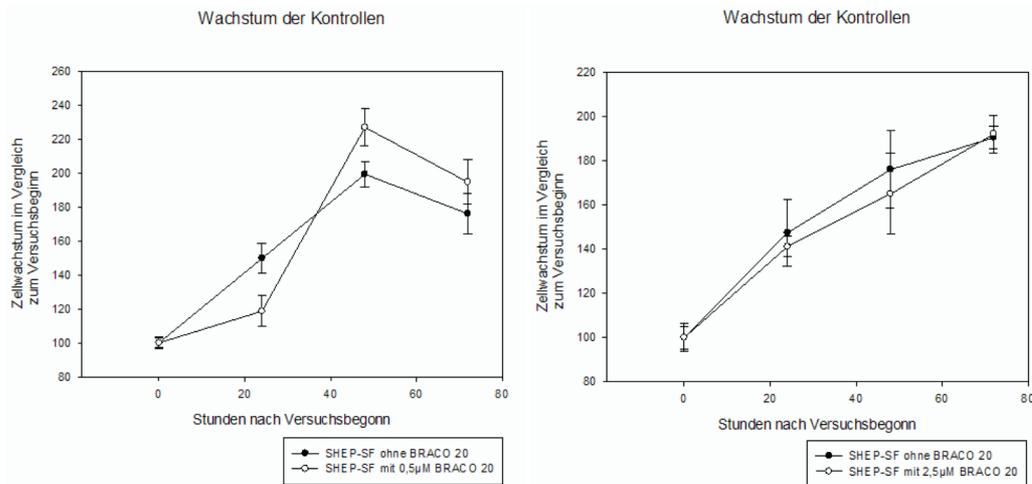
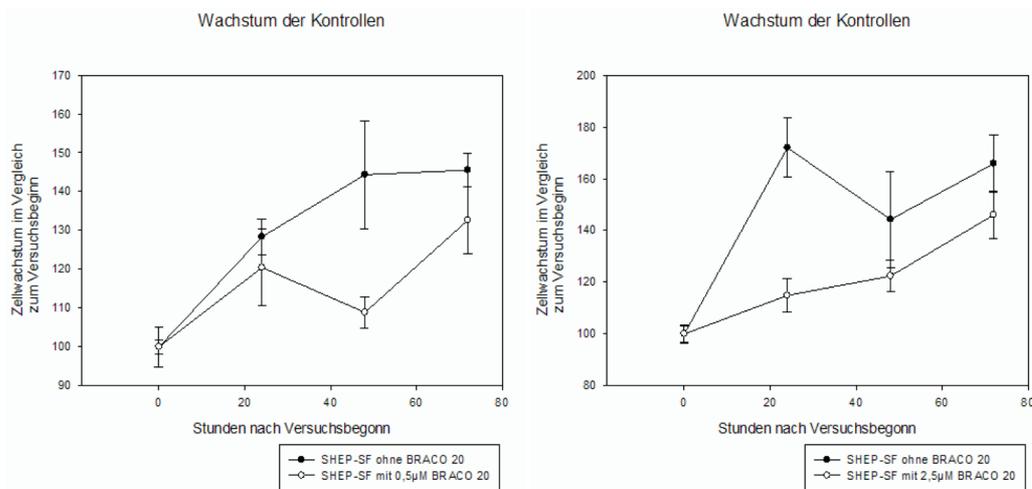


Abb. 53: Wachstum der Zelllinie SHEP-SF ohne und mit BRACO 20 (0,5µM bzw. 2,5µM) nach 10 bzw. 2 wöchiger Behandlung



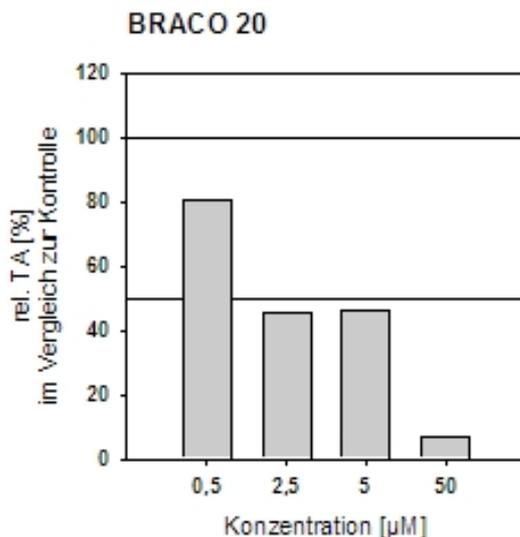
Wurden die Zellen über einen Zeitraum von 10 (0,5 µM) bzw. 2 (2,5 µM) Wochen mit BRACO 20 behandelt, war das Wachstum der Zellen, die mit 0,5 µM BRACO 20 behandelt wurden, vorübergehend eingeschränkt. Insgesamt konnte aber unter beiden BRACO 20 Konzentrationen eine Zunahme vitaler Zellen beobachtet werden.

## 4.5 Telomeraseaktivität

Nach den Angaben des Herstellers hemmte BRACO 20 die Telomerase mit einer  $IC_{50}$  von 74 nM. Um sicherzugehen, dass die Substanz, die von Prof. Neidle zur Verfügung gestellt wurde, die Telomerase-Aktivität inhibiert, wurden Zelllysate der Neuroblastomzelllinien KCN mit unterschiedlichen BRACO 20 Konzentrationen über 1h inkubiert und anschließend wurde die Telomerase-Aktivität mit dem TRAP Assay analysiert.

Die beobachtete  $IC_{50}$  war höher als die vom Hersteller angegebene  $IC_{50}$ , so hemmten 0,5  $\mu$ M BRACO 20 die Telomerase-Aktivität im Lysat zu 20%, bei 2,5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M BRACO 20 wurde die Aktivität der Telomerase im Zelllysate zu etwa 50% gehemmt, während es bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M BRACO 20 zu einer 90%igen Hemmung der Telomerase-Aktivität kam (vgl. Abb. 54).

Abb. 54: Hemmung der Telomerase-Aktivität in Proteinlysaten der Neuroblastomzelllinien KCN durch BRACO 20



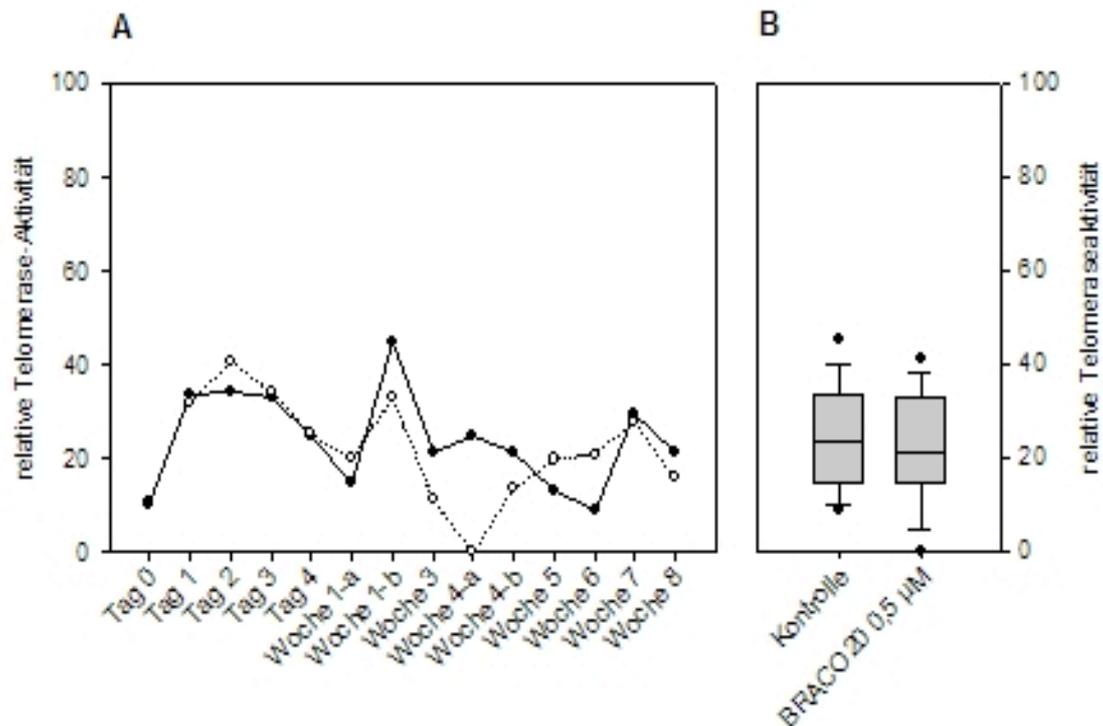
So zeigte sich zwar bei 2,5  $\mu$ M BRACO 20 eine deutliche Hemmung der Telomerase-Aktivität, aber bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M BRACO 20 war nur eine geringe Hemmung der Telomerase-Aktivität im Zelllysate nachweisbar, obwohl diese Konzentration deutlich über der vom Hersteller angegebenen  $IC_{50}$  Konzentration lag. Höhere BRACO 20 Konzentrationen konnten für die

geplanten Kombinations- und Langzeitversuche nicht eingesetzt werden, da ab einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  BRACO 20 deutliche Toxizität gegenüber den Zelllinien KCN und SHEP-SF zeigte. Selbst eine Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 konnte bei der Zelllinie KCN nicht länger als eine Woche eingesetzt werden.

#### 4.5.1 Telomeraseaktivität KCN 0,5 $\mu\text{M}$ BRACO 20

Die Zelllinie KCN konnte mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 über einen Zeitraum von 8 Wochen behandelt werden. Bei jeder Zellpassage bzw. jedem Wechsel des Zellkulturmediums wurde erneut BRACO 20 zugesetzt, so dass das Zellkulturmedium ununterbrochen 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 enthielt. Parallel dazu wurden KCN Zellen kultiviert, die nicht mit BRACO 20 behandelt wurden. Bei jeder Zellpassage wurden Kontrollzellen und mit BRACO 20 behandelte Zellen zur Bestimmung der Telomeraseaktivität entnommen. Abb. 55 fasst die relative Telomeraseaktivität in den behandelten und den nicht behandelten Kontrollzellen über die Zeit zusammen.

Abb. 55: **A.** Relative Telomeraseaktivität der Zelllinie KCN nach Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 (-o-) und in den nicht behandelten Kontrollzellen (-•-) über einen Zeitraum von 8 Wochen. **B.** Box Plot der relativen Telomeraseaktivität in den mit BRACO 20 behandelten und den nicht behandelten Kontrollzellen.

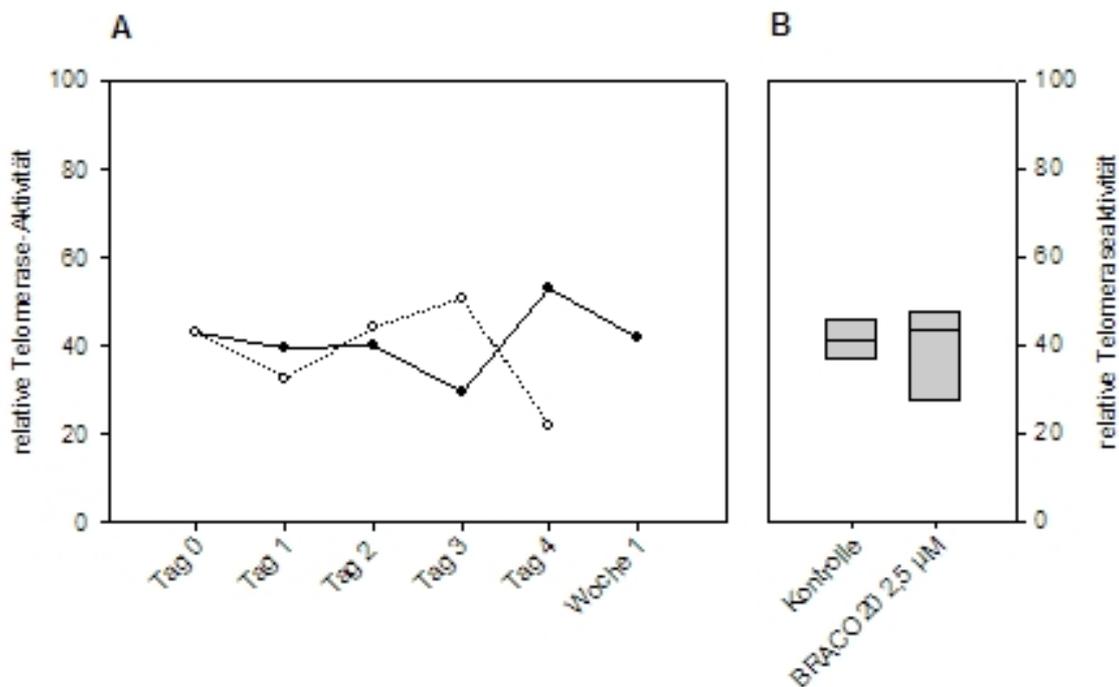


Im Versuchsverlauf waren sowohl bei den mit BRACO 20 behandelten als auch in den Kontrollzellen Schwankungen der Telomeraseaktivität zu beobachten. Dabei war zwischen der 1. und 4. Woche die Telomeraseaktivität in den behandelten Zellen niedriger als in den Kontrollzellen. Allerdings lag die Telomeraseaktivität der behandelten Zellen in der 5. und 6. Woche über der in den Kontrollzellen bestimmten Telomeraseaktivität. Zusammengefasst ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Telomeraseaktivität in den unbehandelten und den mit BRACO 20 behandelten Zellen ( $p > 0,5$ , paired t-Test).

#### 4.5.2 Telomeraseaktivität KCN 2,5 $\mu$ M BRACO 20

Mit 2,5  $\mu$ M BRACO 20 konnten die KCN Zelllinien nur über einen Zeitraum von einer Woche inkubiert werden. Eine Behandlung über einen längeren Zeitraum erwies sich als nicht möglich, da spätestens nach zwei Wochen die Zellen starben. Selbst nach einer Woche konnte nicht mehr ausreichend Material extrahiert werden, um die TA zu bestimmen (vgl. Abb. 56).

Abb. 56: **A.** Relative Telomeraseaktivität der Zelllinie KCN nach Behandlung mit 2,5  $\mu$ M BRACO 20 (-o-) und in den nicht behandelten Kontrollzellen (-•-) über einen Zeitraum von einer Wochen. **B.** Box Plot der relativen Telomeraseaktivität in den mit BRACO 20 behandelten und den nicht behandelten Kontrollzellen.



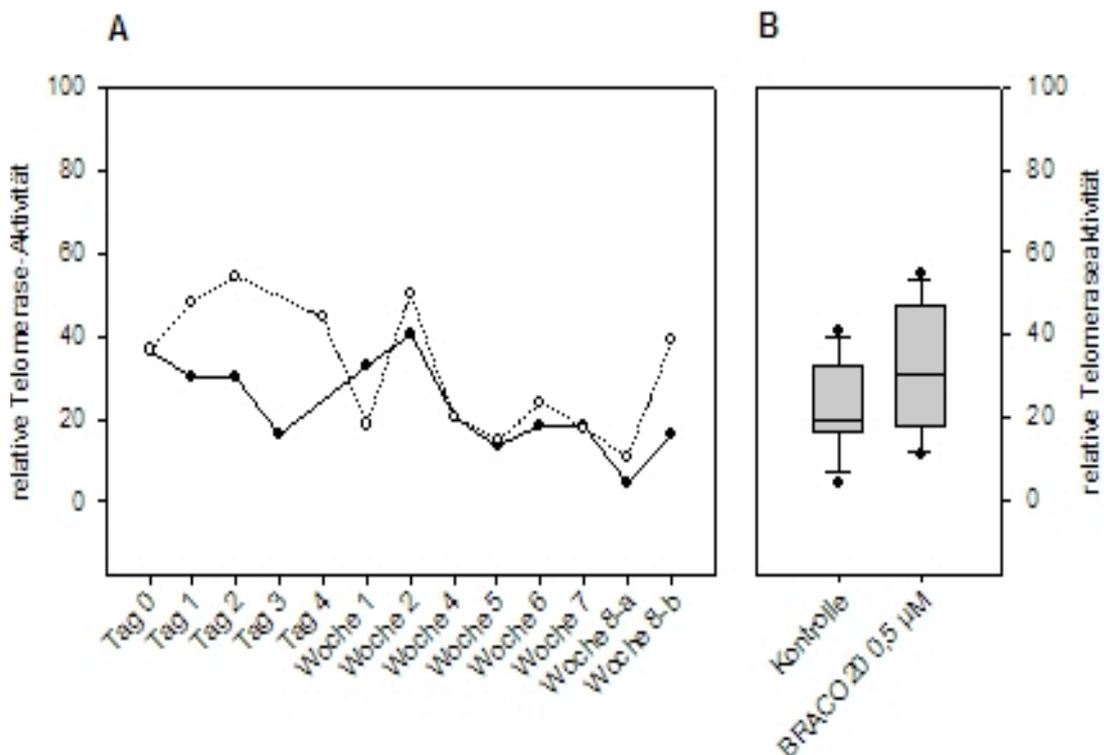
In den ersten Tagen konnte mit der höheren BRACO 20 Konzentration keine deutliche Reduktion der Telomeraseaktivität beobachtet werden. Am 4. Behandlungstag lag die Telomeraseaktivität in den behandelten Zellen deutlich niedriger als in den Kontrollzellen. Am Tag 7 war allerdings die Zellzahl bei den mit BRACO 20 behandelten Zellen soweit reduziert, dass nicht mehr genügend Zellen für die Bestimmung der Telomeraseaktivität gewonnen werden konnten.

Zusammenfassend ergab sich im Beobachtungszeitraum kein statistisch signifikante Reduktion der Telomeraseaktivität in KCN Zellen durch die Behandlung mit BRACO 20 ( $p > 0,5$ , paired t-Test).

#### 4.5.3 Telomeraseaktivität SHEP-SF 0,5 $\mu$ M BRACO 20

Bei diesem Versuchsansatz konnten die Zellen der Linie SHEP-SF für insgesamt 8 Wochen mit 0,5  $\mu$ M BRACO 20 behandelt werden. Die Auswirkungen der Behandlung auf die Telomeraseaktivität sind im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen in der Abb. 57 zusammengefasst.

Abb. 57: **A.** Relative Telomeraseaktivität der Zelllinie SHEP-SF nach Behandlung mit 0,5  $\mu$ M BRACO 20 (-○-) und in den nicht behandelten Kontrollzellen (-●-) über einen Zeitraum von 8 Wochen. **B.** Box Plot der relativen Telomeraseaktivität in den mit BRACO 20 behandelten und den nicht behandelten Kontrollzellen.



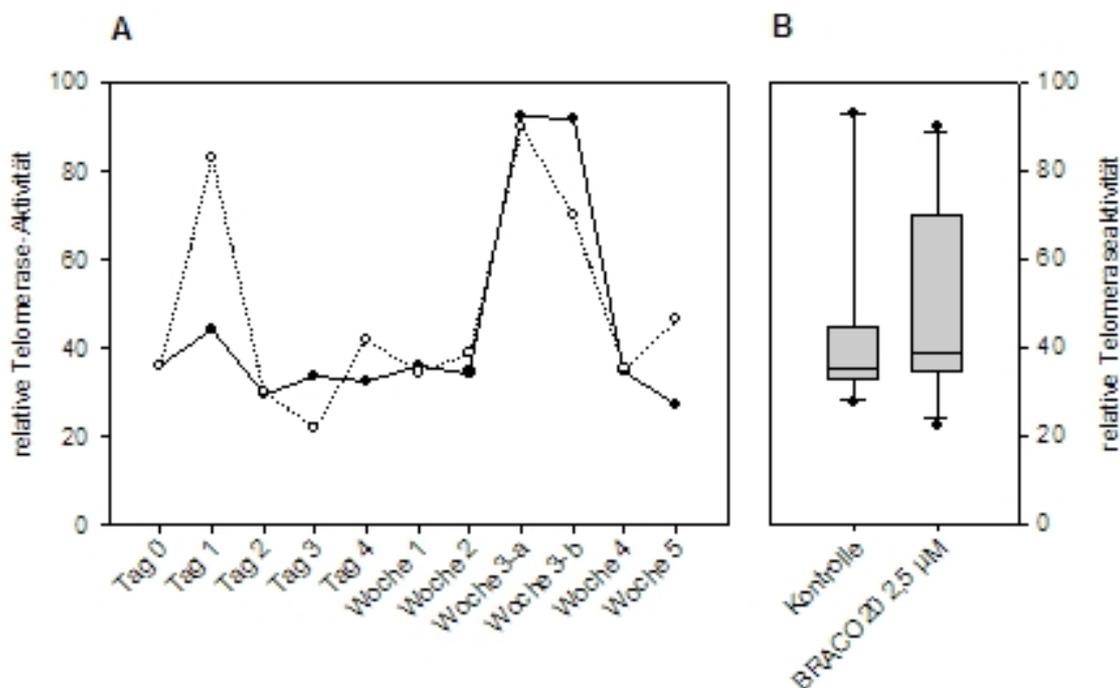
Bei der Zelllinie SHEP-SF, die mit 0,5  $\mu$ M BRACO 20 behandelt wurde, zeigte initial paradoxerweise eine Steigerung der Telomeraseaktivität bei den

behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Diese Unterschiede waren allerdings nach eine Woche nicht mehr zu beobachten. Insgesamt war über den Beobachtungszeitraum keine signifikante Veränderung der Telomeraseaktivität durch die Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  nachweisbar ( $p > 0,5$ , paired t-Test).

#### 4.5.4 Telomeraseaktivität SHEP-SF 2,5 $\mu\text{M}$ BRACO 20

Die Zelllinie SHEP-SF ist über einen Zeitraum von 5 Wochen mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 behandelt worden.

Abb. 58: **A.** Relative Telomeraseaktivität der Zelllinie SHEP-SF nach Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 (-○-) und in den nicht behandelten Kontrollzellen (-●-) über einen Zeitraum von 5 Wochen. **B.** Box Plot der relativen Telomeraseaktivität in den mit BRACO 20 behandelten und den nicht behandelten Kontrollzellen



Die Zelllinie SHEP-SF reagierte nicht so empfindlich auf eine 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 Behandlung wie die Zelllinie KCN und konnte über einen Zeitraum von 5 Wochen behandelt werden. Innerhalb dieses Beobachtungszeitraumes wurde am Tag 1 vorübergehend ein Anstieg der Telomeraseaktivität beobachtet. In

der dritten Behandlungswoche wurde sowohl bei den behandelten als auch bei den unbehandelten SHEP-SF Zellen ein Anstieg der Telomeraseaktivität gemessen. Insgesamt konnte aber auch in dieser Serie keine signifikante Beeinflussung der Telomeraseaktivität durch BRACO 20 nachgewiesen werden ( $p > 0,5$ ; paired t-Test).

#### 4.5.5 Methodenvergleich Taqman vs konventioneller TRAP-Assay mit Fragmentanalyse

Neben dem etablierten TRAP Assay wurde zur Bestimmung der Telomerase Aktivität eine weitere Methode angewandt. Dieses Verfahren beruhte auf der Real-Time PCR. Analog zum TRAP Assay wurden Proteinlysate mit einem Mix aus Telomertemplates und entsprechenden Primern bei 37°C über einen definierten Zeitraum inkubiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation der synthetisierten Telomeren unter Zusatz des fluoreszierenden DNA Farbstoffes SybrGreen®, wobei nach jedem PCR Zyklus die Fluoreszenz im Inkubationsansatz gemessen wurde. Der Übergang der PCR in die exponentielle Phase korrespondierte mit der Menge an synthetisiertem Telomeren Template und gab damit direkt Aufschluss über die Telomerase Aktivität im Proteinlysat. Im Unterschied dazu mussten beim TRAP Assay nach der Amplifikation der synthetisierten Telomeren, diese elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert werden. Die auf der Real-Time PCR basierende Methode war erst kurz zuvor publiziert worden und sollte im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit untersucht werden<sup>46</sup>.

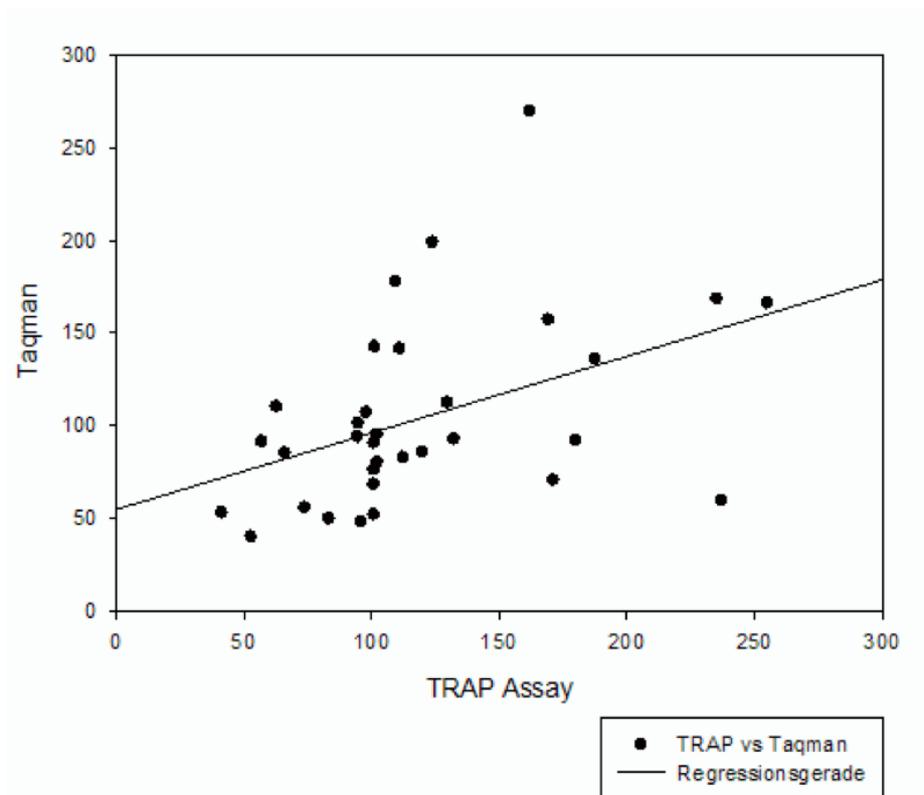
Dazu wurden alle Proben die vor und unter der Behandlung mit BRACO 20 bezüglich der Telomerase Aktivität mit dem TRAP Assay untersucht wurden auch der Real-Time PCR basierten Methode unterzogen.

In Abb. 59 sind die relative Telomerase Aktivitäten, gemessen mit dem TRAP Assay und der Real-Time PCR basierten Methode gegenüber gestellt.

Zwischen beiden Methoden bestand eine signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ , Pearson Product Moment Correlation). Allerdings ergab sich aus dem Korrelationskoeffizient von 0,432 nur eine geringe Korrelation ( $< 0,5$ ) zwischen

den Messergebnissen. Die Steigung der Regressionsgeraden mit 0,4 zeigte, dass insgesamt mit dem TRAP Assay höhere relative Telomerase Aktivitäten gemessen wurden als mit der Real-Time PCR. Die Regressionsgerade schneidet die y Achse nicht im Nullpunkt. Keine Aktivität im TRAP Assay würde demnach immer noch zu einer messbaren Telomerase Aktivität mit der Real-Time PCR führen.

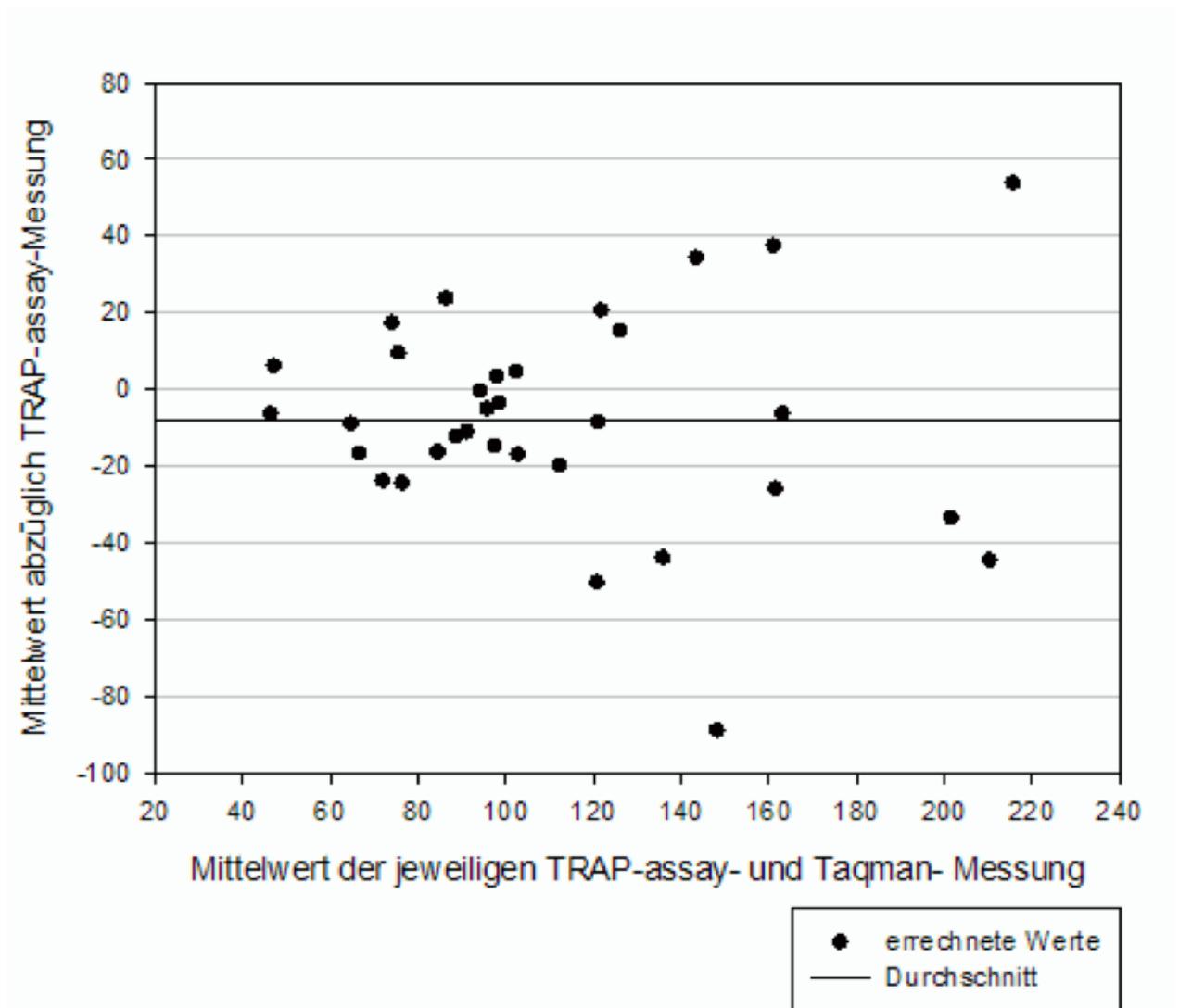
Abb. 59: Relative Telomerase Aktivität gemessen mit dem TRAP Assay und der Real-Time PCR basierten Methode (Taqman®).



Der Bland-Altman-Test bestätigte die Ergebnisse der Korrelationsanalyse, so wurden insgesamt mittels TRAP Assay höhere relative Telomerase Aktivitäten gemessen als mit der Real-Time PCR Methode. Insgesamt streuten die Ergebnisse gleichmäßig den Mittelwert, so dass eine systematische methodisch bedingte Verzerrung der Messergebnisse ausgeschlossen werden konnte. Ausgeprägte Differenzen waren speziell bei der Bestimmung hoher

Telomerase-Aktivitäten zu beobachten.

Abb. 60: Bland-Altman Analyse der mit dem TRAP Assay und der Real-Time PCR basierten Methode gemessenen Telomerase-Aktivität

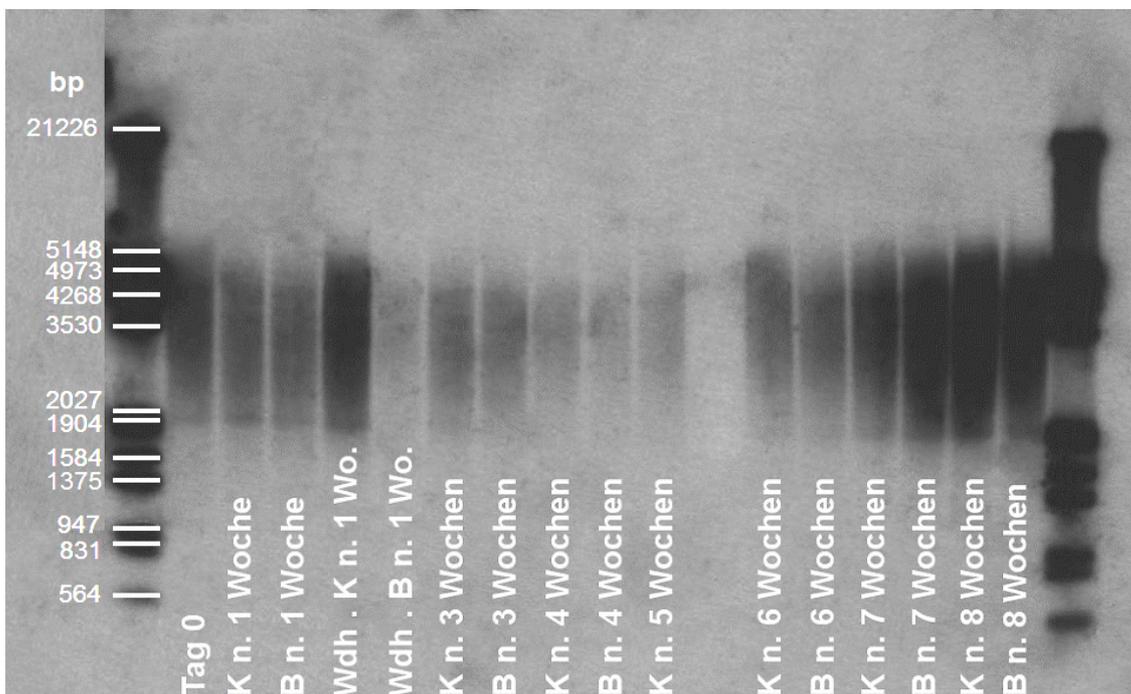


## 4.6 Southern-Blots

### 4.6.1 KCN 0,5µM BRACO 20

Die Behandlung mit 0,5 µM BRACO 20 hatte analog zu der fehlenden Hemmung der Telomerase Aktivität bei der Zelllinie KCN keine Auswirkungen auf die Telomerenlängen (Abb. 61)

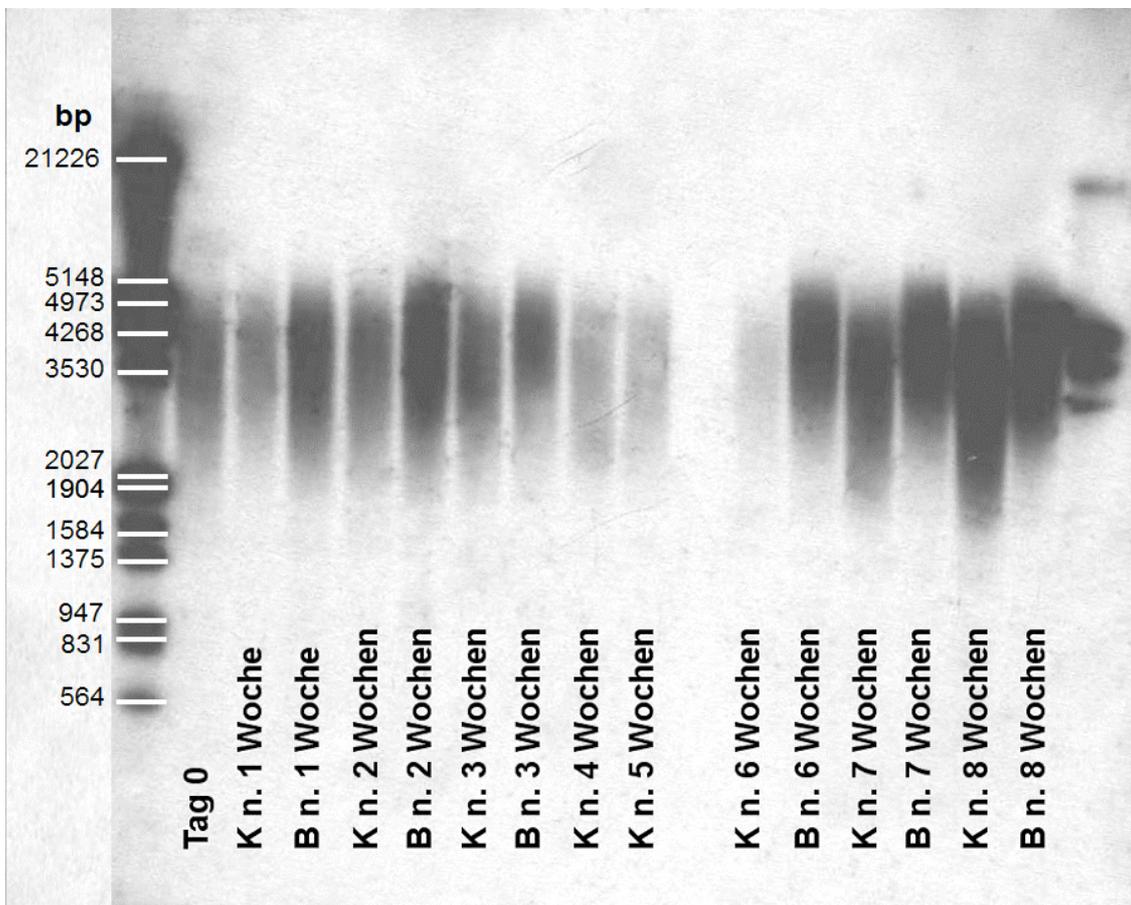
Abb. 61: Telomerlängen der Zelllinie KCN nach Behandlung mit 0,5µM BRACO 20 (K = Kontrolle, B = mit BRACO 20 behandelt)



### 4.6.2 SHEP-SF 0,5µM BRACO 20

Bei der Zelllinie SHEP-SF zeigte sich dagegen wider Erwarten nach etwa sechswöchiger Behandlung mit 0,5 µM BRACO 20 eine Verlängerung der Telomeren (vgl. Abb. 62).

Abb. 62: Telomerlängen der Zelllinie SHEP-SF nach Behandlung mit 0,5µM BRACO 20 (K = Kontrolle, B = mit BRACO 20 behandelt)



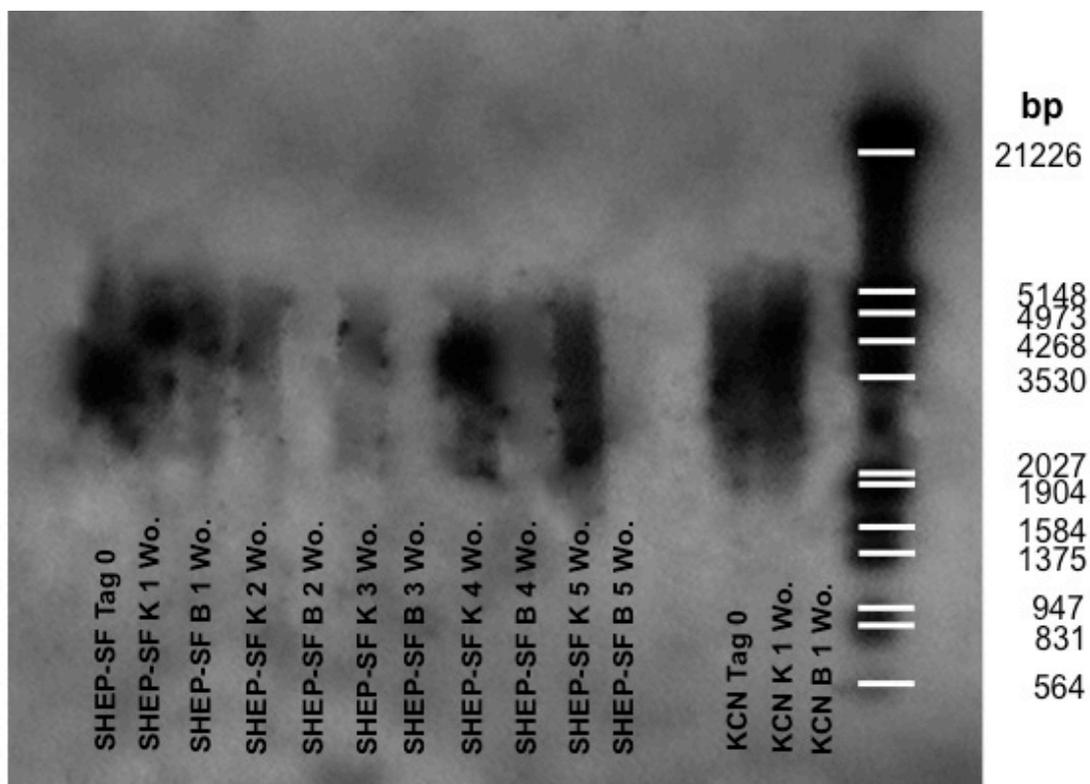
#### 4.6.3 KCN und SHEP-SF 2,5 µM BRACO 20

Nach 4 wöchiger Behandlung mit 2,5 µM BRACO 20 ließ sich bei der Zelllinie SHEP-SF keine Veränderung der Telomerlänge nachweisen. Leider stand für den Southern Blot nach 5 wöchiger Behandlung und nach 2 und 3 wöchiger Behandlung nicht genügend DNA zur Verfügung, um die Telomerlänge darzustellen.

Die Zelllinie KCN konnte nur über eine Woche behandelt werden und auch hier war in der behandelten Gruppe nach einer Woche nicht genügend Material extrahierbar. Letzendlich konnte so bzgl. der Zelllinie KCN keine Aussage zur Änderung der Telomerlängen erhoben werden und bei der Zelllinie SHEP-SF

war zumindest nach 4 wöchiger Behandlung kein Unterschied feststellbar (Abb.: 63).

Abb. 63: Telomerlängen der Zelllinien SHEP-SF und KCN nach Behandlung mit 2,5 µM BRACO 20 (K = Kontrolle, B = mit BRACO 20 behandelt)



## 5 Diskussion

### 5.1 Warum Telomeraseinhibition bei der Behandlung des Neuroblastoms?

Leider bleiben auch heute trotz vieler unterschiedlicher Behandlungsmethoden insbesondere fortgeschrittene Tumorerkrankungen meistens unheilbar. Durch Erschließung alternativer Behandlungsmethoden, wie beispielsweise die Antikörpertherapie oder speziell beim Neuroblastom die MIBG-Therapie oder die Behandlung mit Vitamin-A-Derivaten, kann die Prognose verbessert werden. Leider stellt aber besonders die Behandlung des fortgeschrittenen Neuroblastoms immer noch ein Problem dar, so dass hier weitere Therapiealternativen bzw. adjuvante Behandlungsmodalitäten gefragt sind. Da in fortgeschrittenen Neuroblastomen die Telomeraseaktivität in den meisten Fällen stark erhöht ist<sup>43,70,72</sup>, scheint es sinnvoll, dass an dieser Stelle versucht wird, die therapeutischen Optionen zu erweitern. Eine gezielte Reduktion der Telomeraseaktivität könnte eine nebenwirkungsarme und trotzdem effiziente Verbesserung bei der Behandlung des Neuroblastoms bewirken. So haben z.B. Binz et al. die Wirkung des Telomeraseinhibitors Telomestatin an Neuroblastomzellen untersucht. Dabei bewirkte eine hohe Dosierung eine akutzytotoxische Wirkung. In niedriger, nicht zytotoxischer aber telomerasehemmender Dosierung, konnte neben einer Verkürzung der Telomeren auch eine Wachstumshemmung und eine vermehrte Apoptose beobachtet werden. Diese Auswirkungen traten, wie zu erwarten, erst nach einer längeren Behandlung mit Telomestatin ein<sup>10</sup>.

Eine alleinige Behandlung mit einem Telomeraseinhibitor stellt dabei aufgrund der Wirklatenz keine Option dar. Wie bereits erläutert, tritt eine Hemmung des Tumorwachstums erst dann ein, wenn die Telomeren der Krebszellen nach einer entsprechenden Anzahl von Zellteilungen unter Telomerase-Hemmung eine kritische Länge erreicht haben und in das Stadium der Seneszenz eingetreten sind. Diese Wirklatenz ist aber insbesondere bei malignen Erkrankungen inakzeptabel und muss mit anderen, bereits etablierten Therapieoptionen überbrückt werden.

Vielfach wird die Kombination von klassischen Chemotherapeutika mit einem Telomeraseinhibitor befürwortet, da zum Teil durch die zusätzliche Hemmung der Telomerase eine verbessertes Ansprechen der Tumorzellen auf die Behandlung beobachtet werden konnte<sup>69,86</sup>.

Bei der Behandlung des Neuroblastoms werden seit vielen Jahren Zytostatika wie Etoposid, Doxorubicin, Ifosfamid oder Cisplatin erfolgreich zur Bekämpfung des Tumors eingesetzt. Dies wäre somit eine gute Möglichkeit zur Zeitüberbrückung bis zum Wirkeintritt des Telomeraseinhibitors. Aufgrund seines Wirkungsmechanismus scheint gerade Cisplatin ein vielversprechender Kandidat für die Kombinationsbehandlung. Cisplatin wird intrazellulär in einen sogenannten Aquo-Komplex umgewandelt. Dabei handelt es sich um ein stark nukleophiles Agens, welches in der Zelle zu einer Übertragung des Platins auf nukleophile Gruppen führt, wie beispielsweise dem N7 im Heterozyklus des Guanins in der DNA oder Amino- und Thiolgruppen in Aminosäuren und Proteinen. Durch die Behandlung mit Cisplatin kommt es speziell bei benachbarten Guanin-Basen in der DNA zur Ausbildung sogenannter „Intrastrand-Cross-Links“. Da auch die Telomeren mit ihren TTAGGG-Repeats reich an Guanin-Basen sind, stellen sie u.a. eine Zielstruktur für Cisplatin dar. Somit erscheint die Kombination mit Telomerase-Hemmstoffen speziell vor dem Hintergrund des klinischen Stellenwertens des Cisplatins evaluierenswert.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf den Telomeraseinhibitor BRACO 20 gelegt und dessen Wirkung in Kombination mit Cisplatin getestet. Hierfür wurde zunächst die Toxizität des neuen Wirkstoffes an zwei permanenten humanen Neuroblastomzelllinien untersucht. Diese Zelllinien können in der Zellkultur beliebig vermehrt werden und stehen so über einen beliebigen Zeitraum in vergleichbarer Qualität mit identischen Eigenschaften auch für Wiederholungsanalysen zur Verfügung. Allerdings repräsentieren Zelllinien nur den Subklon des ursprünglichen Tumorgewebes und zwar den, für den die gewählten Kulturbedingungen die optimalen Wachstumsbedingungen darstellen. Überdies stammen viele Zelllinien von bereits behandelten Tumoren ab, so dass von eher therapieresistenten Tumoren auszugehen ist<sup>42</sup>. Damit

bilden die humanen Tumorzelllinien in vitro zwar Tumorzellen mit ihren entsprechenden genetischen Charakteristika ab, allerdings kann damit kein reales heterogenes Tumorgewebe simuliert werden. Die Zelllinien wachsen in der Zellkultur in vitro in Form eines „Zellrasens“ am Boden der Zellkulturflasche, so dass Tumoreigenschaften, wie z.B. Vaskularisierung, Tumor-Stroma-Interaktion oder Gewebehypoxie nicht nachgeahmt werden. Auch die Exposition von Tumorzellen gegenüber aktiven Substanzen ist in vitro anders als in vivo. In der Zellkultur werden die Zellen gleichmäßig über einen definierten Zeitraum mit der Testsubstanz behandelt. Physiologische Eliminationsprozesse, wie hepatische Metabolisierung und renale Exkretion finden nicht statt. Auch ist die Proteinbindung von Testsubstanzen nur sehr begrenzt mit der im Serum von Menschen vergleichbar. Desweiteren sind die Degradationsprozesse in der Zellkultur nur bedingt mit der Metabolisierung im Organismus vergleichbar<sup>95</sup>.

Trotz dieser Limitationen eignen sich in vitro-Chemosensitivitätstestungen grundsätzlich, um Hinweise auf das zytotoxische Potential von Testsubstanzen zu ermitteln, die bei Tumoren eine Wirkung zeigen könnten. Reproduzierbare Hinweise auf Wirksamkeit in der Zellkultur liefern die Rationale für weitergehende präklinische Untersuchungen im Tiermodell. Die Zytotoxizitätstestungen wurden mit dem standardisierten und etablierten MTT-Test durchgeführt. Jede Testkonzentration wurde pro Versuchsansatz 4-mal getestet und jeder Versuchsansatz wurde unabhängig vom ersten Versuchsansatz ein weiteres Mal wiederholt.

Unter der Annahme, dass BRACO 20 mit jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomeren führt, welches wiederum eine Zunahme der Sensibilität der Zellen mit sich bringen könnte, sollten die Zelllinien über einen möglichst langen Zeitraum mit BRACO 20 behandelt werden, um dann die Zytotoxizität von Cisplatin mittels MTT-Test zu ermitteln. Überdies könnte eine Hemmung der Telomerase neben den Effekten durch die Verkürzung der Telomeren auch andere zellbiologische Funktionen beeinflussen, welche sich dann auf die Wirksamkeit von Cisplatin auswirken könnten. Um dies zu untersuchen, wurde auch zu Beginn der Behandlung mit BRACO 20 eine Zytotoxizitätsanalyse von

Cisplatin durchgeführt. Parallel zu den Versuchen wurden Zellen für die Analyse der Telomerase-Aktivität und der Telomerenlängen asserviert, um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte mit einer Reduktion der Telomeraseaktivität bzw. einer Veränderung der Telomerenlängen einhergingen.

Wie auch schon für andere Telomeraseinhibitoren, wie beispielsweise Telomestatin beschrieben, war auch unter BRACO 20 eine akuttoxische Wirkung auf die untersuchten Zelllinien zu beobachten, wobei die beiden untersuchten Zelllinien unterschiedlich empfindlich auf die Testsubstanz reagierten. Nach 96 Stunden lagen z.B. bei der Zelllinie KCN die  $GI_{50}$  bei 16,8  $\mu\text{M}$  und die  $LC_{50}$  bei 88,5  $\mu\text{M}$ , und bei der Zelllinie SHEP-SF die  $GI_{50}$  bei 64,6  $\mu\text{M}$  und die  $LC_{50}$  bei 108  $\mu\text{M}$  BRACO 20, somit reagierte die Zelllinie KCN empfindlicher auf die Substanz als die Zelllinie SHEP-SF. Anhand dieser Ergebnisse wurden daraufhin für die Langzeitversuche Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  und 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 gewählt, die wenigstens 34 mal bzw. 7 mal unter der niedrigsten gemessenen  $GI_{50}$  lagen, aber um den Faktor 7 bzw. 35 oberhalb der vom Hersteller angegebenen telomerasehemmenden Konzentration von 74 nM.

Versuche an Zelllysaten der Zelllinie KCN zeigten allerdings, dass mit 0,5  $\mu\text{M}$  nur eine 10 %ige Hemmung der Telomeraseaktivität erreicht werden konnte. Mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 dagegen wurde eine 50%ige Hemmung der Telomeraseaktivität im TRAP Assay erreicht. Höhere Konzentrationen an BRACO 20 führten zu einer weiteren Hemmung der Telomeraseaktivität, jedoch schien eine Behandlung über einen längeren Zeitraum nicht durchführbar, da bereits bei einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  die langfristige Kultivierung aufgrund der Akuttoxizität schwierig war.

#### **Exposition von KCN mit BRACO 20**

Unter Exposition mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 konnte bei der Zelllinie KCN keine gesteigerte Sensitivität gegenüber Cisplatin festgestellt werden. Auch die  $GI_{50}$  und  $LC_{50}$  für Cisplatin waren nahezu identisch. Selbst, wenn die KCN Zellen über 5 Wochen mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 inkubiert wurden, zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Wachstumsverhalten der Kontrollzellen und der

Versuchszellen. Die GI50 und LC50 lagen in vergleichbaren Bereichen, wie beim einwöchigen Versuch. Insgesamt war weder nach einwöchiger, noch nach fünfwöchiger Behandlung mit dem Telomeraseinhibitor BRACO 20 in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  eine Zunahme der Chemosensitivität von KCN gegenüber Cisplatin feststellbar.

Unter Exposition mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 war ebenfalls keine konsistente Beeinflussung der Chemosensitivität von KCN gegenüber Cisplatin zu beobachten, allerdings konnte aufgrund von unspezifischen akuttoxischen Wirkungen von BRACO 20 eine wiederholte Exposition mit 2,5  $\mu\text{M}$  nur über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt werden. Am Ende der zweiwöchigen Behandlung mit BRACO 20 waren die Zellen nahezu nicht mehr teilungsfähig.

Die Untersuchungen hinsichtlich der Telomeraseaktivität ergaben weder nach Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  noch mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 Hinweise auf eine reproduzierbare Inhibition.

Bezüglich der Telomerlängen zeigte der Southern-Blot auch nach achtwöchiger Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 keine Beeinflussung durch die Testsubstanz. Da die Zellen nach spätestens zweiwöchiger Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  das Wachstum einstellten, konnte für die Telomerlängenbestimmung bei dieser Konzentration leider nicht ausreichend DNA asserviert werden, es ist allerdings davon auszugehen, dass der Zeitraum für eine meßbare Veränderung der Telomerlängen zu kurz gewesen wäre.

Somit konnte letztendlich nicht beantwortet werden, ob eine kritische Verkürzung der Telomeren oder eine Hemmung der Telomerase zu einer Änderung der Chemosensitivität führt.

Eine Beeinflussung der Cisplatinsensitivität von KCN durch Off-Target Effekte von BRACO 20 konnte mit diesem Versuchsansatz ebenfalls ausgeschlossen werden, da BRACO 20 die Cisplatin-Sensitivität von KCN nicht reproduzierbar verändert hat.

#### **Exposition von SHEP-SF mit BRACO 20**

Die Zelllinie SHEP-SF war gegenüber den unspezifisch toxischen Effekten von

BRACO 20 deutlich resistenter als die Zelllinie KCN. Unter stetiger Exposition mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 über einen Zeitraum von 10 Wochen zeigte sich keine Beeinträchtigung des Wachstums von SHEP-SF. Überdies war eine Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 über 5 Wochen möglich. Die Behandlungen mit der Testsubstanz zeigten keine systematischen Veränderungen der Zelllinie im Hinblick auf Cisplatinsensitivität/-resistenz. Zwischen den einzelnen Messzeitpunkten waren geringfügige Veränderungen (sowohl Steigerung als auch Reduktion der Cisplatintoxizität in den mit BRACO 20 behandelten Zellen) zu beobachten, diese lagen aber alle innerhalb der beobachteten Variabilität der MTT-Tests.

Bezüglich der Telomeraseaktivität konnte weder bei 0,5  $\mu\text{M}$  noch bei 2,5  $\mu\text{M}$  eine anhaltende Reduktion gemessen werden. In den ersten Tagen der Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 kam es im Vergleich zu den Kontrollzellen sogar vorübergehend zu einer Steigerung der Telomeraseaktivität in den mit BRACO 20 behandelten SHEP-SF Zellen, die sich allerdings innerhalb einer Woche nivellierte.

Überraschenderweise war nach der Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 über die Behandlungsdauer von 10 Wochen eine Telomerenverlängerung detektierbar. Obwohl initial eine vorübergehende Zunahme der Telomeraseaktivität gemessen wurde, unterschied sich die TA im weiteren Verlauf in den behandelten Zellen nicht wesentlich von der in den unbehandelten Zellen, so dass eine paradoxe Steigerung der Telomeraseaktivität als Ursache der Telomerenverlängerung nicht in Frage kam.

Mit 2,5  $\mu\text{M}$  BRACO 20 konnten die Zellen nur 5 Wochen kultiviert werden. Offenbar war dieser Zeitraum aber zu kurz für eine Veränderung der Telomerlängen, jedenfalls war im Southern-Blot keine Änderung meßbar.

Insgesamt war mit diesem Versuchsansatz, keine Beurteilung des Einflusses von Telomerasehemmung oder kritischer Telomerverkürzung auf die Toxizität des Cisplatins möglich. Wie bei KCN, wurde die Cisplatintoxizität gegenüber SHEP-SF auch nicht durch etwaige Off-Target Effekte von BRACO 20 beeinflusst.

#### **Erklärungsansatz bezüglich der paradoxen Telomerverlängerung bei SHEP-SF**

BRACO 20 ist eine Verbindung, die sich an Guanin-reichen DNA-Sequenzen anlagert, wie sie z.B. in den Quadruplex-Strukturen der Telomeren vorkommen. Diese G-reichen Quadruplexstrukturen kommen aber nicht nur in den Telomeren vor, sondern auch an anderen Stellen des DNA-Stranges. Somit ist es denkbar, dass sich BRACO 20 auch an diese Sequenzen anlagert und hier zu möglichen Veränderungen in der Genexpression führt. Für die Vorgängersubstanz BRACO 19 beispielsweise wurde nachgewiesen, dass neben Interaktionen mit der Telomerase bzw. den G-Quadruplexstrukturen in Telomeren auch Interaktionen mit anderen DNA-Sequenzen eingegangen werden<sup>70</sup>. Als Folge dessen könnten Mechanismen in Gang gesetzt worden sein, die zu einer Verlängerung der Telomeren geführt haben.

Eventuell interagierte BRACO 20 auch mit dem telomerassoziierten Proteinkomplex Shelterin (vgl. Kapitel 1.3 „Telomere“). Eine Reduktion der Expression oder eine anderweitige Hemmung von TRF1 beispielsweise könnte in einer Verlängerung der Telomeren resultieren. Auch eine Hemmung von TIN2 oder Rap1 würde indirekt über eine Beeinflussung von TRF1 zu einer Telomerenverlängerung führen.

Dass eine Veränderung der Telomerenlänge nur bei der Behandlung von SHEP-SF mit 0,5 µM BRACO 20 beobachtet werden konnte, lässt sich ausreichend mit der Wirklatenz erklären. Eine Telomerenveränderung ist immer mit der Zellteilung verknüpft, so dass Effekte auf die Telomeren erst nach einer entsprechenden Anzahl von Zellteilungen nachweisbar sind. In Gegenwart von 2,5 µM BRACO 20 konnten SHEP-SF und KCN nur über einen kurzen Zeitraum kultiviert werden, so dass eventuelle Auswirkungen aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraumes nicht sichtbar werden konnten. Nach achtwöchiger Behandlung von KCN mit 0,5 µM BRACO 20 war allerdings keine Verlängerung der Telomeren zu beobachten, was gegen einen generellen pharmakologischen Effekt von BRACO 20 spricht.

KCN und SHEP-SF stammen von unterschiedlich aggressiven Neuroblastomen ab. So repräsentiert KCN mit N-MYC Amplifikation aggressiver wachsende, prognostisch ungünstigere Neuroblastome als die Zelllinie SHEP-SF ohne N-

MYC Amplifikation. Die fehlende Telomerenverlängerung bei der Behandlung mit BRACO 20 könnte demnach auf zellbiologische Unterschiede zurückzuführen sein.

#### **Erklärungsansatz bezüglich der fehlenden Inhibition der Telomeraseaktivität**

Parallel zu den Bestimmungen der Telomerenlänge wurde in behandelten und unbehandelten Zellen die Telomeraseaktivität gemessen. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass durch die Inkubation der Zelllinien mit BRACO 20 die Telomeraseaktivität nicht anhaltend reproduzierbar reduziert werden konnte. Die Vorversuche an Zelllysaten mit unterschiedlichen BRACO 20 Konzentrationen hatten bereits gezeigt, dass mit 0,5 µM BRACO 20, anders als von Hersteller der Substanz angegeben, nur eine 10%ige Reduktion der Telomeraseaktivität erreicht werden konnte, so dass bei dieser Konzentration im Zellkulturversuch mit keiner signifikanten Reduktion der Telomeraseaktivität gerechnet werden konnte. Bei den Behandlungen mit 2,5 µM wäre nach den Vorversuchen allerdings eine deutliche Reduktion der Telomeraseaktivität zu erwarten gewesen. Ein möglicher Erklärungsansatz zur fehlenden Telomerasehemmung im Vergleich zum isolierten Enzym und den Zelllysaten wäre eine unzureichende Aufnahme von BRACO 20 in die intakten Zellen. Untersuchungen der Vorgängersubstanz BRACO 19 haben ergeben, dass es große Schwierigkeiten bei der Überwindung von Zellmembranen gab<sup>84</sup>.

Auch könnte eine schnelle Ausschleusung von BRACO 20 durch Drug-Efflux-Pumpen zu unreichenden intrazellulären BRACO 20 Konzentrationen bei SHEP-SF und KCN geführt haben. Beide Zelllinien exprimieren Mitglieder der ATP-Binding-Cassette (ABC) Transporterfamilie, welche wesentlich an der Ausschleusung von Xenobiotika aus den Zellen beteiligt sind. Dabei weist SHEP-SF deutlich höhere Expressionen der ABC-transporter ABC-B2 und ABC-C3 auf als KCN, was auch die Resistenz von SHEP-SF gegenüber den unspezifisch toxischen Effekten von BRACO 20 erklären könnte. Für eine Hochregulation von Drug-Efflux-Pumpen könnte auch sprechen, dass nach 72h die Toxizität von BRACO 20 sowohl bei KCN als auch bei SHEP-SF nach 72h nicht mehr zunahm sondern stagnierte.

Ferner könnte eine unzureichende Stabilität von BRACO 20 unter den Zellkulturbedingungen Ursache für fehlende Telomerasehemmung und Telomerenverkürzung gewesen sein. Instabilitäten unter den Bedingungen der Zellkultur können die Interpretation von Zellkulturversuchen entscheidend beeinflussen<sup>54,92</sup>. Bei BRACO 20 handelt es sich, wie bei seinem Vorgänger BRACO 19 um ein Acridinbisamid, bei dem über die Aminogruppen in Position 3 und 6 am Acridinring heterozyklischen Carbonsäuren verknüpft wurden. 2008 haben Taetz et al. im International Journal of Pharmaceutics ihre Arbeiten zur Stabilität von BRACO 19 veröffentlicht. Sie haben mittels HPLC-MS die Stabilität von BRACO 19 bei verschiedenen pH-Werten, in verschiedenen Puffersystemen und im Zellkulturmedium untersucht und festgestellt, dass die Amidbindungen in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlich schnell hydrolysiert werden können, wobei die Hydrolyse am schnellsten bei einem physiologischen pH-Wert stattfand. Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums hatte dagegen keinen Einfluss auf die Stabilität von BRACO 19. Bereits nach 7 Stunden waren bei physiologischem pH von 7,4 und Inkubationstemperatur von 37°C nur noch 10% des ursprünglich eingesetzten BRACO19 in der Lösung nachweisbar. Nach 18 Stunden war im RPMI 1640 Medium schließlich gar kein BRACO 19 mehr nachweisbar. Die Abbauprodukte von BRACO 19 hemmten die Telomerase deutlich weniger als BRACO 19<sup>85</sup>. Da sich BRACO 20 von BRACO 19 nur durch den Substituenten in Position 3 und 6 am Acridinring unterscheidet, erscheint es wahrscheinlich, dass auch BRACO 20 unter den Bedingungen der Zellkultur (physiologischer pH, Inkubationstemperatur 37°C) rasch hydrolysiert wurde. Die profunde Instabilität des BRACO 19 gibt allerdings auch Anlass, die zum BRACO 19 publizierten vielversprechenden in-vitro und in-vivo Daten kritisch zu hinterfragen<sup>35</sup>. Letztendlich konnte mit den hier durchgeführten Versuchen im Zellkulturversuch an zwei verschiedenen Neuroblastomzelllinien keine Hemmung der Telomeraseaktivität und keine Telomerenverkürzung beobachtet werden, obwohl sich BRACO 20 und BRACO 19 nur durch die Substituenten am Acridinring unterscheiden und BRACO 20, nach den Angaben der Herstellers eine niedrigere IC<sub>50</sub> hat als BRACO 20. Eine Instabilität von BRACO 20 könnte

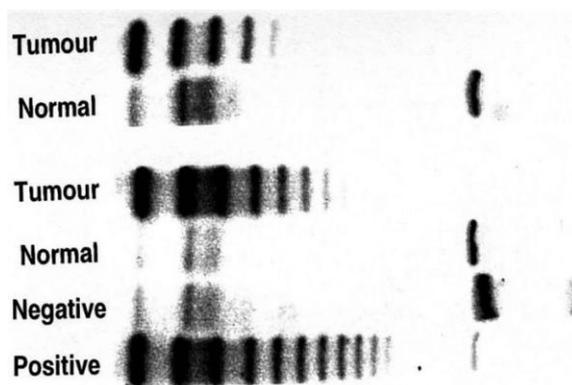
auch erklären, warum bereits bei der kurzen Inkubation mit dem Proteinlysate, die Telomeraseaktivität erst bei Konzentrationen von 2,5 µM BRACO 20 um 50% gehemmt wurde und nicht bei Konzentrationen von 74 nM, wie vom Hersteller angegeben.

#### **Messung der Telomeraseaktivität mit zwei Methoden**

Zur Bestimmung der Telomeraseaktivität wurde während der kontinuierlichen Kultivierung der Zelllinien mit der Testsubstanz stetig Zellmaterial asserviert. Aus diesem Zellmaterial wurden Proteinlysate gewonnen, worin schließlich die Telomeraseaktivität gemessen wurde. Die Telomeraseaktivität wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt.

Der TRAP-Assay ist bis heute das anerkannte Verfahren zur Bestimmung der Telomeraseaktivität, dabei werden meistens die PCR-Amplifikate auf ein Gel aufgetragen und die Intensitäten der Signale miteinander verglichen. Hohe Intensität ist dabei gleichbedeutend mit einer hohen Telomeraseaktivität (vgl. Abb. 64 ).

Abb. 64: Fragmentanalyse der Telomerenleitern nach Durchführung des TRAP-Assays auf einem Acrylamidgel bei Brusttumoren im Gegensatz zu normalem Brustdrüsengewebe<sup>29</sup>

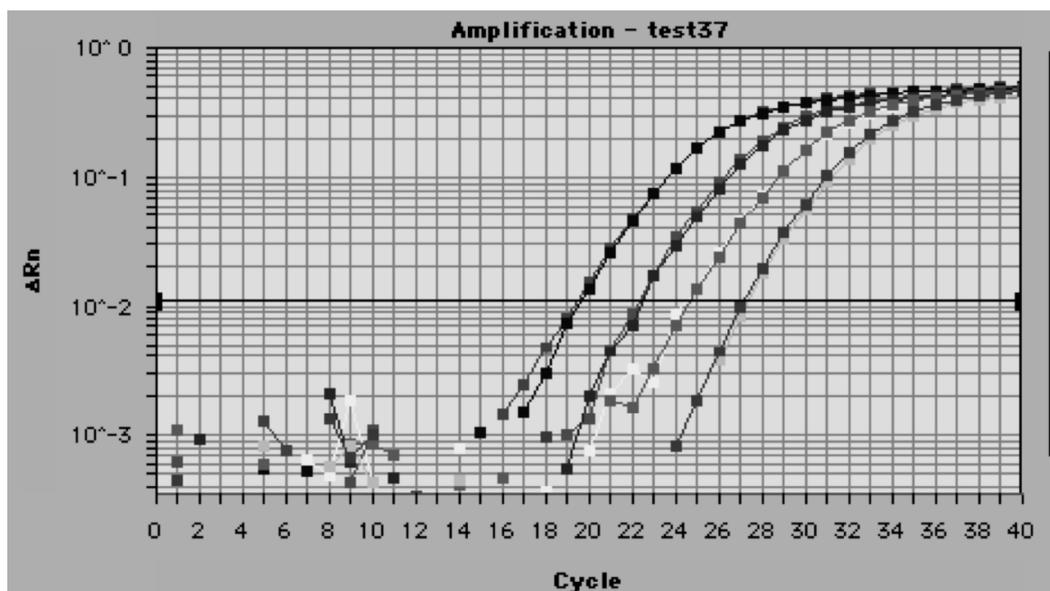


Mit dieser Technik lassen sich Telomeraseaktivitäten nur untereinander vergleichen, wenn sie auf demselben Gel aufgetragen wurden. Darüber hinaus kann es leichter zu falschen Aussagen kommen, wenn z.B. nicht exakt dieselbe Menge Amplifikat aufgetragen wurde.

Um die Sensitivität des TRAP-Assay's zu verbessern, kann statt der Gelelektrophorese auch eine Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt werden. Die Fragmente werden über Fluoreszenzmarkierungen detektiert und über die Fluoreszenzintensität quantifiziert. Durch den Vergleich Fluoreszenzintensität der Telomerenleiter mit einem internen Standard, der bei fehlender oder niedriger Telomeraseaktivität im Proteinlysate entsprechend stärker amplifiziert wird, kann die relative Telomeraseaktivität als Zahlenwert quantifiziert werden. Für die Auswertungen wird üblicherweise der nur der erste Peak der Telomerenleiter zur Quantifizierung der relativen Telomeraseaktivität herangezogen. Der so ermittelte Zahlenwert der relativen Telomeraseaktivität suggeriert eine Genauigkeit, die letztendlich durch das Verfahren, welches eigentlich nur eine semiquantitative Abschätzung erlaubt, nicht gegeben ist. Daher ist es fraglich, ob diese Methode geeignet ist, auch geringe Veränderungen der Telomeraseaktivität im Verlauf serieller Analysen, wie in dieser Arbeit durchgeführt, zu erfassen. Im Zuge der erfolgreichen Einführung der quantitativen Real-Time PCR zur Quantifizierung von DNA- und cDNA-Fragmenten wurde versucht diese Methode auch zur Quantifizierung der Telomeraseaktivität einzusetzen. Hou et al. publizierten 2001 eine Real-time PCR-basierte Methode zur Bestimmung der Telomeraseaktivität<sup>46</sup>. Analog zum TRAP-Assay wird Proteinlysate mit einem Telomerase-Template, Telomerespezifischen Primern und Co-Faktoren über einen definierten Zeitraum inkubiert. In Abhängigkeit von Menge und Aktivität synthetisiert die Telomerase im Proteinlysate mit Hilfe des Templates Telomeren, die dann in der anschließenden PCR amplifiziert werden. Bei dem Real-time PCR basierten TRAP-Assay wird dem Ansatz zusätzlich noch der DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green zugesetzt. Dieser Farbstoff lagert sich während der Amplifikation in den DNA-Doppelstrang ein und emittiert nur in diesem Zustand Licht. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Fluoreszenzintensität im Reaktionsansatz analysiert. Abbildung 65 zeigt exemplarisch den typischen PCR-Verlauf einer Real-time PCR mit SYBR-Green. Die Punkte repräsentieren die Fluoreszenzmessungen nach den jeweiligen PCR Zyklen. Man erkennt die exponentielle Phase wie auch die Sättigungsphase. In der exponentiellen Phase

verdoppelt sich mit jedem PCR-Zyklus das PCR Produkt im Reaktionsansatz. In der Sättigungsphase findet z.B. aufgrund von Reagenzienverbrauch keine weitere Synthese von PCR-Produkten statt. Der Eintritt der Reaktion in die exponentielle Phase korreliert mit der Konzentration an Template im PCR-Ansatz und lässt sich zur Quantifizierung nutzen. Je nach Templatemenge im Inkubationsansatz geht die PCR-Reaktion nach unterschiedlichen Zyklen in die exponentielle Phase über und ermöglicht so Rückschlüsse auf die Menge an synthetisierten Telomeren im Inkubationsansatz und damit Rückschlüsse auf die Telomeraseaktivität im Proteinlysate.

Abb. 65: Beispiel für eine Real-Time PCR am Taqman



Da im klassischen TRAP-Assay die Erfassung der Telomeraseaktivität über die Menge des PCR-Produktes am Ende der Reaktion erfolgt, ist es durchaus möglich, dass sich einige der Reaktionen gegen Ende der PCR bereits in der Sättigungsphase befinden, während andere Reaktionen sich noch in der exponentiellen Phase der PCR befinden. Hierdurch bedingt könnte es zu falschen Rückschlüssen bezüglich der ursprünglichen Templatemenge und

somit zu falschen Angaben bezüglich der Telomeraseaktivität kommen. Darüber hinaus bietet die TA-Bestimmung mittels Taqman noch weitere Vorteile: sie ist deutlich preiswerter als der konventionelle TRAP-Assay mit anschließender Fragmentanalyse, Variabilitäten durch manuelles pipettieren werden verringert, da nur einmal pipettiert werden muss, während beim klassischen TRAP-Assay der PCR Ansatz und die Fragmentanalyse pipettiert werden muss. Ferner ist das Verfahren schneller, da direkt nach der PCR das Endergebnis bereits vorliegt und nicht noch eine Fragmentanalyse zur Auswertung des Resultates angeschlossen werden muss.

Da bislang die quantitative Real-time-PCR zur Bestimmung der TA nicht etabliert war, wurden in der vorliegenden Arbeit beide Verfahren miteinander verglichen. Obwohl die Messergebnisse der beiden Messmethoden erheblich streuten, lieferten beide Methoden insgesamt vergleichbare Ergebnisse. Zwischen den im klassischen TRAP-Assay und den im Real-time PCR-basierten TRAP-Assay bestimmten Telomeraseaktivitäten bestand eine signifikante Korrelation, die allerdings mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,432 nicht hoch war. Die lineare Regressionsanalyse ergab eine Regressiongerade, die nicht durch den Nullpunkt verlief und deren Steigung nicht 1 war. Beide Methoden führten daher nicht zu den gleichen Messergebnissen, was durch den Bland-Altman Test bestätigt wurde. Insgesamt wurden mit der Real-time PCR basierten Methode höhere Telomeraseaktivitäten gemessen als beim klassischen TRAP Assay. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit der Real-time PCR basierten Methode durch die Detektion mit SYBR® Green alle synthetisierten PCR-Fragmente erfasst wurden, während bei der Auswertung des klassischen TRAP-Assays nur der längste Telomerenpeak zur Berechnung herangezogen wurde.

Unabhängig von beiden Methoden bleiben bei der Bestimmung der Telomeraseaktivität Unschärfen. Um die TA bestimmen zu können, wird vor der Inkubation und der anschließenden PCR eine festgelegte Menge an Proteinlysate, welches aus den Zellen gewonnen wurde, eingesetzt. Dieses Proteinlysate wurde vorher aus den Versuchszellen isoliert, jedoch enthält diese Lösung nicht nur das Protein Telomerase, sondern auch unzählige andere

Zellproteine. Letztendlich wird vorausgesetzt, dass der Anteil des Proteins Telomerase am „Gesamtpool“ der Proteine immer gleich ist. Sollte nun eine Zelllinie aus irgendeinem Grund einen größeren Anteil an Telomerase am Gesamtproteinpool haben, so würde eine höhere TA vorgetäuscht, als wirklich vorliegt. Überdies ist es auch fraglich, ob durch die Quantifizierung der PCR Produkte durch die Fragmentanalyse bzw. der Real-Time-PCR die Ergebnisse nicht überinterpretiert werden, da nun konkrete Zahlenwerte zugeordnet werden können. Bei der visuellen Auswertung der Acrylamidgele war lediglich die Aussage möglich, ob die TA hoch, mittel oder niedrig war. Weitergehende Interpretationen erscheinen zweifelhaft.

## **5.2 Abschließende Überlegungen**

Vor Beginn der Versuche bestanden hohe Erwartungen bezüglich des neuen Telomeraseinhibitors BRACO 20, da der Vorgänger, BRACO 19, gute Erfolge in vitro und in vivo erzielen konnte<sup>18</sup>. Durch die Behandlung mit BRACO 20 wurde aber bei den Neuroblastomzelllinien KCN und SHEP-SF keine Reduktion der Telomeraseaktivität erzielt. Es fand demzufolge bei beiden Zelllinien auch keine Reduktion der Telomerenlängen statt. Somit konnte die Frage, ob durch die Hemmung der Telomerase bzw. durch die Verkürzung der Telomeren die Toxizität des Cisplatins bei diesen Zelllinien verändert wird nicht beantwortet werden. Die Frage nach der Beeinflussung der Cisplatintoxizität durch unspezifische BRACO 20 Effekte kann verneint werden, da die Behandlung mit BRACO 20 keinen Effekt auf die Cisplatintoxizität bei den Neuroblastomzelllinien KCN und SHEP-SF hatte. Neuere Untersuchungen zur Stabilität von BRACO 19 lassen die vielversprechenden Untersuchungen, die zur Durchführung dieser Arbeit geführt haben, in einem zweifelhaften Licht erscheinen. Die strukturellen Ähnlichkeiten von BRACO 19 und BRACO 20 legen nahe, dass BRACO 20 wie BRACO19 unter den Versuchsbedingungen nicht ausreichend stabil war, um eine signifikante Hemmung der Telomeraseaktivität und damit auch zu einer Reduktion der Telomerenlängen

zu führen. Es lassen sich auch keine Veröffentlichungen von anderen Arbeitsgruppen und auch nicht vom Entwickler finden, wo sich Hinweise für eine Telomerasehemmung in vitro oder in vivo von BRACO 20 ergeben hatten.

Obwohl diese Untersuchungen wegen Substanz-bedingter Limitationen, keine Bewertung eines potentiellen Nutzens von Telomerase-Hemmung kombiniert mit Chemotherapie beim Neuroblastom ermöglichte, sollte das Konzept von Telomerasehemmung kombiniert mit konventioneller Chemotherapie weiter verfolgt werden. Da beim Neuroblastom gerade die aggressiven Tumoren eine erhöhte Telomeraseaktivität aufweisen, böte die Inhibition der Telomerase hier eine zusätzliche weitestgehend selektive und Tumor-spezifische Therapieoption, die die Wirkung anderer zytostatischer Methoden verstärken könnte. Neben Cisplatin sollte auch die Kombination mit anderen Zytostatika in Betracht gezogen werden. Auch die Verbindung mit einer strahlentherapeutischen Behandlung, die ja in der Regel über mehrere Wochen durchgeführt wird, wäre eine reizvolle Option.

Ein anderer Ansatz, die Auswirkung einer Telomerasehemmung auf Chemo- und Radiosensitivität näher zu untersuchen, wäre die Herstellung transfizierter Zelllinien mit und ohne Telomeraseaktivität. Dies böte den Vorteil, dass unspezifische Substanzwirkungen wie bei chemischen Telomeraseinhibitoren zu vernachlässigen wären.

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Unzulänglichkeit des verwendeten Inhibitors leider keine Effekte gezeigt werden konnten, so ist die Hemmung der Telomerase weiterhin ein attraktives Target, welches z.B. als Dauertherapie zur Konsolidierung der intensiven Therapie oder zur Vermeidung einer Metastasierung zum Einsatz kommen könnte.

## 6 Quellenangaben

1. Abemayor, E., Chang, B. & Sidell, N. (1990), Effects of retinoic acid on the in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett* **55**, 1-5
2. Attiyeh, E.F., *et al.* (2005), Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* **353**, 2243-2253
3. Bagatell, R., *et al.* (2009), Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database. *J Clin Oncol* **27**, 365-370
4. Baumann, P. & Cech, T.R. (2001), Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**, 1171-1175
5. Baumann, P. & Price, C. (2010), Pot1 and telomere maintenance. *FEBS Lett*
6. Bearss, D.J., Hurley, L.H. & Von Hoff, D.D. (2000), Telomere maintenance mechanisms as a target for drug development. *Oncogene* **19**, 6632-6641
7. Berthold, F. & Hero, B. (2000), Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* **59**, 1261-1277
8. Berthold, F., *et al.* (1997), The current contribution of molecular factors to risk estimation in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer* **33**, 2092-2097
9. Bilaud, T., *et al.* (1997), Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**, 236-239
10. Binz, N., Shalaby, T., Rivera, P., Shin-ya, K. & Grotzer, M.A. (2005), Telomerase inhibition, telomere shortening, cell growth suppression and induction of apoptosis by telomestatin in childhood neuroblastoma cells. *Eur J Cancer* **41**, 2873-2881
11. Blackburn, E.H. (2001), Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661-673
12. Blackburn, E.H., *et al.* (1989), Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome* **31**, 553-560

13. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. (1997), Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**, 231-235
14. Brodeur, G.M., *et al.* (1987), Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res* **47**, 4248-4253
15. Brodeur, G.M., *et al.* (1988), International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* **6**, 1874-1881
16. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. (1984), Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**, 1121-1124
17. Brodeur, G.M., Sekhon, G. & Goldstein, M.N. (1977), Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* **40**, 2256-2263
18. Burger, A.M., *et al.* (2005), The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res* **65**, 1489-1496
19. Burger, A.M., Double, J.A. & Newell, D.R. (1997), Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur J Cancer* **33**, 638-644
20. Canete, A., *et al.* (2009), Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *J Clin Oncol* **27**, 1014-1019
21. Caron, H., *et al.* (1996), Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* **334**, 225-230
22. Chong, L., *et al.* (1995), A human telomeric protein. *Science* **270**, 1663-1667
23. Christiansen, H. & Lampert, F. (1988), Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer* **57**, 121-126

24. Christiansen, H., Schestag, J., Christiansen, N.M., Grzeschik, K.H. & Lampert, F. (1992), Clinical impact of chromosome 1 aberrations in neuroblastoma: a metaphase and interphase cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer* **5**, 141-149
25. Cohn, M., McEachern, M.J. & Blackburn, E.H. (1998), Telomeric sequence diversity within the genus *Saccharomyces*. *Curr Genet* **33**, 83-91
26. Colgin, L.M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T.R. & Reddel, R.R. (2003), Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol* **13**, 942-946
27. Cotterill, S.J., *et al.* (2000), Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *Eur J Cancer* **36**, 901-908
28. de Lange, T. (2005), Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**, 2100-2110
29. Elkak, A.E., Newbold, R.F., Thomas, V. & Mokbel, K. (2003), Is telomerase reactivation associated with the down-regulation of TGF beta receptor-II expression in human breast cancer? *Cancer Cell Int* **3**, 9
30. Evans, A.E., D'Angio, G.J. & Randolph, J. (1971), A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer* **27**, 374-378
31. Evans, A.E., Silber, J.H., Shpilsky, A. & D'Angio, G.J. (1996), Successful management of low-stage neuroblastoma without adjuvant therapies: a comparison of two decades, 1972 through 1981 and 1982 through 1992, in a single institution. *J Clin Oncol* **14**, 2504-2510
32. Feng, J., *et al.* (1995), The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241
33. Franke, F., Rudolph, B., Christiansen, H., Harbott, J. & Lampert, F. (1986), Tumour karyotype may be important in the prognosis of human neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **111**, 266-272
34. Gilbert, F., Balaban, G., Moorhead, P., Bianchi, D. & Schlesinger, H. (1982), Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma

- tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* **7**, 33-42
35. Gowan, S.M., *et al.* (2002), A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol Pharmacol* **61**, 1154-1162
  36. Griffith, J.D., *et al.* (1999), Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514
  37. Gutjahr, P. (2004), Krebs bei Kindern und Jugendlichen. **5. Auflage**, 440-460
  38. Hämatologie, G.f.P.O.u. NB2004 Trial Protocol. (Köln, 2004).
  39. Harrington, L., *et al.* (1997), Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* **11**, 3109-3115
  40. Hastie, N.D., *et al.* (1990), Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**, 866-868
  41. Hemann, M.T. & Greider, C.W. (1999), G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res* **27**, 3964-3969
  42. Hill, B.T. (1986), Neuroblastoma--an overview of laboratory studies aimed at inducing tumor regression by initiation of differentiation or administration of antitumor drugs. *Pediatr Hematol Oncol* **3**, 73-88
  43. Hiyama, E., *et al.* (1997), Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* **33**, 1932-1936
  44. Hiyama, E., *et al.* (1995), Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* **1**, 249-255
  45. Hockemeyer, D., *et al.* (2007), Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 754-761
  46. Hou, M., Xu, D., Bjorkholm, M. & Gruber, A. (2001), Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem* **47**, 519-524
  47. Houghtaling, B.R., Cuttonaro, L., Chang, W. & Smith, S. (2004), A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr Biol* **14**, 1621-1631
  48. Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. (1999), p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2.

- Science* **283**, 1321-1325
49. Kilian, A., *et al.* (1997), Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* **6**, 2011-2019
  50. Kim, N.W., *et al.* (1994), Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015
  51. Kim, S.H., Kaminker, P. & Campisi, J. (1999), TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* **23**, 405-412
  52. Kinderkrebsregister, D. Angaben nach dem deutschen Kinderkrebsregister (Zeitraum 1999 bis 2008) gemäß dem Jahresbericht 2009.
  53. Krams, M., Rudolph, P. & Harms, D. (2004), [Proliferation and hTERT expression in neuroblastoma]. *Pathologe* **25**, 317-323
  54. Lanvers, C., Hempel, G., Blaschke, G. & Boos, J. (1998), Chemically induced isomerization and differential uptake modulate retinoic acid disposition in HL-60 cells. *FASEB J* **12**, 1627-1633
  55. Lei, M., Zaug, A.J., Podell, E.R. & Cech, T.R. (2005), Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem* **280**, 20449-20456
  56. Li, B., Oestreich, S. & de Lange, T. (2000), Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**, 471-483
  57. Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J. & Songyang, Z. (2004), Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem* **279**, 51338-51342
  58. Liu, D., *et al.* (2004), PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol* **6**, 673-680
  59. Maris, J.M. & Matthay, K.K. (1999), Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* **17**, 2264-2279
  60. Maris, J.M., *et al.* (2000), Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* **18**, 1888-1899

61. Matthay, K.K., *et al.* (1999), Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* **341**, 1165-1173
62. McElligott, R. & Wellinger, R.J. (1997), The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* **16**, 3705-3714
63. Meyerson, M., *et al.* (1997), hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-795
64. Moyzis, R.K., *et al.* (1988), A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6622-6626
65. Nakamura, T.M., *et al.* (1997), Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-959
66. Neidle, S. & Parkinson, G. (2002), Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 383-393
67. O'Connor, M.S., Safari, A., Liu, D., Qin, J. & Songyang, Z. (2004), The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem* **279**, 28585-28591
68. Parkinson, E.K. & Minty, F. (2007), Anticancer therapy targeting telomeres and telomerase : current status. *BioDrugs* **21**, 375-385
69. Phatak, P. & Burger, A.M. (2007), Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* **152**, 1003-1011
70. Poremba, C., *et al.* (2001), Traditional and emerging molecular markers in neuroblastoma prognosis: the good, the bad and the ugly. *Klin Padiatr* **213**, 186-190
71. Poremba, C., *et al.* (2000), Telomerase is a strong indicator for assessing the proneness to progression in neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* **35**, 651-655
72. Poremba, C., *et al.* (1999), Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol* **10**, 715-721
73. Read, M., *et al.* (2001), Structure-based design of selective and potent G

- quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4844-4849
74. Rubie, H., *et al.* (1997), Loss of chromosome 1p may have a prognostic value in localised neuroblastoma: results of the French NBL 90 Study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique (SFOP). *Eur J Cancer* **33**, 1917-1922
75. Rubie, H., *et al.* (1997), N-Myc gene amplification is a major prognostic factor in localized neuroblastoma: results of the French NBL 90 study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique. *J Clin Oncol* **15**, 1171-1182
76. Schwab, M., *et al.* (1984), Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* **308**, 288-291
77. Schwab, M., Westermann, F., Hero, B. & Berthold, F. (2003), Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* **4**, 472-480
78. Seeger, R.C., *et al.* (1985), Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* **313**, 1111-1116
79. Shay, J.W. & Bacchetti, S. (1997), A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**, 787-791
80. Simon, T., *et al.* (2004), Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* **22**, 3549-3557
81. Simon, T., *et al.* (2005), Infants with stage 4 neuroblastoma: the impact of the chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 consolidation therapy. *Klin Padiatr* **217**, 147-152
82. Simon, T., Spitz, R., Faldum, A., Hero, B. & Berthold, F. (2004), New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status. *J Pediatr Hematol Oncol* **26**, 791-796
83. Simon, T., Spitz, R., Hero, B., Berthold, F. & Faldum, A. (2006), Risk estimation in localized unresectable single copy MYCN neuroblastoma

- by the status of chromosomes 1p and 11q. *Cancer Lett* **237**, 215-222
84. Taetz, S., *et al.* (2006), Biopharmaceutical characterization of the telomerase inhibitor BRACO19. *Pharm Res* **23**, 1031-1037
  85. Taetz, S., *et al.* (2008), Decomposition of the telomere-targeting agent BRACO19 in physiological media results in products with decreased inhibitory potential. *Int J Pharm* **357**, 6-14
  86. Tauchi, T., Ohyashiki, J.H. & Ohyashiki, K. (2007), Telomerase inhibition combined with other chemotherapeutic reagents to enhance anti-cancer effect. *Methods Mol Biol* **405**, 181-189
  87. Theissen, J., *et al.* (2009), Heterogeneity of the MYCN oncogene in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **15**, 2085-2090
  88. Thiele, C.J., Cohen, P.S. & Israel, M.A. (1988), Regulation of c-myc expression in human neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation. *Mol Cell Biol* **8**, 1677-1683
  89. Thiele, C.J., Reynolds, C.P. & Israel, M.A. (1985), Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* **313**, 404-406
  90. van Steensel, B. & de Lange, T. (1997), Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740-743
  91. van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. (1998), TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401-413
  92. Wagner, A., Hempel, G., Gumbinger, H.G., Jurgens, H. & Boos, J. (1999), Pharmacokinetics of anticancer drugs in vitro. *Adv Exp Med Biol* **457**, 397-407
  93. Wang, D. & Lippard, S.J. (2005), Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 307-320
  94. Weinrich, S.L., *et al.* (1997), Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* **17**, 498-502
  95. Weisenthal, L.M. (1981), In vitro assays in preclinical antineoplastic drug screening. *Semin Oncol* **8**, 362-376
  96. Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W. & Shay, J.W.

- (1996), Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* **18**, 173-179
97. Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D. & Shay, J.W. (1997), Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**, 2801-2809
98. Ye, J.Z. & de Lange, T. (2004), TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nat Genet* **36**, 618-623
99. Ye, J.Z., *et al.* (2004), TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* **279**, 47264-47271
100. Ye, J.Z., *et al.* (2004), POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* **18**, 1649-1654
101. Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D. & Blackburn, E.H. (1990), In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* **344**, 126-132
102. Zahler, A.M., Williamson, J.R., Cech, T.R. & Prescott, D.M. (1991), Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **350**, 718-720

