

Aus dem  
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin  
mit Perinatalzentrum und Humangenetik  
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Günter Henze

## **Habilitationsschrift**

# **Biologie neuroektodermaler Tumoren im Kindes- und Jugendalter und deren antitumorale Behandlung mit Valproinsäure**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Pablo Hernáiz Driever**  
**geboren am 17.09.1964 in Anholt-Isselburg Kreis Borken**

**Eingereicht: März 2009**  
**Dekanin: Frau Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich**  
**1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. M. Frühwald**  
**2. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Urban**

*Para  
mis hijos Adrián y Diego José,  
mi esposa María José,  
mis padres Johanna y Ernesto  
y mi hermana Patricia*

„Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.“  
Santiago Ramón y Cajal

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungen	4
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Neuroektodermale Tumoren im Kindes- und Jugendalter	5
1.2 Biologie der Tumorzelle	7
1.3 Einfluss von Midkine auf die Biologie neuroektodermaler Tumoren	9
1.4 Mechanismen der Chemoresistenz neuroektodermaler Tumoren	11
1.5 Antitumorale Behandlung neuroektodermaler Tumoren mit Valproinsäure	13
1.6 Wissenschaftliche Fragestellungen dieser Schrift	15
<b>2. Eigene Arbeiten</b>	<b>16</b>
2.1 Zirkulierende Wachstumsfaktoren sind mit der Tumorentwicklung bei Neurofibromatose Typ 1 assoziiert	16
2.2 Überexpression von Midkine in malignen peripheren Nervenscheidentumorzellen inhibiert die Apoptose und erhöht die angiogene Potenz	18
2.3 Das mit Chemoresistenz erworbene erhöhte maligne Verhalten von Neuroblastomzellen ist unabhängig von der P-gp Expression	20
2.4 Erhöhte fetale Hämoglobinsynthese weist auf eine Differenzierungsinduktion bei Kindern während Valproinsäurebehandlung hin	22
2.5 Valproinsäure induziert die Differenzierung eines supratentoriellen primitiv neuroektodermalen Tumors	24
2.6 Gute Verträglichkeit von Valproinsäure bei erheblich vorbehandelten pädiatrischen Patienten mit hochmalignen Gliomen	25
<b>3. Diskussion</b>	<b>27</b>
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>35</b>
<b>5. Literatur des freien Textes</b>	<b>37</b>
Danksagung	
Erklärung	

## Abkürzungen

ABC	ATP-Binding cassette
AKT	Proteinkinase B
ALK	Anaplastische Lymphatische Kinase
ASCR	Autologe Stammzell-„Rescue“
Bp	Basenpaar
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
EFS	Ereignisfreies Überleben
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
Erk	Extrazelluläre Signalabhängige Kinase
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GNP	Gesellschaft für Neuropädiatrie
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HbGF	Heparin-bindender Wachstumsfaktor
HDCT	Hochdosismchemotherapie
ICD-O	International Classification of Disease for Oncology
INSS	Internationales Neuroblastom Staging System
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	Verlust der Heterozygotie
LRP	LDL-Rezeptor verwandtes Protein
MDK	Humanes Midkine kodierendes Gen
MK	Midkine
MPNST	Maligne periphere Nervenscheidentumoren
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NB	Neuroblastom
NF1	Neurofibromatose vom Typ 1
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor
P-gp	P-Glykoprotein
PI3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PNS	Peripheres Nervensystem
PTN	Pleiotrophin
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VPA	Valproinsäure
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Neuroektodermale Tumoren im Kindes- und Jugendalter

Dem embryonalen Neuralrohr entspringen alle Zellen des ZNS, vor allem Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Die Neuralleiste bildet sich aus der dorsalen Lippe des Neuralrohrs. Die Zellen dieser Leiste wandern während der embryonalen Entwicklung aus und bilden das periphere Nervensystem. Im zentralen und im peripheren Nervensystem entwickeln sich erst Neurone (Neurogenese) und in der Folge Glia (Gliogenese) [1]. Als neuroektodermale Tumoren werden alle Tumoren benannt, die histogenetisch von den Zellen des Neuroektoderms abstammen [2]. Mehr als jeder vierte pädiatrisch onkologische Patient leidet an einem neuroektodermalen Tumor. Die größten Gruppen sind Tumoren des ZNS (ca. 20% aller Patienten) und Neuroblastome (ca. 8% aller Patienten). Dies entspricht jährlich ca. 350 pädiatrischen Hirntumorpatienten [3] und ca. 150 Neuroblastompatienten in Deutschland [4]. Zu den Tumoren des PNS gehören zudem periphere primitiv neuroektodermale Tumoren (peripherer PNET), maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) und Neurofibrome. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems vorgestellt.

#### Tumoren des zentralen Nervensystems

##### Hochgradige diffus infiltrierende Astrozytome (ICD-O 9401/3 und 9440/3)

Es handelt sich um Neoplasien astrozytären Ursprungs, die in Abhängigkeit von der nukleären Atypie, der mitotischen Aktivität, endothelialen Proliferaten und Nekrosen von WHO Grad III bis IV eingestuft werden. Sie kommen im gesamten zentralen Nervensystem vor und infiltrieren diffus das umgebende Gewebe. Dabei stellt das Glioblastoma multiforme den bösartigsten Phänotyp dar [2]. Die Biologie der Tumoren im Kindes- und Jugendalter unterscheidet sich deutlich von dem der erwachsenen Patienten. Pädiatrische Patienten mit supratentoriellen komplett entfernten Tumoren, die mit adjuvanter Chemo- und Strahlentherapie in gleicher Intensität behandelt werden, haben im Gegensatz zu erwachsenen Patienten eine signifikant höhere Gesamtüberlebensrate von bis zu 60% nach 5 Jahren [5-7]. Die Mehrzahl der Patienten entwickelt jedoch einen Tumor, der nicht komplett entfernt werden kann. Da das Ansprechen auf die adjuvante Therapie deutlich eingeschränkt ist, haben diese Patienten unverändert eine äußerst ungünstige Prognose [5-7].

### Supratentorieller primitiv neuroektodermaler Tumor ICD-O 9473/3

Es handelt sich um einen embryonalen Tumor des Gehirns, der aus undifferenziert oder nur wenig differenzierten neuroepithelialen Zellen besteht. Diese können in verschiedene Richtungen ausreifen: Neuronal, astrozytär, ependymal, muskulär oder melanozytisch. Tumoren mit einer spezifischen neuronalen Differenzierung werden zerebrale Neuroblastome genannt. Die Tumoren werden beim Auftreten in der hinteren Schädelgrube als Medulloblastome und in der Pinealisregion als Pinealoblastome bezeichnet [2]. Allen gemeinsam ist die Neigung zur Dissemination über den Liquorweg [8]. Somit erhalten alle Patienten neben der postoperativen Chemotherapie und fokalen Bestrahlung eine kraniospinale Bestrahlungstherapie [9]. Die supratentoriellen PNET sind im Vergleich zum Medulloblastom deutlich aggressiver mit einer höheren Rate an primärer Resistenz gegenüber der adjuvanten Therapie und bedeuten für die Patienten eine ungünstige Prognose [8,10,11].

### Tumoren des peripheren Nervensystems

#### Neuroblastom ICD-O 9500/3

Es handelt sich um den häufigsten soliden extrakraniellen Tumor im Kindes- und Jugendalter. Diese Tumoren gehen von den Zellen aus, die das Nebennierenmark und das sympathische Nervensystem entstehen lassen. Zusammen mit den Medulloblastomen und den supratentoriellen primitiv neuroektodermalen Tumoren bilden sie die Gruppe der embryonalen Tumoren innerhalb der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. Der Schwanzzell-Anteil bestimmt gemäß dem internationalen Neuroblastom Pathologie Komitee die pathologische Einteilung, wobei Neuroblastome Schwanzzell-Stroma arme Tumoren darstellen. Abhängig vom Anteil differenzierter Neuroblasten (über oder unter 5%) liegt ein schwach oder stark differenziertes Neuroblastom vor [2]. Die Hauptlokalisation liegt in der Nebenniere (40%) gefolgt von den abdominellen, thorakalen und zervikalen sympathischen Ganglien. Die Biologie zeigt eine große Variabilität. Neben spontanen Remissionen trotz disseminierter Erkrankung im Säuglingsalter haben lokalisierte Tumorformen ebenfalls eine gute Prognose. Im Gegensatz dazu sind die disseminierten Formen bei Patienten, die älter als ein Jahr sind, mit einer deutlich ungünstigen Prognose behaftet. Unabhängige Determinanten einer aggressiven Biologie sind der Nachweis einer MYCN-Amplifikation und eine Deletion der chromosomalen Region 1p36 [4].

### Neurofibrom ICD-O 9540/0

Es handelt sich um gut abgegrenzte intraneurale oder diffus infiltrierende Tumoren, die aus einer Mischung aus Schwannzellen, perineuralen Zellen und Fibroblasten bestehen und in einer Matrix aus kollagenen Fasern eingebettet sind. Diese kommen spontan oder im Rahmen des Tumordispositionssyndrom Neurofibromatose Typ 1, welches mit einer zellulären Verminderung von Neurofibromin verbunden ist, vor [2]. In der Regel sind sie in der Haut anzutreffen. Etwas weniger häufig treten sie in peripheren Nerven oder weiter proximal im Bereich der Nervenbündel auf. Während Hirnnerven nie befallen sind, werden Beteiligungen der Hinterstrangwurzeln nicht selten beobachtet. In der Haut sind sie einfach zu entfernen, während die operative Entfernung weiter proximal oder zentral immer mit Funktionsverlusten assoziiert ist. Sie treten in der Regel mit dem Beginn der Pubertät auf und sind bisher lediglich chirurgischen Maßnahmen zugänglich [12].

### Maligne periphere Nervenscheidentumoren ICD-O 9540/3

Es handelt sich um maligne Tumoren, die von den peripheren Nerven abstammen. Histologisch imponieren die Tumoren durch ein spindelzelliges, zeldichtes faszikuläres Wachstumsmuster. Die weniger atypischen Zellkerne sind elongiert mit leicht eosinophilem Zytoplasma. Ungefähr die Hälfte der Tumoren entsteht im Rahmen der NF-1. Ungefähr 2 von 3 Tumoren wachsen auf der Basis von Neurofibromen, insbesondere plexiformen Neurofibromen [2]. Obwohl die Tumoren in der Mehrzahl zwischen der 3. und 6. Lebensdekade auftreten, können in der Pädiatrie vor allem Adoleszenten mit und ohne NF-1 diese Tumoren entwickeln. Die häufigsten Lokalisationen sind größere Nervenstränge des Gesäßes, der Oberschenkel, des Plexus brachialis, des Oberarms und der paraspinalen Region. Die Tumoren erweisen sich gegenüber Chemotherapie und Strahlentherapie wenig empfindlich und die Patienten haben dementsprechend eine verminderte Überlebenschance [12].

## **1.2 Biologie der Tumorzelle**

Alle Säugerzellen verfügen über äußerst ähnliche molekulare Mechanismen, die zelluläre Proliferation, Differenzierung der Zelle, Seneszenz der Zelle und Zelltod regulieren. Ein gestörtes Gleichgewicht dieser zentralen Mechanismen führt einerseits zur Entstehung einer malignen Biologie der Zellen und andererseits entscheidet das Ausmaß der Fehlregulation die Ausprägung der bösartigen Eigenschaften. Die Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Krebszelle ist Folge eines mehrstufigen Prozesses, den die Zellen vom normalen hin zum malignen Phänotyp durchlaufen. Dieser Prozess spiegelt die Akkumulation der genetischen Veränderungen wider, die die Grundlage für

die bösartige Biologie darstellen [13]. Die Mehrzahl der bösartigen Erkrankungen beim Menschen wird im Erwachsenenalter diagnostiziert. Dies weist darauf hin, dass wahrscheinlich limitierende stochastische Faktoren wirksam sind. Aus den Daten zur in vitro Herstellung von malignen Zellen, muss von 4-7 Stufen/Faktoren ausgegangen werden, die zusammentreffen müssen, um eine Zelle mit malignem Phänotyp entstehen zu lassen [14]. Diese Beobachtung wird zudem durch genetische Untersuchungen zur progressiven Entartung von Tumorzellen, wie z.B. bei der Entwicklung vom diffusen Astrozytom, über das anaplastische Astrozytom bis hin zum Glioblastoma multiforme gestützt [2].

Das Überleben einer bösartigen Zelle hängt stark von ihren malignen Fähigkeiten ab, die die Überwindung von intrazellulären und extrazellulären Homöostasemechanismen ermöglichen. Hanahan und Weinberg haben sechs essentielle Veränderungen in der Zellphysiologie von Krebszellen identifiziert, die die Überwindung der Kontrollelemente der Homöostase darstellen [13]:

- Selbstversorgung mit Wachstumssignalen
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Umgehung des programmierten Zelltodes
- grenzenloses Teilungsvermögen
- anhaltende Gefäßneubildung
- Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung

Diese Veränderungen auf Proteinebene haben jeweils ein genetisches Korrelat im Sinne eines onkogenen Gewinns und/oder Verlustes an Tumorsuppression [13]. Diese Korrelate reichen von der Punktmutation bis zu groben Störungen des Karyotyps. Dieser Entartungsprozess gleicht der Darwin'schen Evolution, indem Tumorzellen durch jede der akkumulierten genetischen Veränderungen einen Wachstumsvorteil erhalten, die letztendlich zur Ausbildung der Tumorerkrankung trotz der intra- und extrazellulären Kontrollmechanismen führt [15].

In Analogie zu der bei Hanahan und Weinberg gegebenen Übersicht haben wir diese kritischen Eigenschaften der Biologie von neuroektodermalen Tumoren im Kindes- und Jugendalter bezüglich des Einflusses des Wachstumsfaktors MK, der P-gp und MRP vermittelten Resistenzmechanismen und der antitumoralen Wirkung von VPA untersucht.

### 1.3 Einfluss von Midkine auf die Biologie neuroektodermaler Tumoren

Midkine (MK) ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor [16]. Das humane Gen für Midkine (MDK) befindet sich auf Chromosom 11p11.2 [17]. Die Promotorregion beherbergt eine Retinolsäure bindende Region sowie zwei Wilms-Tumor-Suppressor-Gen-1 (WT1) bindende Regionen [18,19].

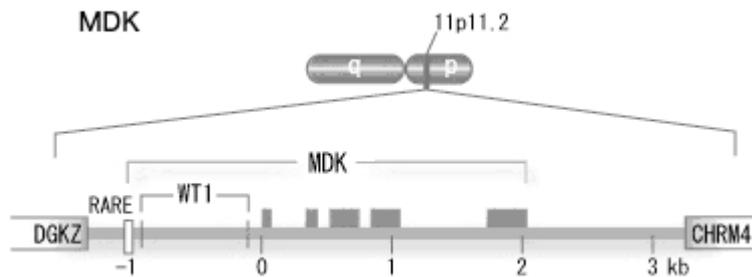


Abb. 1: Struktur des humanen Midkine-Gens [20]

RARE = Retinolsäure bindende Region,

WT1 = Wilms-Tumor-Suppressor-Gen-1 bindende Region

Die MK-Sequenz ist mit der des Wachstumsfaktors Pleiotrophin zu 50 % identisch. Aufgrund der starken Homologie bilden sie eine eigene Familie von sezernierten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die sich strukturell von den anderen Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren unterscheiden [21]. Bisher konnten vier verschiedene Rezeptoren von MK identifiziert werden (Abb. 2). Die Heparin-bindende Aktivität von MK führte zu der Annahme, dass Heparin-Sulfat-Proteoglykane am Rezeptorkomplex beteiligt sein könnten. Tatsächlich konnte eine Bindung von MK an N-Syndecan, das aus transmembranen Heparin-Sulfat-Proteoglykanen besteht, nachgewiesen werden [22]. Des Weiteren bindet MK an die Protein-Tyrosin-Phosphatase  $\zeta$  (PTP  $\zeta$ ), wobei sich die Bindungsstelle hierfür in der C-terminalen Domäne befindet und der intrazelluläre Signalweg über eine Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und der Extrazellulären Signalabhängigen Kinase (Erk) läuft [23]. Ein weiterer Rezeptor für MK ist die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK), deren weiterer Signalpfad ebenfalls über PI3-Kinase und Erk erfolgt [24]. Der vierte Rezeptor ist das mit dem LDL-Rezeptor verwandte Protein (LRP), durch den MK in die Zelle aufgenommen wird und anschließend in den Zellkern gelangen kann [25]. Inwieweit einzelne Rezeptoren an den spezifischen Wirkungen von MK beteiligt sind, ist zur Zeit noch unklar [26].

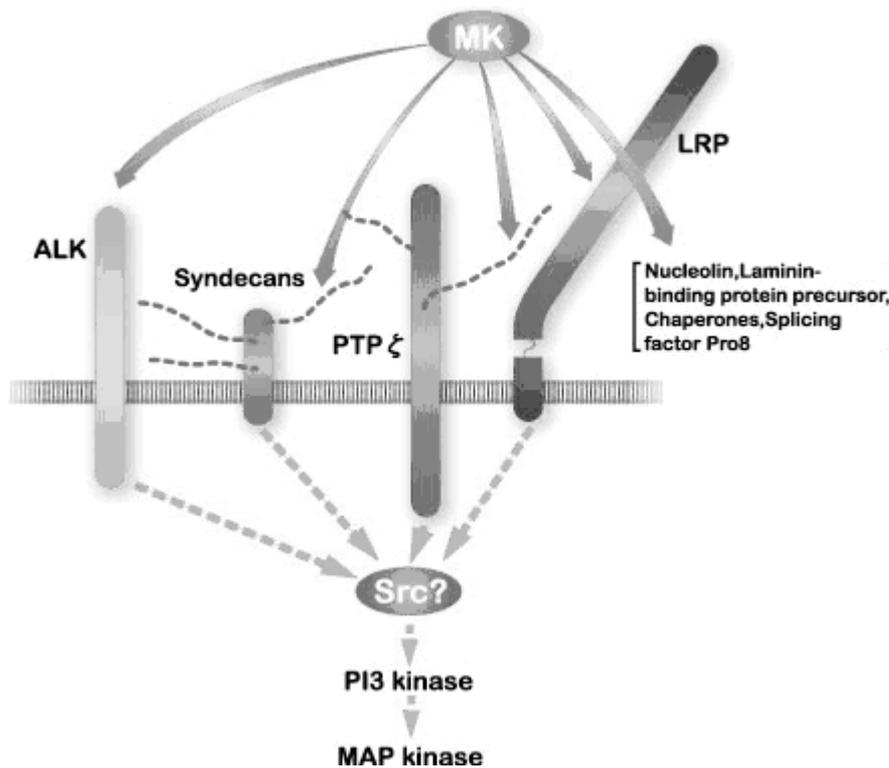


Abb. 2: Der Rezeptorkomplex von Midkine und die intrazelluläre Signalkette [20,27]

### Funktion und biologische Eigenschaften

Die biologischen Eigenschaften von MK sind vielfältig, wobei sich insbesondere eine Beteiligung an Entwicklung, Angiogenese und Inflammation gezeigt hat. MK spielt als neurotropher Faktor eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems. Bei Mäusen fördert MK die Ausbreitung von Neuriten und die Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen zu Neuronen. Darüber hinaus verlängert MK das Überleben von embryonalen Neuronen in Kultur [21,28]. Photorezeptor-Zellen des Auges von Ratten können in vivo durch MK vor Licht-induziertem Schaden bewahrt werden [29].

### Midkine-Expression in Tumoren

In Untersuchungen konnte die Bedeutung von MK für die Tumorigenese herausgestellt werden. So wurde gezeigt, dass MK auf bestimmte Zelltypen mitogen wirkt. Die Proliferation von undifferenzierten neuroektodermalen Tumorzellen und 10T1/2 Fibroblasten wurde durch MK gesteigert [30]. Des Weiteren führte MK zur Transformation von NIH3T3 Zellen [31], zeigte fibrinolytische Aktivität in Endothelzellen [32] und förderte die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen [33,34]. Außerdem wirkt MK als angiogenetischer Faktor bei der Proliferation von Brustkrebszellen [35]. Die MK-Expression ist bei einer Vielzahl von Tumoren erhöht. Dies wurde bereits in

Gewebeproben von Karzinomen der Speiseröhre, des Magens, der Bauchspeicheldrüse, des Kolons, der Leber [36-38], der Brust [39] und der Lunge [40] nachgewiesen. In den ZNS-Tumoren Glioblastom, Medulloblastom, Astrozytom und in primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) wird MK vermehrt exprimiert [41]. Bei embryonalen Tumoren wurde eine erhöhte MK-mRNS-Expression sowohl in Neuroblastom-Proben (N = 72) und -Zelllinien (N = 11), als auch in sechs Nephroblastom-Gewebeproben gemessen [38,42].

#### Midkine als Tumormarker

Tumormarker sind Substanzen, deren Auftreten oder erhöhte Konzentration in Körperflüssigkeiten einen Zusammenhang mit dem Vorhandensein und/oder Verlauf von Tumorerkrankungen aufweist. Er sollte von Tumorzellen produziert werden und in Körperflüssigkeiten bereits in frühen Krankheitsstadien nachweisbar sein, damit der Nachweis des Markers als Screening-Methode für den jeweiligen Tumor dienen kann. Der Tumormarker sollte idealer Weise tumorspezifisch sein, das heißt bei Gesunden oder benignen Erkrankungen nicht vorkommen. Dabei sollte die Konzentration des Markers mit dem Tumolvolumen korrelieren und das klinische Ansprechen auf die antitumorale Therapie reflektieren [43]. Bei dem Wachstumsfaktor MK handelt es sich um ein sezerniertes Protein, das mittels eines ELISA-Testverfahrens im Serum nachgewiesen werden kann [44]. In einer Studie von Ikematsu et al. wurden bei 87% der untersuchten Karzinom-Patienten (N = 150) erhöhte MK-Serumspiegel gefunden. Die Werte gingen bei vier von fünf Patienten mit hepatozellulärem Karzinom nach der Entfernung des Tumors signifikant zurück [45]. Shimada et al. untersuchten 93 Patienten mit einem primären Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus. Die Serumwerte der Tumorpatienten waren signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpatienten. Außerdem waren hohe Werte über 0,3 ng/ml mit einer schlechten Prognose assoziiert [46]. Bei Neuroblastom-Patienten korrelieren die erhöhten MK-Werte mit ungünstigen Prognosefaktoren wie MYCN-Amplifikation, niedriger TrkA-Expression, Diploidie/Tetraploidie und einem Alter von über einem Jahr [47].

#### **1.4 Mechanismen der Chemoresistenz neuroektodermaler Tumoren**

Die Behandlung der Neuroblastome im Kindes- und Jugendalter beinhaltet eine neoadjuvante Therapie mit verschiedenen Substanzen, u.a. Anthrazykline und Vinca-Alkaloide [48,49]. Bei disseminierten Erkrankungen und beim Nachweis von negativen prognostischen Faktoren wie MYCN-Amplifikation und Deletion der chromosomalen Region 1p36 werden die Patienten mit Hochdosischemotherapie mit autologem

Stammzell-„Rescue“ behandelt [4]. Es kommt bei Patienten mit einer disseminierten Erkrankung nach Ansprechen der Tumorerkrankung auf die Therapie häufig zu einer Resistenzentwicklung auf die Chemotherapie [50]. Diese Resistenzentwicklung ist zum großen Teil mit einer vermehrten Expression der für Resistenz der Zellen mit verantwortlichen Proteine „Multidrug-resistance associated protein“ (MRP) und/oder P-Glykoprotein (P-170) verbunden [51]. Diese beiden Proteine gehören zur Familie der ABC (ATP-Binding cassette)-Transporterproteine, die aus sieben Subfamilien besteht: ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20 und White [52,53].

P-Glykoprotein wird auch als Permeabilitätsglykoprotein bezeichnet und ist ein Vertreter der ABC-Transporter der MDR/TAP-Subfamilie (ATP-Binding cassette sub-family B member 1), die hauptsächlich für die Resistenz gegenüber Chemotherapie verantwortlich ist. Das Protein wird in den Epithelzellen des Dünndarms, den Hepatozyten, den renalen proximalen Tubuluszellen sowie den kapillären Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert. Die Funktion besteht im Transport unterschiedlicher Moleküle durch extra- und intrazelluläre Membranen. Infolgedessen wird bei einer vermehrten Expression des Proteins im Dünndarm die Aufnahme von Substanzen vermindert, die als Substrate von P-gp fungieren. Umgekehrt können suprathérapeutische Plasmakonzentrationen und Toxizitäten von Substanzen infolge einer verminderten P-gp Expression beobachtet werden. Bezüglich der verminderten Empfindlichkeit von zentralnervösen Tumoren gegenüber einer systemischen Chemotherapie spielt dieses Protein ebenfalls eine Rolle, da es in der Blut-Hirn-Schranke für die Ausschleusung von therapeutisch aktiven Substanzen sorgt [52].

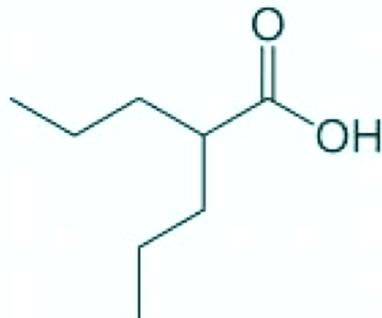
Das „Multi-drug resistance-associated protein“ (MRP) ist ein Vertreter der ABC-Transporter der CFTR/MRP Subfamilie (ATP-Binding cassette sub-family C member 2). Dieses Protein wird im apikalen Teil der Hepatozyten (kanalikulär) exprimiert und agiert als Teil des biliären Transports. Verschiedene Mutationen dieses Gens sind bei Patienten mit einer autosomal rezessiv vererbten konjugierten Hyperbilirubinämie (Dubin-Johnson-Syndrom) assoziiert [53].

Chemoresistente Neuroblastomzelllinien sind ausgezeichnete in vitro-Modelle, um die biologischen Veränderungen, die mit der Chemoresistenz einhergehen, zu untersuchen [54,55].

### 1.5 Antitumorale Behandlung neuroektodermaler Tumoren mit Valproinsäure

Die klinische Erfahrung in der Behandlung maligner Gliome zeigt, dass trotz der sehr aggressiven intensiven Behandlung mit Chemo- und Strahlentherapie manche als Restläsionen mit differenzierten Tumorzellen persistieren. Dabei ist nicht klar, ob es zu einer Selektion differenzierter Tumorzellen kam oder unreife Tumorzellen zur Differenzierung induziert wurden [56-58]. Untersuchungen mit kurzkettigen Fettsäuren wie Phenylacetat zeigten, dass in vitro wie in vivo verschiedene Tumorzellen in ihrem Wachstum gehemmt wurden und von einer Differenzierung der Zellen begleitet war [59,60].

Abb. 3: VPA



VPA (di-n-Propylessigsäure, Abb.3), eine weitere kurzkettige Fettsäure, ist als antiepileptische Substanz und in der Behandlung psychiatrischer Erkrankungen bereits seit Jahrzehnten im Einsatz. Somit sind das pharmakokinetische und Toxizitätsprofil bestens bekannt. Talspiegel von VPA für die antiepileptische Wirkung liegen im Bereich um 50 bis 100 mg/l. Dies entspricht 0,3 bis 0,6 mM [61]. Die teratogene Wirkung von VPA in diesem Wirkungsbereich ist ebenfalls bekannt [62,63]. Höhere Dosen sind mit der Gefahr der Entwicklung einer Thrombozytopenie, einer Pankreatitis, einer Schilddrüsenunterfunktion, und einem polyzystischen Ovarial-Syndrom assoziiert [64,65]. Im Rahmen der Studien zur Teratogenität, wurden in der Regel unreife neuroektodermale Tumorzellen als Modell genommen [66]. Diese Erfahrungen haben wir aufgenommen und so konnten wir zeigen, dass die teratogene Wirkung einer wachstumshemmenden Wirkung auf neuroektodermale Tumorzellen entspricht. Zudem wurden auch hämatopoetische Tumorzellen in ihrem Wachstum gehemmt. Die Wachstumshemmung der Tumorzellen war von einer Differenzierungsinduktion und der Erhöhung der Immunogenität der Zellen begleitet [67,68].

Der der antitumoralen Wirkung von VPA zugrunde liegende Hauptmechanismus besteht aktuellem Wissensstand nach in einer Inhibition der Histondeacetylasen. Die Histonacetylierung ist einer der Hauptmechanismen epigenetischer Regulierung der Genexpression, in dem die DNS-Helix aus ihrer Bindung an Histone gelockert wird und

somit der Bindung von Promotorproteinen, die die Expression fördern, zur Verfügung steht. Auf der anderen Seite führt die Histondeacetylierung zu einer stärkeren Bindung der DNS-Stränge an die Histone, die somit den die Expression fördernden Promotorkomplexen nicht mehr zur Verfügung steht. Infolgedessen wird die Expression der kodierenden Abschnitte vermindert. In Übersichten haben wir die aktuellen Kenntnisse zum Mechanismus der antitumoralen Wirkmechanismen von VPA dargestellt. Die wichtigsten Effekte sind Hemmung der Proliferation, Induktion der Differenzierung und Erhöhung der Immunogenität der behandelten Tumorzellen. Die antitumorale Wirkung führt auch zur Minderung der Metastasierung und der angiogenen Potenz der behandelten Zellen [69-71]. In letzter Zeit sind weitere Substanzen entwickelt worden, die bestimmte Histondeacetylase inhibieren [72].

Nach den ersten Ergebnissen in unseren präklinischen Modellen haben wir klinisch die differenzierungsinduzierende Fähigkeit von VPA bei Epilepsiepatienten untersucht [73]. Im Weiteren haben wir, ermutigt durch Erfolge bei einzelnen Patienten [74-76], ein Konzept entworfen, in dem nach einer Induktionstherapie bestehend aus einer Chemo- und Strahlentherapie bei pädiatrischen Patienten mit hochmalignen Gliomen eine Erhaltungstherapie angeschlossen wurde, die auf einer Differenzierungsinduktion mit VPA basierte (Therapieoptimierungsstudie der GPOH und GNP „HIT-GBM-C“, Abb. 4). Dabei nahmen wir an, dass die verbliebenen Tumorzellen, die eine kombinierte Chemo- und Strahlentherapie überlebt hatten, mittels VPA zur Differenzierung induziert würden und zudem infolge erhöhter Immunogenität von den Immunzellen des Wirts abgetötet werden [77].

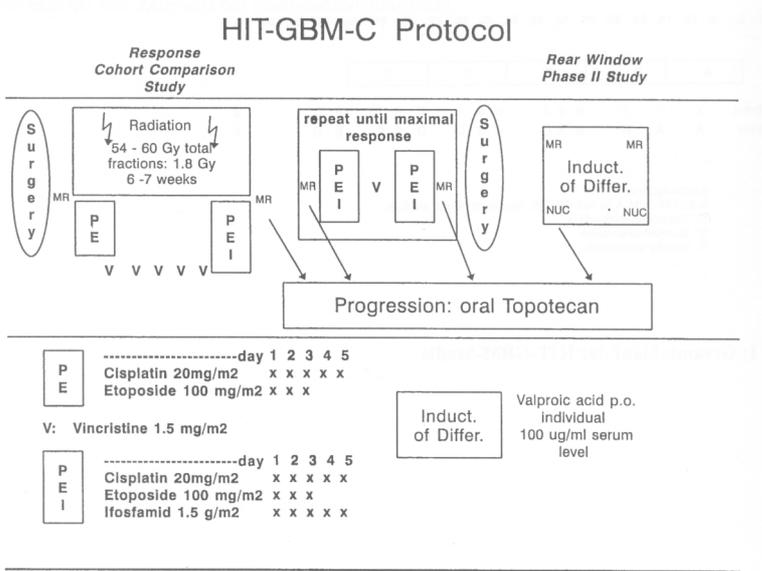


Abb. 4: Schema der Therapieoptimierungsstudie HIT-GBM-C

## **1.6 Wissenschaftliche Fragestellungen dieser Schrift:**

- Moduliert MK die Biologie neuroektodermaler Tumoren im Kindes- und Jugendalter?
- Ist die Chemoresistenz neuroektodermaler Tumoren im Kindes- und Jugendalter mit anderen malignen Eigenschaften verbunden?
- Übt VPA bei pädiatrischen Patienten mit neuroektodermalen Tumoren im Kindes- und Jugendalter antitumorale Wirkung aus?

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1 Zirkulierende Wachstumsfaktoren sind mit der Tumorentwicklung bei Neurofibromatose Typ 1 assoziiert

Mashour GA\*, **Hernáiz Driever P\***, Hartmann M\*, Drissel SD, Zhang T, Scharf B, Ursula Felderhoff-Müser U, Sakuma S, Friedrich RE, Martuza RL, Mautner VF, Kurtz A: Circulating growth factor levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1, Clin Cancer Res, 2004, 5677-83 (**10**), \*Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen

Patienten mit dem häufigsten Tumordispositionssyndrom Neurofibromatose Typ 1 (NF-1) entwickeln infolge ihrer Erkrankung im Laufe ihres Lebens multiple Neurofibrome des peripheren Nervensystems, die von Neurofibromin-defizienten Schwannzellen ausgehen so wie andere Tumoren des ZNS. Aufgrund der variablen Verläufe insbesondere im Kindes- und Jugendalter wird die Diagnose mittels der klassischen Kriterien gemäß NCI (National Cancer Institute) häufig erst spät gestellt. Fehlerhaft erhöhte Wachstumsfaktoren spielen bei der Entstehung der Tumoren eine wesentliche parasowie endokrine Rolle.

Wir wollten mit dieser Arbeit folgende Fragen beantworten:

- Hat das Serum von NF-1 Patienten einen mitogenen Effekt auf Schwannzellen und Endothelzellen in vitro?
- Sind Wachstumsfaktoren wie Midkine (MK), Stammzellfaktor (SCF) und epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) im Serum von NF-1 Patienten erhöht?
- Haben die Konzentrationen von Wachstumsfaktoren im Serum von NF-1 Patienten einen diagnostischen Wert?
- Unterscheiden sich die Serumkonzentrationen von Wachstumsfaktoren von NF-1 Patienten im Laufe des Lebens?
- Besteht eine Korrelation zwischen Serumkonzentrationen von Wachstumsfaktoren bei NF-1 Patienten und deren Tumorlast?

Zu diesem Zweck wurde das Serum von 39 Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 im Alter zwischen 7 und 70 Jahren untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Konzentrationen von MK und SCF in dieser Patientengruppe im Vergleich zu einer bezüglich Alter und Geschlecht gleich verteilten Kohorte der Normalpopulation (n=35) signifikant erhöht waren. Die Konzentrationen des EGF wiesen keine Erhöhung im Vergleich zur Kohorte der Normalbevölkerung auf. Innerhalb der Patientengruppe mit NF-1 stiegen die MK-

Spiegel von einem Durchschnittswert von 0,79 ng/ml bei Patienten unter 18 Jahren auf einen Durchschnittswert von über 1,18 ng/ml bei Patienten über 18 Jahren. Für 96% der NF-1 Patienten in unserer Kohorte waren Konzentrationen oberhalb eines Schwellenwertes für SCF (>440 pg/ml) und MK (>0.9 ng/ml) diagnostisch hinweisend. Das Serum der NF-1 Patienten verstärkte die Proliferation von menschlichen primären Schwannzellen aus Neurofibromen sowie Endothelzellen signifikant stärker als das Serum der Kohorte der Normalbevölkerung. Die Werte für MK im Serum korrelierten nur tendenziell und nicht signifikant mit der Tumorlast der kutanen Neurofibrome der NF-1 Patienten.

Schlussfolgerung: Die erhöhten Wachstumsfaktorkonzentrationen im Serum tragen zu der diffusen Tumorentwicklung der NF-1 Patienten bei und sind ein Ansatz für eine mögliche molekulare Diagnostik der NF-1.

## 2.2 Überexpression von Midkine in malignen peripheren Nervenscheidentumorzellen inhibiert die Apoptose und erhöht die angiogene Potenz

Friedrich C, Holtkamp N, Cinatl Jr J, Sakuma S, Mautner VF, Wellmann S, Michaelis M, Henze G, Kurtz A and **Hernández Driever P**: Overexpression of Midkine in malignant peripheral nerve sheath tumor cells inhibits apoptosis and increases angiogenic potency, *Int J Oncol*, 2005, 1433-30 (27)

Maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) sind aggressiv wachsende Tumoren des peripheren Nervensystems, die spontan und vor allem im Rahmen des Tumordispositionssyndroms NF-1 entstehen. Aufgrund der Kenntnis, dass der Wachstumsfaktor MK bei der Genese von Neurofibromen und plexiformen Neurofibromen, den Vorstufen von MPNST, eine mitogene, anti-apoptotische und angiogene Rolle spielt, haben wir den Einfluss von MK auf MPNST Zellen untersucht. Hierzu wurden MPNST stabil mit einem MK-Vektor transfiziert.

Wir wollten mit dieser Arbeit folgende Fragen beantworten:

- Können MPNST-Zellen stabil mit einem MK-Vektor transfiziert werden?
- Sezernieren transfizierte MPNST-Zellen vermehrt MK?
- Verändert die erhöhte MK-Produktion die Proliferation von MPNST-Zellen?
- Verändert die erhöhte MK-Produktion die Sensitivität von MPNST-Zellen gegenüber Chemotherapeutika?
- Ändert MK das Apoptoseverhalten von MPNST-Zellen?
- Erhöht MK die angiogenetische Potenz von MPNST-Zellen?
- Wachsen nicht tumorigene MPNST-Zellen nach stabiler Transfektion mit MK im Xenotransplantat-Modell an?

Hierzu wurden die MPNST-Zelllinien S462 und ST88-14 stabil mit einem MK-Vektor und einem Kontrollvektor transfiziert. Die Überexpression von MK nach stabiler Transfektion der MPNST-Zelllinie S462 erhöhte die Lebensfähigkeit der Zellen und schützte diese vor Apoptose durch Serumentzug, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen. Zudem wurde durch die Überexpression von MK in S462 Zellen die Vincristin vermittelte Apoptose vermindert. Das konditionierte Medium der MK transfizierten Zellen erwies sich als starkes Mitogen für menschliche HUVEC. Die erhöhte MK-Expression in S462 Zellen war mit einer erhöhten mRNA Konzentration des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) assoziiert. Trotz der stabilen Transfektion von MK und der

beobachteten Erhöhung des malignen Verhaltens in vitro waren weder S462 noch ST88-14 MK-transfizierte MPNST- Zellen in der Lage im Xenotransplantat-Modell anzuwachsen.

Schlussfolgerung: Die antiapoptotische und angiogene Aktivität von MK auf MPNST unterstreicht die Möglichkeit, spezifische MK Inhibitoren als therapeutischen Ansatz in der Behandlung von MPNST-Patienten zu entwickeln.

### **2.3 Das mit Chemoresistenz erworbene erhöhte maligne Verhalten von Neuroblastomzellen ist unabhängig von der P-gp Expression**

Kotchetkov R\*, **Hernáiz Driever P\***, Cinatl J, Michaelis M, Karaskova J, Blaheta R, Squire JA, von Deimling A, Moog J, Cinatl J Jr: Increased malignant behavior in neuroblastoma cells with acquired multi-drug resistance does not depend on P-gp expression, Int J Oncol, 2005,1029-37 (**27**), \*Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen

Die primäre und erworbene Resistenz von neuroektodermalen Tumorzellen wird mit dem zellulären Nachweis des Proteins MRP („multidrug-resistant related protein“) oder P-gp (P170) in Verbindung gebracht. Aktuell ist die Bedeutung beider Resistenzmechanismen bei NB-Zellen weitestgehend nicht erhellt. Wir benutzten ein NB-Modell, das aus NB-Zelllinien besteht, die eine Chemoresistenz gegenüber Vincristin bzw. Doxorubicin in vitro erworben haben und mit den parental chemosensiblen Zellen verglichen werden können.

Wir wollten mit dieser Arbeit folgende Fragen beantworten:

- Sind Vincristin- und Doxorubicin-resistente Neuroblastomzelllinien sensibel gegenüber anderen Chemotherapeutika wie Etoposid und Topotecan?
- Wird das Resistenzverhalten durch Verapamil und einem AKT-Inhibitor SH 5 moduliert?
- Expressieren chemoresistente Neuroblastomzelllinien P-gp, MRP, N-myc und NCAM?
- Wird die Funktion dieser Proteine in chemoresistenten Zellen durch Reserpin und Verapamil modifiziert?
- Ist der Erwerb der Chemoresistenz mit zusätzlichen genomischen Veränderungen assoziiert?
- Ist der Erwerb der Chemoresistenz mit einer p53-Mutation assoziiert?
- Ist die erworbene Chemoresistenz mit einem in vitro und in vivo aggressiverem Verhalten bezüglich Strahlenresistenz, Adhäsion an Endothelzellen, Überleben unter serumfreien Bedingungen und Tumorwachstum im Xenotransplantatmodell assoziiert?

Hierzu züchteten wir zwei NB-Zelllinien, die einerseits gegenüber Vincristin (UKF-NB-3<sup>r</sup>VCR<sup>10</sup>) und andererseits gegenüber Doxorubicin (UKF-NB-3<sup>r</sup>DOX<sup>20</sup>) resistent sind. UKF-NB-3<sup>r</sup>VCR<sup>10</sup> und UKF-NB-3<sup>r</sup>DOX<sup>20</sup> Zellen zeigten parallel eine Überexpression von

funktionalem P-gp, erhaltene Sensitivität gegenüber Topotecan und Etoposid und einen deutlich verstärkt malignen Phänotyp. Dieser zeichnete sich durch eine konstitutive Phosphorylierung von Proteinkinase B (AKT), deutlich erhöhte Strahlenresistenz, und erhöhtes Überleben, d.h. verminderte Apoptose nach Serumentzug aus. Die Inhibition von P-gp der chemoresistenten NB-Zelllinien führte zur Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber Chemotherapie, beeinflusste jedoch nicht das erhöhte Überleben unter Serumentzug und die verstärkte Resistenz gegenüber Strahlentherapie. Auf der anderen Seite führte die Inhibition von AKT zur erneuten Empfindlichkeit der resistenten NB-Zellen gegenüber Serumentzug. Die Chemoresistenz blieb davon unbeeinflusst. Im Rahmen der erworbenen Chemoresistenz der beiden NB-Zelllinien beobachteten wir zusätzliche chromosomale Veränderungen. UKF-NB-3<sup>VCR</sup><sup>10</sup> Zellen wiesen außerdem eine „missense“-Mutation in Exon 5 des P53 Gens, eine erhöhte MYCN Amplifikation, eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen, eine verminderte Expression des neuronalen zellulären Adhäsionsmoleküls (NCAM), eine erhöhte Klonogenität und eine verstärktes Wachstum im Xenotransplantat-Modell auf.

Schlussfolgerung: Erworbene Chemoresistenz von Neuroblastomzellen geht mit einem wesentlich stärker ausgeprägten biologisch malignen Verhalten der Zellen einher. Diese Phänomene sind unabhängig von der Expression des Chemoresistenzproteins P-gp.

## 2.4 Erhöhte fetale Hämoglobinsynthese weist auf eine Differenzierungsinduktion bei Kindern während Valproinsäurebehandlung hin

Kieslich M, Schwabe D, Cinatl J Jr, **Hernáiz Driever P**:

Increase of fetal hemoglobin synthesis indicating differentiation induction in children receiving valproic acid, *Ped Hem Oncol*, 2003,15-22 **(20)**

In in vitro Versuchen hatten wir nachgewiesen, dass VPA eine Differenzierungsinduktion und Wachstumshemmung von neuroektodermalen Tumorzellen, wie Neuroblastom- und Glioblastomzellen, bei Konzentrationen auslöst, die auch bei der antiepileptischen Therapie von Epilepsiepatienten mit VPA regelhaft erreicht werden. Ausgehend von der Kenntnis, dass andere verwandte kurzkettige Fettsäuren die Hämoglobin F – Konzentration bei Hämoglobinopathien induzieren sind wir der Frage nachgegangen, ob VPA-Konzentrationen, die bei Epilepsiepatienten infolge antiepileptischer Therapie erreicht werden, nachweisbare Veränderungen bei Patienten ohne Hämoglobinopathie im Sinne einer Differenzierungsinduktion von erythroiden Progenitorzellen auslöst. Als Kontrollen untersuchten wir alters- und geschlechtsgepaarte Kinder- und Jugendliche vor Beginn einer antiepileptischen Therapie.

Wir wollten mit dieser Arbeit folgende Fragen beantworten:

- Erhöht VPA in antiepileptisch wirksamen Konzentrationen im Blut die Hämoglobin F – Konzentration?
- Ist die Erhöhung der Hämoglobin F - Konzentration im Serum abhängig von der Konzentration an VPA im Serum?
- Hat die VPA-Medikation einen Einfluss auf andere Parameter der Erythropoese: Retikulozytenzahl und Hämoglobinkonzentration?

Das fetale Hämoglobin war signifikant bei 30 pädiatrischen Epilepsie-Patienten, die mit einer VPA Monotherapie mindestens 3 Monate behandelt wurden, im Vergleich zu einer bezüglich Alter und Geschlecht gleich verteilten unbehandelten Patientengruppe deutlich erhöht. Dabei korrelierten die fetalen Hämoglobinkonzentrationen mit den Talspiegeln der VPA im Serum. Andere Parameter wie Gesamthämoglobin und Retikulozytenzahl blieben von der VPA-Behandlung unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu stieg das mittlere zelluläre Volumen der Erythrozyten (MCV) signifikant an, während die Thrombozytenzahlen sanken.

Schlussfolgerung: Wir wiesen einen dosisabhängigen stimulierenden Effekt auf die fetale

Hämoglobinsynthese bei VPA behandelten pädiatrischen Epilepsiepatienten nach. Somit ist wahrscheinlich, dass VPA bei Konzentrationen, die bei Epilepsiepatienten erreicht werden, differenzierungsinduzierende therapeutische Effekte auch bei pädiatrischen Patienten mit soliden Tumoren erreicht werden können. Die breite klinische Erfahrung und die gute Verträglichkeit von VPA ermutigt zur Prüfung der antitumoralen Wirksamkeit von VPA im Sinne einer Differenzierungsinduktion in der pädiatrischen Onkologie.

## **2.5 Valproinsäure induziert die Differenzierung eines supratentoriellen primitiv neuroektodermalen Tumors**

**Hernáiz Driever P**, Wagner S, Hofstädter F, Wolff JEA: Valproic acid induces differentiation of a supratentorial primitive neuroectodermal tumor, *Ped Hem Oncol*, 2004, 743-751 (21)

In präklinischen Modellen führte VPA in antiepileptisch wirksamen Dosen zur Differenzierungsinduktion von neoplastischen Zellen. Diese führte zur Entwicklung eines antitumoralen Behandlungskonzeptes, das auf der Annahme basiert, dass Tumorzellen unreifen Progenitorzellen entsprechen, die die Fähigkeit zur terminalen Differenzierung besitzen. In diesem Fallbericht stellen wir einen Jungen vor, der an einem supratentoriell primitiv neuroektodermalen Tumor litt und über 7 Monate mit VPA antiepileptisch behandelt wurde bevor ein Rezidiv des Tumors auftrat. Der Rezidivtumor wies im Gegensatz zum initialen Tumor eine ausgeprägte gliale Differenzierung und einen niedrigen Proliferationsindex auf. Es handelt sich hierbei um den ersten Bericht eines Rezidivs eines supratentoriellen primitiv neuroektodermalen Tumors im Kindes- und Jugendalter, der eindeutige Zeichen einer Differenzierungsinduktion aufweist.

## **2.6 Gute Verträglichkeit von Valproinsäure bei erheblich vorbehandelten pädiatrischen Patienten mit hochmalignen Gliomen**

Wolff JE, Kramm C, Kortmann RD, Pietsch T, Rutkowski S, Jorch N, Gnekow A, **Hernáiz Driever P**: Valproic acid was well tolerated in heavily pretreated pediatric patients with high-grade glioma, J Neurooncol, 2008, 309-14 **(90)**

Infolge der präklinischen Erkenntnisse zur antitumoralen Wirksamkeit von VPA, den Hinweisen auf die differenzierungsinduzierende Eigenschaften von VPA auf erythroide Progenitorzellen in der Behandlung von Epilepsiepatienten, den Erfahrungen von Einzelfällen, und der ausgeprägten klinischen Erfahrung zur Verträglichkeit wurde VPA als antitumorale Substanz in der Behandlung von Patienten mit malignen Gliomen im Kindes- und Jugendalter als remissionserhaltende Therapie nach postoperativer adjuvanter Chemo- und Strahlentherapie oder im Rezidiv eingesetzt.

Wir wollten mit dieser Arbeit folgende Fragen beantworten:

- Hat die Behandlung mit VPA bei pädiatrischen Patienten mit einem malignen Gliom, die bereits Chemo- und Strahlentherapie erhalten haben, eine toxische Wirkung?
- Können bei der Behandlung mit VPA Spiegel erreicht werden, die eine antitumorale Wirksamkeit ermöglichen?
- Führt die Behandlung der Patienten mit VPA zu einem Ansprechen der Tumoren auf die Therapie?
- Hat die Behandlung von pädiatrischen malignen Gliompatienten mit VPA einen günstigen Einfluss auf das Überleben?

Im Rahmen des HIT-GBM-C Protokolls für pädiatrischen Patienten mit malignen Gliomen, d.h. als Erhaltungstherapie, oder infolge eines Rezidivs wurden 44 ausgeprägt chemotherapeutisch vorbehandelte pädiatrische Patienten mit hochgradigen Gliomen oder diffus intrinsischen pontinen Gliomen mit VPA behandelt. Die Dosis wurde individuell angepasst. Der Erkrankungsstatus zu Beginn der Behandlung war folgender: komplette Remission 12, stabile Resterkrankung 10, progressive Erkrankung 22. Die durchschnittlichen Talspiegel für VPA betragen 99 mg/l. Die häufigste unerwünschte Wirkung war Somnolenz. Eine schwere Toxizität wurde nicht beobachtet. Einer der Rezidivpatienten sprach auf die Therapie mit VPA an. Eine frühe Progression der Erkrankung wurde bei 3 Patienten in der Ersttherapie und bei 6 Patienten in der Rezidivbehandlung beobachtet. Das mediane Gesamtüberleben für alle Patienten betrug

1,33 Jahre. Während Patienten in der Erstbehandlung eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 44% erreichten, war im Rezidivfall nur eine 5-Jahres-Gesamtüberlebenschance von 0,14 zu beobachten.

Schlussfolgerung: Die Anwendung von VPA in dieser pädiatrischen Patientengruppe war sicher. Die moderate antitumorale Wirksamkeit erlaubt die weitere klinische Prüfung der Substanz innerhalb einer Kombination mit anderen antitumoralen Agenzien.

### 3. Diskussion

#### **Einfluss von MK auf neuroektodermale Tumoren**

Tumoren exprimieren eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, die im Serum der Patienten nachgewiesen werden können [78]. Neben dem Vorteil der serumbasierten Tumordiagnostik und Klassifikation, fördern diese Wachstumsfaktoren systemisch das Tumorstadium, insbesondere von Metastasen, und stellen somit therapeutische Zielstrukturen dar. In einer Untersuchung wurden mittels Serumbehandlung mit Pentosan-Polysulfat zirkulierende Heparin-bindende Proteine komplexiert und in der Folge aus dem Serum depletiert. Dieses depletierte Serum stimulierte signifikant geringer das Tumorzellwachstum *in vitro*, welches die para- und endokrine Bedeutung der Wachstumsfaktoren unterstreicht [79]. Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen ebenso nahe, dass durch die relativ unspezifische Depletion wahrscheinlich auch andere durch die Tumoren sowie von anderen Geweben sezernierte Faktoren mit eliminiert worden sind, die möglicherweise auch antitumorale Eigenschaften haben [80]. Deshalb wollten wir die Zusammensetzung des Serums von NF-1 Patienten untersuchen, um später eine spezifischere Hemmung und/oder Elimination von zentralen Wachstumsfaktoren für das Tumorstadium in der antitumoralen Behandlung zu ermöglichen.

MK kann als heparin-bindender Wachstumsfaktor in der Epidermis und Tumorzellen von NF-1 Patienten nachgewiesen werden [81,82]. Damit stellt MK einen idealen Kandidaten für die Diagnostik der NF-1 und ein potentielles Therapieziel dar. Im Weiteren wird SCF in NF-1 Schwanzzellen exprimiert und sezerniert [83]. In unserer Untersuchung konnten wir beide Faktoren in signifikant erhöhten Konzentrationen im Serum von NF-1 Patienten nachweisen. Dabei fiel auf, dass die erhöhten MK-Werte fast ausschließlich bei Patienten im Erwachsenenalter nicht jedoch bei Kindern und Jugendlichen nachweisbar waren, deren Werte im Vergleich zur gesunden altersgleichen Normalbevölkerung identisch verteilt waren. Dabei stellt sich die Frage, ob sich der Unterschied der MK-Serumkonzentrationen allein durch die hormonellen Veränderungen im Rahmen der Pubertät erklären lässt [81,82]. Der Anstieg der MK-Werte findet um den Beginn des disseminierten Wachstums der kutanen Neurofibrome statt, die fast parallel mit der Pubertät einhergeht. Möglicherweise spielen somit die hormonellen Änderungen im Rahmen der Pubertät eine onkogene Rolle. In unserer Studie korrelierte Tumormasse, soweit mittels der klinischen Untersuchung (Zählen der Neurofibrome in definierten Hautarealen ohne Beurteilung von Tumorstadium und Tumormasse) erfassbar, nicht mit erhöhten MK-Werten. In Zukunft sind möglicherweise bildgebende Verfahren wie Ganzkörper-MRT in der Lage, die definitive Tumormasse im Sinne von Zahl der Läsionen

und Tumolvolumen quantitativ zu erfassen. Durch das bessere Erfassen der Tumorlast wäre es möglich, die Konzentrationen an Wachstumsfaktoren im Serum präziser mit der Tumorlast und zudem auch im Verlauf der Zeit zu vergleichen.

In unserer Untersuchung konnten wir zeigen, dass MK und SCF das Wachstum von Schwannzellen aus NF-1 assoziierten Neurofibromen und von Endothelzellen stimuliert. Somit stützen unsere Daten Beobachtungen, dass MK und SCF zum systemischen Tumorwachstum bei NF-1 Patienten im Sinne eines auto- und parakrinen Mechanismus beitragen, da beide Faktoren MPNST-assoziierte Zellen und MK auch Endothelzellen in ihrem Wachstum stimulieren [35,81,84]. Überraschenderweise reichte bereits die Verdoppelung der Wachstumsfaktoren im Serum der NF-1 Patienten aus, um sowohl die Zellproliferation von Endothel- als auch von Schwannzellen *in vitro* zu stimulieren, die mit dem Serum der Patienten behandelt wurden. Eine Erklärung dafür wäre die Beobachtung, dass bereits minimale Änderungen der Expression von Onkogenen das Tumorwachstum beeinflussen können. Damit könnten bereits geringe Änderungen an Serumfaktoren zum bekannten periodischen Wachsen multipler Tumorerläsionen bei NF-1 Patienten beitragen [85,86]. Andererseits müssen wir postulieren, dass wahrscheinlich auch andere nicht in unserer Untersuchung nachgewiesene Faktoren eine stimulierende Wirkung auf Schwannzellen und Endothelzellen hatten.

Damit haben wir mehrere Hinweise, dass das Wachstum der Tumoren bei NF-1 durch die Serumkomponenten stimuliert wird. Die Anzahl der Tumoren wird wiederum am ehesten durch andere genetische und epigenetische Faktoren determiniert, die zum Teil für die phänotypische Vielfalt auf interindividueller Ebene zwischen NF-1 Patienten und innerhalb von NF-1 Familien verantwortlich sind [87,88]. Es erscheint unwahrscheinlich, dass ein Wachstumsfaktor alleine das Wachstum von Neurofibromzellen unter physiologischen stimuliert. Wahrscheinlich handelt es sich am ehesten um eine Matrix zirkulierender Serumfaktoren, die zusätzlich zu den von uns bestimmten Faktoren MK und SCF das systemische Wachstum der Tumoren stimuliert. Es bieten sich hierfür mehrere Faktoren an: Fetales Antigen 1, Nervenwachstumsfaktor und Progesteron. Fetales Antigen 1 und NGF wurden in erhöhter Konzentration im Serum von NF-1 Patienten nachgewiesen [89-91]. Dabei war die Erhöhung des fetalen Antigen 1 mit Auffälligkeiten des Gehirns und des Rückenmarks bei NF-1 Kindern assoziiert [90]. Im Weiteren konnte eine Stimulation von NF-1 assoziierten Tumorzellen durch Progesteron erreicht werden [92]. Die Assoziation von hohen MK-Spiegeln im Serum und dem Nachweis eines Glioms der Sehbahn bei drei pädiatrischen Patienten in unserer Untersuchung sowie der Nachweis von MK in Gliomen [93], lässt vermuten, dass bei unseren Patienten ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Tumorwachstum und den erhöhten MK-Serumkonzentrationen vorliegt. Dabei stellt sich die Frage, ob es sich um eine Erhöhung

infolge der Tumoren oder um eine Erhöhung handelt, die die Tumorbildung gefördert hat. Hierzu müssten größere pädiatrische NF-1 Patientenpopulationen bezüglich der MK-Werte untersucht werden, die an einem pilozytischen Astrozytom leiden und somit mit anderen NF-1 Kindern ohne Hirntumor verglichen werden könnten.

Es wäre vorstellbar, dass Konzentrationsänderungen von MK, SCF und anderen noch zu identifizierenden Wachstumsfaktoren dem Wachstum oder Stillstand der Tumorlast von NF-1 Patienten vorausgehen. Ebenso ist zu prüfen, ob diese Wachstumsfaktoren mögliche Surrogatmarker für künftige innovative Therapien darstellen.

Ganz im Gegensatz zu unseren Erwartungen war die Überexpression von MK in den stabil transfizierten S462 MPNST Zellen nicht in der Lage die Proliferation zu steigern. Andererseits entspricht es publizierten Daten, dass exogenes MK das Wachstum von ST88-14 MPNST-Zellen und aortalen Endothelzellen und CC139 Hamster Fibroblasten nicht erhöht [81,94,95]. Andere Zelltypen wiederum ließen sich in ihrer Proliferationsrate durch MK empfindlich stimulieren: G401 Nephroblastomzellen und 10T1/2 Fibroblasten [30,96]. Somit erscheint in der Zusammenschau das mitogene Potential von MK selektiv zu sein. Retinolsäure behandelte embryonale Karzinomzellen 1009 waren bis zum Zeitpunkt der Differenzierung in ihrer Proliferation durch MK stimulierbar [30]. Eine Erklärung für die mangelnde Stimulation der Proliferation unserer Zelllinie wäre, dass die ohnehin hohe Expression der Ursprungszellen keinen Effekt der Steigerung erlaubt. Die mitogene Bedeutung von MK für MPNST wird dadurch unterstützt, dass in einer anderen Untersuchung ST88-14 Zellen nach Behandlung mit antisense-Oligonukleotiden für MK in ihrer Proliferationsrate erheblich eingeschränkt waren [81].

Ein wichtiger Befund unserer Untersuchung war die Steigerung der antiapoptotischen Signale. Hierzu haben wir die MK-transfizierten S462 MPNST-Zellen unterschiedlichen Apoptose induzierenden Stimuli ausgesetzt. Dazu zählen Serumentzug sowie Behandlung mit wichtigen chemotherapeutischen Substanzen wie Vinca-Alkaloiden und Platinderivaten. Die MK transfizierten S462 Zellen wiesen eine verminderte Apoptose, d.h. ein stärkeres Überleben nach Serumentzug wie auch nach Vincristinbehandlung auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden von PC12 Phäochromozytomzellen, die durch MK-Gabe nach Serumentzug deutlich zahlreicher überlebten [97]. Im Weiteren förderte MK in anderen Studien das Überleben von murinen Neuronen nach Serumentzug und inhibierte zudem die Aktivierung von Caspase-3 [98]. Parallel zu unseren Versuchen konnte in den S462 Zellen eine LOH des einen *TP53*-Allel nachgewiesen werden [99]. Das verbliebene Allel weist in unserer Untersuchung eine *TP53*-Mutation auf, welches zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt. Trotz der Mutation mit Funktionsverlust der proapoptotischen Wirkung von P53 haben in unserer Studie ein Viertel der nicht MK-

transfizierten Kontrollzellen nach Serumentzug überlebt. Im Gegensatz zu der Beobachtung, dass MK die S462 MPNST Zellen gegenüber Vincristinbehandlung Wirkung schützte, war MK nicht in der Lage S462 Zellen vor der Cisplatin induzierten Apoptose zu feien. Die stärkere Resistenz der Zellen gegenüber Vincristin in unseren Untersuchungen ist möglicherweise mit dem MK-vermittelten Anstieg der VEGF Expression assoziiert, da beide Vincristin resistente Subklone auch hohe VEGF mRNS Konzentrationen aufwiesen. Dies ist eine mögliche Erklärung, da VEGF eine bcl-2 vermittelte Hemmung der Apoptose in Leukämiezellen induzierte [100].

Die angiogene Potenz von MK ist noch nicht endgültig geklärt. Auf der einen Seite existieren Hinweise, dass rekombinantes menschliches MK auf HUVEC keinen mitogenen Einfluss hatte [95,101], umgekehrt induzierte partiell auf gereinigtes MK aus dem Überstand humaner Tumorzellen eindeutig die Proliferation von HUVEC [24,35,82]. Unsere Untersuchungen stützen die Hinweise auf angiogene Effekte von MK auf HUVEC, da der Zellüberstand der MK-transfizierten Zellen nach Serumentzug HUVEC in ihrer Proliferation eindeutig stimulierte. Dies ist möglicherweise durch die verstärkte Expression von VEGF zu erklären. Der Nachweis vermehrter VEGF mRNS steht im Einklang mit der Beobachtung anderer Studien, dass auch andere Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF und FGF-2 die Expression von VEGF in Gliom- und anderen Tumorzellen erhöhte [102].

Wir erwarteten, dass die MK-transfizierten S462 MPNST Zellen im Xenotransplantatmodell in der bestrahlten Nacktmaus als Tumoren anwachsen würden, da MK-Transfektion von NIH3T3 Zellen wie auch SW13 Adenokarzinomzellen ein Tumorstadium in diesem Modell ermöglichte [24,31]. Zudem war auch die Tumorigenität von MCF-7 Mammakarzinomzellen und UM-MC-3 Blasenkarzinomzellen durch erhöhtes MK mit einem verbesserten Tumorstadium und verstärkter Angiogenese im Xenotransplantat-Modell assoziiert [35,103]. Leider war dies für keinen Klon der von uns transfizierten MPNST-Zellen der Fall. Somit müssen in MPNST-Zellen Faktoren aktiv sein, die trotz MK-Transfektion das Anwachsen in diesem Modell verhindern.

In der Summe sind wir der Ansicht, dass unsere Ergebnisse, die Aussage unterstützen, dass MK und seine Signalwege potentielle Ziele für eine spezifische antitumorale Therapie von neuroektodermalen Tumoren darstellen.

### **Chemotherapieresistenz neuroektodermaler Tumorzellen**

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der Erwerb von P-gp assoziierter Resistenz gegenüber Doxorubicin und Vincristin in NB-Zellen mit einer breiten Zunahme an malignen Eigenschaften, vor allem einem stark vermehrten Tumorstadium im Xenotransplantat-Modell einhergeht. Somit widersprechen unsere Daten, den

Ergebnissen anderer Studien, dass chemoresistente NB-Zellen eine verminderte Tumorigenität aufweisen [104]. Zudem konnten wir die Ergebnisse der Untersuchungen zur Chemoresistenz gegenüber Doxorubicin und Vincristin anderer NB-Zelllinie, die ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe generiert wurden, bestätigen [54]. Der Vorteil unseres Modells ist, dass im Gegensatz zu selektiv P-gp transfizierten NB-Zellen, unsere chemoresistenten NB-Zellen, ähnlich der klinischen Situation, durch Kultivieren mit aufsteigenden Konzentrationen selektiert wurden, bis stabile chemoresistente NB-Subklone entstanden. Die unbeeinträchtigte Sensibilität der resistenten NB-Zellen in unserer Studie gegenüber den Substanzen Topotecan und Etoposid entspricht den klinischen Erfahrungen, dass im NB-Rezidiv die Tumorzellen auf Topotecan-haltige Regime ansprechen [48]. Die induzierte Kreuzresistenz der chemoresistenten NB-Zellen gegenüber Bestrahlung hat hohe klinische Relevanz für die zeitliche Abfolge der multimodalen Therapie, da die Bestrahlungsbehandlung einen wichtigen Teil in der NB-Behandlung von Hochrisikopatienten darstellt [105].

Interessanterweise wurden in unseren Untersuchungen die anderen malignen Eigenschaften der resistenten NB-Zellen nicht durch die Inhibition des verstärkt exprimierten P-gp beeinflusst. Dies wäre eine mögliche Erklärung, dass die Gabe von Verapamil, die zur Hemmung der Chemoresistenz in Behandlungsstudien der pädiatrischen Onkologie angewendet wurde, nicht die erwarteten therapeutischen Erfolge im Sinne eines Ansprechens auf die Therapie noch auf die Wahrscheinlichkeit des Überlebens erzielte [106]. Somit erscheint P-gp lediglich einen Einfluss auf die Chemoresistenz auszuüben und der vergesellschaftete erweiterte maligne Phänotyp durch andere Faktoren unabhängig von P-gp reguliert zu sein.

Im Weiteren war die Chemoresistenz der NB-Zellen in unserer Studie mit einer Zunahme an chromosomalen und genetischen Veränderungen der NB-Zellen im Sinne einer MYCN-Amplifikation, P53 missense Mutation und einem mit weiteren Aberrationen behafteten Karyotyp assoziiert. Dies würde der klinischen Situation entsprechen, dass eine verstärkte MYCN-Amplifikation, der Verlust an Wildtyp P53 und die Zunahme der chromosomalen Veränderungen mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert ist [107-111]. Eine Zunahme an chromosomalen Veränderungen entspricht einer Zunahme an genomischer Instabilität. Diese wiederum erlaubt neue genetische Bedingungen im Sinne eines Gewinns an Onkogenen und/oder Verlusten von Tumorsuppressoren, die neue selektive Vorteile der NB-Zellen vermittelt können. Dabei stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um einen genuinen Erwerb von Eigenschaften und dafür verantwortlichen genetischen Veränderungen handelt oder ob unserer Beobachtung eine Selektion zugrunde liegt.

Aus der Kenntnis unserer Ergebnisse im in vitro und in vivo Modell zu Chemoresistenz von NB-Zellen, die auf die Assoziation von starker maligner Biologie der NB-Zellen und einer Chemoresistenz hinweisen, würden Patienten mit NB mit malignem Phänotyp, d.h. im Sinne einer Disseminierung hochwahrscheinlich bereits bei Diagnosestellung eine primäre Chemoresistenz ihrer NB-Zellen aufweisen. Infolgedessen wäre das Konzept, die Patienten mit HDCT und aSCR zu behandeln, nicht ausreichend. Möglicherweise würden die Patienten bezüglich ihrer Überlebenswahrscheinlichkeit profitieren, wenn sie zusätzlich zum bisherigen Konzept mit Medikamenten behandelt würden, die gezielt die anderen malignen Merkmale wie Metastasierung, Angiogenese und Invasion angreifen. Dieses könnten kleine Moleküle sein, die spezifisch in die Signalwege eingreifen, die für Klonogenität, Angiogenese und antiapoptotisches Verhalten verantwortlich sind.

### **Antitumorale Wirkung von VPA auf neuroektodermale Tumoren**

Durch die in den ersten beiden Teilen diskutierten Ergebnisse, wird unserer Meinung klar, dass neuroektodermale Tumorzellen über multiple Mechanismen verfügen, die einerseits den Zellen beim Überwinden der intra- und extrazellulären homöostatischen Kontrollmechanismen helfen und andererseits sie auch gegenüber der konventionellen Chemotherapie resistent machen. Somit haben wir uns mit der Suche nach Substanzen beschäftigt, die einerseits eine antitumorale Wirkung ausüben und andererseits eine deutlich höhere therapeutische Breite als die herkömmlichen chemotherapeutischen Medikamente aufweisen. Nachdem wir in Voruntersuchungen zeigen konnten, dass die antiepileptisch wirksame Substanz VPA antitumorale Wirksamkeit auf verschiedene neuroektodermale Tumorzellen im Sinne einer Proliferationshemmung, Differenzierungsinduktion und Erhöhung der Immunogenität ausübte, haben wir bei pädiatrischen Patienten, die mit VPA im Rahmen einer Epilepsie behandelt wurden, nachgewiesen, dass VPA in antikonvulsiv wirksamen Dosen die Induktion der  $\gamma$ -Globulin-Expression erythroider Progenitorzellen bewirkt. In der Folge konnten wir vorhergehende Berichte bestätigen, dass VPA zu einer Erhöhung an HbF im Blut der behandelten Patienten führt [112]. In einer klinischen Untersuchung zeigte sich, dass VPA bei Sichelzellanämiepatienten eine signifikante Erhöhung der HbF-Spiegel im Blut verursachte. In der gleichen Studie waren jedoch die Unterschiede der HbF-Spiegel im Blut bei VPA behandelten Epilepsiepatienten im Vergleich zu Carbamazepin-behandelten Epilepsiepatienten nicht signifikant [113]. Diese HbF-Konzentrationserhöhungen sind wahrscheinlich nicht wie bei Behandlung mit Poetinen beobachtet, auf eine erhöhte Kinetik der erythroiden Differenzierung von Progenitorzellen zurückzuführen, sondern am ehesten auf eine direkt veränderte Aktivität der fetalen Hämoglobingene zurück zu führen.

Dieses Postulat wird durch eine Untersuchung gestützt, in der Erythroblasten mit kurzkettigen Fettsäuren unterschiedlicher Länge (2 bis 9 Kohlenstoffatome) behandelt wurden. Dabei zeigte sich durch die Behandlung mit den Fettsäuren eindeutig erhöhte  $\gamma$ -Globulin mRNA Konzentrationen pro Erythroblast, wobei die kürzeren Fettsäuren stärker stimulierten als die längeren Fettsäuren [114].

Neben den präklinischen Beobachtungen der antitumoralen Aktivität von VPA unserer und anderer Gruppen haben wir einzelne Fälle untersuchen können, die auf die antitumorale Wirkung von VPA bei neuroektodermalen Tumoren bei pädiatrischen Patienten hinweisen. In einem Patienten konnten wir nachweisen, dass das Wachstum eines progredienten malignen Glioms durch VPA-Behandlung nicht nur gehemmt werden konnte, sondern auch das Tumolvolumen abnahm. Hierzu wurde der Patient mit VPA in Dosierungen behandelt, die zu Spiegelkonzentrationen der VPA führte, die bis zu 3 mal höher lagen als antiepileptisch wirksame Konzentrationen. Als unerwünschte Wirkung trat eine erhebliche Müdigkeit auf. Diese beeinträchtigte den Patienten und so setzte er die VPA Medikation ab. In der Folge kam es zum erneuten Rezidiv des Tumors [76]. In einem weiteren pädiatrischen Patienten mit einem supratentoriellen PNET beobachteten wir nach postoperativer multimodaler Therapie und Behandlung über 9 Monate mit VPA als Antikonvulsivum im Rezidiv einen ausgeprägt glial differenzierten Tumor. Dabei konnten wir aufgrund der Morphologie eine reaktive Astroglieose neuropathologisch ausschließen. Der Rezidivtumor wurde entfernt und der Patient sich seit mehr als 6 Jahren in kompletter Remission [74]. Die Beobachtung, dass der Patient so lange Zeit nach dem frühen Rezidiv eines supratentoriellen PNET bei Behandlung mit Temozolomid (12 Zyklen) und gleichzeitiger Fortführung der antikonvulsiven Therapie mit VPA sich weiterhin in Remission befindet, spricht dafür, dass VPA bei der antitumoralen Behandlung synergistisch im Sinne der Differenzierungsinduktion des Primärtumors gewirkt hat.

Die gute Verträglichkeit von VPA bei pädiatrischen Patienten, die präklinischen Daten und die Einzelfallbeobachtungen, ermöglichten uns, eine klinische Studie zur Wirksamkeit von VPA bei pädiatrischen Patienten mit malignen Gliomen zu initiieren [77]. Diese Therapieoptimierungsstudie HIT-GBM-C war eine Studie, die unter der Leitung der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und der Gesellschaft für Neuropädiatrie geführt wurde. Dabei wurden 44 pädiatrische Patienten mit malignen Gliomen und diffus intrinsischen Pongliomen in der Erstbehandlung nach einer postoperativen multimodalen Chemo- und Strahlentherapie als Erhaltungstherapie oder im Rezidiv/Progression mit VPA behandelt. Ähnlich wie in anderen Phase I Studien zu VPA bei erwachsenen Patienten mit Malignomen konnten wir eine gute Verträglichkeit von VPA bei

vorbehandelten Patienten beobachten [115]. Dabei gelang es uns, Patienten mit VPA Dosen zu behandeln, die zu Wirkspiegeln im Bereich um 100 µg/ml führten. Dies entspricht dem oberen Grenzbereich der antikonvulsiven Therapie mit VPA. In anderen Untersuchungen zur antitumoralen Behandlung mit VPA bei Erwachsenen waren neurotoxische Wirkungen in der Regel dosislimitierend [115]. Hierzu ist anzumerken, dass in dieser klinischen Studie bei Erwachsenen alle Patienten VPA intravenös erhalten hatten. Die VPA-Behandlung fand über 5 Tage alle 28 Tage in einer Dosierung von 60 mg/kg/Tag statt [115]. Im Gegensatz dazu nahmen unsere Patienten, die VPA im Rahmen des HIT-GBM-C Protokolls als Erstbehandlung erhielten, die Medikation oral in einer Dosis bis zu 50 mg/kg/Tag als abendliche Einzeldosis ein. Bei keinem unserer Patienten beobachteten wir trotz der intensiven Vorbehandlung kritische toxische unerwünschte Wirkungen. Unseren aktuellen Daten nach erreichten die 22 Patienten der Erstbehandlung bei lediglich 3 frühen Rezidivtumoren eine 5-Jahres-Überlebensrate von 40%. Dies ist ein Ergebnis, welches deutlich höher liegt als erwartet [116]. Im Weiteren wurden sogar bei Patienten, die VPA in der Rezidivbehandlung erhielten, 3 Langzeitüberlebende mit 4,5, 4,95 und 5 Jahren beobachtet. Ein wesentlicher Anteil der Patienten in der Erstbehandlung (7/14) wurde mittels VPA mit einer stabilen Erkrankung gehalten. Somit weisen diese Ergebnisse auf einen klinischen antitumoralen Effekt von VPA bei pädiatrischen Patienten mit malignem Gliom neben Einzelberichten hin. VPA und andere Histondeacetylase-Hemmer werden daher in Zukunft in Kombinationstherapien auf ihre antitumorale Wirksamkeit weiter geprüft werden, da präklinische Daten einen antitumoralen Synergismus von VPA mit Chemo- und Strahlentherapie aufweisen.

#### 4. Zusammenfassung

Wir untersuchten die Biologie von neuroektodermalen Tumoren im Kindes- und Jugendalter bezüglich des Einflusses des Wachstumsfaktors MK, der P-gp und MRP vermittelten Resistenzmechanismen und dem damit assoziierten malignen Phänotyp sowie der antitumoralen Wirkung von VPA.

Wir wiesen signifikant erhöhte Serumkonzentrationen des Heparin-bindenden Wachstumsfaktors MK und des SCFs bei NF-1 Patienten nach. In der untersuchten Kohorte erwies sich die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren ab einem Schwellenwert für 96% der NF-1 Patienten als diagnostisch. Das Serum der NF-1 Patienten förderte das Wachstum von humanen Schwannzellen und Endothelzellen in vitro im Sinne einer tumorfördernden Matrix. Serumsignaturen der Wachstumsfaktoren ermöglichen somit auch eine molekulare Diagnostik der NF-1. Im Weiteren konnten wir nachweisen, dass stabil mit MK transfizierte MPNST-Zellen in ihrer Fähigkeit, auf apoptotische Stimuli zu reagieren, deutlich eingeschränkt waren und eine Chemoresistenz gegenüber Vincristin erwarben. Die ebenso erworbene verstärkte angiogene Potenz ermöglichte jedoch nicht das Anwachsen im Xenotransplantat-Modell. Das Kultivieren von NB-Zellen unter zunehmenden Konzentrationen von Vincristin und Doxorubicin führte zur Resistenz der NB-Zellen gegenüber diesen Substanzen. Diese Chemoresistenz war mit einer erhöhten Expression von P-gp verbunden. Damit traten auch zusätzliche chromosomale Veränderungen, eine inaktivierende p53 Mutation und ein deutlich stärker ausgeprägtes malignes Verhalten im Sinne von Klonogenität und erhöhter Adhäsion an Endothelzellen in vitro und verstärktem Tumorwachstum in vivo auf. Die spezifische Inhibition von P-gp stellte lediglich die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie wieder her. Die anderen Merkmale blieben weitestgehend unbeeinflusst. Antiepileptische Wirkspiegel von VPA bei pädiatrischen Epilepsiepatienten führten zur Differenzierungsinduktion von erythroiden Progenitorzellen, mit der Folge signifikant erhöhter Hämoglobin F-Spiegel. In einem Fall beobachteten wir, dass ein pädiatrischer Patient mit einem supratentoriellen primitiv neuroektodermalen Tumor, der 7 Monate mit VPA als Antiepileptikum zusätzlich zur Chemo- und Strahlentherapie behandelt wurde, einen Rezidivtumor entwickelte, der deutliche Anzeichen einer glialen Differenzierung und eine deutlich niedrigere Proliferationsrate zeigte. Gemäß dem von uns mit entworfenen Behandlungsprotokoll „HIT-GBM-C“ wurden 44 pädiatrische Patienten, die an hochgradigen Gliomen oder diffus intrinsischen Ponsgliomen litten, mit VPA in der Primärtherapie im Sinne einer Erhaltungstherapie oder im Rezidiv palliativ behandelt. Die Patienten vertrugen VPA gut und ein Patient mit einem Rezidiv sprach auf die Therapie an. Die Gesamtüberlebensrate der VPA behandelten Patienten war insgesamt höher als erwartet. Somit sollte die antitumorale und differenzierungsinduzierende Wirkung von

VPA in der Behandlung von Hirntumoren im Kindes- und Jugendalter im Sinne einer Kombinationstherapie von VPA und anderen antitumoralen Substanzen weiter untersucht werden.

## 5. Literatur des freien Textes

1. Zhu Y, Parada LF. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):616-626.
2. Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. Lyon: IARC Press; 2000.
3. Kaatsch P, Rickert CH, Kuhl J, et al. Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children. *Cancer* 2001;92(12):3155-3164.
4. Humpl T. Neuroblastome. In: Gutjahr P, editor. *Krebs bei Kindern und Jugendlichen*. 5. Auflage ed. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2004. p 440-460.
5. Sposto R, Ertel IJ, Jenkin RD, et al. The effectiveness of chemotherapy for treatment of high grade astrocytoma in children: results of a randomized trial. A report from the Childrens Cancer Study Group. *J Neurooncol* 1989;7(2):165-177.
6. Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005;5(3):198-206.
7. Wolff JE, Gnekow AK, Kortmann RD, et al. Preradiation chemotherapy for pediatric patients with high-grade glioma. *Cancer* 2002;94(1):264-271.
8. Albright AL, Wisoff JH, Zeltzer P, et al. Prognostic factors in children with supratentorial (nonpineal) primitive neuroectodermal tumors. A neurosurgical perspective from the Children's Cancer Group. *Pediatr Neurosurg* 1995;22(1):1-7.
9. Timmermann B, Kortmann RD, Kuhl J, et al. Role of radiotherapy in the treatment of supratentorial primitive neuroectodermal tumors in childhood: results of the prospective German brain tumor trials HIT 88/89 and 91. *J Clin Oncol* 2002;20(3):842-849.
10. Cohen BH, Zeltzer PM, Boyett JM, et al. Prognostic factors and treatment results for supratentorial primitive neuroectodermal tumors in children using radiation and chemotherapy: a Childrens Cancer Group randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13(7):1687-1696.
11. Reddy AT, Janss AJ, Phillips PC, et al. Outcome for children with supratentorial primitive neuroectodermal tumors treated with surgery, radiation, and chemotherapy. *Cancer* 2000;88(9):2189-2193.
12. Korf BR. Malignancy in neurofibromatosis type 1. *Oncologist* 2000;5(6):477-485.
13. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
14. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87(2):159-170.
15. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-28.
16. Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151(3):1312-1318.
17. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, et al. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 1996;56(11):2515-2518.
18. Adachi Y, Matsubara S, Pedraza C, et al. Midkine as a novel target gene for the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene* 1996;13(10):2197-2203.
19. Matsubara S, Take M, Pedraza C, et al. Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity. *J Biochem (Tokyo)* 1994;115(6):1088-1096.
20. Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem* 2002;132(3):359-371.
21. Muramatsu H, Shirahama H, Yonezawa S, et al. Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev Biol* 1993;159(2):392-402.

22. Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, et al. Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem (Tokyo)* 1997;121(2):197-205.
23. Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, et al. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem* 1999;274(18):12474-12479.
24. Stoica GE, Kuo A, Powers C, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 2002;277(39):35990-35998.
25. Shibata Y, Muramatsu T, Hirai M, et al. Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol* 2002;22(19):6788-6796.
26. Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* 2004;204(2):127-143.
27. Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem (Tokyo)* 2002;132(3):359-371.
28. Michikawa M, Xu RY, Muramatsu H, et al. Midkine is a mediator of retinoic acid induced neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192(3):1312-1318.
29. Unoki K, Ohba N, Arimura H, et al. Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by midkine, a retinoic acid-responsive gene product. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(12):4063-4068.
30. Nurcombe V, Fraser N, Herlaar E, et al. MK: a pluripotential embryonic stem-cell-derived neuroregulatory factor. *Development* 1992;116(4):1175-1183.
31. Kadomatsu K, Hagihara M, Akhter S, et al. Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer* 1997;75(3):354-359.
32. Kojima S, Inui T, Muramatsu H, et al. Midkine is a heat and acid stable polypeptide capable of enhancing plasminogen activator activity and neurite outgrowth extension. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216(2):574-581.
33. Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, et al. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;105(4):489-495.
34. Takada T, Toriyama K, Muramatsu H, et al. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem* 1997;122(2):453-458.
35. Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, et al. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* 1997;57(9):1814-1819.
36. Aridome K, Tsutsui J, Takao S, et al. Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res* 1995;86(7):655-661.
37. Kato M, Shinozawa T, Kato S, et al. Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(6):848-852.
38. Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 1993;53(6):1281-1285.
39. Garver RI, Jr., Radford DM, Donis-Keller H, et al. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer* 1994;74(5):1584-1590.
40. Garver RI, Jr., Chan CS, Milner PG. Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9(5):463-466.
41. Kato S, Ishihara K, Shinozawa T, et al. Monoclonal antibody to human midkine reveals increased midkine expression in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(5):430-441.

42. Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, et al. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1995;55(8):1792-1797.
43. Bates SE, Longo DL. Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Semin Oncol* 1987;14(2):102-138.
44. Muramatsu H, Song XJ, Koide N, et al. Enzyme-linked immunoassay for midkine, and its application to evaluation of midkine levels in developing mouse brain and sera from patients with hepatocellular carcinomas. *J Biochem (Tokyo)* 1996;119(6):1171-1175.
45. Ikematsu S, Yano A, Aridome K, et al. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer* 2000;83(6):701-706.
46. Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, et al. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94(7):628-632.
47. Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, et al. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer* 2003;88(10):1522-1526.
48. Garaventa A, Luksch R, Biasotti S, et al. A phase II study of topotecan with vincristine and doxorubicin in children with recurrent/refractory neuroblastoma. *Cancer* 2003;98(11):2488-2494.
49. Rubie H, Plantaz D, Coze C, et al. Localised and unresectable neuroblastoma in infants: excellent outcome with primary chemotherapy. *Neuroblastoma Study Group, Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique. Med Pediatr Oncol* 2001;36(1):247-250.
50. Keshelava N, Seeger RC, Groshen S, et al. Drug resistance patterns of human neuroblastoma cell lines derived from patients at different phases of therapy. *Cancer Res* 1998;58(23):5396-5405.
51. Bader P, Schilling F, Schlaud M, et al. Expression analysis of multidrug resistance associated genes in neuroblastomas. *Oncol Rep* 1999;6(5):1143-1146.
52. Search Pubmed. ABCB1 ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 [ Homo sapiens ].  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&log\\$=seqview\\_gene&list\\_uids=5243](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&log$=seqview_gene&list_uids=5243)
53. Search Pubmed. ABCC2 ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 [ Homo sapiens ].  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Link&LinkName=gene PubMed&from\\_uid=1244](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Link&LinkName=gene PubMed&from_uid=1244)
54. Kotchetkov R, Cinatl J, Blaheta R, et al. Development of resistance to vincristine and doxorubicin in neuroblastoma alters malignant properties and induces additional karyotype changes: a preclinical model. *Int J Cancer* 2003;104(1):36-43.
55. Kotchetkov R, Driever PH, Cinatl J, et al. Increased malignant behavior in neuroblastoma cells with acquired multi-drug resistance does not depend on P-gp expression. *Int J Oncol* 2005;27(4):1029-1037.
56. Engelhard HH, Duncan HA, Dal Canto M. Molecular characterization of glioblastoma cell differentiation. *Neurosurgery* 1997;41(4):886-896; discussion 896-887.
57. Linskey ME. Developmental glial biology: the key to understanding glial tumors. *Clin Neurosurg* 2000;47:46-71.
58. Linskey ME, Gilbert MR. Glial differentiation: a review with implications for new directions in neuro-oncology. *Neurosurgery* 1995;36(1):1-21; discussion 21-22.
59. Samid D, Hudgins WR, Shack S, et al. Phenylacetate and phenylbutyrate as novel, nontoxic differentiation inducers. *Adv Exp Med Biol* 1997:501-505.
60. Samid D, Shack S, Sherman LT. Phenylacetate: a novel nontoxic inducer of tumor cell differentiation. *Cancer Res* 1992;52(7):1988-1992.

61. Löscher W. Valproinsäure: Pharmakodynamische Wirkungen und biochemische Wirkungsmechanismen. In: Krämer G, Laub, M., editor. Valproinsäure. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1992. p 3-23.
62. Ehlers K, Sturje H, Merker HJ, et al. Spina bifida aperta induced by valproic acid and by all-trans-retinoic acid in the mouse: distinct differences in morphology and periods of sensitivity. *Teratology* 1992;46(2):117-130.
63. Ehlers K, Sturje H, Merker HJ, et al. Valproic acid-induced spina bifida: a mouse model. *Teratology* 1992;45(2):145-154.
64. Isojarvi JI, Laatikainen TJ, Pakarinen AJ, et al. Polycystic ovaries and hyperandrogenism in women taking valproate for epilepsy. *N Engl J Med* 1993;329(19):1383-1388.
65. Rogiers V, Akrawi M, Vercruyssen A, et al. Effects of the anticonvulsant, valproate, on the expression of components of the cytochrome-P-450-mediated monooxygenase system and glutathione S-transferases. *Eur J Biochem* 1995;231(2):337-343.
66. Regan CM. Therapeutic levels of sodium valproate inhibit mitotic indices in cells of neural origin. *Brain Res* 1985;347(2):394-398.
67. Cinatl J, Jr., Cinatl J, Driever PH, et al. Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 1997;8(10):958-963.
68. Cinatl J, Jr., Cinatl J, Scholz M, et al. Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 1996;7(7):766-773.
69. Blaheta RA, Cinatl J, Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* 2002;22(5):492-511.
70. Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, et al. Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* 2005;25(4):383-397.
71. Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, et al. Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem* 2002;9(15):1417-1433.
72. Witt O, Lindemann R. HDAC inhibitors: Magic bullets, dirty drugs or just another targeted therapy. *Cancer Lett* 2009.
73. Kieslich M, Schwabe D, Cinatl J, Jr., et al. Increase of fetal hemoglobin synthesis indicating differentiation induction in children receiving valproic acid. *Pediatr Hematol Oncol* 2003;20(1):15-22.
74. Driever PH, Wagner S, Hofstadter F, et al. Valproic acid induces differentiation of a supratentorial primitive neuroectodermal tumor. *Pediatr Hematol Oncol* 2004;21(8):743-751.
75. Wagner S, Csatory CM, Gosztonyi G, et al. Combined treatment of pediatric high-grade glioma with the oncolytic viral strain MTH-68/H and oral valproic acid. *Apmis* 2006;114(10):731-743.
76. Witt O, Schweigerer L, Driever PH, et al. Valproic acid treatment of glioblastoma multiforme in a child. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43(2):181.
77. Driever PH, Knupfer MM, Cinatl J, et al. Valproic acid for the treatment of pediatric malignant glioma. *Klin Padiatr* 1999;211(4):323-328.
78. Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(6):3410-3415.
79. Parker BW, Swain SM, Zugmaier G, et al. Detectable inhibition of heparin-binding growth factor activity in sera from patients treated with pentosan polysulfate. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(13):1068-1073.
80. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1(1):27-31.
81. Mashour GA, Ratner N, Khan GA, et al. The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene* 2001;20(1):97-105.

82. Mashour GA, Wang HL, Cabal-Manzano R, et al. Aberrant cutaneous expression of the angiogenic factor midkine is associated with neurofibromatosis type-1. *J Invest Dermatol* 1999;113(3):398-402.
83. Badache A, Muja N, De Vries GH. Expression of Kit in neurofibromin-deficient human Schwann cells: role in Schwann cell hyperplasia associated with type 1 neurofibromatosis. *Oncogene* 1998;17(6):795-800.
84. Demitsu T, Kiyosawa T, Kakurai M, et al. Local injection of recombinant human stem cell factor promotes human skin mast cell survival and neurofibroma cell proliferation in the transplanted neurofibroma in nude mice. *Arch Dermatol Res* 1999;291(6):318-324.
85. Kurtz A, Martuza RL. Antiangiogenesis in neurofibromatosis 1. *J Child Neurol* 2002;17(8):578-584; discussion 602-574, 646-551.
86. Yan H, Dobbie Z, Gruber SB, et al. Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis. *Nat Genet* 2002;30(1):25-26.
87. Easton DF, Ponder MA, Huson SM, et al. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet* 1993;53(2):305-313.
88. Szudek J, Joe H, Friedman JM. Analysis of intrafamilial phenotypic variation in neurofibromatosis 1 (NF1). *Genet Epidemiol* 2002;23(2):150-164.
89. Fabricant RN, Todaro GJ. Increased serum levels of nerve growth factor in von Recklinghausen's disease. *Arch Neurol* 1981;38(7):401-405.
90. Jensen CH, Schroder HD, Teisner B, et al. Fetal antigen 1, a member of the epidermal growth factor superfamily, in neurofibromas and serum from patients with neurofibromatosis type 1. *Br J Dermatol* 1999;140(6):1054-1059.
91. Riopelle RJ, Riccardi VM, Faulkner S, et al. Serum neuronal growth factor levels in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Ann Neurol* 1984;16(1):54-59.
92. McLaughlin ME, Jacks T. Progesterone receptor expression in neurofibromas. *Cancer Res* 2003;63(4):752-755.
93. Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, et al. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett* 1997;233(1):29-32.
94. Kretschmer PJ, Fairhurst JL, Decker MM, et al. Cloning, characterization and developmental regulation of two members of a novel human gene family of neurite outgrowth-promoting proteins. *Growth Factors* 1991;5(2):99-114.
95. Raulais D, Lagente-Chevallier O, Guettet C, et al. A new heparin binding protein regulated by retinoic acid from chick embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174(2):708-715.
96. Qi M, Ikematsu S, Ichihara-Tanaka K, et al. Midkine rescues Wilms' tumor cells from cisplatin-induced apoptosis: regulation of Bcl-2 expression by Midkine. *J Biochem* 2000;127(2):269-277.
97. Owada K, Sanjyo N, Kobayashi T, et al. Midkine inhibits apoptosis via extracellular signal regulated kinase (ERK) activation in PC12 cells. *J Med Dent Sci* 1999;46(1):45-51.
98. Owada K, Sanjo N, Kobayashi T, et al. Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J Neurochem* 1999;73(5):2084-2092.
99. Frahm S, Mautner VF, Brems H, et al. Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients. *Neurobiol Dis* 2004;16(1):85-91.
100. Wang L, Chen L, Benincosa J, et al. VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli. *Leukemia* 2005;19(3):344-353.
101. Sumi Y, Muramatsu H, Takei Y, et al. Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its

- action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 13):2659-2667.
102. Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 1995;82(5):864-873.
  103. Muramaki M, Miyake H, Hara I, et al. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9(14):5152-5160.
  104. Biedler JL, Spengler BA. Reverse transformation of multidrug-resistant cells. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13(2):191-207.
  105. Bradfield SM, Douglas JG, Hawkins DS, et al. Fractionated low-dose radiotherapy after myeloablative stem cell transplantation for local control in patients with high-risk neuroblastoma. *Cancer* 2004;100(6):1268-1275.
  106. Cowie FJ, Pinkerton CR, Phillips M, et al. Continuous-infusion verapamil with etoposide in relapsed or resistant paediatric cancers. *Br J Cancer* 1995;71(4):877-881.
  107. Kuittinen T, Eggert A, Lindholm P, et al. A novel human processed gene, DAD-R, maps to 12p12 and is expressed in several organs. *FEBS Lett* 2000;473(2):233-236.
  108. Ladenstein R, Ambros IM, Potschger U, et al. Prognostic significance of DNA ditetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36(1):83-92.
  109. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396(6712):643-649.
  110. Takita J, Hayashi Y, Takei K, et al. Allelic imbalance on chromosome 18 in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2000;36(4):508-513.
  111. Vandesompele J, Speleman F, Van Roy N, et al. Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? *Med Pediatr Oncol* 2001;36(1):5-10.
  112. Collins AF, Dover GJ, Luban NL. Increased fetal hemoglobin production in patients receiving valproic acid for epilepsy [letter]. *Blood* 1994;84(5):1690-1691.
  113. Selby R, Nisbet-Brown E, Basran RK, et al. Valproic acid and augmentation of fetal hemoglobin in individuals with and without sickle cell disease [letter]. *Blood* 1997;90(2):891-893.
  114. Liakopoulou E, Blau CA, Li Q, et al. Stimulation of fetal hemoglobin production by short fatty acids. *Blood* 1995;86:3227-3235.
  115. Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, et al. Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. *Br J Cancer* 2007;97(2):177-182.
  116. Wolff JE, Classen CF, Wagner S, et al. Subpopulations of malignant gliomas in pediatric patients: analysis of the HIT-GBM database. *J Neurooncol* 2008;87(2):155-164.

## Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die meine berufliche „Biologie“ beeinflusst haben:

- unseren Patienten und Ihren Eltern für Ihr Vorbild an Hoffnung und Kraft
- Dr. Matthias Bollinger und Dr. Andreas Fiedler für die gemeinsame Zeit in der pädiatrischen Neurologie sowie eine besondere und tiefe Freundschaft
- Dr. Tobias Reindl und allen bisherigen und aktuellen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, für die Herausforderung gemeinsam zu arbeiten, Lösungen zu finden, nicht aufzugeben und auch zu feiern
- Viola Diesselhorst und Luellin Bienert sowie dem psychosozialen Team der Klinik für Pädiatrie mS Onkologie/Hämatologie für die Zusammenarbeit, die Wertschätzung und die Möglichkeit neue Perspektiven im Leben zu erkennen
- Prof. Dr. Gert Jacobi, für die Einführung in die pädiatrische Neurologie und klinische Neurophysiologie, für das Vorbild als Arzt und für die Freundschaft als Kollege und Sportler
- Dr. Sam Rabkin und Dr. Andreas Kurtz für die wissenschaftliche Kreativität, für Ihre kritisch-konstruktiven Stimuli, Mut sowie die langjährige Freundschaft
- Prof. Dr. Jindrich Cinatl und Dr. Jaroslav Cinatl für die wissenschaftliche Ausbildung, die langjährige Freundschaft und das Vorbild an wissenschaftlicher Leidenschaft
- Frau Dr. Ursula Schulte-Overberg, Dr. Rüdiger Fengler, PD Dr. Dr. Karl Seeger und Dr. Arend von Stackelberg, für die Unterstützung dieses Projekts und Kollegialität
- Prof. Dr. Dusan Drahovsky, für die wissenschaftliche Ausbildung sowie für die Einführung in die Methylierung der DNS und in ihrer Rolle bei der Differenzierung unreifer Zellen sowie für das Vorbild an wissenschaftlicher Hingabe
- Prof. Dr. Thomas Boehm, für das Erwecken des Interesses an der Kinderheilkunde und für die kontinuierliche Unterstützung nach dem Tode von Prof. Drahovsky
- Prof. Dr. Bernhard Kornhuber, für die Möglichkeit der Weiterbildung in Kinder- und Jugendmedizin, für die Einführung in die Pädiatrische Onkologie und Hämatologie und für das Vorbild als Arzt
- Dr. Robert Martuza (Higgins Professor of Neurosurgery) für die Möglichkeit mit replikationskompetenten Herpesviren sowie einem patched-knockout Mausmodell zu arbeiten und für das Erkennen der Vereinbarkeit von Klinik und Forschung
- Prof. Dr. Dr. Günter Henze, für die Möglichkeit eine Arbeitsgruppe Pädiatrische Neuroonkologie aufzubauen, für die Unterstützung dieses Projekts, für das Vorbild als Arzt und für das Erkennen der Vereinbarkeit von Klinik und Musik

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift