

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kombination von Chemotherapie und MDM2-Inhibition als neuer
therapeutischer Ansatz beim Neuroblastom

MDM2-Inhibitor basierte Kombinationstherapien zur Prävention von Resistenzen

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Catharina Anna Marie Baum aus Wiesbaden

Datum der Promotion: 3.12.2021

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ABSTRACT	VIII
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 EPIDEMIOLOGIE & ÄTIOLOGIE	1
1.2 GENETIK, PATHOGENESE, KLASSEFIKATION	1
1.2.1 MYCN AMPLIFIKATION	1
1.2.2 ALK MUTATION UND AMPLIFIKATION	2
1.2.3 DELETION VON CHROMOSOM 11Q	3
1.2.4 ZUGEWINN VON CHROMOSOM 17Q	4
1.2.5 PLOIDIEGRAD.....	4
1.3 PROGNOTISCHE FAKTOREN UND RISIKOKLASSIFIKATION	5
1.4 RISIKOADAPTIERTE THERAPIE.....	7
1.4.1 NIEDRIGES RISIKO	8
1.4.2 INTERMEDIÄRES RISIKO	9
1.4.3 HOHES RISIKO	10
1.5 DIE ROLLE VON TP53 IM NEUROBLASTOM.....	12
1.5.1 MDM2 INHIBITOREN.....	13
1.6 DIE ROLLE VON SURVIVIN IM NEUROBLASTOM.....	16
1.6.1 SURVIVIN INHIBITOREN.....	18
1.7 ZIELE DIESER ARBEIT	20
<u>2 MATERIAL UND METHODIK</u>	<u>22</u>
2.1 ZELLKULTUR.....	22
2.2 ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT, APOPTOSE UND MIGRATION.....	22
2.2.1 ZELLVIABILITÄT	22
2.2.2 BESTIMMUNG DES KOMBINATIONSSINDEX.....	23
2.2.3 NACHWEIS DER APOPTOSE.....	24
2.2.4 SCRATCH ASSAY	26
2.3 ANALYSE DER EXPRESSION DER ZIELGENE.....	27

2.3.1 WESTERN BLOT	27
2.4 STATISTISCHE ANALYSE	28
3 ERGEBNISSE	30
3.1 DIE KOMBINATION VON DS3032B UND CHEMOTHERAPIE FÜHRT ZU EINER SYNERGISTISCHEN VERSTÄRKUNG DER VIABILITÄTSCHEMMUNG IN DER NEUROBLASTOMZELLINIE IMR5	31
3.2 DIE KOMBINATION VON YM155 UND MDM2 INHIBITION FÜHRT ZU EINER SYNERGISTISCHEN VERSTÄRKUNG DER VIABILITÄTSCHEMMUNG IN NEUROBLASTOMZELLEN	32
3.3 DIE KOMBINATION VON YM155 UND RG7388 HEMMT DIE MIGRATIONSFÄHIGKEIT DER NEUROBLASTOMZELLEN	36
3.4 DIE KOMBINATION VON YM155 UND RG7388 VERSTÄRKT DIE APOPTOSE-INDUKTION IN NEUROBLASTOMZELLEN.	37
3.5 DIE ANTITUMORALE WIRKUNG DER KOMBINATIONSBEHANDLUNG IST UNABHÄNGIG VON DEM TUMORSUPPRESSOR P53	42
3.6 DER KNOCKDOWN VON SURVIVIN IMITIERT DIE YM155 VERMITTELTE PRO- APOPTOTISCHE WIRKUNG.....	45
4 DISKUSSION	47
4.1 DIE ROLLE VON SURVIVIN IM NEUROBLASTOM UND DIE BEDEUTUNG VON SURVIVIN INHIBITION ALS THERAPEUTISCHER ANSATZ IM NEUROBLASTOM	47
4.2 DIE KOMBINATION VON YM155 UND RG7388	49
4.3 DIE BEDEUTUNG EINES FUNKTIONALEN P53 SIGNALWEGS FÜR DIE BEHANDLUNG MIT YM155, RG7388 UND DER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG	52
LITERATURVERZEICHNIS	57
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	67
LEBENS LAUF	68
DANKSAGUNG	69

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Die Assoziation von MYCN Amplifikation und der Überlebensraten in 471 Neuroblastompatienten.....	2
Abbildung 2. Übersicht über die Therapiemodalitäten der Patienten mit niedrigem Risiko.....	9
Abbildung 3. Übersicht über die Therapiemodalitäten der Patienten mit intermediärem Risiko.....	10
Abbildung 4. Übersicht über die Therapiemodalitäten der Patienten mit hohem Risiko.....	12
Abbildung 8. Abbildung der nicht mutationsbedingten Inaktivierung von p53 durch MDM2 Amplifikation oder <i>p14^{ARF}</i> Mutation.	13
Abbildung 9. Abbildung der Regulationsmechanismen von p53.....	14
Abbildung 5. Struktur der Gruppe „Inhibitors of Apoptosis“.	16
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Apoptose-induktion, sowie des antiapoptotischen Mechanismus von Survivin.	17
Abbildung 7. Die Rolle von Survivin bei der Zellteilung.	18
Abbildung 10. Darstellung des genetischen Hintergrundes der verwendeten Neuroblastomzelllinien.....	31
Abbildung 11. Wirkung von Cisplatin, Doxorubicin, DS3032b und der Kombinationsbehandlung auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.....	32
Abbildung 12. Wirkung von YM155, RG7388 und der Kombinationsbehandlung auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.	34
Abbildung 13. Wirkung von YM155, DS3032b und der Kombinationsbehandlung auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.	35
Abbildung 14. Wirkung von YM155, RG7388 und der Kombinationsbehandlung auf die Migrationsfähigkeit der Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5.....	37

Abbildung 15. Wirkung von YM155, RG7388 und der Kombinationsbehandlung auf die Apoptose-induktion in den Neuroblastomzelllinien.....	39
Abbildung 16. Caspase-3 Aktivierung nach Behandlung der Zelllinie IMR32 mit YM155, RG7388 und der Kombination beider Substanzen.	41
Abbildung 17. Proteinexpression der Neuroblastomzelllinien IMR 5 und IMR 32 nach Behandlung mit YM155, RG7388 und der Kombination beider Substanzen.	43
Abbildung 18. Apoptose-induktion der Zelllinien IMR5 und IMR32 nach Transfektion mit einer <i>dnTP53</i> Mutante und Behandlung mit YM155, RG7388 und der entsprechenden Kombination.	45
Abbildung 19. Apoptose-induktion in der Zelllinie IMR32 nach erfolgreichem Survivin Knockdown und anschließender Behandlung mit YM155, RG7388 und der entsprechenden Kombination.	46

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.	Schema der Internationalen Risikogruppe zur prätherapeutischen Klassifikation.....	6
Tabelle 2.	Schematische Darstellung der Risikostratifizierung gemäß mechanistischer Definition.....	7
Tabelle 4.	Auswahl einiger MDM2 Inhibitoren.	15
Tabelle 3.	Auswahl einiger Survin Inhibitoren.	19
Tabelle 5.	Überblick über verwendete Antikörper Verdünnungen.	28

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALK	<i>Anaplastische Lymphomkinase</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BAX	<i>Bcl2 Associated X protein</i>
<i>BIRC5</i>	<i>Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat-Containing 5</i>
CPC-complex	<i>Chromosomal passenger complex</i>
CTRP	<i>Cancer Therapeutic Response Portals</i>
Cyt-c	<i>Cytochrom c</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EFS	<i>Event Free Survival</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i>
FCS	<i>Fetal bovines Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanit</i>
GD2	<i>Disialoganglioside</i>
GDSC	<i>Gemomics of Drug Sensitivity in Cancer Datenbank</i>
GM-CSF	<i>Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor</i>
IAP	<i>Inhibitors of Apoptosis</i>
ILP2	<i>IAP-like-protein 2</i>
INCENP	<i>Inner Centromere Protein</i>
INRG	<i>Internationalen Neuroblastom Risiko Gruppen</i>
MAPK Signalweg	<i>MAP Kinase</i>
MCL-1	<i>Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein</i>
MIBG	<i>Metaiodbenzylguanidin-Szintigrafie</i>
ML-IAP	<i>Melanoma-IAP</i>
MLPA	<i>Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation</i>
NAIP	<i>Neuronal Apoptosis-Inhibitory Protein</i>
nM	<i>Nanomolar</i>
PARP	<i>poly(ADP-ribose)-Polymerasen</i>
PBS	<i>Phosphate Bufferd Saline</i>
PDX -Model	<i>Patient derived Xenograft Model</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
<i>RAS</i>	<i>Rat Sarcoma</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interferin RNA</i>
SZT	<i>Stammzelltransplantation</i>
XIAP	<i>X-linked IAP</i>
XTT	<i>Triphenyltetrazoliumchlorid</i>

ABSTRACT

Hintergrund

Die Behandlung des Hochrisikoneuroblastoms stellt eines der aktuell wichtigsten Herausforderungen der pädiatrischen Onkologie dar. Trotz maximaler Ausschöpfung multimodaler Therapieoptionen beträgt die 5-Jahres Überlebensrate der Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastom ca. 50%, ein Rezidiv oder ein Progress der Tumorerkrankung verlaufen häufig letal. Die Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapieansätze ist somit eines der wichtigsten Ziele pädiatrisch onkologischer Forschung. Die gezielte Aktivierung des Tumorsuppressors p53 durch Inhibition des p53 negativ Regulators MDM2 wurde beim Neuroblastom eingehend untersucht. Der Einsatz von MDM2-Inhibitoren als Monotherapie führt jedoch durch die Entwicklung von *de-novo* Mutationen zu Therapieresistenzen. Es ist deshalb von großem Interesse, präklinisch wirksame Kombinationstherapien zu untersuchen, um dauerhaftere Therapieansprechen zu erzielen und gleichzeitig die Toxizität zu reduzieren. Daher haben wir die Wirkung des MDM2-Inhibitors DS3032b in Kombination mit herkömmlicher Chemotherapie und die Kombination des MDM2-Inhibitors RG7388 mit dem Survivin-Inhibitor YM155 untersucht. Die Überexpression von Survivin ist mit einer schlechten Prognose, Metastasierung und Chemotherapieresistenz assoziiert. Dies macht es zu einem besonders attraktiven Ziel zielgerichteter Therapeutika. Diese Arbeit soll präklinische Daten als Basis für den möglichen klinischen Einsatz einer MDM2-Inhibitor basierten Kombinationstherapie liefern.

Methoden

Die Effekte der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität, Migration und Apoptose wurden *in vitro* mit etablierten Neuroblastom-Zelllinien mit unterschiedlich genetischem Hintergrund untersucht. Die Effekte der Kombinationsbehandlung auf die Neuroblastom-Zellviabilität wurden mittels XTT untersucht. Die Zellviabilitätswerte wurden in relative Kombinationswirkungswerte umgewandelt und die CI-Werte wurden mit der CompuSyn-Software gemäß Chou & Talalay

(1984) berechnet. Scratch Assays wurden durchgeführt, um die Effekte der Kombinationsbehandlung auf die Migration zu untersuchen. Die Apoptose-Induktion wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Annexin/PI- und Caspase-3-Antikörpern und durch Immunoblot-basierten Nachweis der PARP-Spaltung nachgewiesen. Die p53-Abhängigkeit wurde mit Neuroblastom-Zelllinien getestet, die eine dominant negative *TP53*-Mutante exprimieren. Die Untersuchung der entsprechenden Zielgen-Expression wurde mittels Western Blot durchgeführt.

Ergebnisse

Wir untersuchten die Wirkung des MDM2-Inhibitors DS3032b mit herkömmlicher Chemotherapie und konnten eine synergistische Verstärkung der Viabilitätshemmung zeigen. Zur weiteren Charakterisierung haben wir uns auf den klinisch weiter entwickelten MDM2 Inhibitor RG7388 und die Kombination mit dem Survivin-Inhibitor YM155 fokussiert. Wir konnten zeigen, dass die Kombination von MDM2- und Survivin-Inhibition die Viabilität der Neuroblastomzellen reduziert und zu synergistischen CI-Werten führt. Die Migrationsfähigkeit von Neuroblastomzellen wurde durch die Kombinationsbehandlung reduziert. Der durchflusszytometrische Nachweis von Annexin V/Propidiumjodid (PI)-Färbung und Caspase 3-Aktivität sowie der Immunoblot-basierte Nachweis von gespaltenem PARP zeigten, dass die Kombinationsbehandlung die Apoptose-induktion in Neuroblastom-Zelllinien dosisabhängig verstärkt. Stabile, ektopische dn-*TP53*-Expression schwächte die RG7388-Einzelwirkstoff-Behandlung ab, beeinflusste aber nicht die durch YM155 oder die Kombinationsbehandlung vermittelte Apoptose-Induktion.

ABSTRACT

Background

The treatment of high-risk neuroblastoma is currently one of the most important challenges in pediatric oncology. Despite aggressive multimodal treatment, the 5-year survival rate of patients with high-risk neuroblastoma is approximately 50%, and recurrence or progression of the tumor disease is often fatal. Thus, the development of new, targeted therapeutic approaches is one of the most important goals of pediatric oncological research. Targeted activation of the tumor suppressor p53 by inhibition of the p53 negative regulator MDM2 has been extensively studied in neuroblastoma. In order to prevent the development of *de novo* mutations it is of great interest to investigate effective combination therapies to achieve more durable treatment responses. We investigated the effect of the MDM2 inhibitor DS3032b in combination with chemotherapy and the combination of the MDM2 inhibitor RG7388 with the Survivin inhibitor YM155. Survivin overexpression is associated with poor prognosis, metastasis, and chemotherapy resistance, making it an attractive target for novel therapeutic approaches. This work aims to provide basic, preclinical data as a basis for potential clinical use of MDM2 inhibitor-based combination therapy.

Methods/Materials

The effects of the combination treatment on cell viability, migration and apoptosis was investigated *in vitro* using established neuroblastoma cell lines with varying genetic backgrounds. The effects of the combination treatment on neuroblastoma cell viability was investigated using XTT and CI values were calculated, using CompuSyn software. Scratch Assays were performed to investigate the effects of the combination treatment on migration. Apoptosis induction was detected by flow cytometry using Annexin/PI, Caspase-3 antibody and by immunoblot based detection of PARP cleavage. TP53 dependency was tested using neuroblastoma cell lines overexpressing a dominant negative TP53 mutant. Mode-of-action analysis was performed using western blotting experiments.

Results

We investigated the effect of the MDM2 inhibitor DS3032b with conventional chemotherapy and demonstrated synergistic enhancement of viability inhibition. We characterized the effects of the clinically more advanced MDM2 inhibitor RG7388 in combination with the Survivin inhibitor YM155. We demonstrated that the combination of MDM2 and Survivin inhibition reduced neuroblastoma cell viability and led to synergistic CI values. The migratory ability of neuroblastoma cells was reduced by the combination treatment. Flow cytometric detection of annexin V/propidium iodide (PI) staining, caspase 3 activity and immunoblot-based detection of cleaved PARP demonstrated that combination treatment enhanced apoptosis induction in neuroblastoma cell lines. Stable, ectopic dn-TP53 expression attenuated RG7388 single-agent treatment but did not affect apoptosis induction mediated by YM155 or combination treatment.

1 EINLEITUNG

1.1 EPIDEMIOLOGIE & ÄTIOLOGIE

Das Neuroblastom ist ein neuroektodermaler Tumor, der aus den Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems entsteht und sich durch seine klinische, sowie biologische Heterogenität auszeichnet. Es macht, mit einer Prävalenz von 1:7000 Lebendgeborenen und einer jährlichen Inzidenz von 1,3 Erkrankungen pro 100.000 Kinder < 15 Jahren, 7-8% aller kindlicher Krebserkrankungen in den Industrienationen aus. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 14 Monaten (1). Die Ätiologie des Neuroblastoms ist bisher noch ungeklärt, genetische Veränderungen sind sehr heterogen und bisher konnten keine, konstant auftretende, genetischen Veränderung identifiziert werden.

1.2 GENETIK, PATHOGENESE, KLASSIFIKATION

In der überwiegenden Mehrheit der Neuroblastome lassen sich allerdings zahlreiche spontane, somatische Genveränderungen finden, denen keine Keimbahnmutation zugrunde liegt. Im Folgenden werden einige ausgewählte molekularen Veränderungen dargestellt.

1.2.1 MYCN AMPLIFIKATION

MYCN ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Proliferation, Migration, sowie Aktivierung des Zellzyklus in Neuroblasten eine wichtige Rolle spielt. Dementsprechend verhindert eine Amplifikation von *MYCN* den Zellzyklusaustritt, sowie Differenzierung der Zelle und ist somit grundlegend an der Tumorentstehung beteiligt. Die Amplifikation des *MYCN*-Onkogens, auf Chromosom 2p24, tritt in etwa 20% der Neuroblastome auf und ist assoziiert mit besonders aggressiven biologischen Eigenschaften des Tumors, einem hohen Tumorstadium und schlechtem

Therapieansprechen. Es ist somit der wichtigste Prognosefaktor des Neuroblastoms und bestimmt die weitere therapeutische Strategie (2, 3). *MYCN* kodiert für den Transkriptionsfaktor N-MYC, der zusammen mit C-MYC und L-MYC der Gruppe der Proto-Onkogene angehört. N-MYC oder synonym *MYCN*, zeichnet aus, dass es insbesondere während bestimmter Embryonalstadien hauptsächlich im Nervengewebe und mesenchyalem Gewebe exprimiert wird und nur selten in adultem Gewebe

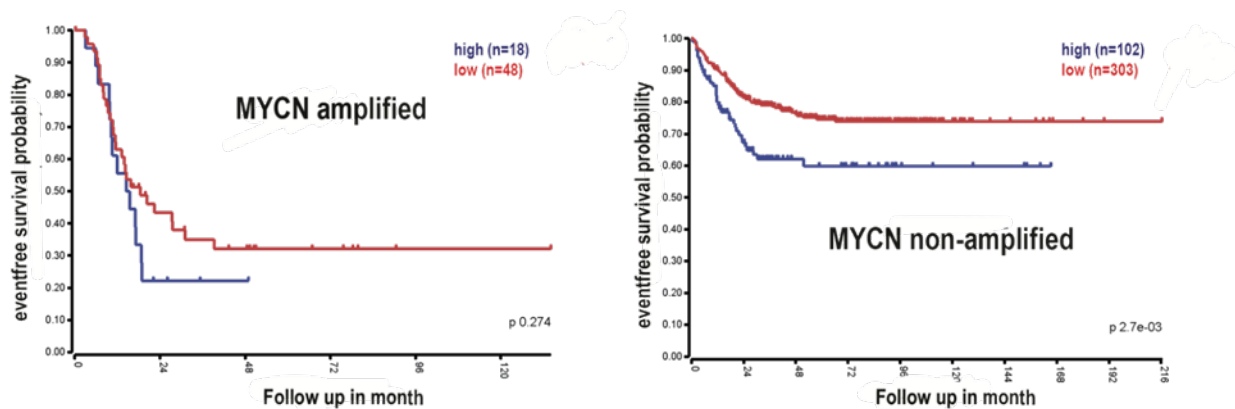


Abbildung 1. Die Assoziation von MYCN Amplifikation und der Überlebensraten in 471 Neuroblastompatienten. Die Abbildung zeigt die Überlebenskurven von 471 primären Neuroblastomen in Abhängigkeit von der MYCN-Amplifikation (4).

1.2.2 *ALK* MUTATION UND AMPLIFIKATION

Die anaplastische Lymphom-Kinase (*ALK*) ist eine Tyrosinkinase und wird insbesondere in embryonalem und neonatalem Nervengewebe exprimiert (5). Die Bildung von *ALK*-Fusionsproteinen, durch chromosomale Translokation führt zu einer Aktivierung von *ALK* und wurde bereits in einer Vielzahl maligner Tumore nachgewiesen. Aktivierende *ALK* Mutationen an den Positionen R1275, F1174 und 1245 und Genamplifikationen sind, insbesondere wenn sie mit *MYCN* Amplifikationen auftreten, assoziiert mit hochaggressiven Neuroblastomen (6, 7). In 7-12% der Fälle sind *ALK* Mutationen sporadisch erworben (6, 7), *ALK*-Keimbahnmutationen gelten als Hauptursache des familiären Neuroblastoms, das aber vergleichsweise selten (1-2 % der NBs) auftritt (8, 9). Die aktivierte alkalische Lymphomkinase beeinflusst eine Vielzahl an Signalwegen,

die das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung beeinflussen. Die Aktivierung dieser Signalwege, zu denen der MAPK Signalweg(10), PI3K/AKT (11) und JAK-STAT (12) gehören, werden aktuell für das aggressive Wachstum von Neuroblastomen diskutiert. Die Inhibition der ALK Signaltransduktion ist somit ein attraktives Ziel in der Neuroblastomtherapie. ALK Inhibitoren binden an die ATP Bindungsstelle des Rezeptors, sodass die Autophosphorylation und somit Signaltransduktion von ALK gehemmt werden. Zu den ersten ALK Inhibitoren, die für die Behandlung von Patienten mit nichtkleinzelligem Lungen-Karzinom und deregulierter ALK Funktion eingesetzt wurden, zählen Crizotinib (Avelumab, Pfizer, NCT02584634), LDK378 (Ceritinib; Novartis Pharmaceuticals; NCT017 42286) und Alecitinib (CH5424802; Alecensa; NCT01871805) (13). Der Einsatz dieser ALK-Inhibitoren ist allerdings, durch die Entwicklung verschiedener Resistenzmechanismen, begrenzt. Für den erfolgreichen Einsatz dieses gezielten Therapieansatzes ist die Detektion sinnvoller Kombinationstherapie essenziell und wird aktuell in ersten klinischen Studien untersucht.

1.2.3 DELETION VON CHROMOSOM 11Q

Bei 20-45% der neu diagnostizierten Neuroblastome finden sich Deletionen des chromosomalen Abschnittes 11q. Seit der Identifizierung dieser chromosomalen Aberration zielen viele Studien auf die Identifikation möglicher Kandidaten für Tumorsuppressorgene an dieser Lokalisation und die somit ausgelösten genetischen Veränderungen ab. Es wurde eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert, deren veränderte Expression stark mit dem Verlust der 11q Region korreliert ist (14). Es wird vermutet, dass die Deletion von 11q einhergeht mit einer eingeschränkten Funktionalität von Tumorsuppressoren (15), wie H2AFX (16) oder TSCL1 (17).

Klinisch korreliert die chromosomale Deletion von 11q stark mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und hohem Rezidivrisiko (18). Es ist also weiterhin von hohem Interesse, mögliche, für die Entstehung und Progression des Neuroblastoms relevante Gene zu identifizieren,

die an dieser Stelle lokalisiert sind, um neue therapeutische Strategien für Patienten mit dieser chromosomalen Aberration zu entwickeln.

1.2.4 ZUGEWINN VON CHROMOSOM 17Q

Der somatische Zugewinn des distalen Anteils von Chromosom 17q ist die häufigste genetische Veränderung im Neuroblastom und tritt entweder als Zugewinn des gesamten Chromosoms (z.B. Tetrasomie 17 bei einem triploiden Tumor), oder als partieller Zugewinn des distalen Anteils 17q21 auf. Die Hälfte der Primärtumore weisen einen Zugewinn von 17q auf und sind assoziiert mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, einem höheren Erkrankungsalter, *MYCN* Amplifikation und 1p Deletion (19). Mindestens zwei Gene, *BIRC5/SURVIVIN*, welches für das anti-apoptotische Protein Survivin kodiert und *NM23/NME1*, welches für eine Nukleosiddiphosphatkinase kodiert, sind mögliche Kandidatengene dieser Region und scheinen bei der Ausbildung dieses aggressiven Phänotyps des Neuroblastoms eine Rolle zu spielen (20-22).

1.2.5 PLOIDIEGRAD

Etwas 50 % der neuroblastischen Tumore weisen einen hyperdiploiden oder triploiden DNA Gehalt auf. Der DNA-Gehalt im Vergleich zur diploiden Referenz wird durchflusszytometrisch bestimmt und als DNA-Index bezeichnet. Ein hyperdiploider DNA-Index hat einen hohen positiv prognostischen Wert bei Säuglingen <18 Monaten und ist zusammen mit dem Vorhandensein eines intakten Chromosom 1 vermutlich eine genetische Vorbedingung für die spontane Differenzierung der Neuroblastomzellen und somit günstiger Prognose (23). Ebenso haben Patienten mit einem triploiden Chromosomensatz oder Trisomien eine ähnlich gute Prognose (24). Dagegen sind die Patienten mit Tumoren, die einen tetraploiden Chromosomensatz oder einer

Tetrasomie aufweisen, mit einem aggressiven Verlauf assoziiert und haben eine deutlich schlechtere Prognose (24).

1.3 PROGNOSTISCHE FAKTOREN UND RISIKOKLASSIFIKATION

Bis 2009 wurden Neuroblastompatienten in die Risikogruppen 1, 2A/B, 3, 4 und 4S, anhand der Metastasierung und Ausmaß der Tumorresektion zum Diagnosezeitpunkt eingeteilt. Patienten im Tumorstadium 1 und 2 hatten grundsätzlich eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium (Stadium 3 und 4). Bei dem Stadium 4S handelt es sich um einen Sonderfall, zu denen Kinder <1 Jahr zählten, die trotz disseminierter Erkrankung (Metastasierung in Leber, Haut und Knochenmark) eine günstige Prognose hatten.

Um eine einheitliche Risiko- und somit auch Therapiestratifizierung zu entwickeln, wurden durch ein internationales Expertengremium 13 prognostisch relevante Faktoren untersucht, die zu der Etablierung der international gültigen Risikoklassifikation, der Internationalen Neuroblastom Risiko Gruppen (INRG)-Klassifikation, führte. Hierfür wurden die Daten von 8,800 Neuroblastom-Patienten, die zwischen 1990 und 2002 in Nordamerika und Australien (Childrens Oncology Group), Europa (International Society of Pediatric Oncology Europe Neuroblastoma Group und German Pediatric Oncology and Hematology Group) und Japan diagnostiziert wurden, untersucht. Die Therapiestratifizierung erfolgt in drei Risikogruppen: Sehr niedriges (5- Jahres EFS >85%), niedriges (5-Jahres EFS >75% - <85%), intermediäres (5-Jahres FS >50 - <75%) und hohes Risiko (5 Jahres EFS <50%). Ausschlaggebende Faktoren sind, neben dem Alter und *MYCN* Status auch 1p36-Deletion, die Histopathologie, sowie der DNA-Ploidiegrad (25).

INRG-Stadium ^a	Alter	Diagnose, Gruppe, Tumor, Graduierung	MYCN	11q-Aberration	Ploidiegrad	Prätherapeutische Risikogruppe
L1		GN ausreifend, GNB intermixed	NA			A, sehr niedriges Risiko
		Alle anderen außer GN	NA			B, sehr niedriges Risiko
		Ausreifend oder GNB intermixed	Amp			H, mittleres Risiko
L2		GN ausreifend, GNB intermixed				A, sehr niedriges Risiko
	<18 Monate	Alle anderen außer GN	NA	Nein		D, niedriges Risiko
		Ausreifend oder GNB intermixed		Ja		I, mittleres Risiko
	≥18 Monate	GNB nodulär, differenzierend NB differenzierend	NA	Nein		E, niedriges Risiko
		GNB nodulär, gering differenzierend oder undifferenziert, NB gering differenzierend	NA	Ja		J, mittleres Risiko
	Jedes Alter		NA	(Beides)		J, mittleres Risiko
M	<18 Monate		Amp			N, hohes Risiko
			NA		Hyperdiploid	F, niedriges Risiko
					Diploid	G, niedriges Risiko
	≥18 Monate		Amp			O, hohes Risiko
Ms	<18 Monate					P, hohes Risiko
			NA	Nein		C, sehr niedriges Risiko
				Ja		K, mittleres Risiko
		Amp			Q, hohes Risiko	

GNB Ganglioneuroblastom, *GN* Ganglioneurom, *NB* Neuroblastom, *NA* nicht amplifiziert, *Amp* amplifiziert
^a Tab. 24.2

Tabelle 1. Schema der Internationalen Risikogruppe zur prätherapeutischen Klassifikation.

L1: Lokalisierter, auf ein Körperkompartiment beschränkter Tumor, **L2:** Lokoregionaler Tumor. **M:** Metastasiertes Erkrankungsstadium. **Ms:** Metastasierte Erkrankung mit Beschränkung auf Haut, Leber und/oder Knochenmark bei Kindern <18 Monate. **Alter:** 12 Monate entsprechen 365 Tagen, somit entsprechen 18 Monaten 547 Tagen. **Histopathologie:** GN: Ganglioneurom, GNB: Ganglioneuroblastom. **MYCN:** Amp: Amplifiziert. NA: Nicht amplifiziert. **Ploidiegrad:** diploid (DNA-Index 1.0); hyperdiploid (DNA-Index 1.0 und umfasst triploide und tetraploide Tumore). Sehr niedriges (5- Jahres EFS >85%), Niedriges (5- Jahres EFS >75% - <85%), intermediäres (5-Jahres FS >50 - <75%) und hohes Risiko (5 Jahres EFS <50%) (26).

Ackermann et. al haben eine erweiterte, mechanistische Klassifikation des Neuroblastoms auf Grundlage molekularer Merkmale vorgeschlagen. Hierfür wurden 416 Proben vorbehandelter Neuroblastome auf genomischer Ebene sequenziert, wobei für 208 dieser Tumore weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Erhaltung der Telomere durchgeführt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten ohne Mechanismen, die der Erhaltung der Telomere dienen, eine deutlich bessere Prognose hatten, als die Patienten mit entsprechenden Erhaltungsmechanismen. Am niedrigsten waren die Überlebensraten der Neuroblastom Patienten, die neben den Telomer Erhaltungsmechanismen auch Mutationen im *RAS/MAPK* und p53 Signalweg aufwiesen. Damit werden in dieser Arbeit Neuroblastompatienten, die Telomererhaltungsmechanismen mit zusätzlicher *ALK* aufweisen als Ultra-Hochrisiko-Patienten eingestuft. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde eine zusätzliche Klassifikation entwickelt, die eine feinere

Risikostratifizierung erlauben und so das Überleben von Neuroblastompatienten verbessern könnte (Tab. 2).

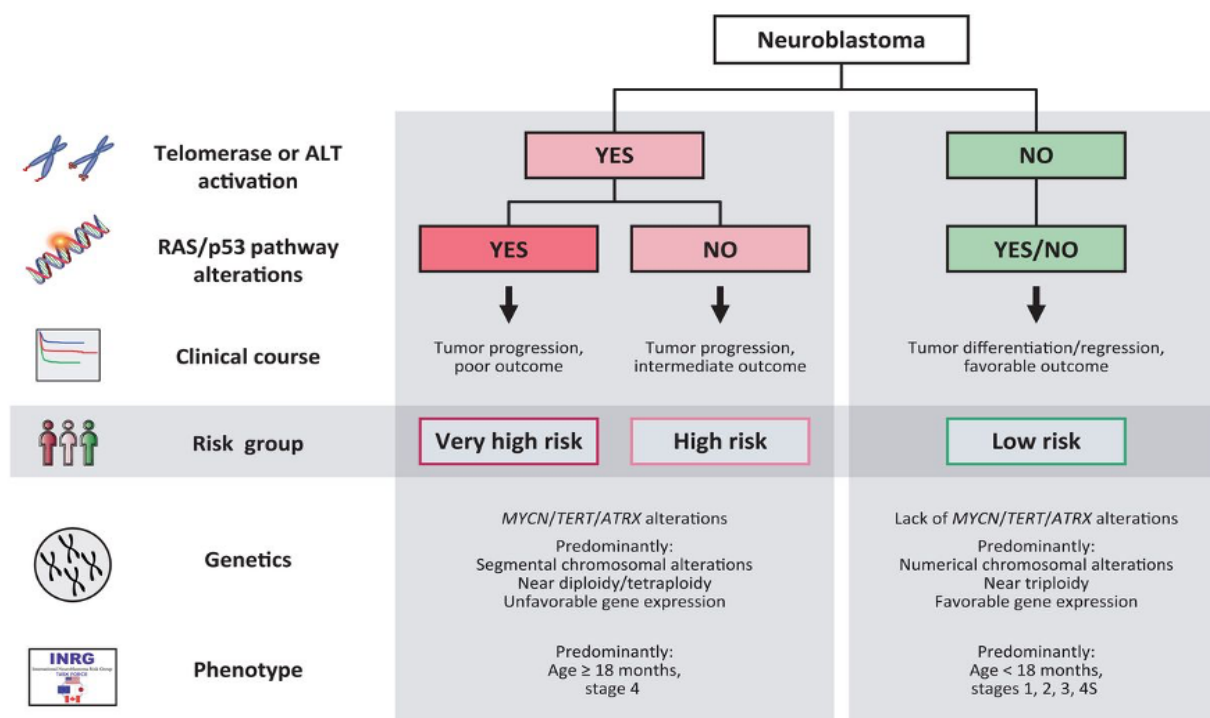


Tabelle 2. Schematische Darstellung der Risikostratifizierung gemäß mechanistischer Definition.

Die Klassifizierung wurde auf Grundlage der Telomerase Aktivität, RAS oder p53 Mutationen und weiterer bekannter genetischer und klinischer Eigenschaften, die zur Risikostratifizierung herangezogen werden (*MYCN*, *TRT*, *ATRX* Veränderungen, klinischer Phänotyp) (27).

1.4 RISIKOADAPTIERTE THERAPIE

Die klinische und biologische Heterogenität des Neuroblastoms erfordern eine risikoadaptierte Therapie. Grundsätzlich umfasst sie die Therapiemodalitäten der Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Für die histopathologische Diagnosestellung und molekulare Einordnung des Tumors erfolgt eine Biopsie des Primärtumors mit ggf. zusätzlicher Resektion potentiell befallener Lymphknoten. Die Resektion des Primärtumors erfolgt in der Regel erst nach neo-adjuvanter Chemotherapie. Insbesondere abdominelle Hochrisikotumore könnten jedoch aufgrund ihrer Nähe zu den großen Bauchgefäßen und den Nierengefäßen meist nicht mikroskopisch im Gesunden reseziert werden. Daher ist die nachfolgende Bestrahlung des Tumorbetts und ggf. eines

erkennbaren Resttumors, sowie von vitalen, MIBG-aviden (meist Knochen-)Metastasen, essentieller Bestandteil der Therapie von Hochrisikopatienten (28). Bei niedrigem oder intermediärem Risiko wird sie nur nach individueller Risikoabschätzung angewandt.

Die wichtigste Therapiemodalität für Patienten mit intermediärem oder hohem Risiko stellt die Chemotherapie dar. Die Kombination aus Alkylanzien, Anthrazyklinen, Platinanaloga, Epipodophyllotoxinen und Camphotecinen hat sich in Phase II- und III Studien, als wirksam gezeigt.

1.4.1 NIEDRIGES RISIKO

Das Phänomen der Spontanregression unterscheidet das Neuroblastom von anderen Tumorentitäten im Kindesalter und erlaubt einen milden Therapieansatz. Eine Spontanregression ist bei Kindern innerhalb der ersten 2 Lebensjahre mit einem günstigen molekularen Risikoprofil zu erwarten. In 40% der Fälle kommt es zur lokalen Tumorprogression, die mit einem chirurgischen Eingriff mit zusätzlicher milder Chemotherapie (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin) geheilt werden kann und mit einer Überlebensrate von 97% einhergeht. Selbst bei inkompletter Resektion des Tumors haben diese Patienten, unabhängig von ihrem Alter, ein ereignisfreies Überleben von >85% und ein Gesamtüberleben von 99%. Lokale Rezidive können meist erfolgreich mit den oben genannten Therapiemodalitäten kontrolliert werden.

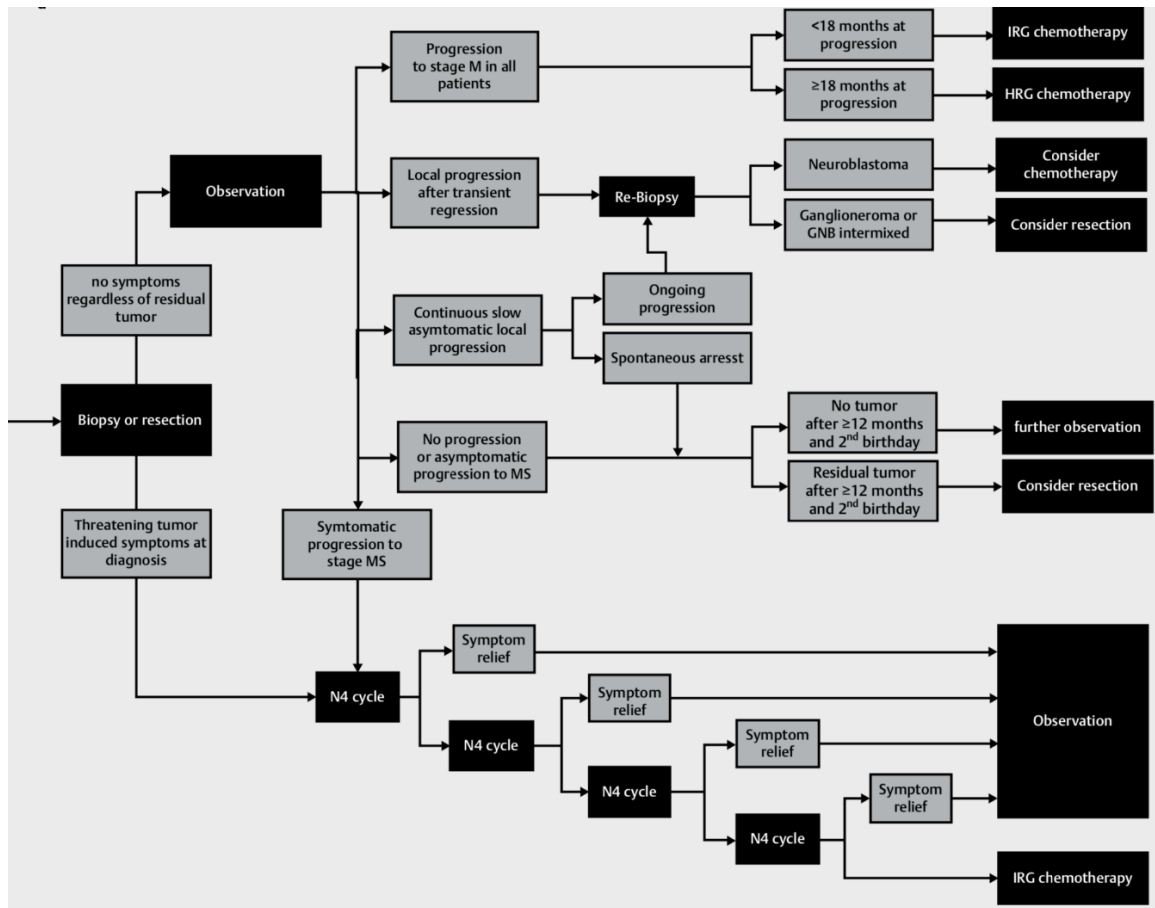


Abbildung 2. Übersicht über die Therapiemodalitäten der Patienten mit niedrigem Risiko.

Patienten mit niedrigem Risikoprofil gehören zu der Beobachtungsgruppe. Patienten ohne Symptome und ohne Progress der Erkrankung werden beobachtet. Wird im Anschluss keine komplette Remission erreicht, ist ein chirurgischer Eingriff ohne weitere Therapie ausreichend. Sollten eine Progression zum Stadium MS oder initial Symptome auftreten, die vital bedrohlich sind, werden die Patienten mit einem oder mehreren Zyklen milder Chemotherapie behandelt. Patienten mit einem Progress der Erkrankung zum Stadium M werden je nach Alter (< / ≥ 18 Monate) gemäß der mittleren oder hohen Risikogruppe behandelt. Patienten mit lokalem Progress werden nach einer Re-Biopsie und entsprechender Histopathologie mit einer milden Chemotherapie oder Operation behandelt. Patienten mit einem Progress zum Stadium 4 werden gemäß Hochrisiko Therapiestandard behandelt (29). **N4:** Chemotherapiezyklus **IRG:** intermediate risk group **HRG** high risk group

1.4.2 INTERMEDIÄRES RISIKO

Das Spontanregressionspotential in der Gruppe mit intermediärem Risiko ist gering und umfasst die Patienten mit metastasierter Erkrankung ohne *MYCN*-Amplifikation, Patienten > 24 Monate mit Stadium 2 und Patienten mit Stadium 2 oder 3 und 1p Deletion. Sie machen ca. 15% aller Neuroblastome aus. Diese Patienten erhalten eine mittelintensive Chemotherapie (mit Cisplatin, Etoposid, Vindesin, Vincristin, Dacarbacin, Ifosfamid/Cyclophosphamid und Doxorubicin). Nach

individueller Risikoabschätzung und je nach Behandlungsverlauf, können zusätzliche Therapiemaßnahmen, wie eine Operation und/oder Strahlentherapie erfolgen.

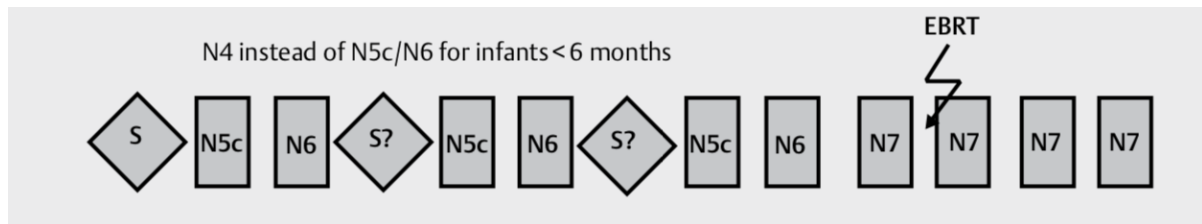


Abbildung 3. Übersicht über die Therapiemodalitäten der Patienten mit intermediärem Risiko.

Patienten mit intermediärem Risiko werden mit einer mittelintensiven Chemotherapie behandelt (29). S: Operation; N5/6/7: Chemotherapiezyklus; EBRT: externe Strahlentherapie

1.4.3 HOHES RISIKO

Trotz maximaler Ausschöpfung aller Therapieoptionen beträgt die 5-Jahres Überlebensrate der Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastom ca. 50%, ein Rezidiv oder ein Progress der Tumorerkrankung verlaufen häufig letal (5 Jahres-Langzeitüberleben: 20 % (30)). Die multimodalen Therapien des Hochrisiko- Neuroblastoms umfassen eine intensive Induktionschemotherapie, eine möglichst komplette chirurgische Resektion (ggf. kombiniert mit Strahlentherapie), eine myeloablative Konsolidierung mit Blutstammzell-Rückgabe, sowie, zur Eradizierung potentieller residualer Tumorzellen Immuntherapeutika (Abb. 4). Die Nebenwirkungen dieser Therapie (Hochdosischemotherapie, operative Resektion, Radiotherapie, autologe Stammzelltherapie und Immuntherapie) sind gravierend und verursachen bei den Überlebenden beträchtliche Langzeitfolgen (29).

Um eine möglichst maximale Reduktion des Tumorumfanges und der Metastasen zu erreichen, erfolgt initial eine Induktionstherapie, in der Cisplatin mit Anthrazyklinen, Alkylanzien und Topoisomerase-II-Inhibitoren kombiniert werden. Das Ziel ist es, hierbei möglichst schnell und dosisintensiv zu behandeln, um der schnellen Resistenzentwicklung entgegenzuwirken. Zur Lokalkontrolle erfolgt die möglichst komplette chirurgische Resektion. Die Bestrahlung des

Primärtumorbetts (im präoperativen Ausmaß) scheint das Risiko eines Lokalrezidivs zu senken (31). Um weitere, Chemotherapie-insensitive Tumorzellen zu eliminieren, kommt das Konzept der Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer SZT zum Tragen. Hierbei hat sich die myeloablative Konditionierung mit Busulfan/Melphalan gegenüber der Konditionierung mit Carboplatin / Etoposid, Melphalan als signifikant überlegen gezeigt (32).

Da die Sammlung peripherer hämatopoetischer Stammzellen weniger invasiv möglich ist und eine CD34+ Selektion, um residuelle Tumorzellen zu eradizieren, ermöglicht, werden diese bei der autologen Stammzelltransplantation vorrangig genutzt. Der Vorteil einer allogenen Stammzelltransplantation hat sich in internationalen Studien bisher nicht als überlegen gezeigt.

Da Rezidive auch nach o.g. Therapieelementen häufig sind und mit Heilungsraten von 20% einher gehen, ist eine Dauertherapie zur Eliminierung residualer Tumorzellen von großer Bedeutung. Nachdem sich eine Dauertherapie mit cis-Retinsäure als wenig effektiv erwies, scheint eine Immuntherapie mit gegen das Neuroblastom-spezifische Oberflächengangliosid GD2 gerichteten Antikörpern ein vielversprechender Therapieansatz zu sein. Yu et.al konnten 2010 zeigen, dass eine Kombination des chimären GD2-Antikörpers ch14.18, IL-2 und GM-CSF bei Hochrisiko Patienten zu einem signifikanten höheren 4 Jahres-Überleben gegenüber cis-Retinsäure allein geführt hat (33).

Trotz dieser hochkomplexen Therapie sind die Heilungschancen von Kindern mit Hochrisiko-Neuroblastom weiter schlecht und Langzeitüberlebende leiden häufig unter beträchtlichen und anhaltenden Folgen der Therapie. Hierzu zählen neben Infertilität, Kardiotoxizität, Ototoxizität, auch das Auftreten von Zweitmalignomen.

Durch die molekulargenetische Analyse von Tumormaterial hat man wichtige Informationen über veränderte molekulare Signalwege erhalten, die den Tumorprogress und Therapieresistenzen begünstigen. Eines der aktuell wichtigsten Ziele der pädiatrischen Onkologie ist es nun, diese

molekularen Informationen in neue zielgerichtete Therapien umzusetzen, um therapieassoziierte Nebenwirkungen zu senken und gleichzeitig das Überleben zu verbessern.

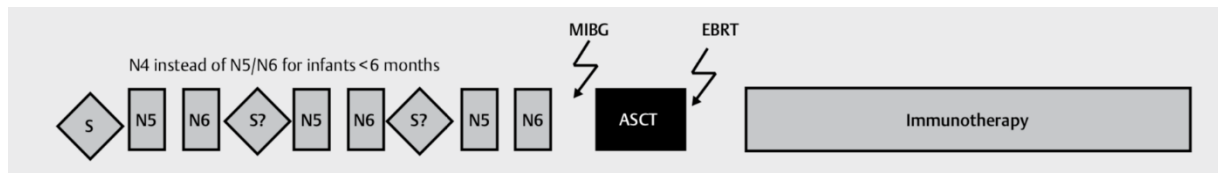


Abbildung 4. Übersicht über die Therapiemodalitäten der Patienten mit hohem Risiko.

Patienten mit hohem Risikoprofil erhalten eine hochkomplexe Behandlung mit den Modalitäten: Start mit einer hochdosierten Chemotherapie, gefolgt von einer kompletten Tumorresektion bei ausreichendem Ansprechen, Bestrahlung aller Tumorbereiche und autologer Stammzelltransplantation. Erhaltungstherapie mit Antikörpern, die gegen das Neuroblastom-spezifische Oberflächenglycosid GD2 gerichtet sind (29). **S**: Operation; **N5/N6/N8**: Chemotherapiezyklus; **MIBG**: MIBG Behandlung; **ASCT**: Autologe Stammzelltransplantation; **EBRT**: externe Strahlentherapie; **Immunotherapy**: Immuntherapie.

1.5 DIE ROLLE VON TP53 IM NEUROBLASTOM

Die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 ist ein häufiger Mechanismus der Tumorentstehung. Das Protein p53 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Apoptose, Zellzyklus-Arrest, Differenzierung und Seneszenz. Unter normalen zellulären Bedingungen ist p53 auf niedrigem Niveau vorhanden mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten und akkumuliert nur bei zellulärem Stress, wie DNA-Schäden. Es bindet anschließend an eine spezifische DNA-Sequenz, um die Transkription einer Vielzahl an Genen wie *CDKN1A*, *MDM2* und *BAX* zu aktivieren. P21^{WAF1} hemmt die G₁ Cyclin abhängigen Kinasen und blockiert somit den Übergang der G₁ zur S-Phase. Über einen autologen Feedback Mechanismus wird die p53 Aktivität streng reguliert. MDM2 bindet an p53 und hemmt die transkriptionale Aktivität des Tumorsuppressors, P14^{ARF} hingegen hemmt die p53/MDM2 Interaktion und erhält somit die p53 Aktivität.

In 50% der im Erwachsenenalter diagnostizierten Tumore lassen sich *TP53* Mutationen nachweisen, die eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit des Tumorsuppressors zur Folge haben und somit entscheidend zur Tumorentstehung beitragen (34). Bei den meisten pädiatrischen Tumoren hingegen wird die p53 Funktionalität durch genetische Veränderungen der

vorgeschalteten Signalwege verursacht (35). Die wohl bekannteste nicht-mutationsbedingte Inaktivierung von p53 wird durch die Überexpression der E3-Ubiquitin Ligase MDM2 hervorgerufen (35). MDM2 ist ein nukleäres Protein, welches als wichtigster Negativregulator der p53 Aktivität und Stabilität fungiert. MDM2 kann p53 direkt binden, blockiert so die Transaktivierungsdomäne und kann p53 dem proteasomalen Abbau zuführen. Die Inhibition von MDM2 und die somit wiederhergestellte p53 Funktionalität mit nachgeschaltetem p53 Zellzyklusarrest und Apoptose-induktion ist ein besonders attraktiver Ansatz neuer zielgerichteter Therapien.

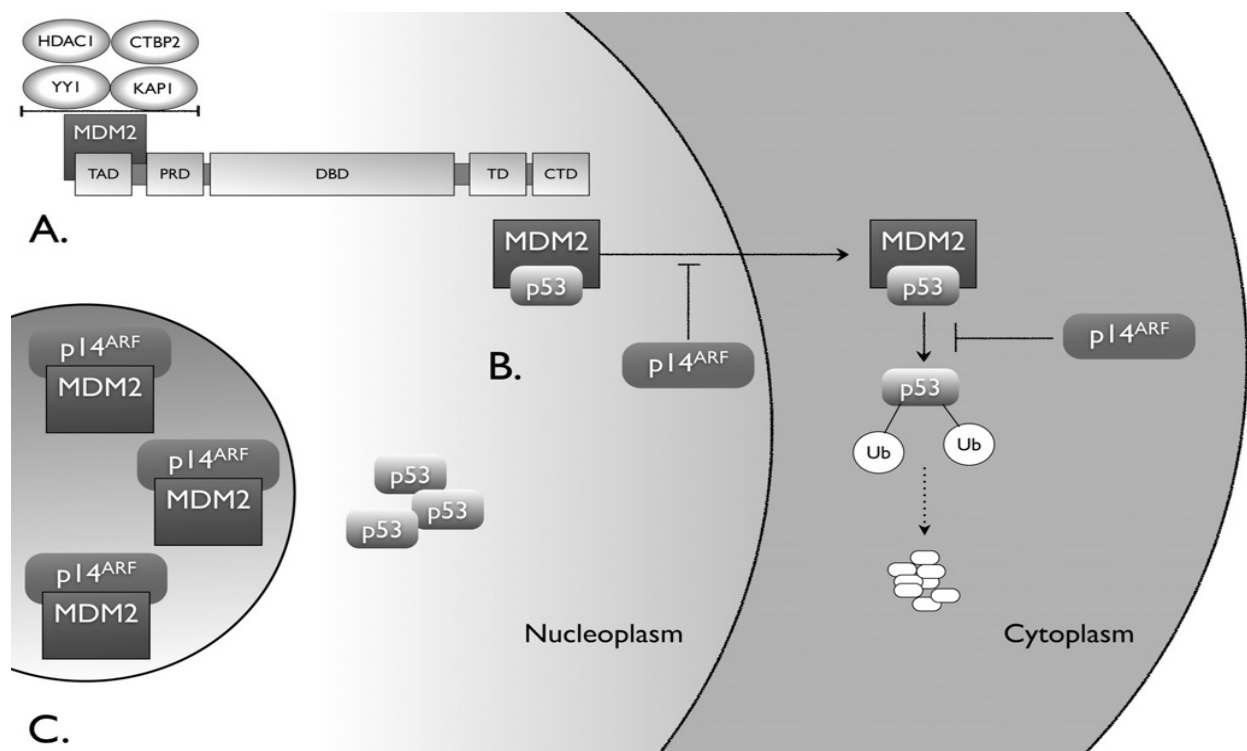


Abbildung 5. Abbildung der nicht mutationsbedingten Inaktivierung von p53 durch MDM2 Amplifikation oder *p14^{ARF}* Mutation.

A MDM2 kann die Transaktivierungsdomäne von p53 blockieren und somit die Transkriptionsaktivität des Tumorsuppressors hemmen. **B** MDM2 kann p53 aus dem Nucleoplasm exportieren und dem proteasomalen Abbau zuführen. *p14^{ARF}* kann MDM2 in den Nucleolus exportieren und somit die Ubiquitinierung von p53 verhindern (36).

1.5.1 MDM2 INHIBITOREN

Beim primären Neuroblastom sind *TP53*-Mutationen selten (<2%) und bleiben ein seltenes Ereignis beim Rezidiv (<15%) (37). Die Inaktivierung von p53 im Neuroblastom lässt sich auf Amplifikation oder Mutation von vorgeschalteten Genen, wie *MDM2* oder *CDKN2A*,

zurückführen (38). Diese biologischen Eigenschaften sind besonders günstig für den erfolgreichen Einsatz von MDM2 Inhibitoren. MDM2 Inhibitoren sind *cis*-Imidazoline (Nutlins) und wurden 2004 erstmals von Vassilev et al. als Verbindungen beschrieben (39). Die sogenannte Gruppe der Nutlins (Nutlin-1, Nutlin-2 und Nutlin 3) binden MDM2 an der p53 Bindungsstelle über 3 Aminosäurereste, verhindert so die Interaktion und stellt die p53 Funktionalität wieder her.

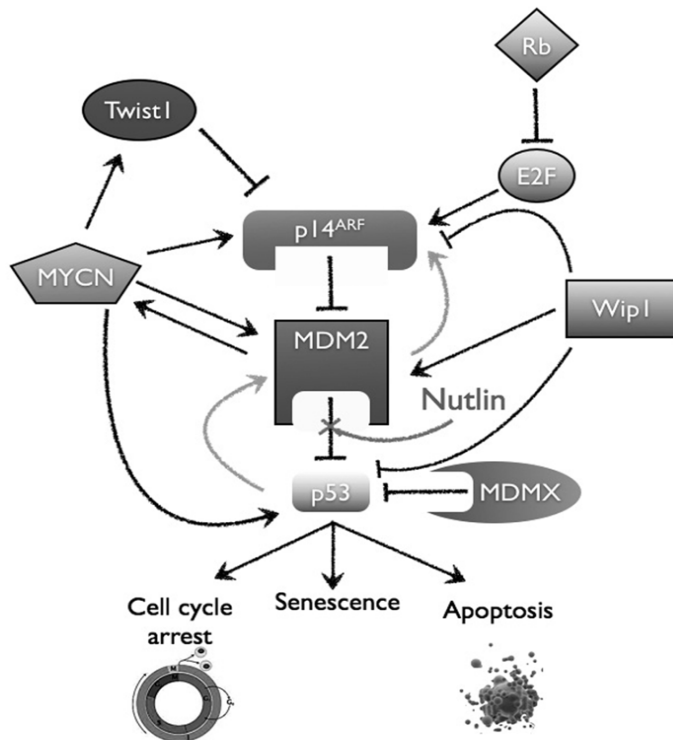


Abbildung 6. Abbildung der Regulationsmechanismen von p53.

Die durch p53 ausgelösten Signalwege des Zellzyklus-Arrest, Seneszenz und Apoptose-induktion unterliegen einem strengen Regulationsmechanismus, der unter anderem p14^{ARF} und MDM2 beinhalten. MDM2 wird durch einen autologen Feedbackmechanismus durch p53 aktiviert und hemmt anschließend die p53 Funktionalität. Wip1 stabilisiert MDM2 und erhöht die p53 Bindungsaffinität. MDM2 hingegen wird durch p14^{ARF} streng reguliert, welches durch E2F aktiviert wird. MDM2 Inhibitoren (Nutlin) setzen an der p53 Bindungsstelle an und blockieren somit die MDM2 Funktionalität (36).

Die Effekte von MDM2 Inhibitoren im Neuroblastom wurden bereits umfangreich untersucht. Zu der ersten Generation der MDM2 Inhibitoren zählt Nutlin-3. Dieser MDM2 Inhibitor wurde durch Van Maerken et al. in einem präklinischen Neuroblastommodell (*in vitro* und *vivo*) eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Nutlin-3 durch die Reaktivierung des p53 Signalwegs signifikante antitumorale Effekte in chemotherapieresistenten Neuroblastomzelllinien besitzt (40). Die klinische Einsatzfähigkeit der frühen Generation der MDM2 Inhibitoren (Nutlin-3 und RG7112) war jedoch durch eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, gastrointestinale Nebenwirkung und

dosislimitierende Thrombozytopenien, eingeschränkt (www.clinicaltrials.gov; NCT00623870, NCT00559533). Zu der neuen Generation der MDM2 Inhibitoren zählt RG7388 (Idasanutlin). Chen et al. haben die Wirksamkeit dieses neuen MDM2 Inhibitors alleine und in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika untersucht. Sie konnten zeigen, dass RG7388 alleine und in Kombination durch die Reaktivierung des p53 Signalwegs das Neuroblastomzellwachstum hemmen konnte und signifikante antitumorale Aktivität besitzt (41). Dies bildet nun die Grundlage für eine erste große pädiatrische Studie mit dem MDM2 Inhibitor RG7388 in Kombination mit konventioneller Chemotherapie und/oder in Kombination mit dem BCL2 Inhibitor ABT-19, die seit Juli 2019 bei pädiatrischen Patienten getestet wird (www.clinicaltrials.gov, NCT04029688).

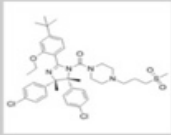
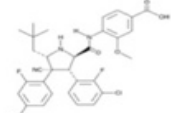
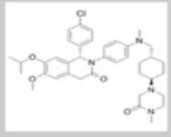
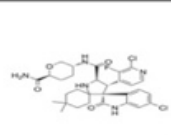
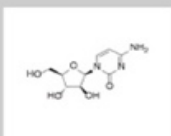
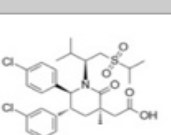
Mechanismus	Name	Struktur	Klinische Studien
Hemmung der MDM2 p53 Interaktion	RG7118		Phase I
Hemmung der MDM2 p53 Interaktion	RG7388		Phase III
Hemmung der MDM2 p53 Interaktion	NVP CGM097		Phase I
Hemmung der MDM2 p53 Interaktion	DS3032b		Phase II
Hemmung der MDM2 p53 Interaktion	MK8242		Phase I
Hemmung der MDM2 p53 Interaktion	AMG232		Phase II

Tabelle 3. Auswahl einiger MDM2 Inhibitoren.

Die Tabelle stellt einige MDM2 Inhibitoren mit ihrer Struktur vor, sowie den Mechanismus der MDM2 Inhibition und den aktuellen Stand der klinischen Studie (www.clinicaltrials.de)

1.6 DIE ROLLE VON SURVIVIN IM NEUROBLASTOM

Survivin zählt zu den „Inhibitors of Apoptosis“ (IAPs) und konnte in zahlreichen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden, wohingegen es in normalen, differenzierten Zellen kaum zu finden ist (42, 43). Die Gruppe der IAPs besteht aus acht Proteinen: Apollon, ML-IAP (melanoma-IAP)/Livin, ILP2 (IAP-like-protein 2), NAIP (neuronal apoptosis-inhibitory protein), c-IAP1, c-IAP2, XIAP (X-linked IAP) und Survivin. Die genauen Mechanismen der Apoptose-inhibition der IAPs werden noch kontrovers diskutiert, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass insbesondere XIAP direkte Caspase Bindungsaktivität besitzt und so ihre Funktionalität einschränken kann (44).

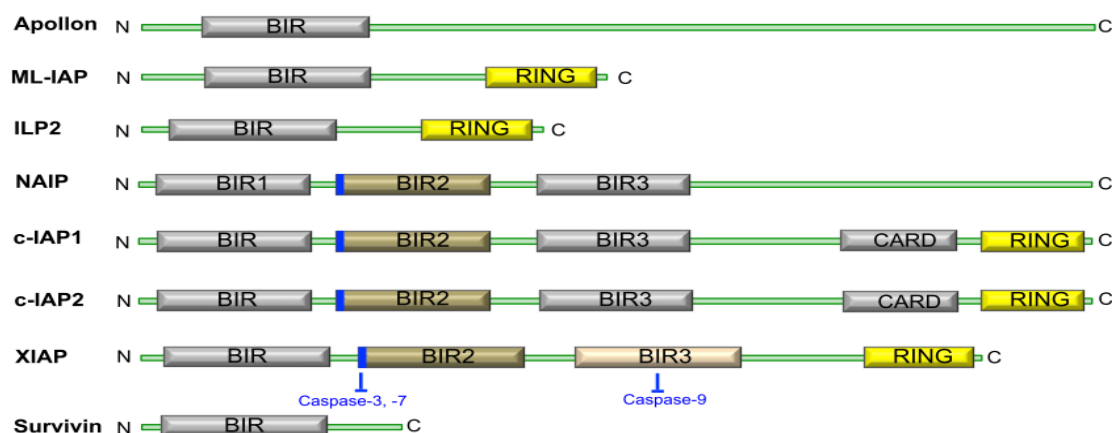


Abbildung 7. Struktur der Gruppe „Inhibitors of Apoptosis“.

Die Gruppe der IAPS besteht aus 8 Proteinen: Apollon, ML-IAP (melanoma-IAP) /Livin, ILP2 (IAP-like-protein 2), NAIP (neuronal apoptosis-inhibitory protein), c-IAP1, c-IAP2, XIAP (X-linked IAP) und Survivin. (45)

Es wurde lange Zeit angenommen, dass *BIRC5/SURVIVIN* nur selten in normalem, differenziertem Gewebe exprimiert wird. Neuere Studien legen allerdings nahe, dass *BIRC5/SURVIVIN* auch in normalen Zellen, wie T-Zellen (46), hämatopoetische Vorläuferzellen (47) und vaskulären, endothelialen Zellen (48) exprimiert wird. Allerdings wird *BIRC5/SURVIVIN*

deutlich häufiger in pathologisch veränderten Zellen nachgewiesen. In Neuroblastompatienten mit Stadium 3 und 4 wurden in 60% der Biopsieproben Survivin nachgewiesen (49), bei Patienten mit Colon-Karzinom (50) oder hochaggressiven Lymphomen lag der Anteil bei 50% (51). Somit gehört Survivin zu den wichtigsten tumorspezifischen Proteinen (52) und ist deshalb ein besonders attraktiver Angriffspunkt neuer zielgerichteter Therapien.

Die Funktionen von Survivin lassen sich grob unterteilen in die Apoptose Inhibition und die Mitoseregulation. Während der Apoptose greift Survivin insbesondere in den mitochondrial (intrinsisch) vermittelten Apoptoseweg ein. Höchstwahrscheinlich blockiert Survivin die Aktivierung von Caspase-9, indem es die Apoptosomenbildung (Cyt-c, Apaf-1 und Procaspase-9) hemmt. Außerdem reguliert Survivin die Aktivität des pro-apoptotischen und regulatorischen Proteins Smac/DIABLO und verstärkt so die Wirkung weiterer IAPs („Inhibitors of Apoptosis“).

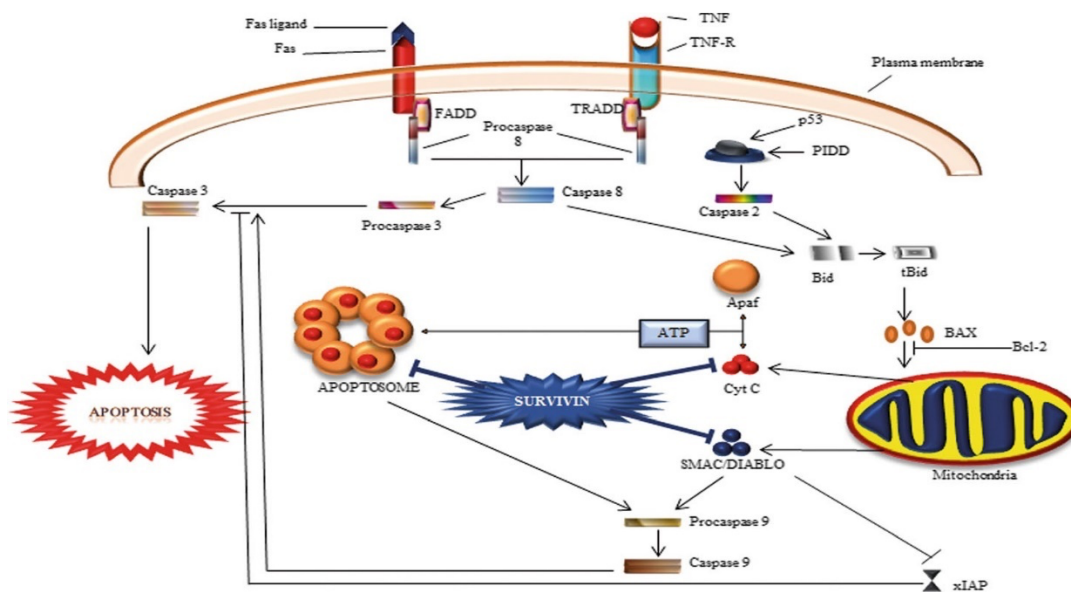


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Apoptose-induktion, sowie des antiapoptotischen Mechanismus von Survivin.

Der Mechanismus der Apoptose-induktion wird vereinfacht dargestellt durch die Unterteilung in den extrinsischen Signalweg (Caspase 8) und intrinsischen Signalweg (Caspase 9), deren Aktivierung wiederum in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 münden. Die Caspase 9 formt, zusammen mit Cyt-c, Apaf 1 den Apoptosomen-Komplex. Diese Formation wird durch Survivin blockiert. SMAC/Diablo ist ein pro-apoptotisches Protein, was die Aktivität der IAPs hemmt. Survivin blockiert die regulatorische Wirkung von SMAC/DIABOLO und stellt so die Wirkung von XIAP wieder her (53).

Survivin ist zudem in die Regulation der Mitose involviert, indem es, zusammen mit anderen Proteinen, den Chromosomal passenger complex (CPC-Komplex) bildet. Der CPC-Komplex bildet sich aus Survivin, der Aurorakinase A, Borealin und INCENP und reguliert die korrekte Chromosomen-Teilung bei der Mitose. Somit ist Survivin in zwei Signalwegen involviert, die bei der Tumorentstehung und Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielen.

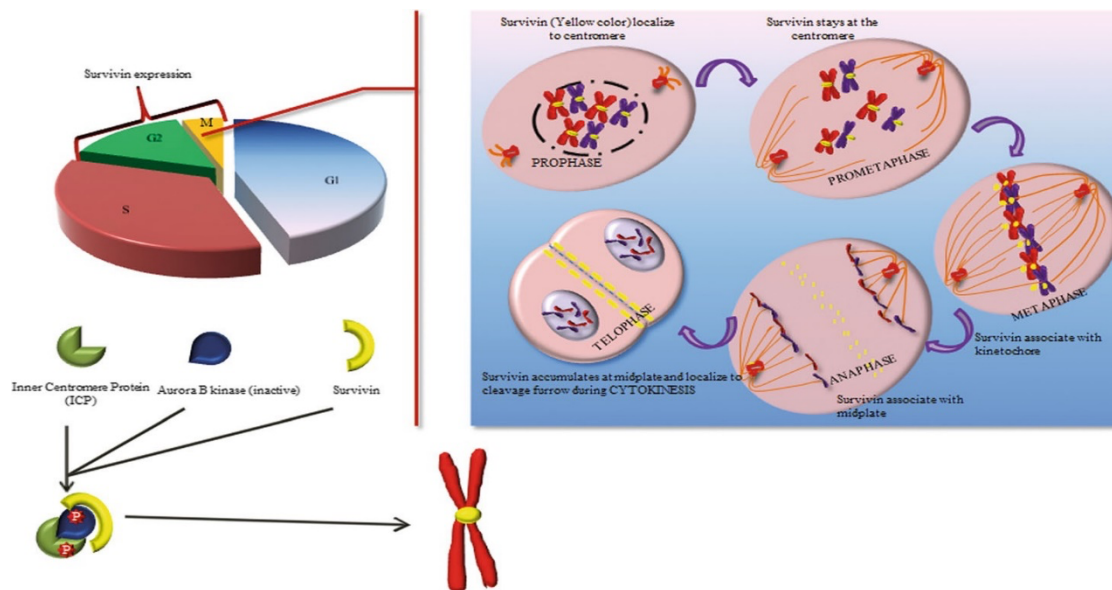


Abbildung 9. Die Rolle von Survivin bei der Zellteilung.

Survivin bildet gemeinsam mit Aurora B und ICP den sogenannten chromosomal passenger complex (CPC-Komplex). Der CPC-Komplex reguliert die chromosomale Teilung und Zytogenese, indem er an das Zentromer, die Mittelplatte des Spindels und Spaltfurche bindet (53).

1.6.1 SURVIVIN INHIBITOREN

Das „baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5“ (*BIRC5*) Gen kodiert für Survivin. Dieses Gen ist lokalisiert auf dem Chromosom 17q25, eine Region, die beim Neuroblastom häufig amplifiziert und mit einer schlechten Prognose, Metastasierung und Chemotherapie Resistenz assoziiert ist. Dies macht Survivin zu einem besonders vielversprechenden Kandidaten für einen zielgerichteten Therapieansatz beim Neuroblastom. Es wurden bereits früh Ansätze entwickelt, um die *BIRC5/SURVIVIN* Expression in Krebszellen gezielt anzugreifen. Hierzu zählen unter anderem Antisense Oligonukleotide, Ribozyme, small-interfering RNA (siRNA), short-hairpin

RNA (shRNA) oder immunologische Ansätze mit Vakzinen. Ein weiterer Ansatz besteht in der Antagonisierung der Survivin Funktion durch dominant negatives *BIRC5/SURVIVIN* oder sogenannte „small molecules“.

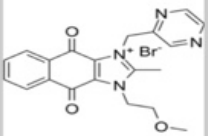
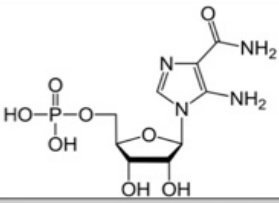
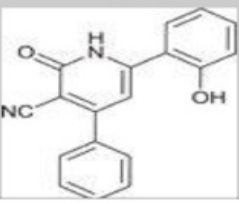
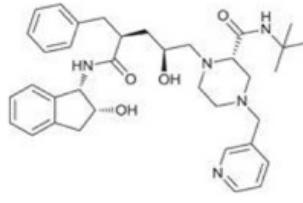
Mechanismus	Name	Struktur	Klinische Studien
Hemmung der Transkription	YM155		Phase II
Hemmung der mRNA	SPC 3042	5'-CTCAatccatggCAGc-3'	Phase II
Hemmung der mRNA	LY2181308	5'-TGTGCTATTCTGTGAATT-3'	Phase II
Hemmung des Hsp90 Komplex	AICAR		
Hemmung der Survivin Homodimeraztion	Abott 8		
Hemmung der mit der Mitose zusammenhängenden Proteinen	Indinavir		Phase II

Tabelle 4. Auswahl einiger Survivin Inhibitoren.

Die Tabelle stellt einige Survivin Inhibitoren mit ihrer Struktur vor, sowie den Mechanismus der Survivin Inhibition und den aktuellen Stand der klinischen Studie (www.clinicaltrials.de)

Einer der vielversprechendsten Survivin Inhibitoren ist YM155. YM155 hemmt die Survivin Transkription und zeigte deutliche antitumorale Effekte in zahlreichen präklinischen Tumormodellen. In Phase I/II klinischen Studien zeigte sich YM155 als gut verträglich und mit geringer Toxizität in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren (54, 55). Im Neuroblastom

wurde der Survivin Inhibitor YM155 in einem präklinischen Modell in Neuroblastomzelllinien mit erworbener Resistenz gegen herkömmliche Chemotherapeutika getestet (56). Es konnte gezeigt werden, dass YM155 durch Survivin Inhibition, signifikante antitumorale Wirkung bei Neuroblastomzellen mit erworbener Resistenz besitzt. YM155 ist somit ein besonders vielversprechender Kandidat für Neuroblastompatienten mit unzureichendem Ansprechen auf herkömmliche Chemotherapien.

1.7 ZIELE DIESER ARBEIT

Das Hochrisiko Neuroblastom geht, trotz Ausschöpfung intensiver Therapien einschließlich Hochdosis-Chemotherapie, Strahlentherapie und radikaler Tumoroperation mit einem Gesamtüberleben von ca. 50% einher. Die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten ist deshalb dringend notwendig, um das Gesamtüberleben zu verbessern und Langzeitfolgen zu mindern. Zielgerichtete Therapien sind ein besonders attraktiver Ansatz in der pädiatrischen Onkologie. Der Einsatz dieser neuen Therapeutika ist allerdings, durch die Entwicklung von Resistenzmechanismen, limitiert. Zur Prävention der Resistenzentwicklung ist die präklinische Untersuchung sinnvoller Kombinationstherapien von hoher Bedeutung.

TP53 Mutationen treten im Neuroblastom selten auf, eine p53 Inaktivierung ist am ehesten durch die Überexpression des Negativregulators MDM2 bedingt und macht dies zu einem besonders attraktiven, zielgerichteten Therapieansatz in dieser Tumorentität.

DS3032b ist ein MDM2 Inhibitor, der vielversprechende präklinische Ergebnisse lieferte (4). Um eine Rationale für den klinischen Einsatz einer DS3032b basierten Kombinationstherapie für Neuroblastompatienten zu liefern, sollte in dieser Doktorarbeit die Kombination dieses MDM2 Inhibitors mit Chemotherapie untersucht werden. Im Verlauf der wissenschaftlichen Arbeit stellte sich der MDM2 Inhibitor RG7388 (Idasanutlin) als klinisch deutlich vielversprechenderer Kandidat heraus. RG7388 wurde allerdings bereits in einer ausführlichen Studie in Kombination

mit Chemotherapie untersucht und ist inzwischen Bestandteil einer großen klinischen Studie, bei der RG7388 in Kombination mit Chemotherapie oder dem BCL2-Inhibitor Venetoclax auch in pädiatrischen Patienten zum Einsatz kommt (41). Eine erneute Erarbeitung einer DS3032b-basierten Kombinationstherapie mit Chemotherapie würde somit für die klinische Anwendung keine neuen relevanten Erkenntnisse liefern. Aus diesem Grund entschieden wir uns dafür, eine bisher nicht charakterisierte, RG7388-basierte Kombinationstherapie mit dem Survivin Inhibitor YM155, zu untersuchen.

Survivin ist bei über 60% der Neuroblastompatienten überexprimiert und stellt so ebenfalls ein attraktives, tumorspezifisches Ziel dar. In präklinischen Studien mit Neuroblastomzelllinien und in einem Xenograft Mausmodell zeigte der Survivin Inhibitor YM155 erste vielversprechende Ergebnisse.

Das Ziel dieser Arbeit war es, in Neuroblastomzelllinien eine günstige Kombinationstherapie zu untersuchen, mit der sich die Wirksamkeit der MDM2 Inhibition verstärken lässt und mögliche Resistenzmechanismen überwunden werden können. Hierfür haben wir die Wirkung der Einzel- und der Kombinationsbehandlungen auf Neuroblastomzelllinien auf Ebene der Zellviabilität, Apoptose-induktion, Caspasen-aktivierung untersucht. Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der Kombinationstherapie von einem funktionellen p53 Signalweg untersucht und die Expression entsprechender Zielgene näher betrachtet.

Diese Arbeit soll die bisher erzielten Erkenntnisse zu RG7388 oder YM155-basierten Therapien erweitern und soll grundlegende, präklinische Daten als Basis für einen möglichen klinischen Einsatz der Kombinationstherapie von RG7388 und YM155 liefern.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 ZELLKULTUR

Die humanen Neuroblastom Zelllinien IMR5, IMR32, SH-SY5Y und Kelly wurden in Nährmedium RPMI 1640 ausgesät, was angereichert war mit 10% fetal bovinem Serum (FCS), L-glutamine und 1% Penicillin/Streptomycin. Alle Zelllinien sind durch die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (Braunschweig, Deutschland) authentifiziert worden. Der *TP53* Mutationsstatus aller Zelllinien wurde in den Laboren von Reinhard Schneppenheim am Universitätsklinikum Hamburg (Deutschland) durch „Sanger Sequenzierung“ und multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA) analysiert. RG7388 wurde in DMSO gelöst und als 1mM Stocklösung bei -20°C gelagert. YM155 wurde ebenso in DMSO gelöst und als 10mM Stocklösung bei -20 °C gelagert.

Für die „Rescue- Experimente“ wurden die IMR5 und IMR32 Zellen (*TP53* Wildtyp) verwendet, die mit einem pMSCVpuro Plasmid transfiziert wurden, das für eine dn-*TP53*-Mutante kodiert. Das pMSCVHpuro Plasmid enthält entweder eine Val135 *TP53*-Mutation oder das alleinige pMSCVpuro-Plasmid als Kontrolle.

2.2 ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT, APOPTOSE UND MIGRATION

2.2.1 ZELLVIABILITÄT

Im ersten Schritt wurden Tumorzelllinien im 96-Well Format in 100 µl RPMI ohne Phenolrot (Nährmedium + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) ausplattiert und 24 Stunden inkubiert. Um eine synergistische Verstärkung des antitumoralen Effektes der Kombinationstherapie zu bestimmen wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen der Einzelbehandlung und den Kombinationen (jeweils in Triplikaten) behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung

der Viabilität wurden 50µl XTT (Sigma # X4251) zu jedem Well hinzugegeben und für weitere 2,5 Stunden inkubiert.

Der XTT Zellproliferationsassay ist eine effektive Methode zur Bestimmung des Zellüberlebens und Zellwachstum. Es handelt sich um einen kolorimetrischen Assay, der die metabolische Aktivität der Mitochondrien detektiert. 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid (XTT) ist ein negativ geladenes Tetrazolium Salz, an der inneren Membran der Mitochondrien zu dem wasserlöslichen Formazan Farbstoff reduziert wird. Die Reduktion kann ausschließlich an Zellen geschehen, die metabolisch aktiv sind. Die Reduktion des Formazans, welches das farblose XTT in ein helles orange überführt, korreliert so mit der Menge der lebenden Zellen. Die Absorption wird nach 2,5h Inkubationszeit bei einer Wellenlänge von 570nm durch einen „microplate-spectrophotometer“ bestimmt.

2.2.2 BESTIMMUNG DES KOMBINATIONSINDEX

Um die Effekte der Kombinationstherapie zu analysieren und die Synergie, Addition oder Antagonismus einordnen zu können, nutzten wir die Chou-Talalay Methode. Die Chou-Talalay - Methode für Kombinationstherapie leiten sich aus dem Prinzip des Massenwirkungsgesetzes ab und basiert auf einer Median-Effekt Gleichung (57).

$$CI = \frac{(D_{\text{comb}})_1}{(D_{\text{alone}})_1} + \frac{(D_{\text{comb}})_2}{(D_{\text{alone}})_2}$$

Der so ermittelte Kombinationsindex (CI) von Chou-Talalay bietet so die Möglichkeit einer quantitativen Definition von Synergismus ($CI < 1$), Addition ($CI = 1$) und Antagonismus ($CI > 1$). Diese Theorie wurde genutzt für einen Algorithmus einer Computersimulation, dem sogenannten CompuSyn. Mit dieser Software wurden sämtliche Auswertungen angefertigt.

2.2.3 NACHWEIS DER APOPTOSE

Zur weiteren Charakterisierung antitumoralen Effekts der Kombinationstherapie wurde eine Apoptose Bestimmung mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit Annexin V –FITC (BD Bioscience #556419) und Propidiumiodid (Sigma #P4864) durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und Charakterisierung einzelner Zellen anhand deren Lichtemission nach Anregung durch verschiedene Laser. Hierbei wird die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (Forward Scatter, FSC) gemessen, der die relative Größe der Zelle anzeigt oder bei 90° (Side Scatter, SSC), der die Granularität der Zelle anzeigt. Zusätzlich kann die Emission der Zellen nach Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Propidiumjodid, DNA), fluoreszenzkonjugierte Antikörper (z.B. CD3 FITC) oder aufgrund der Expression fluoreszierender Proteine (z.B. GFP) gemessen werden. Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden die behandelten Zellen mit dem Fluorescein Isothiocyanit (FITC) konjugierten Annexin und zusätzlich Propidiumiodid gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Apoptose ist ein natürlicher Prozess in der Zelle, der auch durch den Begriff „programmierter Zelltod“ beschrieben wird. Er zeichnet sich aus durch eine anfängliche Plasmamembran-Asymmetrie, den Verlust der Plasmamembran, sowie Kondensation des Zytoplasmas und Nukleus. Bereits in einem frühen Stadium der Apoptose wird Phosphatidylserin an der Außenseite der Plasmamembran exprimiert. Annexin V ist ein 35-36kDa großes Protein, was eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin besitzt und an dieses bindet. Ist dieses Protein nun mit einem Farbstoff (FITC) konjugiert kann es als sensitiver Marker in der Durchflusszytometrie zur Detektion apoptotischer Zellen genutzt werden. Um eine differenziertere Bestimmung der früh- und spätapoptotischen Zellen zu gewährleisten, kann diese Färbung mit einer Propidiumiodid-Färbung kombiniert werden. Propidiumiodid kann die intakte Membran lebender Zellen nicht

durchdringen. In Zellen, die sich also in einem frühen Stadium der Apoptose befinden, kann Propidiumiodid nicht in die Zellen eindringen, sie erscheinen in der Durchflusszytometrie Annexin V positiv und PI negativ. Stark geschädigte bzw. spät-apoptotische Zellen lassen sich in der Durchflusszytometrie als Annexin V und PI positiv detektieren.

Um eine durchflusszytometrische Messung und Annexin V/PI Färbung durchzuführen, wurden die Neuroblastomzellen im 6 Well Format ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurden sie mit Chemotherapie, YM155, RG7388 oder der entsprechenden Kombination (in Triplikaten) behandelt und für weitere 48 h inkubiert. Zur Färbung der Zellen wurde das Medium aus dem Well und die behandelten Zellen (nach Trypsinierung) in ein 15ml Falcon überführt, bei 1500rpm zentrifugiert und in phosphatgepufferter (PBS) Salzlösung aufgenommen. Es wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen in die FACS (fluorescence activated cell sorting) Röhren überführt und 100µl Färbelösung (100µl Annexin Bindungspuffer + 5µl Annexin V FITC und 4µl Propidiumiodid) hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Messung am LSR Fortessa X-20 und die anschließende Auswertung erfolgte mittels der FACSDivaTM software (BD Bioscience).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Apoptose ist die Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Caspasen zählen zu Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen und entfalten ihre Funktion über proteolytische Spaltung. Man unterscheidet hierbei Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10), die Effektorcaspasen aktivieren und so die Apoptose einleiten. Effektorcaspasen (3, 6 und 7) bewirken durch die Spaltung anderer Zellproteine den Zelluntergang. Die aktive Form einer Caspase besteht aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten, die als Heterotetramer die aktive Form des Enzyms bilden. Mittels eines FITC gekoppelten Antikörpers kann man die aktive Form der Effektorcaspase 3 durchflusszytometrisch bestimmen und so mit einer weiteren Methode die Apoptose Induktion nachweisen. Um die aktive Caspase 3 durchflusszytometrisch nachzuweisen, wurden die Neuroblastomzellen im 6 Well Format ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurden sie mit Chemotherapie, YM155, RG7388 oder der entsprechenden Kombination (in Triplikaten) behandelt

und für weitere 48 h inkubiert. Zur Färbung der Zellen wurden die behandelten Zellen nach Trypsinierung in ein 15ml Falcon überführt, bei 1500rpm zentrifugiert und in phosphatgepufferter (PBS) Salzlösung aufgenommen. 1×10^6 Zellen werden in ein die FACS (fluorescence activated cell scanning) Röhrchen überführt und mit 500 μ l Cytotfix fixiert. Anschließend werden die Zellen mit 500 μ l BD Perm Wash gewaschen und mit dem Caspase-3Antikörper gefärbt. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Messung am LSR Fortessa X-20 und die Auswertung mithilfe der FACSDivaTM software (BD Bioscience).

2.2.4 SCRATCH ASSAY

Die Migrationsfähigkeit einer Tumorzelle *in vitro* unter verschiedenen Bedingungen (z.B. ohne Therapie, Einzelbehandlung/Kombinationsbehandlung) gibt Aufschluss über das Metastasierungsverhalten. Der Scratch Assay ist eine einfach durchzuführende und kostengünstige Methode, um die Migration von Tumorzellen *in vitro* zu untersuchen.

Diese Methode beruht darauf Zell-Zell Kontakte mittels eines künstlich geschaffenen Spaltes zu unterbrechen, um im Anschluss die Migration der Zellen in Richtung des Spaltes, bis zur Wiederherstellung der Zell-Zell Kontakte zu dokumentieren.

Um einen möglichst einheitlichen Spalt zu produzieren, nutzten wir die 4-Well Kultureinsätze von Ibidi. Um die Proliferation der Zellen zu hemmen, wurde das Medium mit lediglich 0,5% RPMI angereichert und eine Neuroblastomzell-Suspension mit 2×10^4 Zellen/ml hergestellt. Die Zellsuspension wurde in den entsprechenden Kammern ausgesät und für 24 h inkubiert, sodass eine gleichmäßige Monozellschicht entsteht. Anschließend wurden die 4-Well Kultureinsätze entfernt, sodass sich ein einheitlicher und reproduzierbarer Spalt bildet. Der entsprechende Bereich wurde mit einem 10x Objektiv eines Zeiss Mikroskops fotografiert. Nun wurden die Zellen mit YM155/RG7388 allein oder den entsprechenden Kombinationen behandelt und für weitere 48 h inkubiert. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und eine weitere Aufnahme mit dem 10x

Objektiv des Spaltes angefertigt. Die Auswertung der Migration wurde mit dem Programm Image J durchgeführt.

2.3 ANALYSE DER EXPRESSION DER ZIELGENE

2.3.1 WESTERN BLOT

Mittels Immunoblotting untersuchten wir die RG7388/ YM155 vermittelten MDM2- bzw. Survivin- Inhibition und die Aktivierung der entsprechenden Zielgene anhand der Proteinexpression.

Für die gezielte Untersuchung der Expression eines Proteins in einer Zelle wird ein Zelllysat in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen und anschließend mittels spezifischer Antikörper als Bande nachgewiesen. Man erhält so Informationen über die Expression eines Proteins im Vergleich zu z.B. unbehandelten Zellen als Positivkontrolle. In einem ersten Schritt wurden die Neuroblastomzellen mit RG7388, YM155 und den entsprechenden Kombinationen behandelt. Die behandelten Zellen wurden nach 48 h Inkubation geerntet, in Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung von Zelllysaten werden die Zellen zunächst in einem Lysepuffer (auch RIPA Puffer: 50mM Tris-HCl pH 7,4 (MG 157,6), Sodium desoxycholate 0,25%, 150mM NaCl (MG 58,44) und 1mM EGTA (MG 380,35) inkubiert. Nach Inkubation und Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge nach BCA. Zur Durchführung des Western Blots wird nun ein 10-12%iges Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gel in ein geeignetes Puffersystem (SDS - Laufpuffer: 3,3g Tris-Base, 14,4g Glycine, 5ml 20% SDS ad 100ml a.dest) gebracht und mit 15-25µg des Proteins und einem Größenmarker beladen. Um die Proteine aufzutrennen wird nun eine elektrische Spannung angelegt, sodass die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wandern. Anhand des Markers lässt sich die Auftrennung der Proteine verfolgen. Nach der

erfolgreichen Auftrennung werden nun die Proteine von dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories) oder eine PVDF Membran (Roche) transferiert. Für den Transfer wird ein Transfer-(Towbin) puffer (3,3g Tris-Base, 14,4g Glycine, 2ml Methanol und 1000ml a.dest)benötigt. Durch das senkrecht zum Gel stehende elektrische Feld (BioRad- Trans-Blot Turbo Blotting System) werden nun die Proteine auf die entsprechende Membran übertragen auf der sie, aufgrund hydrophober Wechselwirkungen, haften bleiben. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren werden die Membranen anschließend in 10-20ml Blockpuffer (5%Milchpulver in TBS-T:2,42g Trisbase,80g NaCl pH7,6 ad 1000ml a.dest + 0,1% Tween20) über Nacht blockiert und anschließend mit dem primären Antikörper inkubiert. Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet: MDM2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), PARP(1:1000, Cell Signaling), *TP53* (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), Mcl-1(1:1000, Cell Signaling), BAX(1:5000, Cell Signaling), Survivin (1:1000 R&D Systems) und Actin (1:7500, Sigma-Aldrich) als Ladekontrolle. Anti-Kaninchen HRP (1:5000, GE Healthcare) und Anti-Maus HRP (1:5000, GE Healthcare) wurden als Sekundärantikörper genutzt. Um die Proteine sichtbar zu machen wurden chemiluminisierende Reagentien (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Hierbei ist der sekundäre Antikörper an die Alkalische Phosphatase gekoppelt, die das Substrat zu einem chemilumineszierendem Produkt umsetzt. Das chemilumineszierende Produkt wurde an einem Fusion FX7 Detektionsgerät (Peqlab, Erlangen, Deutschland) detektiert und analysiert.

Antikörper	Größe kD	Firma	Verdünnung in	Konzentration	Sekundärer Antikörper
Survivin	16	Cell Sign (-20er)	Milch TBS-T	1:1000	Rabbit
Mcl1	40	Cell Sign	Milch TBS-T	1:1000	Rabbit
MDM2	90	Santa Cruz	Milch TBS-T	1:1000	Rabbit
BAX	20	Cell Sign	Milch TBS-T	1:5000	Rabbit
P21	21	Santa Cruz(4')	Milch TBS-T	1:500	Rabbit
P53	53	Santa Cruz	Milch TBS-T	1:1000	Mouse
PUMA	21	Cell Sign	Milch TBS-T	1:1000	Rabbit
PARP	89, 115	Cell Signaling	Milch TBS-T	1:1000	Rabbit

Tabelle 5. Überblick über verwendete Antikörper Verdünnungen.

2.4 STATISTISCHE ANALYSE

Die Experimente mit den Neuroblastomzelllinien wurden in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen ($n \geq 2$) mit Dreifachbestimmung für jede Probe im jeweiligen Assay durchgeführt.

Bei den Viabilitätsmessungen mittels XTT-Kit wurde den unbehandelten Neuroblastomzellen eine Zellviabilität von 100% zugerechnet und die Effekte der behandelten Zellen entsprechend normalisiert. Bei der Apoptosemessung wurde den unbehandelten Neuroblastomzellen eine Apoptose-induktion von 0% zugerechnet und die Apoptosewerte der behandelten Zellen wurden entsprechend darauf normalisiert und sind als „spezifische Apoptose“ angegeben.

Die statistische Analyse der Daten wurde mit der Software GraphPad Prism 6 durchgeführt und die Daten in entsprechenden Grafiken dargestellt. Die Daten wurden im Falle kontinuierlicher Variablen als Mittelwert und Standardfehler/SEM dargestellt.

3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, eine sinnvolle MDM2-Inhibitor basierte Kombinationstherapie zu untersuchen, um eine Rationale für eine mögliche klinische Anwendung zu liefern.

In einem ersten Schritt haben wir die Wirkung des MDM2-Inhibitors DS3032b in Kombination mit Chemotherapie auf Ebene der Viabilität untersucht. Im Verlauf der wissenschaftlichen Arbeiten stellte sich der MDM2-Inhibitor RG7388 als vielversprechender Kandidat heraus. Da es bereits eine ausführliche Studie zu dem, in der klinischen Anwendung mittlerweile etablierten MDM2-Inhibitor RG7388 in Kombination mit Chemotherapie gab (41), entschieden wir uns bei der Charakterisierung der Kombinationstherapie für das *small molecule* Sepantropiumbromid (YM155). Hierzu wurden die Effekte der Kombinationstherapie auf Ebene der Viabilität, Apoptose-induktion und Migration analysiert und die Abhängigkeit der synergistischen Verstärkung von einem funktionellen p53 Signalweg untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die antitumorale Wirkung des MDM2 Inhibitors RG7388 durch zusätzliche Survivin Inhibition synergistisch verstärken lässt.

Für die im Anschluss durchgeführten Versuche wurden vier Neuroblastom-Zelllinien mit unterschiedlich genetischem Hintergrund ausgewählt. In einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde der *TP53*-Mutationsstatus in den Neuroblastom-Zelllinien IMR5, IMR32 und SH-SY5Y durch Sequenzanalyse der gesamten kodierenden *TP53*-Region validiert (4). Die Analyse bestätigte die bisher veröffentlichten Ergebnisse, dass die Zelllinien IMR5, IMR32 und SH-SY5Y den Wildtyp *TP53* exprimieren, wohingegen die Zelllinie Kelly eine *TP53* (529C>T P117T Missense-) Mutation aufwies. Die Zelllinien IMR5, IMR32 und Kelly wiesen eine für das Hochrisiko-Neuroblastom typische *MYCN* Amplifikation auf, wohingegen die Zelllinie SH-SY5Y nicht *MYCN* amplifiziert war (Abb. 10 A). Die relative *MDM2*-Expression war bei den Zelllinien ohne *TP53* Mutation höher als bei der Kelly Zelllinie (Abb. 10 B) (4).

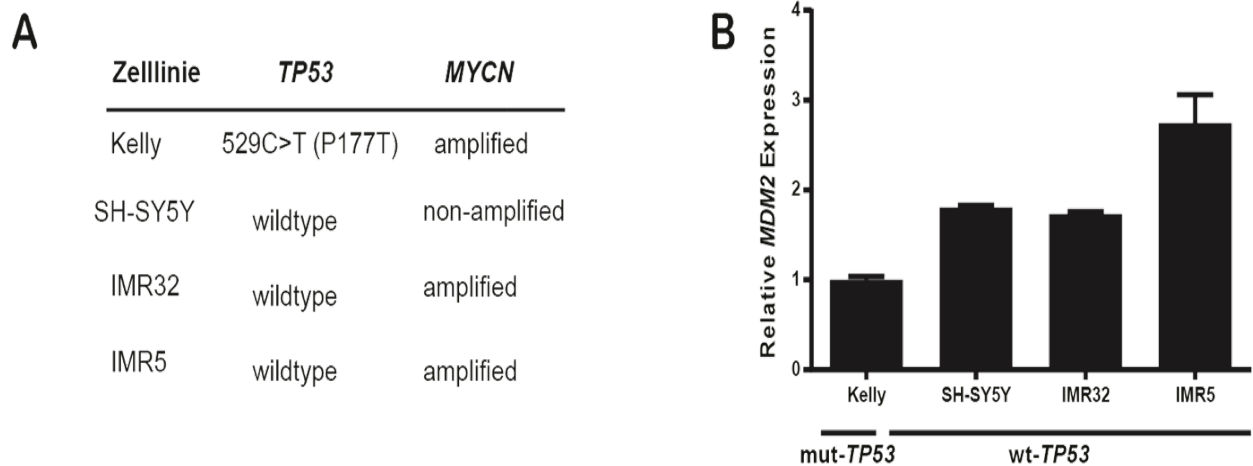


Abbildung 10. Darstellung des genetischen Hintergrundes der verwendeten Neuroblastomzelllinien.

Die Abbildung zeigt eine tabellarische Auflistung einer Sequenzanalyse der *TP53* codierenden Region der verwendeten Zelllinien (Kelly, SH-SY5Y, IMR32, IMR5), sowie den *MYCN* Status. Es wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um die *MDM2* Expression in den verwendeten Neuroblastomzelllinien zu bestimmen. Die Expressionswerte wurden anhand der *GAPDH* Expression normalisiert (4).

3.1 DIE KOMBINATION VON DS3032B UND CHEMOTHERAPIE FÜHRT ZU EINER SYNERGISTISCHEN VERSTÄRKUNG DER VIABILITÄTSHemmUNG IN DER NEUROBLASTOMZELLINIE IMR5

Um die Effekte der Kombinationstherapie auf Ebene der Viabilität zu untersuchen, wurde im ersten Schritt ein XTT Proliferations-Assay durchgeführt.

Die Neuroblastomzelllinie IMR5 wurden im 96-Well Format ausgesät und für 48 h mit aufsteigenden Konzentrationen Cisplatin (0 – 4 μ M), Doxorubicin (0 – 10 nM), DS3032b (0, 7,81 15,63, 31,25 nM) und den entsprechenden Kombinationen behandelt. Es konnte eine Verstärkung der Chemotherapie vermittelten Viabilitätshemmung durch die Kombination mit dem MDM2 Inhibitor nachgewiesen werden (Abb. 11 A + B).

Um die synergistische Wirkung statistisch zu belegen, wurde die Chou-Talalay Methode zur Berechnung des Kombinationsindex angewandt. Es konnte mit beiden Chemotherapeutika in Kombination mit DS3032b synergistische Werte bestimmt werden (Abb. 11 C). Auf Ebene der Viabilitäts-Hemmung konnte somit gezeigt werden, dass sich die antitumorale Wirkung der

Chemotherapie durch die Kombination mit dem MDM2 Inhibitoren DS3032b synergistisch verstärken ließ.

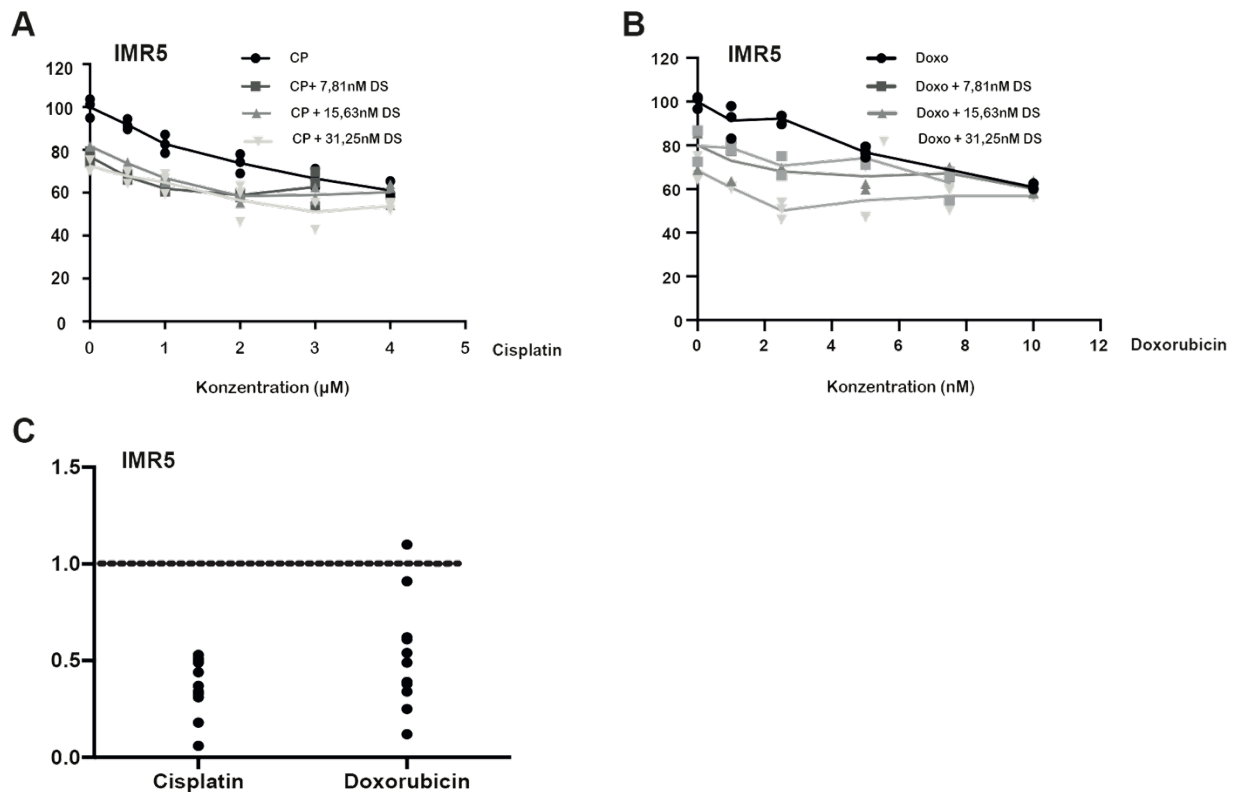


Abbildung 11. Wirkung von Cisplatin, Doxorubicin, DS3032b und der Kombinationsbehandlung auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.

(A-C). Die Abbildung zeigt die Hemmung der Proliferation von Neuroblastomzelllinien nach Behandlung mit Chemotherapeutika, DS3032b oder der Kombinationsbehandlung. Die Zellen wurden für 48 h behandelt, die Viabilität wurde mittels XTT Messung bestimmt. Unbehandelten Zellen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Behandlung entsprechend normalisiert. Der Kombinationsindex wurde mittels Chou-Talalay Methode bestimmt (> 1.2: Antagonismus; 0.9-1.1: Additiver Effekt; <0.9 Synergismus). Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen (n=3) Versuchen. **CP**: Cisplatin; **Doxo**: Doxorubicin.

3.2 DIE KOMBINATION VON YM155 UND MDM2 INHIBITION FÜHRT ZU EINER SYNERGISTISCHEN VERSTÄRKUNG DER VIABILITÄTSHemmUNG IN NEUROBLASTOMZELLEN

Um die Effekte der Kombinationstherapie auf die Viabilität der Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurde im ersten Schritt ein XTT Proliferations-Assay durchgeführt.

Die Neuroblastomzellen wurden im 96-Well Format ausgesät und für 48 h mit aufsteigenden YM155 - (0 - 540 nM), RG7388 - (0 – 90 nM), DS3032b – (0 - 60 nM) Konzentrationen und den entsprechenden Kombinationen behandelt. In den Zelllinien ohne *TP53* Mutation konnte eine Verstärkung der YM155 vermittelten Viabilitätshemmung durch die Kombination mit einem MDM2 Inhibitor nachgewiesen werden. Diese Sensitivierung zeigte sich unabhängig vom *MYCN* Status. (Abb. 12 A-D, Abb. 13 A-D).

Um die synergistische Wirkung statistisch zu belegen, wurde die Chou-Talalay Methode zur Berechnung des Kombinationsindex angewandt. Es konnte in allen Zelllinien synergistische Werte bestimmt werden (Abb. 12 E, Abb. 13 E). Auch in der *TP53* mutierten Zelllinie konnte, trotz fehlender p53 Funktionalität, eine Verstärkung des YM155 vermittelten antitumoralen Effektes durch die Kombination mit RG7388 oder DS3032b nachgewiesen werden (Abbildung 12 D + 13 D).

Auf Ebene der Viabilitäts-Hemmung konnte somit gezeigt werden, dass sich die antitumorale Wirkung von YM155 durch die Kombination mit den MDM2 Inhibitoren RG7388 und DS3032b synergistisch verstärken ließ. Für die weiteren Untersuchungen der Kombinationstherapie wurde sich mit RG7388 auf den MDM2 Inhibitor festgelegt, der bereits in pädiatrischen klinischen Studien angewendet wird und gleichzeitig in dem ersten Screening deutliche synergistische Werte in der Kombinationstherapie zeigte.

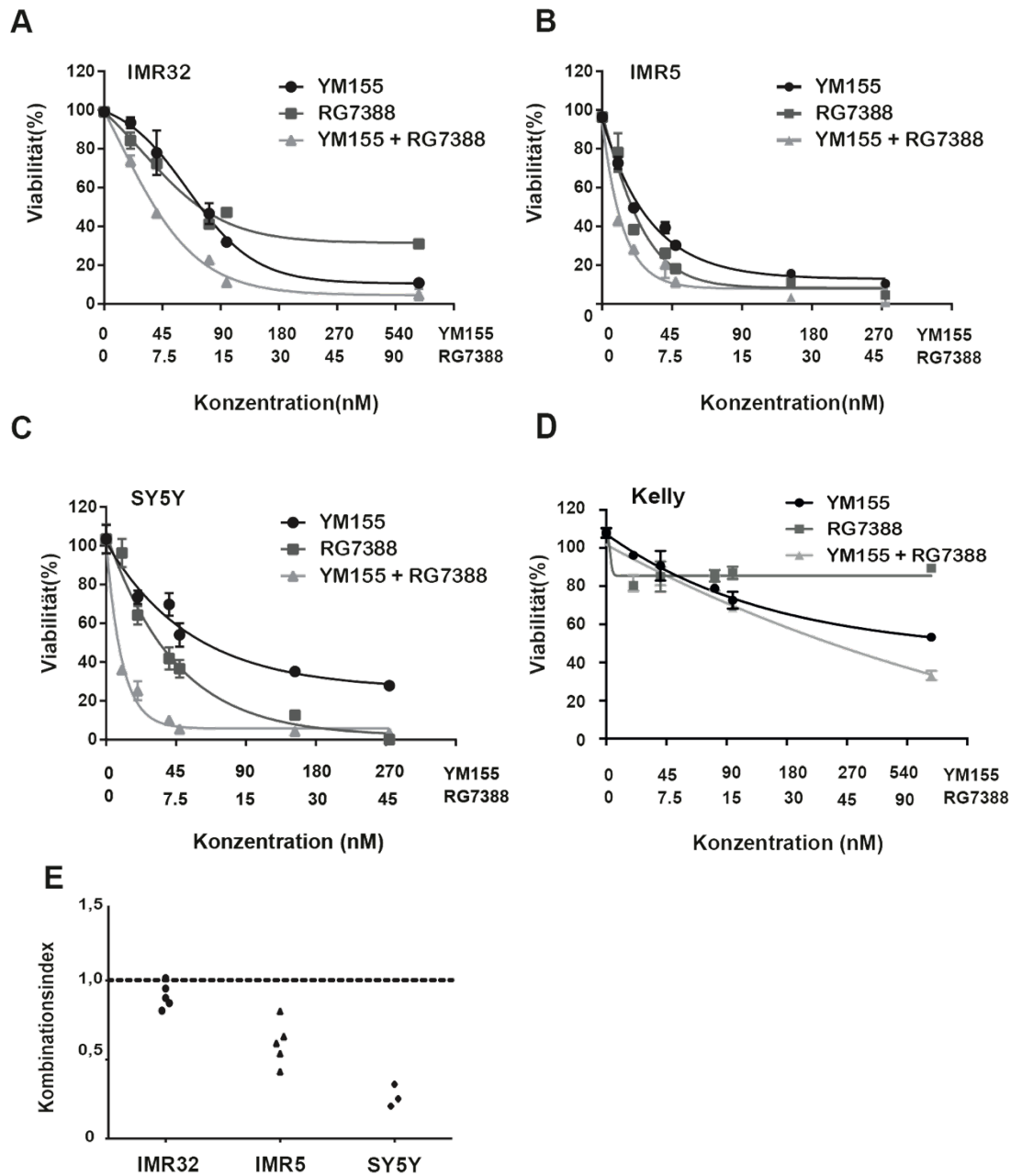


Abbildung 12. Wirkung von YM155, RG7388 und der Kombinationsbehandlung auf die Viabilität von Neuroblastomzellen. (A-D) Die Abbildung zeigt die Proliferation von Neuroblastomzelllinien nach Behandlung mit YM155, RG7388 oder der Kombinationsbehandlung. Die Zellen wurden für 48 h behandelt, die Viabilität wurde mittels XTT Messung bestimmt. Unbehandelten Zellen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Behandlung entsprechend normalisiert. (E) Der Kombinationsindex wurde mittels Chou-Talalay Methode bestimmt (> 1.2 : Antagonismus; $0.9-1.1$: Additiv; < 0.9 Synergismus). Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen ($n=3$) Versuchen.

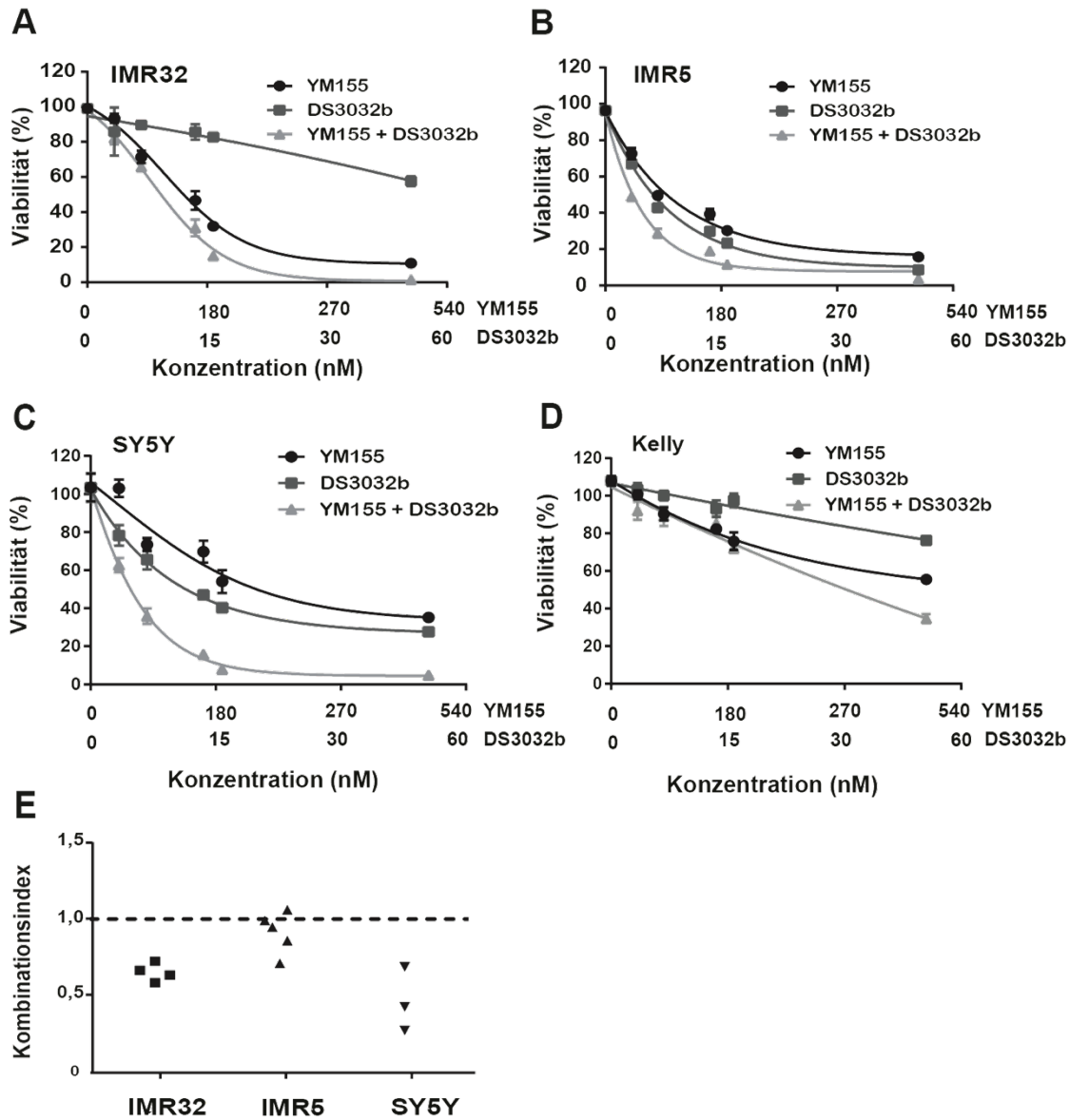


Abbildung 13. Wirkung von YM155, DS3032b und der Kombinationsbehandlung auf die Viabilität von Neuroblastomzellen.

(A-D). Die Abbildung zeigt die Hemmung der Proliferation von Neuroblastomzelllinien nach Behandlung mit YM155, DS3032b oder der Kombinationsbehandlung. Die Zellen wurden für 48 h behandelt, die Viabilität wurde mittels XTT Messung bestimmt. Unbehandelten Zellen wurde eine Zellviabilität von 100% zugewiesen und die Messungen mit Behandlung entsprechend normalisiert (E). Der Kombinationsindex wurde mittels Chou-Talalay Methode bestimmt (> 1.2: Antagonismus; 0.9-1.1: Additiver Effekt; <0.9 Synergismus). Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen (n=3) Versuchen.

3.3 DIE KOMBINATION VON YM155 UND RG7388 HEMMT DIE MIGRATIONSFÄHIGKEIT DER NEUROBLASTOMZELLEN

Um den Effekt der Kombinationsbehandlung auf die Migration der Zellen als Indikator für deren Metastasierungspotential zu untersuchen, wurde ein Scratch Assay durchgeführt.

Um einheitliche, zellfreie Räume zu erhalten (Abb. 14 A), wurden Einsätze mit 4 voneinander getrennten Zellkammern (Ibidi Cell Inserts) genutzt, in denen die Zellen für 24 h ausgesät wurden. Anschließend wurde sich auf die YM155 und RG7388 Konzentrationen festgelegt, die im Viabilitäts-Screening synergistische Werte aufwiesen und die Neuroblastomzelllinien mit den entsprechenden Konzentrationen (30 nM YM155, 3,75-7,5 nM RG7388) behandelt. Nach 48 h Behandlung wurde das Nährmedium entnommen, Aufnahmen des Zellrasens angefertigt und die Fläche des zellfreien Spalts mittels Image J Software quantifiziert.

In den *TP53* Wildtyp Zelllinien IMR32 und IMR5 konnten die Einzelbehandlungen mit YM155 oder RG7388 im niedrig nanomolaren Bereich (30 nM YM155 und 3,75 nM / 7,5 nM RG7388) die Migrationsfähigkeit in den Spalt nicht hemmen. In der Kombinationsbehandlung hingegen wurde die Migration nahezu vollständig unterbunden (Abbildung 14 A-C). Die Zelllinie SH-SY5Y haftete nicht an den Ibidi Cell Inserts, sodass der Versuch für diese Zelllinie nicht durchführbar war.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Migrationsfähigkeit der Neuroblastomzelllinien nur durch die Kombination von YM155 und RG7388 nahezu vollständig unterbunden werden konnte.

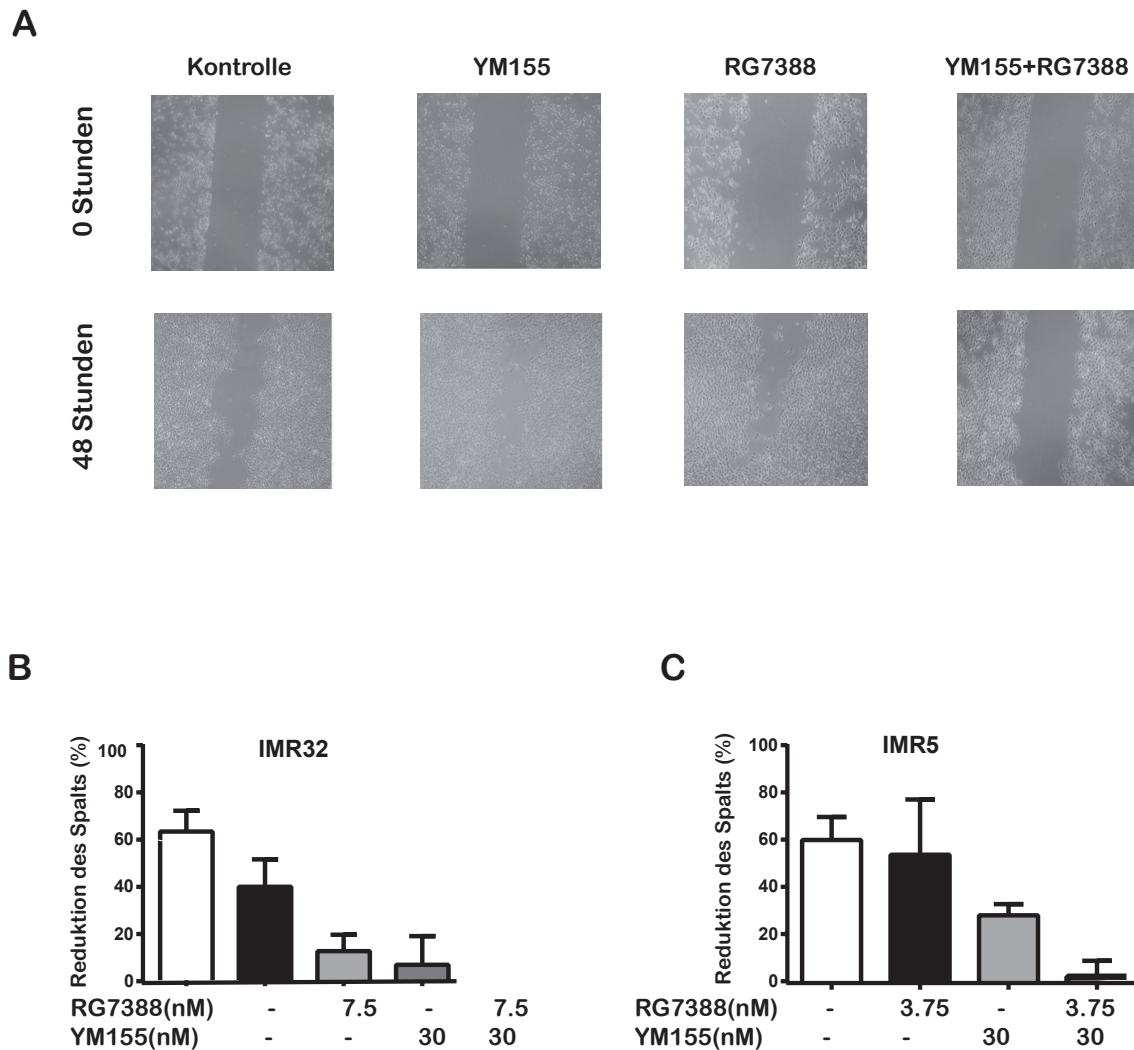


Abbildung 14. Wirkung von YM155, RG7388 und der Kombinationsbehandlung auf die Migrationsfähigkeit der Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5.

(A) Die Abbildung zeigt exemplarische Aufnahmen eines Scratch Assays in 10facher Vergrößerung, der mit der Zelllinie IMR32 durchgeführt wurde. Die Zellen wurden für 48 h mit YM155, RG7388 und der entsprechenden Kombination behandelt, die Aufnahmen wurden zu Stunde 0 und 48 h angefertigt (B + C). Dargestellt sind die Scratch Assays der Neuroblastomzelllinie IMR32 und IMR5. Alle Versuche wurden in mindestens 2 unabhängigen Experimenten durchgeführt, angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen (n=3) Versuchen

3.4 DIE KOMBINATION VON YM155 UND RG7388 VERSTÄRKT DIE APOPTOSE-INDUKTION IN NEUROBLASTOMZELLEN.

Um die Wirkung der Kombinationstherapie im Vergleich zur Einzelbehandlung auf die Apoptose-induktion zu untersuchen, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Hierfür wurden die Zellen im 6 Well Format ausgesät und für 48 h mit aufsteigenden YM155 Konzentrationen (10 – 60 nM) und einer festen RG7388 Konzentration (je nach Zelllinie zwischen 1,875 – 7,5 nM) behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Annexin V und Propidium-Iodid gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet.

In allen *TP53* Wildtyp Zelllinien (IMR32, IMR5 und SY5Y) zeigte sich eine deutliche Apoptoseverstärkung durch die zusätzliche Behandlung mit einer niedrigen RG7388 Konzentration (je nach Zelllinie zwischen 1,875 – 7,5 nM). Trotz lediglich minimaler Apoptose-induktion durch RG7388 allein, zeigte sich eine deutlich synergistische Verstärkung in der Kombination mit YM155 (Abb. 15 A-D). Dies wurde besonders deutlich in den niedrigem YM155 Konzentrationen, in den höheren Konzentrationen hingegen ließ sich der pro-apoptische Effekt von YM155 durch RG7388 weniger verstärken. In der nicht *MYCN* amplifizierten Zelllinie SH-SY5Y zeigte sich ein generell geringeres Ansprechen auf die Behandlung mit YM155, RG7388 oder der Kombinationsbehandlung (Abb. 15 E). Auch in der *TP53* mutierten Zelllinie Kelly zeigte sich in den hohen YM155 Konzentrationen eine Verstärkung der Apoptose-induktion, trotz fehlendem Ansprechen auf die RG7388 Einzelbehandlung (Abb. 15 B, Abb. 15 F). Dieses Ergebnis bestätigte den bereits beschriebenen Effekt der Kombinationsbehandlung auf Ebene der Viabilitäts-Hemmung. Mittels Chou-Talalay Methode wurde der Kombinationsindex bestimmt und für alle Zelllinien konnten synergistische Werte nachgewiesen werden (Abb.15 G).

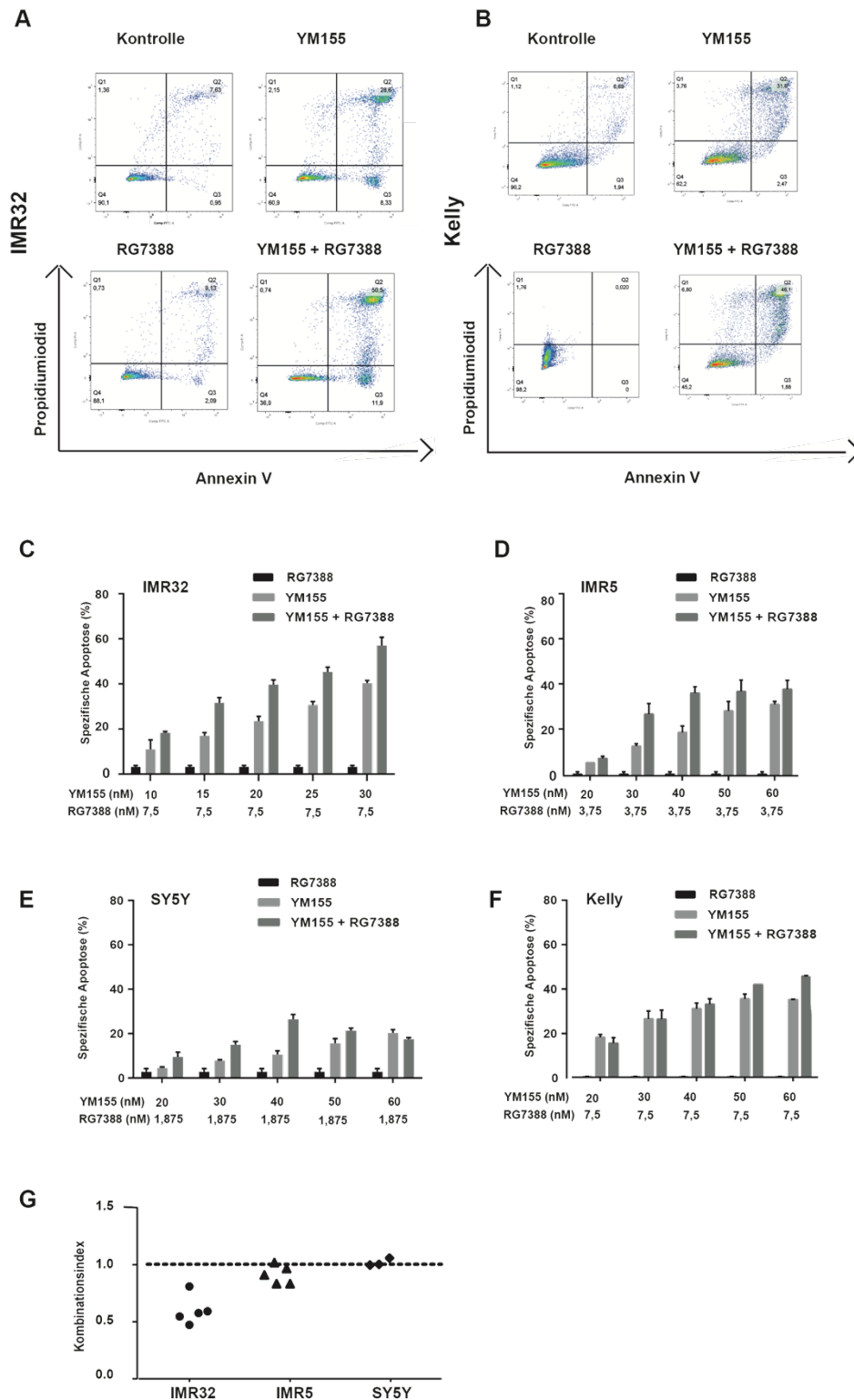


Abbildung 15. Wirkung von YM155, RG7388 und der Kombinationsbehandlung auf die Apoptose-induktion in den Neuroblastomzelllinien. (A + B) Die Abbildung zeigt eine exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose-induktion in den Zelllinien IMR32 und Kelly. Die Neuroblastomzellen wurden für 48 h mit aufsteigenden Konzentrationen (10 – 60 nM) und fester RG7388 Konzentration (je nach Zelllinie zwischen 1,875 – 7,5 nM) behandelt und anschließend mit Propidiumiodid und Annexin V für die durchflusszytometrische Bestimmung gefärbt. (C-E) Dargestellt ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung in den Neuroblastomzelllinien IMR32, IMR 5, SY5Y und Kelly. (F) Der Kombinationsindex wurde mittels Chou-Talalay Methode bestimmt (> 1.2: Antagonismus; 0.9-1.1: Additiv; <0.9 Synergismus). Alle Versuche wurden in mindestens 2 unabhängigen Experimenten, angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen (n=3) Versuchen.

Um den Mechanismus der Apoptose-induktion näher zu untersuchen, wurde die Aktivierung der zentralen Effektorcaspase, Caspase-3, untersucht. In der *TP53* Wildtyp Zelllinie IMR32 wurde dazu eine Färbung und durchflusszytometrische Quantifizierung der gespaltenen und aktivierten Caspase-3 durchgeführt.

Die Aktivierung von Caspase-3 als Effektorcaspase zeigte die Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges an. Diese Caspasenkaskade kann durch Survivin, das zu der Gruppe der „Inhibitors of Apoptosis“ gehört, blockiert werden. Die sogenannten „IAPs“ hemmen die Apoptose, indem sie die Caspasenkaskade blockieren. Durch die gezielte Degradierung von Survivin durch YM155, sollte sich also die Caspasenkaskade wiederherstellen lassen und somit auch eine Induktion der Apoptose erreicht werden. Auch auf dieser Ebene der Caspase-Aktivierung ließ sich eine Zunahme der Apoptose-induktion durch die Kombinationsbehandlung nachweisen (Abb. 15 A + B).

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) wird durch Caspase 3 gespalten und spielt als DNA-Reparatur Enzym eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose. Mittels Westernblot Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Einzelbehandlung mit RG7388, entsprechend dem fehlenden Anstieg der Caspase 3 Aktivität, zu keiner relevanten PARP Spaltung führte. In der Einzelbehandlung mit YM155, sowie in der Kombinationsbehandlung führte die starke Caspase 3 Aktivierung auch zu einer Zunahme der nachgeschalteten PARP Spaltung (Abb. 15 C).

Es konnte somit auf verschiedenen Ebenen des apoptotischen Signalwegs gezeigt werden, dass die Kombination von YM155 und RG7388 die Induktion der Apoptose verstärkt.

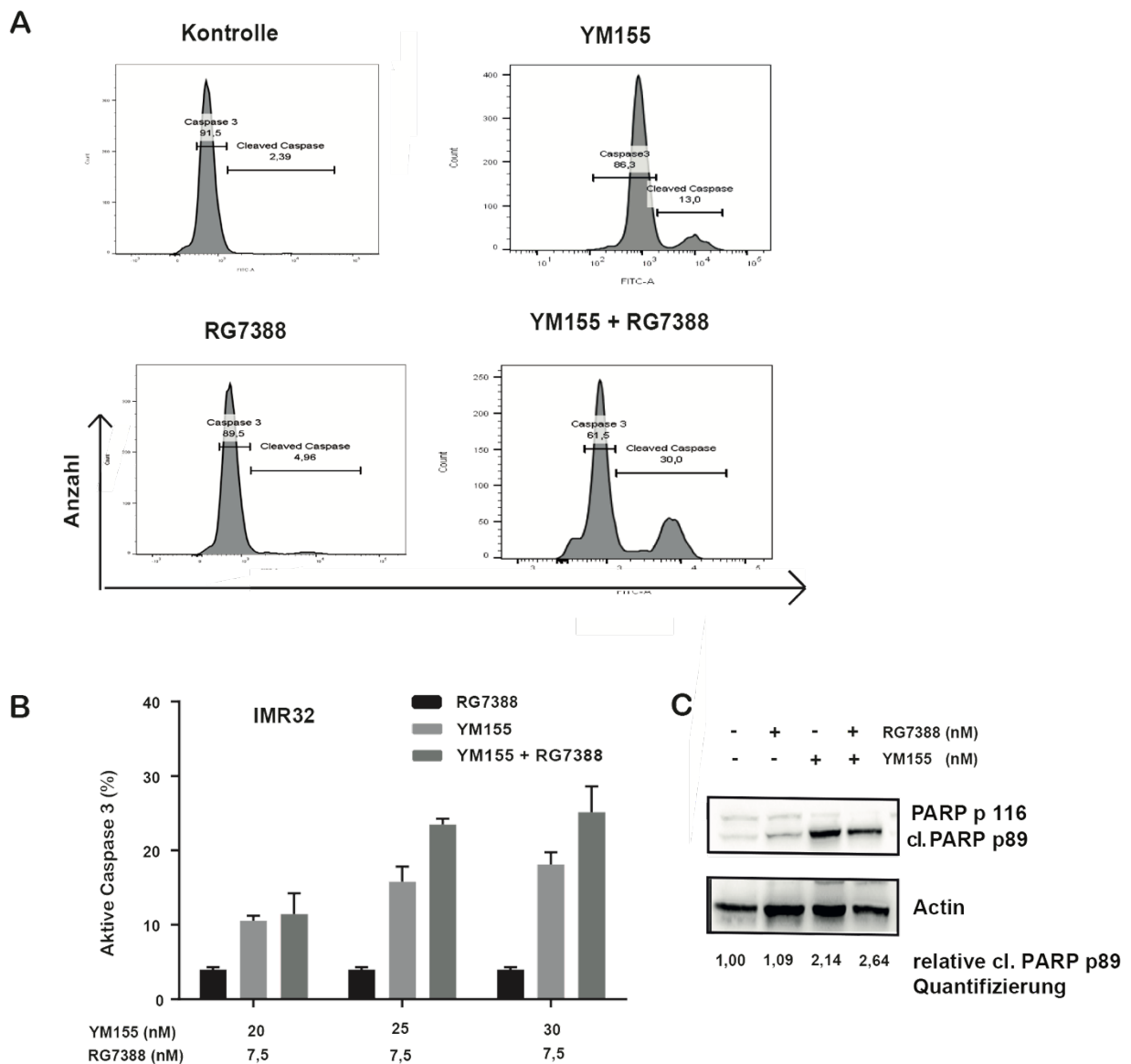


Abbildung 16. Caspase-3 Aktivierung nach Behandlung der Zelllinie IMR32 mit YM155, RG7388 und der Kombination beider Substanzen. (A) Die Abbildungen zeigen exemplarisch die durchflusszytometrischen Bestimmung der gespaltenen, aktiven Caspase 3 Untereinheit in der Zelllinie IMR32. Hierfür wurden die Zellen mit aufsteigenden YM155 Konzentrationen (20 – 30 nM) und einer festen Dosis RG7388 (7,5 nM) für 48 h behandelt. (B) Dargestellt ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung in der Zelllinie IMR 32. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen mit aktiver Caspase-3 normalisiert auf unbehandelte Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen (n=3) Versuchen (C). Mittels Western Blot Analyse wurde in der Zelllinie IMR32 die PARP Spaltung (cleaved PARP; cl PARP p89) nachgewiesen und quantifiziert, hierbei wurden die Werte gemäß Actin Expression normalisiert.

3.5 DIE ANTITUMORALE WIRKUNG DER KOMBINATIONSBEHANDLUNG IST UNABHÄNGIG VON DEM TUMORSUPPRESSOR p53

Da die MDM2 Inhibitoren ihre antiproliferative Aktivität durch die Reaktivierung von p53 entfalten, wurde die Expression von *TP53* und der nachgeschalteten Zielgene nach erfolgter Kombinationsbehandlung mittels Western Blot Analyse untersucht.

Für diesen Versuch wurden die Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5 im 6 Well Format für 48 h mit YM155 und RG7388 allein oder in Kombination behandelt und anschließend geerntet.

In der Western Blot Analyse zeigte sich, dass die RG7388 Einzelbehandlung, wie erwartet, p53 stabilisiert und eine verstärkte Expression von MDM2 nachzuweisen ist. Die Aktivierung der nachgeschalteten p53-Signalwege konnte ebenfalls anhand der Zunahme der Proteinexpression von PUMA, p21, BAX nachgewiesen werden (Abb. 17 A+B). Die Einzelbehandlung mit YM155 führte, wie ebenfalls zu erwarten, zu einer Degradierung von Survivin und dem bekannten *off-target* Mcl-1, die sich durch die Kombinationsbehandlung noch verstärken ließ. YM155 und die Kombinationsbehandlung führten zu einer Stabilisierung von p53, die Aktivierung des nachgeschalteten Signalwegs durch MDM2, PUMA, p21 oder BAX ließ sich zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisen (Abbildung 17 A-D).

In der relativen Quantifizierung zeigte sich bei der YM155 Behandlung im Vergleich zu der nichtbehandelten Kontrolle und RG7388 eine Herunterregulation der Proteinexpression der nachgeschalteten p53 Zielgene. Interessanterweise zeigte sich der gleiche Effekt auch in der Kombination mit RG7388. Die YM155 und Kombinationsbehandlung induzierte Apoptose-induktion scheint also unabhängig von einem funktionalen p53 Signalweg zu sein.

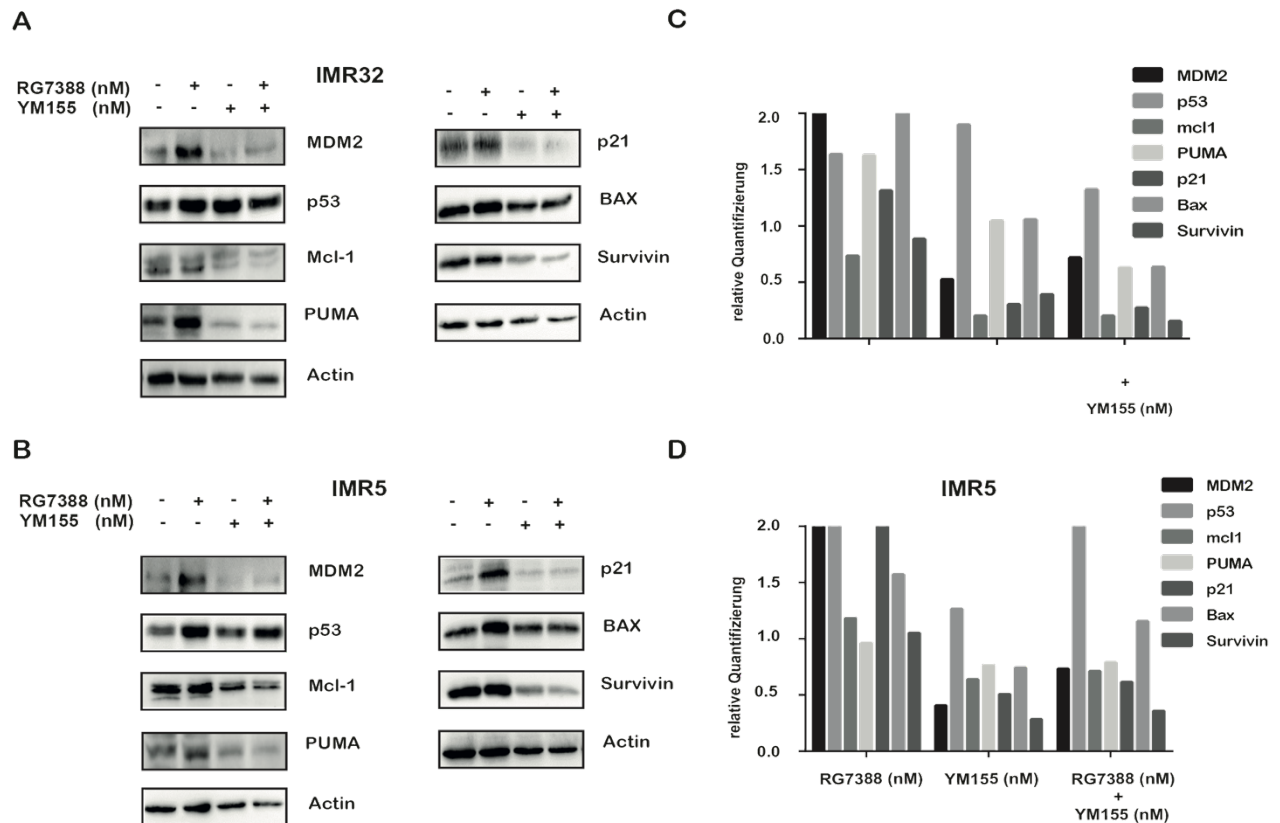


Abbildung 17. Proteinexpression der Neuroblastomzelllinien IMR 5 und IMR 32 nach Behandlung mit YM155, RG7388 und der Kombination beider Substanzen. (A + B) Die Abbildung zeigt die Western Blot Analyse nach erfolgten Einzelbehandlungen mit YM155, RG7388 oder der entsprechenden Kombination. Gezeigt werden insbesondere die Aktivierung des p53 Signalwegs durch RG7388 wurde untersucht durch den Nachweis der entsprechenden Zielgene (MDM2, PUMA, p21 und BAX). YM155 und die Kombinationstherapie supprimieren die Expression von Survivin und Mcl-1. (C + D) Die Western Blots wurden quantifiziert, hierbei wurden die Werte gemäß Actin Expression normalisiert, der Wert 1.0 entspricht der unbehandelten Kontrolle.

Um die Hypothese der p53 unabhängigen Apoptose-induktion zu untermauern, wurde im Folgenden ein Versuch mit Zelllinien durchgeführt, die ein nicht-funktionelles, dominant-negatives *TP53* exprimierten.

Hierfür wurden die Neuroblastom-Zelllinien IMR5 und IMR32 entweder mit einem pMSCVpuro-p53dd-Plasmid, das für eine dominant negative *-TP53*-Mutante kodiert, oder mit dem pMSCVpuro-Plasmid als Kontrolle transfiziert. Die Transfektion mit der dn-*TP53* Mutanten führte dazu, dass der Transkriptionsfaktor TP53 die DNA-Bindungsaktivität verliert und somit funktionell inaktiviert wird. (58, 59)

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 48 h mit aufsteigenden RG7388 Konzentration (30 und 50 nM), mit YM155 (20 nM) oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Es

wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um das Expressionsprofil der dn-*TP53* Mutanten mit oder ohne Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor) zu bestimmen (Abb. 17 A+B). In den Zellen, die mit dem Leervektor (LV) alleine transfiziert wurden, bewirkte die Behandlung mit RG7388, wie erwartet, eine höhere Proteinexpression von p53, da hier die Hemmung von MDM2 das p53 Protein stabilisierte (Abb. 17 A+B). In der dn-*TP53*-Mutanten zeigte sich erwartungsgemäß eine Überexpression und Stabilisierung des (mutierten) p53 Proteins bereits ohne Behandlung; RG7388 hat hier keine weitere induzierende Wirkung (Abb.17 A+B).

Wir konnten zeigen, dass die Zelllinien mit der dn-*TP53*- Mutanten und somit fehlender DNA-Bindungs Kapazität des Tumorsuppressors p53 keinen Einfluss auf die YM155 induzierte Degradierung von Survivin hat (Abb. 17 A+B). Im Anschluss wurden die Effekte auf die Apoptose-induktion mittels durchflusszytometrischer Messung untersucht. Erwartungsgemäß ließ sich in den dn-*TP53*-Zelllinien eine Abschwächung der Apoptose-induktion durch den MDM2-Inhibitor RG7388 nachweisen, welche insbesondere in den hohen Konzentrationen (30 und 50 nM) deutlich wurde.

Die Blockierung des p53-Signalweges durch Expression der dn-*TP53*-Mutante hatte jedoch keinen Effekt auf die Apoptose-induktion durch 20 nM YM155 in beiden Neuroblastomzelllinien (Abb.17 C+D). Auch in den Kombinationsbehandlungen mit 20 nM YM mit 7,5, 30 oder 50 nM RG7388 ließ sich nur eine minimale Abschwächung dieses Effektes nachweisen. Diese Ergebnisse deuten erneut darauf hin, dass die pro-apoptotische Wirkung der Kombinationsbehandlung nicht abhängig von einem funktionellen p53 Signalweg ist.

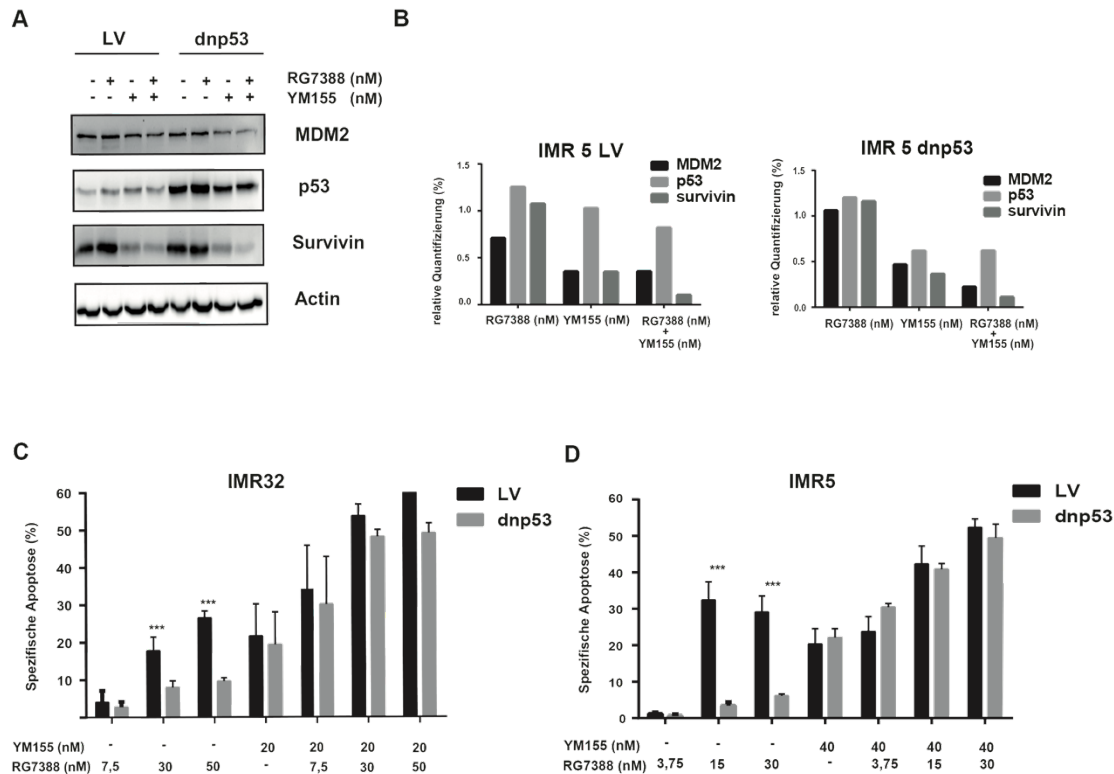


Abbildung 18. Apoptose-induktion der Zelllinien IMR5 und IMR32 nach Transfektion mit einer dnTP53 Mutante und Behandlung mit YM155, RG7388 und der entsprechenden Kombination. (A + B) Zur Bestätigung der erfolgreichen Transfektion wurde eine Western Blot Analyse, sowie eine quantitative Auswertung durchgeführt. Die Werte wurden gemäß Actin Expression normalisiert, der Wert 1.0 entspricht der unbehandelten Kontrolle. **(C + D)** Die Abbildung zeigt die Auswertung der durchflusszytometrischen Apoptose-Messung in den dominant negativen TP53 Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5. Die Neuroblastomzellen wurden für 48 h mit einer festen YM155 Konzentration (je nach Zelllinie 20 und 40 nM) und aufsteigender RG7388 Konzentration (je nach Zelllinie zwischen 3,75 – 50 nM) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid und Annexin V für die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose gefärbt. Alle Versuche wurden in mindestens 2 unabhängigen Experimenten, angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen (n=3) Versuchen

3.6 DER KNOCKDOWN VON SURVIVIN IMITIERT DIE YM155 VERMITTELTE PRO-APOPTOTISCHE WIRKUNG

Die Zelllinie IMR32 wurde im 6-Well Format mit *BIRC5/SURVIVIN* si-RNA ausgesät und der Knockdown im Anschluss nach 24 h mittels qRT-PCR und Western Blot Analyse verifiziert (Abb. 18 B).

Zum Nachweis der Spezifität der *BIRC5/SURVIVIN* si-RNA und zur Einschätzung der transfektionsbedingten Apoptose-induktion führten wir die Versuche mit einer zusätzlichen

Scrambled Kontrolle (gleiche Nukleotide wie in der spezifischen siRNA, aber in nicht-bindender Sequenz) durch. Anschließend wurden die Zellen für 48 h mit RG7388 (7,5 nM), YM155 (30 nM) oder der Kombination beider Substanzen behandelt und eine durchflusszytometrische Apoptosemessung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit dem *BIRC5/SURVIVIN* Knockdown eine vergleichbar hohe Apoptose-induktion herstellen lässt, wie mit YM155 in Zellen ohne *BIRC5/SURVIVIN* Knockdown. In der Zelllinie IMR32 mit *BIRC5/SURVIVIN* Knockdown fand sich nach Behandlung mit YM155 eine weitere Verstärkung der Apoptose-induktion (Abb.18 A). Durch die Kombination mit RG7388 (30 nM YM155 +7,5 nM RG7388) scheint sich dieser Effekt zusätzlich steigern zu lassen (Abb. 18 A). Die Effekte von YM155 lassen sich also durch einen *BIRC5/SURVIVIN* Knockdown imitieren.

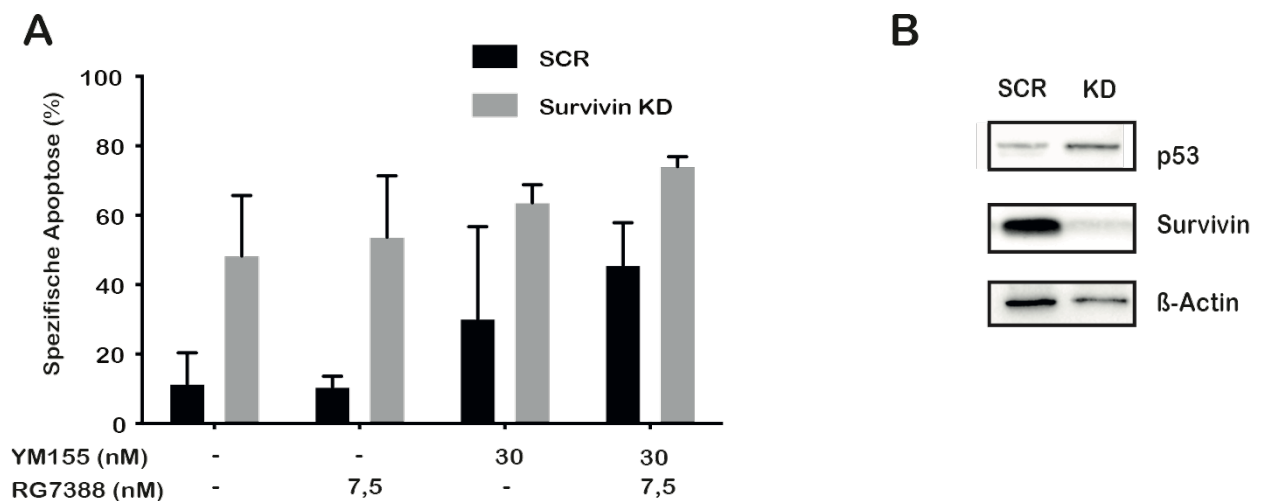


Abbildung 19. Apoptose-induktion in der Zelllinie IMR32 nach erfolgreichem Survivin Knockdown und anschließender Behandlung mit YM155, RG7388 und der entsprechenden Kombination. (A) Apoptose-induktion in der Zelllinie IMR32 nach Behandlung mit YM155 (30 nM) und RG7388 (7,5 nM) für 48 h. Die Apoptose wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin-V / Propidiumiodid bestimmt. **(B)** Westernblot Analyse zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion mit einer Survivin si-RNA (KD) im Vergleich zur „Scrambled“ Kontrolle (SCR).

4 DISKUSSION

Die Behandlung des Hochrisikoneuroblastoms stellt eines der aktuell wichtigsten Herausforderungen der pädiatrischen Onkologie dar. Trotz maximaler Ausschöpfung aller bisher zur Verfügung stehenden Therapieelemente (Hochdosis Chemotherapie, Operation, Bestrahlung und autologe Stammzelltransplantation) überleben nur circa. 50% der Kinder diese Erkrankung. Außerdem geht die Therapie mit beträchtlichen Langzeitnebenwirkungen für die Patienten einher. Die Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapieoptionen ist somit ein wichtiges Ziel in der pädiatrisch onkologischen Forschung, um das Überleben zu verbessern und Langzeitnebenwirkungen zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer MDM2 Inhibitor basierten Kombinationsbehandlung mit Chemotherapie oder dem Survivin Inhibitor YM155 in einem präklinischen Modell untersucht. Anschließend wurden die Effekte der Kombinationstherapie mit dem MDM2 Inhibitor RG7388 und dem Survivin Inhibitor YM155 auf Ebene der Viabilität, Migration und Apoptose charakterisiert. Dies stellt somit eine neue Möglichkeit für den erfolgreichen Einsatz dieser zielgerichteten Therapeutika dar.

4.1 DIE ROLLE VON SURVIVIN IM NEUROBLASTOM UND DIE BEDEUTUNG VON SURVIVIN INHIBITION ALS THERAPEUTISCHER ANSATZ IM NEUROBLASTOM

In einem ersten Schritt wurde die antitumorale Wirkung des Survivin Inhibitors YM155 in Neuroblastomzelllinien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die YM155 Einzelbehandlung im niedrig nanomolaren Bereich (45 – 540 nM) die Viabilität reduzierte und Apoptose induzierte aber keine Hemmung der Migration erreichte. Die beschriebenen antitumorale Effekt von YM155

ließen sich in allen Neuroblastomzelllinien, unabhängig von *MYCN* Status, Survivin Expression und *TP53* Status beobachten.

YM155 wurde bereits in zahlreichen präklinischen Neuroblastom Modellen untersucht, in denen sich vielversprechende Ergebnisse zeigten (56, 60, 61). Liang et al. konnten *in vivo* und *in vitro* nachweisen, dass YM155 Survivin inhibierte und so signifikant antiproliferative Aktivität besaß und das Neuroblastomzellwachstum *in vitro* und *in vivo* hemmte. Sie konnten außerdem zeigen, dass YM155 die antitumorale Aktivität des Chemotherapeutikums Cisplatin *in vitro* und *in vivo* synergistisch verstärken konnte (61). Diese Arbeit bezog sich allerdings lediglich auf die nicht *MYCN* amplifizierte Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, sodass die klinische Übertragbarkeit auf Tumore mit variierend genetischem Hintergrund nur bedingt möglich war.

In einer ausführlichen Studie haben Voges et al. die Wirksamkeit von YM155 in chemotherapieresistenten Neuroblastomzelllinien untersucht. Sie konnten zeigen, dass YM155 im niedrig nanomolaren Bereich die Viabilität, auch in therapieresistenten Neuroblastomzellen (Resistenzen: Cisplatin, Doxorubicin, Vincristin), durch die Depletion von Survivin reduzieren konnte (56).

Auf Grundlage dieser vielversprechenden präklinischen Ergebnisse hat die „New Drug Development Strategy“ (NDDS, ein Projekt innovativer Therapien für Kinder mit Krebserkrankungen, das Europäische Netzwerk für Krebsforschung im Kindes- und Jugendalter und die Internationale Gesellschaft für pädiatrische Onkologie Europa Neuroblastom) YM155 unter den Therapien mit hoher Priorität für die Behandlung des Hochrisiko-Neuroblastoms gelistet (62). Die vorliegenden Daten zur Wirkung von YM155 auf die Viabilität und Apoptose von Neuroblastomzelllinien stehen im Einklang mit diesen Studien und liefern zusammengefasst eine vielversprechende und klinisch übertragbare Grundlage für den erfolgreichen Einsatz dieses Therapeutikums im Neuroblastom.

In der hier dargestellten Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit YM155 in Neuroblastomzelllinien zu einer verminderten Expression von Survivin und Mcl-1 führte und den Tumorsuppressor p53 stabilisierte.

Die antitumoralen Mechanismen, über die YM155 seine Wirksamkeit entfaltet, sind noch umstritten. Das induzierte myeloische Leukämie-Zelldifferenzierungsprotein-1 (Mcl-1) wurde lange Zeit als alternatives Ziel von YM155 diskutiert (63). Im Neuroblastom konnte allerdings in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Depletion von Mcl-1 allein selbst aber kaum antitumorale Aktivität im Neuroblastom besaß (64). Die Reduktion der Mcl-1 Expression schien also nicht verantwortlich zu sein für die YM155 induzierte Viabilitätshemmung der Neuroblastomzellen.

Einige Studien postulierten außerdem, dass YM155 seine Wirksamkeit über DNA-Schädigung entfaltet, die nur sekundär zu einer Reduktion der Survivin Expression in den Tumorzellen führte (65-67). Voges et al. haben in einer Studie zeigen können, dass Neuroblastomzellen, die mit si-RNA transifiziert wurden, die auf Survivin (*BIRC5*) abzielte, zu einer Erhöhung der Marker für DNA-Schäden, γ H2AX Expression (Histon 2AX) und Phosphorylierung der Chk2 (Checkpoint Kinase 2), führten. Dies deutet daraufhin, dass die Reduktion von Survivin selbst zur DNA-Schädigung führte und nicht durch vorherige DNA-Schädigung bedingt sein muss (56).

Die Einsatzfähigkeit eines zielgerichteten Therapeutikums gilt allerdings, durch die Entwicklung von Resistenzmechanismen, als limitiert. Bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien im Hochrisiko Neuroblastom ist nun also der nächste logische Schritt die Identifizierung eines sinnvollen Partners für eine kombinierte zielgerichtete Therapie.

4.2 DIE KOMBINATION VON YM155 UND RG7388

Mit dem MDM2 Inhibitor RG7388 haben wir uns für einen in der klinischen Entwicklung weit fortgeschrittenen Kombinationspartner entschieden, der präklinisch signifikante antitumorale

Effekte im Neuroblastom zeigte und bereits in klinischen Studien in pädiatrische Patienten getestet wird. Zunächst wurde antitumorale Wirksamkeit von RG7388 in Neuroblastomzelllinien untersucht. Es konnten gezeigt werden, dass die Einzelbehandlung mit RG7388 im niedrig nanomolaren Bereich (32 -160 nM) die Viabilität der Neuroblastomzellen reduzierte und Apoptose induzierte. Auf Ebene der Migration konnte mit der RG7388 Einzelbehandlung im niedrig nanomolaren Bereich (3,75-7,5 nM) keine Hemmung erreicht werden. Die Behandlung mit dem MDM2 Inhibitor führte zu einer Stabilisierung von p53 und einer erhöhten Expression bekannter Zielgenen, die zum verstärkten Nachweis von MDM2, BAX, PUMA und p21 in der Western Blot Analyse führte. Diese antitumoralen Effekte ließen sich in allen Wildtyp *TP53* Neuroblastomzelllinien, unabhängig von *MYCN* Status, beobachten.

MDM2 Inhibitoren sind umfangreich untersuchte, gezielte Therapeutika, die sich auch in zahlreichen präklinischen Neuroblastommodellen als effektive neue Therapieoption dargestellt haben (40, 68-70). Van Maerken et al. konnten zeigen, dass eine frühe Generation der MDM2 Inhibitoren, Nutlin-3, den p53 Signalweg aktivierten und signifikant antitumorale Effekte in chemotherapieresistenten Neuroblastomzelllinien und in einem Xenograft Modell besaßen (40). Gamble et al. haben außerdem zeigen können, dass die *MYCN* Amplifikation Neuroblastomzelllinien besonders für eine Behandlung mit dem MDM2 Inhibitor Nutlin-3 sensitivierte und somit insbesondere Patienten mit einer Hochrisikoerkrankung von dieser Therapiestrategie profitieren können (70). Die klinische Einsatzfähigkeit der frühen Generation der MDM2 Inhibitoren (RG7112) war jedoch durch eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, gastrointestinale Nebenwirkung und dosislimitierende Thrombozytopenien, eingeschränkt (www.clinicaltrials.gov; NCT00623870, NCT00559533). Die nächste Generation der MDM2 Inhibitoren (RG7388) zeichnete sich nun durch eine verbesserte orale Verfügbarkeit und Verträglichkeit aus und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit als Kombinationspartner verwendet. Chen et al. haben die antitumoralen Effekte der neusten Generation der MDM2

Inhibitoren RG7388 in einem präklinischem Neuroblastom Model untersucht und konnten zeigen, dass die RG7388 Einzelbehandlung effektiv das Neuroblastomzellwachstum hemmen konnte. Sie haben auf Grundlage des bekannten Wirkmechanismus, die p53 Signalwege untersucht und konnten zeigen, dass RG7388 p53 stabilisierte und zu einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege mit Apoptose-Induktion und Zellzyklusarrest führte (41). Die vorliegenden Daten stehen somit im Einklang mit den bisher veröffentlichten Studien, in denen belegt werden konnte, dass RG7388 deutlich antitumorale Aktivität in präklinischen Neuroblastommodellen besaß.

In einem nächsten Schritt wurde die Kombination von YM155 und RG7388 untersucht und es konnte eine synergistische Verstärkung des antitumoralen Effektes nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die YM155 vermittelte Viabilitätshemmung und Apoptose-Induktion durch die Kombination mit RG7388 synergistisch verstärkt wurde. Auf Ebene der Migration zeigte sich nur die Kombination von YM155 und RG7388 als ausreichend potent, um die Migration der Neuroblastomzellen zu hemmen. Außerdem konnten gezeigt werden, dass die Behandlung mit RG7388 zu einer Stabilisierung von p53 und einer vermehrten Expression der im Signalweg nachgeschalteten Proteinen (BAX, PUMA, p21) führte. YM155 und die Kombinationsbehandlungen stabilisierten p53 und führen zu einer verminderten Expression von Survivin. Mit dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich die YM155 vermittelten antitumoralen Effekte, in Neuroblastomzelllinien mit variierend genetischem Hintergrund, durch die Kombination mit RG7388 verstärken lassen.

RG7388 hat sich bereits in vorangegangenen Studien als günstiger Kombinationspartner herausgestellt. Chen et al. haben den MDM2 Inhibitor RG7388 in Kombination mit herkömmlichen Therapien (Cisplatin, Doxorubicin, Topotecan, Temozolomide, Busulfan) untersucht und Temozolomid und Busulfan als günstige Kombinationstherapien identifizieren können (41). Gothem et. al haben in einem breit angelegten Screening 15 zielgerichtete Medikamente in Kombination mit RG7388 untersucht und auf Grundlage des

Kombinationsindexe günstige Kombinationstherapien hervorheben können. Das besondere Augenmerk dieser Studie lag auf der RG7388 basierten Kombinationstherapie mit dem BCL2-Inhibitor Venetoclax (71). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich die RG7388 vermittelte Proliferationshemmung, Apoptose Induktion (Caspase 3/7 Aktivität und PARP Cleavage), sowie Tumorstadiumshemmung durch den Einsatz eines Bcl2 Inhibitors Venetoclax (ABT-199) synergistisch verstärken ließ. Sie haben außerdem auf Grundlage des Kombinationsindex den Survivin Inhibitor YM155 als vielversprechenden Kombinationspartner hervorgehoben, allerdings wurde keine weitere Charakterisierung dieses Effektes vorgenommen. Diese Studien (Chen et al. & Goethem et al.) bilden nun die Grundlage für eine erste große pädiatrische Studie mit dem MDM2 Inhibitor RG7388 in Kombination mit konventioneller Chemotherapie und/oder in Kombination mit dem BCL2 Inhibitor ABT-19, die seit Juli 2019 bei pädiatrischen Patienten getestet wird (www.clinicaltrials.gov, NCT04029688).

Die vorliegende Arbeit und weitere Charakterisierung RG7388 basierten Kombinationstherapie liefert also eine weitere Grundlage für den erfolgreichen Einsatz dieser zielgerichteten Therapien im Hochrisiko Neuroblastom.

4.3 DIE BEDEUTUNG EINES FUNKTIONALEN P53 SIGNALWEGS FÜR DIE BEHANDLUNG MIT YM155, RG7388 UND DER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die beobachteten antitumoralen Effekte der Kombinationstherapie überraschenderweise unabhängig von einem funktionalen p53 Signalweg sind.

Im Gegensatz zur Kombinationsbehandlung, ließ sich bei der Behandlung mit den MDM2-Inhibitoren RG7388 und DS3032b alleine eine deutliche Abhängigkeit des antitumoralen Effektes von einem funktionalen p53 Signalwegs feststellen. Die Behandlung mit RG7388 führt zu einer deutlichen Stabilisierung von p53 inklusive Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege durch

Induktion von PUMA, BAX, p21 und MDM2. In der *TP53* mutierten Zelllinie Kelly sind die RG7388-vermittelten Effekte auf Ebene der Viabilitätshemmung, der Apoptose-induktion deutlich abgeschwächt. Nach erfolgreicher Transfektion der Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5 mit einem dn-*TP53* Plasmid ließen sich auch hier nur noch stark reduzierte pro-apoptotische Effekte durch RG7388 nachweisen. Diese Beobachtung entspricht dem Wirkungsmechanismus der MDM2 Inhibitoren, die p53 und die nachgeschalteten Signalwege reaktivieren und so ihre antitumoralen Effekte entfalten. Vorangegangenen Studien mit den MDM2 Inhibitoren DS3032b und RG7388 zeigten, dass die *TP53* Wildtyp Neuroblastomzelllinien im Vergleich zu *TP53* mutierten Neuroblastomzelllinien signifikant empfindlicher gegenüber einer Behandlung mit den MDM2 Inhibitoren waren (4, 41, 71).

Die durch RG7388 induzierten Effekte auf Ebene der Viabilitätshemmung und Apoptose-induktion in der *TP53* mutierten Neuroblastomzelllinie Kelly, sowie in den dn-*TP53* Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5, waren zwar deutlich reduziert, jedoch ließen sich weiterhin pro-apoptotische Effekte durch RG7388 nachweisen. Dies lässt darauf schließen, dass es einen p53 unabhängigen Signalweg gibt, der die Verstärkung der Apoptose ermöglicht. Lau et al. haben den pro-apoptotischen Effekt von Nutlin-3, in Osteosarkom- / Neuroblastom und Kolonkarzinomzelllinien mit *TP53* Mutation untersucht und konnten p73 als möglichen *off-target* Kandidaten identifizieren (72). P73 ist ein p53-Homolog und ist in der Lage, dieselben Signalwege wie p53 zu aktivieren. Lau et al. haben zeigen können, dass p73 ebenfalls durch MDM2 reguliert wird und die Inhibition von MDM2 zu einer verstärkten p73 Transkriptionsaktivität führte (72). Dies liefert eine mögliche Erklärung für die verbleibende pro-apoptotische Aktivität von RG7388 in den *TP53* mutierten und dn- *TP53* Neuroblastomzelllinien.

Im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit RG7388 waren die Effekte von YM155 auf Viabilität und Apoptose in der *TP53* mutierten Neuroblastomzelllinie Kelly und den dn-*TP53* Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5 nicht reduziert. Wir konnten zeigen, dass YM155 zu

einer Herunterregulation von Survivin und Mcl-1 führte und p53 stabilisierte. Im Gegensatz zu RG7388 führte die p53 Stabilisierung durch YM155 jedoch nicht zu einer vermehrten Expression der entsprechenden Zielgene.

Dies steht im Einklang mit bisher veröffentlichten Studien, die die p53 unabhängige Wirksamkeit von YM155 untersucht haben. Nakahara et al. haben in einer großen Studie mit einer Vielzahl an humanen Tumorzelllinien und in einem Xenograft Modell die Wirksamkeit von YM155 untersucht. Sie konnten zeigen, dass YM155 sowohl in *TP53* mutierten Tumorzelllinien, als auch Wildtyp *TP53* Tumorzelllinien im niedrig nanomolaren Bereich wirksam war. Auch in den Xenograft Modellen mit *TP53* Mutation (in der NSCLC Tumorzelllinien Calu 6 und NCI-H358, der Blasen-tumorzelllinie UM-UC-3 und der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231) konnte eine signifikante antitumorale Aktivität nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Effektivität von YM155 unabhängig von dem TP53 Status der Tumorzelllinien zu sein scheint (73).

Diese Ergebnisse wurden durch Michaelis et al. unterstützt, die in einer kürzlich veröffentlichten Studie Daten aus einer großen pharmakogenomischen Studie (GDSC) und CTRP) analysiert und so den Einfluss einer YM155 Behandlung auf die basale Genexpression von TP53 untersucht haben. In dieser Metaanalyse ließen sich keine Unterschiede der YM155 Sensitivität in Abhängigkeit des *TP53* Status feststellen (74). Im nächsten Schritt wurde der *TP53* Status in Neuroblastomzelllinien nach verlängerter YM155 Exposition mittels *TP53* Next Generation Sequencing untersucht. Es ließen sich auch nach verlängerter YM155 Exposition keine Veränderungen des *TP53* Status feststellen, was darauf hindeutet, dass der *TP53* Status nur geringen Einfluss auf die Wirksamkeit von YM155 hat und Veränderungen des *TP53* Status nicht zu den YM155 spezifischen Resistenzmechanismen zu zählen scheint.

Auf Grundlage dieser bisherigen Erkenntnisse wurde die Abhängigkeit der Kombinationsbehandlung von einem funktionalen p53 Signalweg untersucht, indem eine *TP53*

mutierte Neuroblastomzelllinie verwendet und die Effekte der Kombinationsbehandlung in zwei Neuroblastomzelllinien (IMR32 und IMR5) nach Transfektion mit einem dn-*TP53* Plasmid untersucht wurden.

Interessanterweise konnte in der *TP53* mutierten Neuroblastomzelllinie Kelly weiterhin eine leichte Verstärkung der YM155 induzierten Viabilitätshemmung durch die Kombination mit RG7388 oder DS3032b beobachtet werden. Auch auf Ebene der Apoptose-induktion konnte eine Verstärkung des pro-apoptotischen Effektes durch die Kombination mit RG7388 beobachtet werden. In der Kombinationsbehandlung zeigt sich eine deutliche Stabilisierung von p53 und Destabilisierung von Survivin. Jedoch ließ sich keine Induktion des p53 Signalwegs durch die Kombinationsbehandlung nachweisen.

Um diesen Effekt weiter zu untersuchen wurde im nächsten Schritt die Neuroblastomzelllinien IMR32 und IMR5 mit dem dn-*TP53* Plasmid transfiziert und mit der Kombinationstherapie behandelt. Auch in diesen Neuroblastomzelllinien konnte gezeigt werden, dass die pro-apoptotischen Effekte von RG7388, im Gegensatz zu der YM155 Einzelbehandlung, deutlich abgeschwächt nachweisbar waren. Trotz des deutlich abgeschwächten Ansprechens ließ sich der pro-apoptotische Effekt von YM155 durch die Kombination mit RG7388 noch deutlich verstärken.

Ausgenommen der p73 Aktivierung sind bisher keine MDM2- Inhibitor *off-targets* beschrieben worden, die eine synergistische Verstärkung des YM155 vermittelten Effekts erklären würden. Ein nächster Schritt bei der Untersuchung möglicher Signalwege wäre eine RNA Sequenzierung der Neuroblastomzellen nach erfolgter Behandlung, um mögliche alternative Signalweg identifizieren zu können, die bei dieser Kombinationsbehandlung eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die antitumoralen Effekte von YM155 durch die Kombination mit RG7388 in Neuroblastomzelllinien mit variierend genetischem Hintergrund, verstärken lassen. Die antitumoralen Effekte in den Neuroblastomzelllinien ohne funktionalen p53

Signalweg deuten darauf hin, dass auch Patienten mit *TP53* Mutation von dieser Kombinationsbehandlung profitieren können. Diese Arbeit kann als Ergänzung aktueller Studien angesehen werden, die YM155 oder RG7388 als therapeutische Option priorisieren und präsentiert eine weitere therapeutische Möglichkeit für die erfolgreiche Behandlung des Hochrisiko Neuroblastoms.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, Crocetti E, Magnani C, Spix C, Zambon P. Time trends of cancer incidence in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*. 2006;42(13):1961-71.
2. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;224(4653):1121-4.
3. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985;313(18):1111-6.
4. Arnhold V, Schmelz K, Proba J, Winkler A, Wunschel J, Toedling J, Deubzer HE, Kunkele A, Eggert A, Schulte JH, Hundsdoerfer P. Reactivating TP53 signaling by the novel MDM2 inhibitor DS-3032b as a therapeutic option for high-risk neuroblastoma. *Oncotarget*. 2018;9(2):2304-19.
5. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14(4):439-49.
6. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):971-4.
7. George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W, 2nd, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P, Xue L, Zozulya S, Gregor VE, Webb TR, Gray NS, Gilliland DG, Diller L, Greulich H, Morris SW, Meyerson M, Look AT. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):975-8.

8. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008;455(7215):930-5.
9. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, Valteau-Couanet D, Frebourg T, Michon J, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):967-70.
10. Hrustanovic G, Olivas V, Pazarentzos E, Tulpule A, Asthana S, Blakely CM, Okimoto RA, Lin L, Neel DS, Sabnis A, Flanagan J, Chan E, Varella-Garcia M, Aisner DL, Vaishnavi A, Ou SH, Collisson EA, Ichihara E, Mack PC, Lovly CM, Karachaliou N, Rosell R, Riess JW, Doebele RC, Bivona TG. RAS-MAPK dependence underlies a rational polytherapy strategy in EML4-ALK-positive lung cancer. *Nat Med*. 2015;21(9):1038-47.
11. Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Morrione A, Majewski M, Xue L, Morris SW, Wasik MA, Skorski T. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Res*. 2001;61(5):2194-9.
12. Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy DE, Inghirami G. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*. 2002;21(7):1038-47.
13. Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, Johnson AM, Litzemberger BC, Khotskaya YB, Sanchez NS, Zeng J, Shufean MA, Shaw KR, Mendelsohn J, Mills GB, Meric-Bernstam F, Simon GR. ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2017;3(1):a001115.

14. McArdle L, McDermott M, Purcell R, Grehan D, O'Meara A, Breatnach F, Catchpoole D, Culhane AC, Jeffery I, Gallagher WM, Stallings RL. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1599-609.
15. Wang Q, Diskin S, Rappaport E, Attiyeh E, Mosse Y, Shue D, Seiser E, Jagannathan J, Shusterman S, Bansal M, Khazi D, Winter C, Okawa E, Grant G, Cnaan A, Zhao H, Cheung NK, Gerald W, London W, Matthay KK, Brodeur GM, Maris JM. Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res*. 2006;66(12):6050-62.
16. Caren H, Kryh H, Nethander M, Sjoberg RM, Trager C, Nilsson S, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4323-8.
17. Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int J Cancer*. 2008;123(9):2087-94.
18. Spitz R, Hero B, Simon T, Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(11 Pt 1):3368-73.
19. Bown N, Lastowska M, Cotterill S, O'Neill S, Ellershaw C, Roberts P, Lewis I, Pearson AD, Group UKCC, the UKCsCSG. 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36(1):14-9.

20. Brodeur GM, Iyer R, Croucher JL, Zhuang T, Higashi M, Kolla V. Therapeutic targets for neuroblastomas. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(3):277-92.
21. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*. 2000;19(5):617-23.
22. Lamers F, van der Ploeg I, Schild L, Ebus ME, Koster J, Hansen BR, Koch T, Versteeg R, Caron HN, Molenaar JJ. Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(6):657-68.
23. Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, Gadner H, Ambros PF. Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996;334(23):1505-11.
24. Ladenstein R, Ambros IM, Potschger U, Amann G, Urban C, Fink FM, Schmitt K, Jones R, Slociak M, Schilling F, Ritter J, Berthold F, Gadner H, Ambros PF. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36(1):83-92.
25. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK, Force IT. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):289-97.
26. Eggert CNUA, editor. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Springer Vrlag GmbH Deutschland; 2018.
27. Ackermann S, Cartolano M, Hero B, Welte A, Kahlert Y, Roderwieser A, Bartenhagen C, Walter E, Gecht J, Kerschke L, Volland R, Menon R, Heuckmann JM, Gartlgruber M, Hartlieb S, Henrich KO, Okonechnikov K, Altmüller J, Nürnberg P, Lefever S, de Wilde B, Sand F, Ikram F, Rosswog C, Fischer J, Theissen J, Hertwig F, Singhi AD, Simon T, Vogel W, Perner S, Krug B,

- Schmidt M, Rahmann S, Achter V, Lang U, Vokuhl C, Ortmann M, Buttner R, Eggert A, Speleman F, O'Sullivan RJ, Thomas RK, Berthold F, Vandesompele J, Schramm A, Westermann F, Schulte JH, Peifer M, Fischer M. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science*. 2018;362(6419):1165-70.
28. Simon T, Hero B, Bongartz R, Schmidt M, Muller RP, Berthold F. Intensified external-beam radiation therapy improves the outcome of stage 4 neuroblastoma in children > 1 year with residual local disease. *Strahlenther Onkol*. 2006;182(7):389-94.
29. Simon T, Hero B, Schulte JH, Deubzer H, Hundsdoerfer P, von Schweinitz D, Fuchs J, Schmidt M, Prasad V, Krug B, Timmermann B, Leuschner I, Fischer M, Langer T, Astrahantseff K, Berthold F, Lode H, Eggert A. 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klin Padiatr*. 2017;229(3):147-67.
30. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Berthold F, Nakagawara A, Ladenstein RL, Iehara T, Matthay KK. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Oncol*. 2011;29(24):3286-92.
31. Kushner BH, Wolden S, LaQuaglia MP, Kramer K, Verbel D, Heller G, Cheung NK. Hyperfractionated low-dose radiotherapy for high-risk neuroblastoma after intensive chemotherapy and surgery. *J Clin Oncol*. 2001;19(11):2821-8.
32. Ladenstein R, Potschger U, Hartman O, Pearson AD, Klingebiel T, Castel V, Yaniv I, Demirer T, Dini G, Party EPW. 28 years of high-dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41 Suppl 2:S118-27.
33. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM, Children's Oncology G. Anti-GD2

- antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010;363(14):1324-34.
34. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323-31.
35. Van Maerken T, Vandesompele J, Rihani A, De Paepe A, Speleman F. Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ.* 2009;16(12):1563-72.
36. Barone G, Tweddle DA, Shohet JM, Chesler L, Moreno L, Pearson AD, Van Maerken T. MDM2-p53 interaction in paediatric solid tumours: preclinical rationale, biomarkers and resistance. *Curr Drug Targets.* 2014;15(1):114-23.
37. Carr-Wilkinson J, O'Toole K, Wood KM, Challen CC, Baker AG, Board JR, Evans L, Cole M, Cheung NK, Boos J, Kohler G, Leuschner I, Pearson AD, Lunec J, Tweddle DA. High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2010;16(4):1108-18.
38. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(12):862-73.
39. Vassilev LT. Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle.* 2004;3(4):419-21.
40. Van Maerken T, Ferdinande L, Taideman J, Lambertz I, Yigit N, Vercruysse L, Rihani A, Michaelis M, Cinatl J, Jr., Cuvelier CA, Marine JC, De Paepe A, Bracke M, Speleman F, Vandesompele J. Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(22):1562-74.
41. Chen L, Rousseau RF, Middleton SA, Nichols GL, Newell DR, Lunec J, Tweddle DA. Pre-clinical evaluation of the MDM2-p53 antagonist RG7388 alone and in combination with chemotherapy in neuroblastoma. *Oncotarget.* 2015;6(12):10207-21.

-
42. Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J.* 2010;430(2):199-205.
 43. Altieri DC. Survivin - The inconvenient IAP. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;39:91-6.
 44. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 2006;7(10):988-94.
 45. Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a preferential target for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2494-516.
 46. Xing Z, Conway EM, Kang C, Winoto A. Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis. *J Exp Med.* 2004;199(1):69-80.
 47. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood.* 2001;98(7):2091-100.
 48. Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol.* 2001;158(5):1757-65.
 49. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet.* 1998;351(9106):882-3.
 50. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5071-4.
 51. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997;3(8):917-21.
 52. Reed JC, Wilson DB. Cancer immunotherapy targeting survivin: commentary re: V. Pisarev et al., full-length dominant-negative survivin for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 9:6523-6533, 2003. *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6310-5.

53. Khan Z, Khan AA, Yadav H, Prasad G, Bisen PS. Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma. *Cell Mol Biol Lett.* 2017;22:8.
54. Zhao X, Puszyk WM, Lu Z, Ostrov DA, George TJ, Robertson KD, Liu C. Small molecule inhibitor YM155-mediated activation of death receptor 5 is crucial for chemotherapy-induced apoptosis in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(1):80-9.
55. Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, Patnaik A, Papadopoulos K, Takimoto C, Bartels P, Keating A, Antonia S. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *J Clin Oncol.* 2008;26(32):5198-203.
56. Voges Y, Michaelis M, Rothweiler F, Schaller T, Schneider C, Politt K, Mernberger M, Nist A, Stiewe T, Wass MN, Rodel F, Cinatl J. Effects of YM155 on survivin levels and viability in neuroblastoma cells with acquired drug resistance. *Cell Death Dis.* 2016;7(10):e2410.
57. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55.
58. Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell.* 1991;65(5):765-74.
59. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science.* 1992;256(5058):827-30.
60. Lamers F, Schild L, Koster J, Versteeg R, Caron HN, Molenaar JJ. Targeted BIRC5 silencing using YM155 causes cell death in neuroblastoma cells with low ABCB1 expression. *Eur J Cancer.* 2012;48(5):763-71.
61. Liang H, Zhang L, Xu R, Ju XL. Silencing of survivin using YM155 induces apoptosis and chemosensitization in neuroblastomas cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(21):2909-15.
62. Moreno L, Caron H, Geoerger B, Eggert A, Schleiermacher G, Brock P, Valteau-Couanet D, Chesler L, Schulte JH, De Preter K, Molenaar J, Schramm A, Eilers M, Van Maerken T, Johnsen JI, Garrett M, George SL, Tweddle DA, Kogner P, Berthold F, Koster J, Barone G, Tucker ER,

- Marshall L, Herold R, Sterba J, Norga K, Vassal G, Pearson AD. Accelerating drug development for neuroblastoma - New Drug Development Strategy: an Innovative Therapies for Children with Cancer, European Network for Cancer Research in Children and Adolescents and International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma project. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(8):801-11.
63. Tang H, Shao H, Yu C, Hou J. Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(9):1066-72.
64. Rapino F, Naumann I, Fulda S. Bortezomib antagonizes microtubule-interfering drug-induced apoptosis by inhibiting G2/M transition and MCL-1 degradation. *Cell Death Dis.* 2013;4:e925.
65. Rauch A, Hennig D, Schafer C, Wirth M, Marx C, Heinzl T, Schneider G, Kramer OH. Survivin and YM155: how faithful is the liaison? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1845(2):202-20.
66. Nakahara T, Yamanaka K, Hatakeyama S, Kita A, Takeuchi M, Kinoyama I, Matsuhisa A, Nakano K, Shishido T, Koutoku H, Sasamata M. YM155, a novel survivin suppressant, enhances taxane-induced apoptosis and tumor regression in a human Calu 6 lung cancer xenograft model. *Anticancer Drugs.* 2011;22(5):454-62.
67. Glaros TG, Stockwin LH, Mullendore ME, Smith B, Morrison BL, Newton DL. The "survivin suppressants" NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;70(1):207-12.
68. Barbieri E, Mehta P, Chen Z, Zhang L, Slack A, Berg S, Shohet JM. MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(9):2358-65.
69. Van Maerken T, Rihani A, Dreidax D, De Clercq S, Yigit N, Marine JC, Westermann F, De Paepe A, Vandesompele J, Speleman F. Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(6):983-93.

-
70. Gamble LD, Kees UR, Tweddle DA, Lunec J. MYCN sensitizes neuroblastoma to the MDM2-p53 antagonists Nutlin-3 and MI-63. *Oncogene*. 2012;31(6):752-63.
71. Van Goethem A, Yigit N, Moreno-Smith M, Vasudevan SA, Barbieri E, Speleman F, Shohet J, Vandesompele J, Van Maerken T. Dual targeting of MDM2 and BCL2 as a therapeutic strategy in neuroblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(34):57047-57.
72. Lau LM, Nugent JK, Zhao X, Irwin MS. HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. *Oncogene*. 2008;27(7):997-1003.
73. Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, Tominaga F, Kinoyama I, Matsuhisa A, Kudou M, Sasamata M. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci*. 2011;102(3):614-21.
74. Michaelis M, Wass MN, Reddin I, Voges Y, Rothweiler F, Hehlhans S, Cinatl J, Mernberger M, Nist A, Stiewe T, Rodel F, Cinatl J, Jr. YM155-Adapted Cancer Cell Lines Reveal Drug-Induced Heterogeneity and Enable the Identification of Biomarker Candidates for the Acquired Resistance Setting. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5).

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Catharina Baum, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Kombination von Chemotherapie und MDM2-Inhibition als neuer therapeutischer Ansatz beim Neuroblastom. MDM2-Inhibitor basierte Kombinationstherapien zur Prävention von Resistenzen (The combination of MDM2 inhibition and chemotherapy as a new therapeutic strategy in neuroblastoma), selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

DANKSAGUNG

Ich danke PD Dr. Patrick Hundsdörfer, meinem Doktorvater, für sein außergewöhnliches Engagement und Einsatz bei der Betreuung meiner Doktorarbeit. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, hat meinen wissenschaftlichen Blick geschärft und mich auf meinem Weg in die Kinderonkologie großartig unterstützt.

Außerdem danke ich Dr. rer. nat. Karin Schmelz für ihre Unterstützung und ihren tagtäglichen Einsatz, die vielen fachlichen und nicht fachlichen Gespräche, die in dieser Zeit besonders gutgetan haben und wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein großer Dank gilt außerdem Jutta Proba, die mich vom ersten Tag an begleitet hat, mich in die Laborarbeit eingearbeitet hat und großartig verstanden hat mich immer wieder aufzubauen.

Ich danke Frau Prof. Angelika Eggert, die mir die Möglichkeit gegeben hat Teil ihres tollen wissenschaftlichen und klinischen Teams zu werden und mich stets gefördert und gefordert hat.

Ich danke dem gesamten Team der AG Eggert, der stetige Austausch innerhalb dieser Arbeitsgruppe haben den Grundstein für mein wissenschaftliches Verständnis gelegt. Die Zeit der Labor-Arbeiten wird mir immer als besonders schöne, bereichernde und lehrreiche Zeit in Erinnerung bleiben.

Ich danke außerdem meinen Eltern und Geschwistern, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt haben und mit liebevollen Worten immer an meiner Seite standen. Mein Dank gilt außerdem meiner besten Freundin Clara, die mich in schwierigen Zeiten immer wieder auf neue Gedanken gebracht hat, neu motiviert und jeden kleinen Erfolg liebevoll mitgefeiert hat. Ich danke von ganzem Herzen meinem Freund Lukas, der mir insbesondere in der letzten Phase dieser Arbeit und vor der Geburt unseres Sohnes, mit seiner Liebe eine besondere Stütze war.

Ein besonderer Dank gilt außerdem der Kind Philipp Stiftung, die mir durch ein Stipendium ermöglicht hat, mich vollkommen auf die Wissenschaft und diese Arbeit konzentrieren zu können.