

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren bei der Retinsäureresistenz in Neuroblastomzellen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Nina Sophie Pommert**

aus Hamburg

Kiel 2024

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Vicki Wätzig

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Gesa Cohrs

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.05.2025

gez. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Vicki Wätzig  
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	iv
1 Einleitung .....	1
1.1 Das Neuroblastom .....	1
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie .....	1
1.1.2 Klinik und Diagnostik.....	1
1.1.3 Stadieneinteilung.....	2
1.1.4 Therapie und Prognose.....	5
1.2 Wachstumsfaktoren und ihre Signaltransduktion .....	7
1.2.1 Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) .....	7
1.2.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF) .....	10
1.2.3 Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF).....	10
1.3 Das Neuroblastom im Zellmodell.....	11
1.3.1 Kelly-Zellen.....	11
1.3.2 SH-SY5Y-Zellen .....	12
1.4 Retinsäure .....	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Material und Methodik.....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Technische Ausstattung.....	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.4 Kits .....	17
2.1.5 Antikörper.....	18
2.1.6 TaqMan-Assays .....	19
2.2 Zellkultur .....	20
2.2.1 Zellkultivierung .....	20
2.2.2 Zellpassage.....	20
2.2.3 Stimulation in Kulturschalen.....	22
2.2.4 Stimulation in 96-Well-Platten .....	22
2.2.5 Fotodokumentation .....	23
2.3 Untersuchung von Zellproliferation und Zellsterben.....	23
2.3.1 CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay.....	23

2.3.2 BrdU-Proliferationsassay .....	23
2.3.3 CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätsassay .....	24
2.3.4 Caspase3/7-Assay .....	25
2.4 Untersuchung der Proteinexpression und –aktivität .....	25
2.4.1 Herstellung von Zelllysaten.....	25
2.4.2 Proteinbestimmung .....	27
2.4.3 Probenverdünnung .....	28
2.4.4 Western Blot .....	29
2.5 Untersuchung der Genexpression mittels TaqMan-Assay .....	34
2.5.1 Herstellung von Zellpellets .....	34
2.5.2 RNA-Extraktion .....	34
2.5.3 RNA-Quantifizierung .....	34
2.5.4 Reverse Transkription .....	35
2.5.5 TaqMan-Assay.....	35
2.6 Untersuchun der Proteinfreisetzung mittels ELISA.....	36
2.7 Statistische Analyse .....	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Charakterisierung der naiven Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Vollmedium .....	39
3.1.1 Verhalten der naiven Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen.....	39
3.1.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren .....	41
3.1.3 Inhibitorexperimente.....	43
3.2 Charakterisierung der naiven Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Medium ohne Serum.....	51
3.2.1 Verhalten naiver Zellen unter Serumentzug.....	52
3.2.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren .....	54
3.2.3 Inhibitorexperimente.....	57
3.3 Charakterisierung der Retinsäure-behandelten Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Vollmedium .....	61
3.3.1 Verhalten der Retinsäure-behandelten Zellen .....	61
3.3.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren .....	66
3.3.3 Inhibitorexperimente.....	67
3.4 Charakterisierung von Retinsäure-behandelten Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Medium ohne Serum.....	81
3.4.1 Verhalten der Retinsäure-behandelten Zellen unter Serumentzug .....	81



3.4.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren .....	87
3.4.3 Inhibitorexperimente.....	92
4 Diskussion .....	98
4.1 Relevanz von EGF, IGF und HGF für Wachstum und Überleben von Neuroblastomzellen.....	98
4.1.1 EGF .....	99
4.1.2 IGF .....	100
4.1.3 HGF .....	102
4.1.4 Weitere Wachstumsfaktoren.....	104
4.1.5 Zusammenfassung: Wachstumsfaktoren.....	104
4.2 Therapeutische Möglichkeiten durch Wachstumsfaktorrezeptorinhibitoren .....	105
4.2.1 Erlotinib .....	105
4.2.2 Linsitinib.....	107
4.2.3 Tepotinib.....	108
4.2.4 BMS-754807 .....	109
4.2.5 Crizotinib.....	110
4.2.6 Zusammenfassung: Inhibitoren .....	111
4.3 Wirkung von Retinsäure auf die Regulation von Wachstumsfaktoren und zusätzlich zur Wachstumsfaktorrezeptorinhibition .....	112
4.3.1 Kelly-Zellen.....	112
4.3.2 SH-SY5Y-Zellen .....	115
4.3.3 Zusammenfassung: Retinsäure.....	118
5 Zusammenfassung .....	119
6 Literaturverzeichnis .....	121
A Anhang.....	140
A.1 Tabellenverzeichnis .....	140
A.2 Abbildungsverzeichnis .....	141
Veröffentlichungen.....	144
Danksagung .....	145

## Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Bidestilliertes Wasser
AAF	Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluciferin
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AurA/B	Aurorakinase A/B
Bad	Bcl-2-associated death promotor
BMS1	BMS-754807 1 $\mu$ M
BrdU	5- Bromo-2-desoxyuridin
CEB	Cytoplasmic Extraction Buffer
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl]-ammonio -1-propansulfonat
c-Met	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
c-Myc	Transkriptionsfaktor
Crizo1	Crizotinib 1 $\mu$ M
CST	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Cycl. D1	Cyclin D1
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLB	Direct lysis buffer
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	EGF
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermal Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ErbB	Erythroblastic leukemia viral oncogene homologue

ERK1/2	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1 und 2
Erlo10	Erlotinib 10 µM
ERRFI1	ERbB receptor feedback inhibitor 1
FCS	Fetales Kälberserum
Foxo3A	Forkhead-Box-Protein O3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
Grb-2	Growth factor receptor binding protein
GTP	Guanosintriphosphat
H	HGF
HCL	Salzsäure
HER1	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HRP	Horseradish Peroxidase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
I	IGF
IDRF	Image Defined Risk Factors
IGF	Insulin-like Growth Factor (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IGF1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Isoform 1
IGF2	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Isoform 2
IGFR	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IP3	Inosit-1,4,5-triphosphat
IRA	Insulin-Rezeptor A
JAK	Janus-Kinase
JNK	Jun amino-terminale Kinase
JNKK	JNK-Kinase
K	Kontrolle
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	Dikaliumhydrogenphosphit
Linsi1	Linsitinib 1 µM

LK	Lymphknoten
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEB	Membrane Extraction Buffer
MEK	MAP/ERK-Kinase
MIBG	Metaiodbenzylguanin
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
MYC	Transkriptionsfaktor
MYCN	Transkriptionsfaktor
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	Dinatriumhydrogenphosphit
NaOH	Natriumhydroxid
NET	Norepinephrin-Transporter
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGF	Nerv Growth Factor (Nervenwachstumsfaktor)
N-Myc	Transkriptionsfaktor
p	phosphoryliert
p21	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1
PAK	p21/CDC42/Rac1-Aktivierte Kinase
PBS	Phosphate buffered saline
pc-Myc	Transkriptionsfaktor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor (Thrombozytenwachstumsfaktor)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PLCγ	Phospholipase Cγ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RA	Retinsäure
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RET	Rezeptortyrosinkinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Reverse Transkriptase

S	Serum
S-100	Tumormarker
SC	Santa Cruz, Heidelberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	Son of Sevenless
SP1	Specific protein 1
SP3	Specific protein 3
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription proteins
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-box Binding Protein
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
Tepo5	Tepotinib 5 µM
TF	Transkriptionsfaktoren
TM	Trademark
tPA	tissue plasminogen activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA/B	Tropomyosinkinase A/B
TTBS	Tween-Tris-buffered saline
UNG	Uracil-N-Glykosylat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer Endothelwachstumsfaktor)
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VM	Vollmedium
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta
∅	Medium ohne Serum, Durchmesser

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Neuroblastom

### 1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor des peripheren sympathischen Nervengewebes und wurde erstmals im Jahr 1865 durch Rudolf Virchow beschrieben (Virchow 1865). Nach Tumoren des Zentralnervensystems stellen Neuroblastome die häufigsten soliden malignen Tumoren des Kindesalters dar mit einem Häufigkeitsgipfel im zweiten Lebensjahr (Papaioannou und McHugh 2005). Knapp 15 Prozent der Krebstodesfälle im Kindesalter sind auf Neuroblastome zurückzuführen (Maris et al. 2007). Ausgehend von Zellen der embryonalen Neuralleiste findet sich der Primärtumor in über 60 Prozent der Erkrankungsfälle im abdominellen Bereich, vor allem im Nebennierenmark (35 %) und den paravertebralen Ganglien (30 %), sowie im Mediastinum (20 %) (Papaioannou und McHugh 2005; Vo et al. 2014). Die Hälfte der Patienten weist bei Erstdiagnose bereits eine Fernmetastasierung auf (DuBois et al. 1999; Morgenstern et al. 2016).

Die Ätiologie des Neuroblastoms ist größtenteils unklar. Erkrankungsfälle treten sporadisch auf, weniger als ein Prozent sind familiär bedingt. Zu den erblichen Faktoren gehören Keimbahnmutationen in der *anaplastischen Lymphomkinase* (ALK), die das Tumorwachstum beschleunigen können (Janoueix-Lerosey et al. 2008). Bei 20 Prozent der Patienten findet sich zudem eine Amplifikation des Onkogens MYCN, die mit einem fortgeschrittenen Stadium sowie einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Swift et al. 2018). Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Veränderungen in den intrazellulären Signalwegen des Wachstums und Überlebens beschrieben, durch die das heterogene klinische Bild des Neuroblastoms entsteht.

### 1.1.2 Klinik und Diagnostik

Die klinische Präsentation des Neuroblastoms ist sehr variabel, abhängig von der Lokalisation des Primärtumors sowie einer vorhandenen Metastasierung (Matthay et al. 2016). Gerade bei lokalisierter Erkrankung wird das Neuroblastom häufig inzidentell im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen oder Infekten entdeckt. Die wachsende Tumormasse kann regionalen Beschwerden hervorrufen, beispielsweise Bauchschmerzen und Inappetenz bei abdomineller oder Husten und Dyspnoe bei mediastinaler Lokalisation. Wächst ein paravertebral gelegener Tumor in den Spinalkanal ein, kann es zu neurologischen Defiziten bis hin zu einer Querschnittssymptomatik kommen. Charakteristisch für Neuroblastome ist auch das Auftreten von Lidexchymosen bei einem Befall der Periorbita (Maris et al. 2007; Trahair et al. 2017). Selten kommt es bei neuroendokrin

aktiven Tumoren zu paraneoplastischen Syndromen wie Hypertension durch Katecholamin-Freisetzung oder Diarrhö durch Sekretion des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP) (Maris et al. 2007; Hero und Schleiermacher 2013). Bei metastasierter Erkrankung zeigen die Patienten häufig unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Gedeihstörungen und Gewichtsabnahme. Metastasen finden sich vor allem im Knochenmark, gefolgt von Knochen, nicht-regionalen Lymphknoten und der Leber (DuBois et al. 1999).

In der Diagnostik des Neuroblastoms spielen laborchemische, bildgebende und histologische Parameter eine Rolle. Durch ihre Abstammung von adrenergem Gewebe exprimieren Neuroblastomzellen häufig Enzyme des Katecholaminstoffwechsels. Daher findet sich bei circa 75 Prozent der Patienten eine Erhöhung der Katecholaminabbauprodukte Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure in Blut und Urin (LaBrosse et al. 1980; Swift et al. 2018). Zudem lässt sich häufig eine Erhöhung der Neuronen-spezifischen Enolase im Serum feststellen. Eine bildgebende Ausbreitungsdiagnostik mittels Sonographie, MRT, Röntgen und CT ist indiziert und kann durch die mIBG-Szintigraphie ergänzt werden, bei der Metaiodbenzylguanin spezifisch in adrenerges Gewebe aufgenommen wird. Eine Knochenmarkspunktion vervollständigt die Ausbreitungsdiagnostik (Swift et al. 2018). Die definitive Diagnose eines Neuroblastoms wird histologisch anhand einer Tumorbioptie gestellt (Brodeur et al. 1993). Neuroblastome gehören zur Gruppe der klein-rund-blauzelligen Tumoren und exprimieren immunhistochemische Marker wie die Neuronen-spezifische Enolase, S-100 oder Chromogranin (Rajwanshi et al. 2009). Auch die prognostisch relevante Amplifikation des Onkogens MYCN kann histopathologisch mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung festgestellt werden (Swift et al. 2018). Ist eine Biopsie des Primärtumors nicht möglich, so kann die Diagnose bei metastasierter Erkrankung auch zytologisch anhand einer Knochenmarkspunktion bei gleichzeitiger Erhöhung der Katecholaminabbauprodukte in Blut oder Urin gestellt werden (Cohn et al. 2009).

### 1.1.3 Stadieneinteilung

Passend zur vielfältigen Ätiologie und Klinik können Neuroblastomerkkrankungen unterschiedlichste Verlaufsformen annehmen. Das Spektrum reicht von Spontanremission und Ausdifferenzierung zu benignen Tumorformen bis hin zu aggressiv metastasierenden Erkrankungsfällen mit hoher Letalität. Für eine adäquate Therapie ist daher eine genaue Klassifizierung notwendig.

Im *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) wird das Neuroblastom postoperativ in die lokalisierten Stadien 1 bis 3 sowie das metastasierte Stadium 4 eingeteilt. Beurteilt werden chirurgische Resektabilität, lokoregionärer Lymphknotenbefall und Metastasierung (Brodeur et al. 1988; Brodeur et al. 1993) (vgl. Tab. 1). Einen Sonderfall bildet das Stadium 4S des metastasierten Neuroblastoms im Säuglingsalter. Trotz Metastasen in Haut, Leber und Knochen kommt es hier häufig zur Spontanremission, ohne dass eine Therapie erforderlich ist (D'Angio et al. 1971; Raitio et

al. 2021). Limitationen des *INSS* sind die Abhängigkeit von der operativen Therapie und damit auch die fehlende Berücksichtigung der spontan regressiven Tumoren (Cohn et al. 2009). Die *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) entwickelte daher ein weiteres Klassifikationssystem, um den Tumor bereits vor jeglicher Form von Therapie zu beurteilen. Das *INRG Staging System* (INRGSS) berücksichtigt 20 radiologische Risikokriterien, sogenannte *Image Defined Risk Factors* (IDRF), beispielsweise das Einwachsen des Tumors in große Gefäße, anhand derer Operabilität und Prognose eingeschätzt werden (Cohn et al. 2009; Brisse et al. 2011) (vgl. Tab. 1). Weiterentwicklungen der INRG wie das *INRG Classification System* berücksichtigen neben dem Tumorstadium zusätzliche Risikofaktoren wie Alter, Histologie, Differenzierungsgrad, MYCN-Amplifikation, Aberrationen der Chromosomen 11q oder 1p sowie Ploidie der Tumorzellen. Anhand dieser Parameter werden die Patienten prätherapeutisch einer Risikogruppe zugeordnet, die über die folgende Therapie entscheidet (Cohn et al. 2009; Pinto et al. 2015) (vgl. Tab. 2).



International Neuroblastoma Staging System (INSS)		International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)	
1	lokalisierter Tumor nach kompletter Resektion, ipsy-/kontralaterale, nicht-adhärente LK mikroskopisch tumorfrei	L1	lokalisierter Tumor ohne Nachweis von IDRF und begrenzt auf eine Körperhöhle
2A	lokalisierter Tumor nach inkompletter Resektion, LK mikroskopisch tumorfrei		
2B	lokalisierter Tumor nach kompletter/inkompletter Resektion, ipsylateraler LK-Befall kontralaterale LK mikroskopisch tumorfrei		
3	irresektabler Tumor mit Überschreitung der Mittellinie <u>oder</u> lokalisierter Tumor mit kontralateralem LK-Befall <u>oder</u> Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung oder LK-Befall	L2	lokalisierter Tumor mit Nachweis von einem oder mehreren IDRF
4	Fernmetastasierung (außer 4S)	M	Fernmetastasierung (außer MS)
4S	Metastasierung in Leber, Haut, Knochenmark bei Säuglingen < 1 Jahr bei Diagnosestellung	MS	Metastasierung in Haut, Leber und/oder Knochenmark bei Kindern < 18 Monate

**Tabelle 1:** Stadieneinteilung nach INSS und INRG

LK: Lymphknoten, Mittellinie: kontralaterale Begrenzung der Wirbelsäule, IDRF: Image Defined Risk Factors (radiologische Risikokriterien).

### 1.1.4 Therapie und Prognose

Basierend auf der Stadieneinteilung nach INSS und INRG wurden in Deutschland drei Risikogruppen des Neuroblastoms definiert (Tab. 2) und ihre jeweiligen Therapiestrategien nach aktuellem Behandlungsstandard in einer S1-Leitlinie festgelegt (GPOH 2019). Da fast alle Patienten zudem in klinische Studien eingeschlossen werden, können neue Therapiekonzepte evaluiert werden (GPOH 2019).

Risikogruppe	Einschlusskriterien
Niedriges Risiko	INSS 1 INSS 2 ohne Aberrationen des Chromosoms 1p INSS 3 im Alter unter zwei Jahren INRG MS (jeweils ohne MYCN-Amplifikation)
Mittleres Risiko	INSS 2 mit Deletionen oder Imbalancen im Chromosom 1p INSS 3 ohne 1p-Aberrationen im Alter über zwei Jahren INRG M im Alter unter 18 Monaten (jeweils ohne MYCN-Amplifikation)
Hohes Risiko	INRG M im Alter über 18 Monaten alle Stadien bei vorliegender MYCN-Amplifikation

**Tabelle 2:** Risikogruppen und Einschlusskriterien

INSS: International Neuroblastoma Staging System, INRG: International Neuroblastoma Risk Group.

In der Therapie der Niedrigrisikogruppe ist eine alleinige operative Tumorentfernung mit engmaschiger Nachsorge ausreichend. Aufgrund der hohen Spontanremissionsrate ist dabei keine mikroskopische in-sano-Resektion erforderlich. Eine Chemotherapie kommt im Niedrigrisikobereich nur bei Irresektabilität oder schwerer Symptomatik wie spinaler Kompression zum Einsatz und wird bereits bei einem Progressionsstopp beendet. Bestrahlung wird im Niedrigrisikobereich nicht angewandt. Eine Sonderstellung nimmt das INRG-Stadium MS ein, bei dem im Normalfall ohne weitere Interventionen die Spontanregression abgewartet wird. In Einzelfällen sind symptomlindernde Eingriffe im Stadium MS erforderlich, beispielsweise eine temporäre Bauchwandhernienanlage zur intraabdominellen Druckreduktion bei extremer Hepatomegalie (Simon et al. 2017; GPOH 2019).

Das Therapiekonzept der mittleren Risikogruppe besteht aus einer möglichst vollständigen operativen Tumoresektion, begleitet durch eine perioperative Kombinationschemotherapie. Verwendet werden Mitosehemmstoffe wie Vincristin, Alkylantien wie Carboplatin und Topoisomerasehemmstoffe wie Etoposid. Im Anschluss an die perioperative Chemotherapie erfolgt eine Erhaltungskemotherapie mit Cyclophosphamid. Eine Radiotherapie kommt nur bei inoperablem vitalem Resttumor zum Einsatz (Pinto et al. 2015; GPOH 2019).

Zur Hochrisikogruppe in der Neuroblastom-Therapie zählen alle Patienten im INRG-Stadium M im Alter über 18 Monaten sowie jene mit MYCN-Amplifikation. Die Standardtherapie in dieser Gruppe ist eine Induktionschemotherapie zur Tumorreduktion mit den genannten Substanzen vor einer operativen Tumoresektion. Ob eine vollständige Tumoresektion einen Überlebensvorteil gegenüber einer inkompletten Resektion bringt, wird kontrovers diskutiert, eine Verstümmelung mit dem Ziel einer Komplettresektion ist jedoch nicht gerechtfertigt (Simon et al. 2017). Nach der Operation folgt bei allen Patienten die Konsolidierung durch eine myeloablative Hochdosis-Chemotherapie aus Busulfan und Melphalan mit anschließender Rettung aus der Knochenmarksuppression durch autologe Stammzelltransplantation (Park et al. 2019). Die post-Konsolidierungs-Therapie ist eine Immuntherapie mit dem anti-GD2-Antikörper Dinutuximab, prospektive Langzeitstudien zu dessen Kombination mit Interleukin-2 und 13-cis-Retinsäure stehen noch aus (Yu et al. 2021). Eine Bestrahlung der Primärtumoregion wird für alle Hochrisikopatienten empfohlen (Simon et al. 2017; GPOH 2019). Ein weiteres Therapiekonzept der Hochrisikogruppe ist die <sup>131</sup>I-MIBG-Therapie (<sup>131</sup>I-Metaiodbenzylguanin), bei der das Radionuklid über den Norepinephrin-Transporter NET selektiv in das MIBG-positive Tumorgewebe aufgenommen wird (GPOH 2019). Auch genomische Ansätze werden verfolgt. So weisen beispielsweise 20 Prozent der Hochrisiko-Neuroblastome eine ALK-Aberration auf, der mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib begegnet werden soll (Saletta et al. 2014).

Die Prognose des Neuroblastoms ist stark abhängig vom Risikoprofil. Bei niedrigem und mittlerem Risiko kann aufgrund der hohen Spontanremissionsrate mit geringer oder sogar ohne Therapie ein Überleben von über 90 Prozent erreicht werden (Pinto et al. 2015). Im Gegensatz dazu überleben in der Hochrisikogruppe trotz intensiver Therapie weniger als 50 Prozent der Patienten. Ein schlechtes Ansprechen auf Chemotherapeutika sowie hohe Rezidivneigung spielen hierbei eine Rolle. Für diese Patienten wird daher eine präzise Therapiestrategie basierend auf spezifischen Targets benötigt (Pinto et al. 2015). Auch die schweren Nebenwirkungen der intensiven Therapie sind Gründe dafür, dass für diese Gruppe weitere Therapiekonzepte entwickelt werden müssen (Louis und Shohet 2015).

## 1.2 Wachstumsfaktoren und ihre Signaltransduktion

Wachstumsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei der physiologischen Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben und Organen. Ihre Expression und Freisetzung sowie die Menge und Funktionalität ihrer Rezeptoren unterliegen im gesunden Organismus einer strengen Regulation, um kontrollierte Zellteilung und Zellwachstum zu gewährleisten. Erste Erkenntnisse zur Funktion von Wachstumsfaktoren und ihrer Assoziation zu Krebs wurden in den 1950er-Jahren gewonnen. Cohen et al. beschrieben hier die Förderung des Nervenwachstums in Hühnerembryonen durch den *Nerv Growth Factor* (NGF), der aus murinen Sarkomzellen gewonnen wurde (Cohen et al. 1954). Weitere Forschungen der folgenden Jahre kamen zu dem Schluss, dass Wachstumsfaktoren zwar weniger in die Tumorentstehung involviert sind, jedoch eine große Rolle bei der Tumorprogression spielen (Witsch et al. 2010). Dabei steuern sie über autokrine Mechanismen die klonale Expansion der Tumorzellen und fördern Migration und Invasion durch Verlust der Zellpolarität, motile Transformation und Sekretion von Proteasen. Außerdem fungieren sie als Mediatoren zwischen Tumor und umgebender Extrazellulärmatrix sowie Stromazellen und ermöglichen somit die Angiogenese, die für die Etablierung des Tumors entscheidend ist (Folkman 1971; Lee et al. 1984). Durch Überexpression der Wachstumsfaktorrezeptoren oder aktivierende Mutationen in nachgeschalteten Signalwegen verstärkt der Tumor die Wirkung der Wachstumsfaktoren und fördert Resistenzen gegen Chemo- oder Radiotherapie (DiFiore et al. 1987; Huang et al. 1997).

Mittlerweile ist eine Vielzahl an verschiedenen Wachstumsfaktoren bekannt, von denen im Folgenden EGF, IGF und HGF näher betrachtet werden sollen.

### 1.2.1 Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

Der *epidermale Wachstumsfaktor* (EGF) wurde in den 1960er-Jahren entdeckt. Das Polypeptidhormon bekam seinen Namen aufgrund der zunächst beobachteten Förderung der Proliferation und Keratinisierung epidermaler Zellen (Cohen et al. 1987). Im Verlauf wurde dessen Bedeutung für andere Zelltypen nachgewiesen, so auch für das Neuroblastom (Ho et al. 2005; Tamura et al. 2007).

EGF bindet an den *EGF-Rezeptor* (EGFR, auch HER1) aus der Familie der ErbB-Rezeptoren, die vier Rezeptor-Subtypen (HER1 bis HER4) umfasst. Der EGFR gehört zur Gruppe der Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität und wird als Transmembranprotein an der Oberfläche zahlreicher Zellen exprimiert (Wells 1999). An ihm lässt sich die typische Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren demonstrieren (Abb. 1). Bindung eines Liganden, unter anderem EGF, an die extrazelluläre Domäne eines Rezeptor-Monomers führt zu dessen Konformationsänderung und ermöglicht die Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptor-Monomer. Durch die Dimerisierung werden die beiden intrazellulär gelegenen Tyrosinkinasedomänen in räumliche Nähe gebracht,

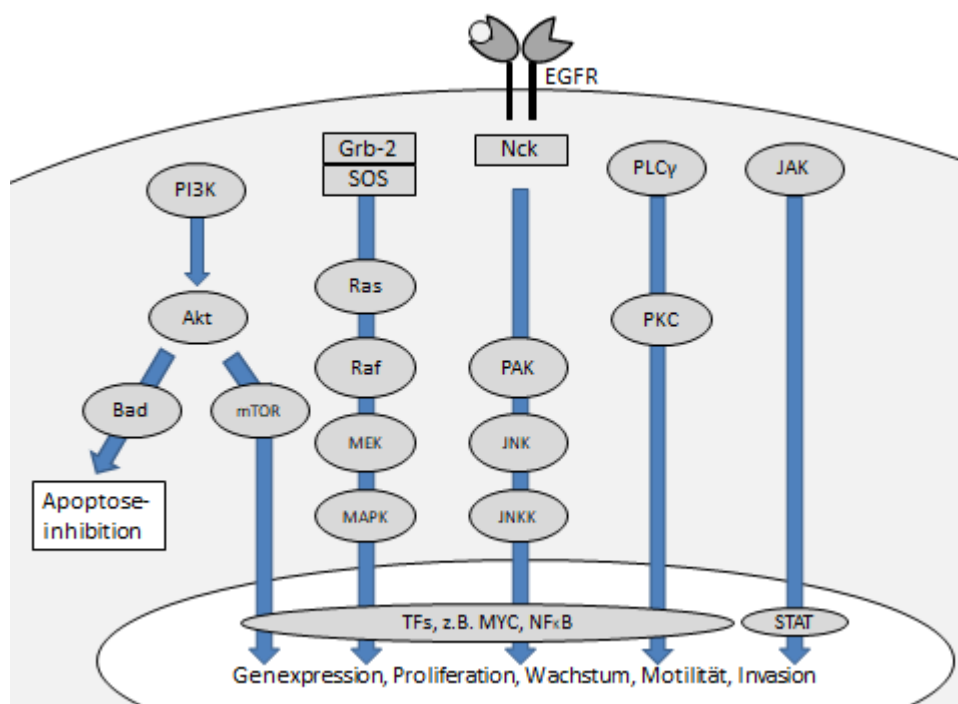
sodass diese sich gegenseitig phosphorylieren können (sogenannte Autophosphorylierung). Dadurch wird der Rezeptor aktiviert und eine multifunktionelle Bindungsstelle für Proteine geschaffen, die verschiedene nachgeschaltete Phosphorylierungs- und Aktivierungskaskaden auslöst (Yarden und Sliwkowski 2001; Yarden und Shilo 2007; Witsch et al. 2010).

Eines der Adapterproteine ist das *Growth factor receptor binding protein* (Grb-2), das den Guaninnukleotidaustauschfaktor SOS bindet. Letzterer aktiviert GDP-Ras zu GTP-Ras, der die Serin-Threonin-Kinase Raf an die Zellwand rekrutiert und aktiviert. Raf aktiviert die MAP/ERK-Kinase MEK, die wiederum die MAP-Kinase phosphoryliert. Zu den wichtigsten Vertretern der *Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen* (MAPK) gehört die *Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2* (ERK1/2). Die aktivierte MAPK wird in den Zellkern transloziert und beeinflusst dort über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Proliferation und Differenzierung der Zelle. Außerdem kann sie weitere zytoplasmatische Substrate phosphorylieren (Yarden und Sliwkowski 2001; Yarden und Shilo 2007, Witsch et al. 2010, Sabbah et al. 2020).

Des Weiteren kann die Rezeptor-Autophosphorylierung zur Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  führen. Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat zu den Signalmolekülen Diacylglycerin (DAG) und Inosit-1,4,5-triphosphat (IP3), wodurch die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern ermöglicht wird und weitere Signalwege aktiviert werden, unter anderem die Proteinkinase C (Yarden und Sliwkowski 2001).

Die Aktivierung der *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI3K) durch direkte Phosphorylierung durch den Rezeptor bzw. über Ras ermöglicht die Phosphorylierung von Akt. Akt phosphoryliert als Serin-Threonin-Kinase unter anderem das antiapoptotische Protein Bad und aktiviert die Kinase mTOR und den Transkriptionsfaktor *Nuclear-Factor- $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) (Yarden und Sliwkowski 2001; Witsch et al. 2010; Sabbah et al. 2020).

Weitere Aktivierungswege betreffen den Signaltransduktor *Signal Transducer and Activator of Transcription* proteins (STAT) über die Janus-Kinase sowie die *Jun amino-terminale Kinase* JNK (Wells 1999; Yarden und Sliwkowski 2001; Yarden und Shilo 2007; Witsch et al. 2010; Sabbah et al. 2020).



**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung des Wachstumsfaktor-Signalwegs am Beispiel des EGFR

Bad: Bcl-2-associated death promotor, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, Grb-2: Growth factor receptor binding protein, JAK: Janus-Kinase, JNK: c-Jun-N-terminalen Kinase, JNKK: JNK-Kinase, MAPK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase, MEK: MAP/ERK-Kinase, mTOR: mechanistic target of Rapamycin, NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, PAK: p21/CDC42/Rac1-Aktivierte Kinase, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PKC: Proteinkinase C, PLCγ: Phospholipase Cγ, Raf: Rapidly growing fibrosarcoma, Ras: Rat sarcoma, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription proteins, SOS: Son of Sevenless, TF: Transkriptionsfaktoren (nach Yarden und Sliwkowski 2001; Hecht et al. 2004; Yarden und Shilo 2007; Witsch et al. 2010; Sabbah et al. 2020).

Wie bereits für Wachstumsfaktoren im Allgemeinen beschrieben, beeinflusst EGF am EGFR über diese Signalwege nicht nur physiologische Prozesse, sondern auch wichtige Merkmale der Karzinogenese wie Proliferation und Apoptoseinhibition. Eine Überexpression des EGFR findet sich bei verschiedenen Tumoren und führt zu Progression und Metastasierung (Wells 1999). Daher bietet sich der EGFR als Zielstruktur in der onkologischen Therapie an, was zur Entwicklung verschiedener Wirkstoffe geführt hat. Grundsätzlich werden zwei Kategorien von EGFR-Inhibitoren unterschieden, die monoklonalen Antikörper und die Tyrosinkinaseinhibitoren.

Monoklonale Antikörper binden an die extrazelluläre Domäne des EGFR und verhindern somit die Ligandenbindung (Castillo et al. 2004). Beispiele sind Cetuximab und Panitumumab, die in Kombination mit Chemotherapie bereits beim kolorektalen, Bronchial- und Pankreaskarzinom Anwendung finden. Sie steigern die antineoplastische Wirkung der Chemotherapie und reduzieren die Bildung von Resistenzen (Cunningham et al. 2004; Sabbah et al. 2020). Tyrosinkinaseinhibitoren hingegen hemmen die Autophosphorylierung des Rezeptors und damit auch die nachgeschalteten

Phosphorylierungskaskaden (Arora und Scholar 2005). Die EGFR-Inhibitoren Gefetinib und Erlotinib werden ebenfalls bereits in der Therapie von Bronchial- und Pankreaskarzinomen verwendet (Ciardiello und Tortora 2008). Auch an Neuroblastompatienten wurden bereits erste Studien mit EGFR-Inhibitoren durchgeführt (Jakacki et al. 2008).

### 1.2.2 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)

Der *Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor* (IGF) erhielt seinen Namen aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu Insulin. Seine beiden Isoformen IGF1 und IGF2 sowie der gemeinsame *IGF-1-Rezeptor* (IGF1R, IGFR) konnten in Neuroblastomzellen nachgewiesen werden (Megison et al. 2013). Die Signaltransduktion nach Bindung von IGF an den IGFR ist vergleichbar mit der von EGF, mit der Einschränkung, dass der IGFR bereits als Dimer in der Zellmembran vorliegt. Es können auch Hybridrezeptoren aus dem IGFR und dem Insulinrezeptor mit hoher Affinität für IGF1 gebildet werden (Weroha und Haluska 2008).

In der Signaltransduktion des IGFR spielen vor allem die oben beschriebene Aktivierung des MAPK- sowie des PI3K/Akt-Signalwegs eine wichtige Rolle (Carboni et al. 2009). Dies ermöglicht die Ausübung physiologischer Funktionen, beispielsweise in Wachstumsprozessen und Energiestoffwechsel (Weroha und Haluska 2008). Darüber hinaus ist der IGF-Signalweg aber auch essentiell für Zellteilung sowie Überleben von Tumorzellen und fördert Proliferation und Metastasierung (Baserga 1995; Carboni et al. 2005).

Wie auch EGF bietet sich damit IGF als Zielstruktur in der onkologischen Therapie an. Linsitinib (OSI-906) ist ein oral applizierbarer Tyrosinkinaseinhibitor mit selektiver Aktivität gegen den IGFR sowie in höheren Konzentrationen gegen den Insulin-Rezeptor (Mulvihill et al. 2009). Seine Wirksamkeit in Mono- oder Kombinationstherapie wird bereits bei verschiedenen Krebsarten wie Bronchial- oder Mammakarzinomen getestet (King und Wong 2012). Insgesamt wird Linsitinib eine gute Verträglichkeit attestiert. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen betreffen vor allem milde Hyperglykämien durch die Wirkung auf den Insulinrezeptor (Puzanov et al. 2015; Davis et al. 2018). Ähnliches gilt für den Tyrosinkinaseinhibitor BMS-754807, der zusätzlich zum IGFR und Insulinrezeptor noch weitere Kinasen und Rezeptoren inhibiert. Für verschiedene Tumorentitäten konnte für BMS-754807 bereits eine Reduktion des Tumorwachstums durch Induktion der Apoptose nachgewiesen werden (Carboni et al. 2009). Auch an Neuroblastomzellen wurden bereits Untersuchungen durchgeführt (Carboni et al. 2009; Kolb et al. 2011).

### 1.2.3 Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF)

Der *Hepatozyten-Wachstumsfaktor* (HGF) wurde erstmals als Wachstumsfaktor für Leberzellen entdeckt (Nakamura et al. 1989). Er wird durch mesenchymale Zellen als Vorläuferprotein sezerniert

und durch proteolytische Spaltung in seine aktive Form umgewandelt (Nakamura et al. 1989). Diese bindet an den spezifischen Rezeptor c-Met auf der Oberfläche epithelialer und endothelialer Zellen, woraufhin eine Signalkaskade vergleichbar mit EGF und IGF ausgelöst wird (Hecht et al. 2004). In der Signalkaskade werden außerdem die *Matrix-Metalloproteinase* (MMP) und der *tissue plasminogen activator* (tPA) aktiviert, die die Degradierung von Proteinen der extrazellulären Matrix ermöglichen und somit Tumorinvasion und –metastasierung erleichtern (Hecht et al. 2004).

Die ausgelösten Signalkaskaden von HGF und c-MET sind essentiell für Prozesse wie Embryogenese, Geweberegeneration, Wundheilung und Angiogenese (Birchmeier und Gherardi 1998). Eine Überexpression von Wachstumsfaktor und Rezeptor fördern jedoch auch die Progression und Metastasierung vieler Tumoren, auch die des Neuroblastoms (Hecht et al. 2004; Crosswell et al. 2009). Klinische Studien an Neuroblastom-Patienten zeigen, dass HGF bei Patienten mit Neuroblastom erhöht ist und zusätzlich auf ein fortgeschrittenes Stadium hinweist (Crosswell et al. 2009). Ein erhöhter HGF-Spiegel korreliert dabei auch mit genetischen Markern für ein schlechtes Outcome (1p-Deletion, MYCN-Amplifikation).

Die Blockade der HGF-vermittelten Signale ist demnach eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit. Tepotinib als gezielter oraler c-Met-Inhibitor wird unter anderem bei Bronchialkarzinomen angewandt und zeigt eine gute Verträglichkeit mit nur milden unerwünschten Wirkungen wie peripheren Ödemen (Xu et al. 2022). Bei den Neuroblastomzelllinien H1993, SH-EP, SK-N-AS und SK-N-SH konnten durch Tepotinib eine Induktion der Apoptose und ein reduziertes Tumorwachstum erreicht werden (Scorsone et al. 2014). Der c-Met- und ALK-Inhibitor Crizotinib zeigte in klinischen Studien an Hochrisiko-Neuroblastomen bereits ein initiales Ansprechen, war jedoch mit einer späteren Resistenzentwicklung verbunden. Die Studienleiter postulierten, dass die benötigten Crizotinib-Konzentrationen zur Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität nicht erreicht werden konnten (Foster et al. 2021). Nähere Betrachtungen der Resistenzmechanismen sind hier notwendig.

## 1.3 Das Neuroblastom im Zellmodell

Als Zellmodell für die vorliegende Arbeit wurden exemplarisch die beiden humanen Neuroblastomzelllinien Kelly und SH-SY5Y verwendet, die klinisch relevanten Mutationen aufweisen.

### 1.3.1 Kelly-Zellen

Kelly-Zellen stammen von einer einjährigen Neuroblastompatientin. Die runden bis fusiformen Zellen mit Neuritenfortsätzen wachsen adhärent in Mono- oder Multilayern mit einer Verdopplungszeit von 30 bis 40 Stunden (Leibniz Institute DSMZ GmbH 2024). Eine Besonderheit der Kelly-Zellen ist das Vorliegen einer genomischen Amplifikation des Transkriptionsfaktors MYCN (Preis et al. 1988;



Schwab et al. 1983; Bannasch et al. 1999). Zudem weisen Kelly-Zellen wie auch SH-SY5Y-Zellen eine aktivierende Mutation der Rezeptortyrosinkinase ALK auf (F1174L), die die ALK-Phosphorylierung und damit das Zellwachstum fördert (Sasaki et al. 2010; Del Grosso et al. 2011).

### **1.3.2 SH-SY5Y-Zellen**

SH-SY5Y-Zellen sind ein neuronaler Subklon der Neuroepitheliom-Zelllinie SK-N-SH, die im Jahr 1970 aus der Knochenmarksbiopsie eines vierjährigen Mädchens mit metastatischer Neuroblastomerkrankung gewonnen wurde (Biedler et al. 1973). Im Gegensatz zum epithelialen Subklon weisen die SH-SY5Y-Zellen kurze neuronale Fortsätze sowie die für katecholaminerge Neurone typische Enzymaktivität der Tyrosin-Hydroxylase und der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase auf (Ross et al. 1983). Kulturen der SH-SY5Y-Zellen bestehen aus zwei Fraktionen mit unterschiedlichem Wachstumsmuster; eine aus frei im Medium flottierenden Zellclustern und eine mit adhärentem Wachstum in Monolayern (Kovalevich und Langford 2013). Die Verdopplungszeit beträgt 50 bis 60 Stunden (Leibniz Institute DSMZ GmbH 2024). Im Gegensatz zu Kelly-Zellen besitzen SH-SY5Y-Zellen zwar keine genomische MYCN-Amplifikation, exprimieren jedoch trotzdem hohe Spiegel von MYCN und MYC (Sadée et al. 1987). Zudem weisen SH-SY5Y-Zellen eine zusätzliche Kopie des Chromosoms 1q auf (Biedler et al. 1978).

## **1.4 Retinsäure**

Retinsäure, ein Derivat des Vitamin A, kann in die Regulation von Zelldifferenzierung, Wachstum und Apoptose eingreifen und findet daher Anwendung in der Therapie verschiedener onkologischer Erkrankungen (Chlapek et al. 2018).

In Neuroblastomzellen reduziert Retinsäure die Expression von MYCN und kann infolge dessen die Differenzierung zu einem reiferen neuronalen Phänotyp induzieren (Preis et al. 1988; Cheung et al. 2009). Es kommt konzentrationsabhängig zur Ausbildung langer neuronaler Fortsätze und zu erhöhter Expression neuronaler Marker wie der Neuronen-spezifischen Enolase (Cheung et al. 2009). Der Effekt ist jedoch nicht ausreichend, um die vollständige Ausdifferenzierung der Tumorzellen zu erreichen und die Fähigkeit zur Koloniebildung aufzuheben (Preis et al. 1988). Gleichzeitig erzielt Retinsäure konzentrations- und zeitabhängige Effekte auf das Wachstum der verschiedenen Neuroblastomzelllinien (Seeger et al. 1982; Thiele et al. 1985). In Kelly-Zellen wird durch Behandlung mit all-trans-Retinsäure ein Stoppen der Proliferation erreicht, während sich bei SH-SY5Y-Zellen die Zellzahl erhöhte (Waetzig et al. 2019).

Retinsäure war daher lange Zeit Teil des multimodalen Therapiekonzeptes zur Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen. Neuere Studien zeigten jedoch Zweifel an der Wirksamkeit. Ein Problem

ist die Bildung Retinsäure-resistenter Zellen durch Aktivierung der Überlebenssignalwege über Akt und ERK1/2 und Reduktion der Apoptose (Chlapek et al. 2018; Waetzig et al. 2019). In den aktuellen Empfehlungen zur post-Konsolidierungs-Therapie wurde die Retinsäure daher durch den Antikörper Dinutuximab abgelöst (Peinemann et al. 2016).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die zentrale Rolle der Wachstumsfaktoren in der Tumorprogression wurde für zahlreiche Krebsarten beschrieben und zielgerichtete Therapiestrategien vielversprechend eingesetzt. Für das Neuroblastom fehlen jedoch genaue Betrachtungen, die angesichts der schlechten Prognose des Hochrisiko-Neuroblastoms notwendig sind. Ziel dieser Arbeit war daher die Einschätzung der Rolle der Wachstumsfaktoren für das Neuroblastom, um eine mögliche therapeutische Konsequenz ableiten zu können. Anhand der beiden Neuroblastomzelllinien Kelly und SH-SY5Y wurde der Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF, IGF und HGF auf Zellviabilität, Proliferation und Differenzierung untersucht.

Folgende Kernfragen sollten dabei genauer betrachtet werden:

- Welche der untersuchten Wachstumsfaktoren werden unter optimalen Bedingungen bzw. in Mangelsituationen exprimiert und freigesetzt?
- Welche Funktionen haben die untersuchten Wachstumsfaktoren?
- Können die Zellen adaptieren, wenn die Wachstumsfaktorrezeptoren von EGF, IGF oder HGF blockiert werden?
- Hat die Differenzierung mit Retinsäure einen Einfluss auf Expression und Freisetzung der untersuchten Wachstumsfaktoren?

## 2 Material und Methodik

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit genutzten technischen Ausstattungen sowie die Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien, Kits, Antikörper und TaqMan-Assays aufgeführt (Tabelle 3 bis 9) und die angewandte Methodik erläutert.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Ausstattung

Hersteller	Gerät
Bandelin electronic (Berlin)	Ultraschall-Homogenisator Sonopuls GW70
Biometra (Göttingen)	Schüttelplattform WT12
Bio-Rad Laboratories (München)	Glasplatten 1,5 mm Kamm, 15-Well Mini PROTEAN® Gelkammer Mini PROTEAN® System Gelgießstand Power PacTM 300 Power Supply Subcell® GT Cell Elektrophoresekammer T100™ Thermocycler Tank Blot Insert Tank Blot Kammer
Eppendorf AG (Hamburg)	Combitips (0,1 – 2,5 ml) Kühlzentrifuge 5415 R Laborzentrifuge 5810 Multistepper Pipetten (0,5 – 1000 µl) Thermomixer compact
GFL (Burgwedel)	Wasserbad
Heidolph (Kehlheim)	Polymax 2040 Schüttler
Heraeus (Osterode)	Varifuge 3.0
Hitachi (Düsseldorf)	Spektrophotometer U2000
Implen (München)	NanoPhotometer
Leica (Wetzlar)	Fluoreszenzmikroskop DMIL
LI-COR Biosciences (Bad Homburg)	Odyssey CLx
Millipore (Schwalbach)	Milli-Q Wasseraufreinigungsanlage

neoLab (Berlin)	Vortex Genie 2
Ohaus (Greifensee, Schweiz)	Navigator™ Laborwaage
Olympus GmbH (Hamburg)	Mikroskop Olympus CK2 Mikroskop Olympus IX73
Omnilab (Bremen)	KNF Miniport (Vakuumpumpe)
Phase (Lübeck)	Semi-Dry Blotter
Roche AG (Basel, Schweiz)	CASY TT
Seral (Ransbach-Baumbach)	Seradest RO-25 compact/Seralpur Pro90CN
Schott (Mainz)	Glasgefäße
Tecan (Crailsheim)	Tecan Infinite® M200 pro
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	HeraCell™ Zellkulturbrutschrank Heraeus™ Multifuge 3 S-R HeraSafe™ Zellkulturbank Nunc™ 96-well-Platten, weiß, klarer Boden QuantStudio™ 7

**Tabelle 3:** Technische Ausstattung**2.1.1.1 Ergänzungen zur technischen Ausstattung****Sterilbank**

Gemäß Herstellerangaben wurde die Sterilbank (HeraSafe™ Zellkulturbank, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) 30 Minuten vor Benutzung für Arbeiten der Zellkultur eingeschaltet und mit 70 % Ethanol gereinigt, um Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden.

**Sterilisation**

Die verwendeten Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden mithilfe des Tuttnauer 3850 EL (Tuttnauer, Wesel) bei 121 °C und 2,2 bar für 15 Minuten autoklaviert. Lösungen und Reagenzien wurden, sofern sie nicht bereits steril gekauft wurden, für 20 Minuten autoklaviert.

**Bidestillierung**

Sofern nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung von Puffern und Lösungen bidestilliertes Wasser, im Folgenden als „A. bidest.“ angegeben, verwendet. Dieses wurde mithilfe des Seradest RO-25 compact/Seralpur Pro90CN (Seral, Ransbach-Baumbach) hergestellt.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Hersteller	Verbrauchsmaterial
Hartmann AG (Heidenheim)	Peha-soft Handschuhe, powderfree
Hecht-Assistent (Sondheim v. d. Rhön)	Pasteurpipetten 230 mm
GE Healthcare (München)	Whatman™ Filterpapier 3 MM CHR
Li-Cor Biosciences (Bad Homburg v. d. Höhe)	Nitrozellulosemembran
Sarstedt (Nümbrecht)	Kunststoffküvetten Pipetten (steril; 5/10/25 ml) Pipettenspitzen (2,5/10/100/1000 µl) Reaktionsgefäß (0,5/1,5/2,0/10,0 ml) Zellkulturschalen (ø 10 cm) Zellkulturschalen (6-well) Zellkulturschalen (96-well) Zellschaber 15-/50-ml-Röhrchen
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	96-Well-Platte, optical-bottom, white

**Tabelle 4:** Verbrauchsmaterialien

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Hersteller	Chemikalie/Reagenz
AppliChem (Darmstadt)	Acrylamid/Bis-acrylamid Lösung (30%)
Bio-Rad Laboratories (München)	Bio-Rad Protein Assay Standard II
Bio&Sell (Nürnberg)	Foetales Kälberserum (FCS) Ultrapure Water
Carl Roth (Karlsruhe)	Aprotinin Dye Reagent EDTA (Ethylendiamintetraacetat) Ethanol Glycin Leupeptin Pepstatin PIPES/NaOH (pH 6,5) (Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)) PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) TEMED (Tetramethylenethylendiamin)

	Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
Li-Cor Biosciences (Bad Homburg v. d. Höhe)	Odysseus Blocking Solution Marker Chameleon Duo
Life Technologies, Gibco (Karlsruhe)	DMEM Penicillin/Streptomycin RPMI 1640
Merck (Darmstadt)	Ammoniumpersulfat (APS) Bromphenolblau CHAPS Dimethylsulfoxid (DMSO) Tween 20
PAN-Biotech (Aidenbach)	Trypsin
Schärfe System (Hamburg)	CASYton isotonische Salzlösung
Sigma (München)	Phosphatase Inhibitor Cocktail II
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	DTT (Dithiotreitol) 10x PBS Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) TaqMan® Universal PCR Master Mix without AmpErase® UNG
Tocris (Wiesbaden)	All-trans Retinsäure

**Tabelle 5:** Chemikalien und Reagenzien

### 2.1.4 Kits

Hersteller	Kit
Omega bio-tek (Norcross, USA)	E.Z.N.A® Total RNA Kit I (R6834-O2)
Promega (Mannheim)	Caspase-Glo® 3/7-Assay CellTiter-Glo® CytoTox-Glo™
R&D Systems (Wiesbaden)	Human HGF Quantikine® ELISA Kit Human IGF2 Quantikine® ELISA Kit
Sigma (München)	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Subcellular Protein Fractionation Kit

**Tabelle 6:** Kits

### 2.1.5 Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung in Blockierlösung	Hersteller
Akt	Maus	1: 1.000	SC
c-Met	Maus	1: 500	SC
c-Myc	Maus	1: 1.000	SC
Cyclin D1	Maus	1: 1.000	SC
EGFR	Maus	1: 1.000	SC
ERK1/2	Maus	1: 750	SC
GAPDH	Maus	1: 5.000	SC
Hsp90	Kaninchen	1: 1.000	CST
IGFR	Maus	1: 1.000	SC
Myc	Maus	1: 1.000	SC
N-Myc	Maus	1: 1.000	SC
pAkt	Kaninchen	1: 1.000	CST
pc-Myc	Maus	1: 1.000	SC
pERK1/2	Kaninchen	1: 2.500	CST
p21	Maus	1: 1.000	SC

**Tabelle 7:** Primärantikörper

CST: Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M.), SC: Santa Cruz (Heidelberg).

Name	Spezies	Wellenlänge	Verdünnung in TTBS	Hersteller
anti-rabbit	Ziege	800 nm	1: 5.000	Li-Cor
anti-mouse	Ziege	800 nm	1: 5.000	Li-Cor
anti-mouse	Ziege	700 nm	1: 5.000	Li-Cor

**Tabelle 8:** Sekundärantikörper

Li-Cor: Li-Cor Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe.

### 2.1.6 TaqMan-Assays

Name	Assay-ID
Actin b	Hs99999903_m1
EGF	Hs01099990_m1
EGFR	Hs01076090_m1
HGF	Hs00300159_m1
IGF1	Hs01547656_m1
IGF2	Hs00171254_m1
IGFR	Hs00609566_m1
MycN	Hs00232074_m1
MET	Hs01565591_m1
TBP	Hs00427620_m1
YWHAZ	Hs03044281_g1

**Tabelle 9:** TaqMan-Assays

Alle verwendeten TaqMan-Assays wurden durch Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) hergestellt.



## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Kelly- und SH-SY5Y-Zellen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) gekauft. Die Zellen wurden auf unbeschichteten 10-cm-Kunststoffschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (HeraCell™ Zellkulturbrutschrank, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) kultiviert. Unter Wachstumsbedingungen erhielten die Zellen 7 ml des unten genannten Nährmediums, das alle zwei bis drei Tage ausgetauscht wurde. Alle Arbeitsschritte der Zellkultivierung wurden unter der Sterilbank (HeraSafe™ Zellkulturbank, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) durchgeführt, um Verunreinigungen zu vermeiden. Vor der Verwendung wurden die Zellen unter dem inversen Mikroskop (Olympus CK2, Olympus, Hamburg) untersucht, sodass eventuell kontaminierte Zellen verworfen werden konnten.

Inhaltsstoffe	Kelly	SH-SY5Y
RPMI 1640	500 ml	-
DMEN	-	500 ml
Foetales Kälberserum FCS	50 ml	100 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml	5 ml
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>		

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Nährmedien zur Kultivierung der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen

Die Nährmedien wurden unter der Sterilbank angesetzt und vor dem Gebrauch im Wasserbad (GFL, Burgwedel) auf 37 °C erwärmt. Das foetale Kälberserum FCS wurde im Vorfeld im Wasserbad bei 56° C für 30 Minuten hitzeinaktiviert.

### 2.2.2 Zellpassage

Alle sieben Tage wurde die Zellhaltung auf neuen Kulturschalen ausgesät. Dazu wurde zunächst das Nährmedium mithilfe einer Vakuumpumpe (KNF Miniport, Omnilab, Bremen) abgesaugt und die Platte mit 2 ml PBS gewaschen. Um die Zellen von der Schale abzulösen, wurden sie anschließend mit 2 ml Trypsin für sechs (Kelly) oder zwölf (SH-SY5Y) Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden 5 ml des Vollmediums hinzugefügt und die Suspension nach mehrfachem Spülen der Platte in ein 15-ml-Röhrchen übertragen. Das Röhrchen wurde für zehn Minuten bei 1000 rpm (Varifuge 3.0, Heraeus, Osterode) zentrifugiert und der entstandene Überstand abgesaugt, bevor das verbliebene Zellpellet in 3 ml neuem Vollmedium resuspendiert wurde.

Zur Zählung der Zellen wurde der CASY TT (Roche AG, Basel, Schweiz) verwendet, der vor Inbetriebnahme gespült wurde. Der CASY TT ist in der Lage, anhand von Spannungsveränderungen die Zellzahl und Zellviabilität einer Probe zu bestimmen. Dazu wurden zunächst 25 µl der Zellsuspension in 5 ml der Elektrolytlösung CASYton gegeben. Die Probe wird durch die Messkapillare des CASY TT gesaugt, an der ein elektrischer Strom anliegt, der durch die durchfließenden Zellen verringert wird. Viable Zellen mit intakter Zellmembran erzeugen dabei einen größeren Widerstand als tote Zellen, bei denen nur noch der Kern vorhanden ist. So kann der CASY die viablen Zellen von den toten unterscheiden.

Die gezählten Zellen wurden auf neuen Kulturschalen und 96-Well-Platten ausgesät. In den Schalen wurden dafür 7 ml des Vollmediums vorgelegt, bevor die gewünschte Zellmenge hinzupipettiert und die Schale geschwenkt wurde. Für die 96-Well-Platten wurde die gewünschte Zellmenge zunächst in ein weiteres 15-ml-Röhrchen gegeben und die Flüssigkeitsmenge mit Vollmedium auf 11 ml (pro 96-Well-Platte) aufgefüllt und geschwenkt. Mithilfe des Multistepplers (Eppendorf, Hamburg) wurden anschließend 100 µl der Suspension pro Well aufgetragen.

Für diese Arbeit wurden nur Zellen der Passage 1 bis 20 verwendet.

Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
NaCl	1,37 M
KCl	0,03 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	0,07 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	0,02 M
<i>Für 1x PBS 1:10 verdünnt mit A. bidest.</i>	
<i>Autoklaviert, bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 11:** Zusammensetzung Stammlösung 10x PBS

Verwendungszweck	Zellzahl Kelly	Zellzahl SH-SY5Y
Haltung	0,4-1,2 x 10 <sup>6</sup>	0,8-1,2 x 10 <sup>6</sup>
Lyse	0,8-1,2 x 10 <sup>6</sup>	1,8-2,2 x 10 <sup>6</sup>
96-well-Platten	0,03 x10 <sup>6</sup> pro Well (zur Stimulation am folgenden Tag) 0,005 x10 <sup>6</sup> pro Well (zur Stimulation in drei Tagen)	

**Tabelle 12:** Gewünschte Zelldichte der Kulturschalen

### 2.2.3 Stimulation in Kulturschalen

Zur Stimulation der Zellen in Kulturschalen wurde zunächst das vorhandene Nährmedium abgesaugt und durch neues Nähr- bzw. Stimulationsmedium ersetzt. Anschließend wurden die Stimulationssubstanzen hinzupipettiert und die Schale für eine homogene Verteilung geschwenkt. Für Stimulationen, bei denen eine geringe Zellzahl zu erwarten war, wurden zwei Platten angesetzt und bei der Lyse (siehe Abschnitt 2.4) vereint. Die Platten wurden weiterhin im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und nach 24, 48 oder 72 Stunden für die Versuche verwendet.

Stimulationsmedium	RPMI/DMEN	FCS
Vollmedium (VM)	siehe Zusammensetzung Nährmedien	
0,5 %iges Medium (0,5 %)	49,75 ml	250 µl
0 %iges Medium (ø)	50 ml	-
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>		

**Tabelle 13:** Zusammensetzung Stimulationsmedien (für einen 50-ml-Ansatz)

Stimulationssubstanz	Konzentration/Menge	Verdünnungssubstanz
Retinsäure (RA)	5 µM, 10 µM	DMSO
EGF	100 ng/ml	Ultra Pure Water
IGF1	100 ng/ml	Ultra Pure Water
IGF2	100 ng/ml	Ultra Pure Water
HGF	50 ng/ml, 100 ng/ml	Ultra Pure Water
BMS	1 µM, 5 µM, 10 µM	DMSO
Crizotinib	1 µM, 5 µM, 10 µM	DMSO
Erlotinib	1 µM, 5 µM, 10 µM	DMSO
Linsitinib	1 µM, 5 µM, 10 µM	DMSO
Tepotinib	1 µM, 5 µM, 10 µM	DMSO
<i>Bei -20 °C gelagert.</i>		

**Tabelle 14:** Verdünnung der Stimulationssubstanzen

### 2.2.4 Stimulation in 96-Well-Platten

Für die Stimulation der Zellen in 96-Well-Platten wurden zunächst die Stimulationsmedien und -substanzen in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen vorbereitet. Pro Well wurden 100 µl Ansatz (Medium mit Stimulationssubstanz) benötigt, die mit einer Pipettierzugabe von 30 µl angesetzt wurden. Dabei

wurden für jede Stimulationsart und jeden Messzeitpunkt zwei Werte angesetzt, aus denen in der Analyse der Mittelwert gebildet wurde. Anschließend wurde das Nährmedium aus den Wells abgesaugt und durch das vorbereitete Medium aus den Reaktionsgefäßen ersetzt. Die Platten wurden im Brutschrank für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert und auf Zellproliferation und Zellsterben (siehe Abschnitt 2.3) untersucht.

### **2.2.5 Fotodokumentation**

Zur Charakterisierung der morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Stimulation wurden diese vor ihrer Weiterverwendung mithilfe eines inversen Mikroskops (Fluoreszenzmikroskop IX73, Olympus, Hamburg) betrachtet und mit der Software cellSens (Olympus, Hamburg) fotografiert. Zur Auszählung wurde das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Open Source) genutzt.

## **2.3 Untersuchung von Zellproliferation und Zellsterben**

Für die folgenden Untersuchungsmethoden wurden Zellen in 96-Well-Platten kultiviert (siehe Abschnitt 2.2.4).

### **2.3.1 CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay**

Zur Messung der Anzahl der lebenden Zellen wurde der CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay (Promega, Mannheim) benutzt. Dieser lysiert die Zellen und generiert ein Lumineszenz-Signal proportional zur vorhandenen ATP-Menge. Der ATP-Gehalt als Marker der metabolischen Aktivität ist laut Hersteller wiederum proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Das CellTiter-Glo® Reagenz wurde aufgetaut und abgedunkelt auf Raumtemperatur erwärmt, bevor mithilfe des Multisteppers (Eppendorf AG, Hamburg) 40 µl des Reagenz in jedes Well der zu messenden 96-Well-Platte gegeben wurden. Dann wurde die Platte für zehn Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Der Inhalt der Wells wurde anschließend auf eine weiße 96-Well-Platte für Lumineszenz-Messungen überführt und das Lumineszenz-Signal am Tecan-Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen.

### **2.3.2 BrdU-Proliferationsassay**

Der BrdU-Proliferationsassay (Sigma, München) beruht auf dem Einbau des Thymidinanalogons Bromodesoxyuridin (BrdU) in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen. Mithilfe eines immunchemischen Nachweises des eingebauten BrdUs kann die Zellproliferation quantifiziert werden. Die verwendeten Substanzen wurden bei 4 °C gelagert und für die Versuche auf Raumtemperatur erwärmt.

Bestandteil	Beschreibung
BrdU labeling reagent	5-Bromo-2'-desoxyuridin zum Einbau in neu synthetisierte DNA
FixDenat	Lösung zur Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA
Anti-BrdU-POD	monoklonaler anti-BrdU-Antikörper konjugiert mit Peroxidase (POD)
Antibody dilution solution	Verdünnungslösung
Washing buffer	Waschpuffer
Substrate Solution	Tetramethylbenzidin als Substrat der Peroxidase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	zur Beendigung der Peroxidase-Reaktion
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 15:** Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Sigma, München)

Zunächst wurden 10 µl BrdU in jedes Well gegeben und während der 24-stündigen Inkubationszeit anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Anschließend wurden pro Well 200 µl Fix/Denat hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch konnten die Zellen fixiert und die DNA partiell denaturiert werden, um so das eingebaute BrdU für die folgende Antikörperreaktion zugänglich zu machen. Anschließend wurde das Fix/Denat abgegossen und durch 100 µl des anti-BrdU-POD-Antikörpers ersetzt, der das freigesetzte BrdU detektiert. Nach einstündiger Inkubation wurde der überschüssige, ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit Wash Buffer (1:10 verdünnt in PBS) entfernt. Mithilfe von 100 µl Substrate Solution wurde eine Farbreaktion katalysiert durch die antikörpergebundene Peroxidase ausgelöst, die nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mithilfe von 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beendet wurde. Die Messung der Farbreaktion erfolgte spektrophotometrisch bei 450 nm am Tecan-Reader (Tecan, Crailsheim). Nach Abzug der Leerwerte ohne Zellen und Normalisierung auf Kontrollzellen konnte so die Proliferation quantifiziert werden.

### 2.3.3 CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätsassay

Mithilfe des CytoTox-Glo™-Zytotoxizitätsassays (Promega, Mannheim) wurde die Zytotoxizität der Zellpopulationen bestimmt. Dabei wird das AAF-Glo™-Substrat (Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluciferin) selektiv in tote Zellen mit fehlender Membranintegrität aufgenommen und durch die sogenannte *dead cell protease* gespalten, sodass Aminoluciferin freigesetzt wird. Dieses führt als Substrat der Luciferase zu einer Lichtproduktion proportional zur Anzahl toter Zellen.

Das CytoTox-Glo™-Reagenz wurde bei -20 °C gelagert, vor Beginn der Messung auf Raumtemperatur erwärmt, mit Assay-Puffer rekonstituiert und auf 37 °C erwärmt. Pro Well wurden 50 µl Reagenz zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Lumineszenz-Messung wurden die Überstände der Wells anschließend auf eine weiße 96-Well-Platte übertragen und das Lumineszenz-Signal mittels Tecan-Reader (Tecan, Crailsheim) bestimmt.

### **2.3.4 Caspase3/7-Assay**

Der Caspase-Glo® 3/7-Assay (Promega, Mannheim) dient der Untersuchung der Apoptose über Messung der Aktivität der Caspasen 3 und 7. Durch Zugabe eines luminogenen Caspase-3/7-Substrates wird ein Lumineszenzsignal proportional zur Caspaseaktivität erzeugt. Das Kit wurde bei -20 °C gelagert und vor Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt.

Zu den Zellen in einer 96-Well-Platte wurden 100 µl des Caspase-Glo® 3/7-Reagenz hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Überstände der Wells auf eine weiße 96-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) übertragen und das Lumineszenz-Signal am Tecan-Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen.

## **2.4 Untersuchung der Proteinexpression und -aktivität**

### **2.4.1 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Stimulation auf die Menge und Aktivität von Proteinen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation Zelllysate angefertigt. Nach einem gemeinsamen Anfangsschritt zur Herstellung von Zellpellets wurden verschiedene Lyseformen angewendet, um die Proteine aus unterschiedlichen Zellkompartimenten zu gewinnen. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde im Anschluss photometrisch bestimmt, sodass der Einsatz der exakten Proteinmenge im Western Blot ermöglicht wurde.

#### **2.4.1.1 Herstellung von Zellpellets**

Zu Beginn wurde das Medium von den Zellschalen abgegossen und jede Platte mit 800 µl PBS gespült. Dann wurden in erneut 800 µl PBS die Zellen mithilfe eines Plastischabers von ihrer Platte abgeschabt und die Zellsuspension in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden an der Tischzentrifuge (NeoLab, Heidelberg) für eine Minute zentrifugiert, bis ein Pellet entstand, von dem das überstehende PBS abpipettiert und verworfen wurde. Das Pellet konnte sofort für die verschiedenen Lyseformen weiterverwendet werden oder zunächst bei -80 °C eingefroren werden.

### 2.4.1.2 DLB-Lyse (Ganzzelllyse)

Mit dieser Methode wurde die gesamte Zelle aufgeschlossen und alle enthaltenen Proteine extrahiert.

Für die DLB-Lyse wurde die Stammlösung 2xDLB-Puffer im Verhältnis 1:1 mit Ultra Pure Water und einem Prozent Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II angesetzt. Die Zellpellets wurden je nach Größe in 50-100 µl des angesetzten Puffers resuspendiert und anschließend für fünf Minuten bei 95 °C am Heizblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Zum vollständigen Aufbrechen der Zellmembranen wurden die Proben danach für jeweils zweimal fünf Impulse am Ultraschallstab (Bandelin electronic, Berlin) lysiert und für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Biofuge Fresco, Thermo Fisher, Darmstadt). Der so entstandene Überstand wurde in neue 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für die Proteinbestimmung verwendet.

Inhaltsstoff	Konzentration/Menge
SDS	2 %
Tris (pH 7,4)	20 mM
<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>	

**Tabelle 16:** Zusammensetzung des 2xDLB-Puffers

### 2.4.1.3 Membran- und Zytoplasmaproteinlyse

Ziel der Lyse ist es, die Membran- und Zytoplasmaproteine getrennt zu extrahieren, um die Membranproteine gezielt untersuchen zu können. Verwendet wurde das Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt).

Bestandteil	Beschreibung
Cytoplasmic Extraction Buffer (CEB)	Puffer zur Freisetzung zytoplasmatischer Proteine
<i>Bei -20 °C gelagert.</i>	
Membrane Extraction Buffer (MEB)	Puffer zur Lyse verbliebener Zellorganellen und Proteine
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Protease-Inhibitor
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 17:** Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt)

Unmittelbar vor Beginn der Lyse wurden die Puffer durch Hinzugabe von 1 % Phosphatase-Inhibitor-Cocktail vorbereitet und für die gesamte Dauer der Lyse auf Eis gelagert.

Das Zellpellet wurde zunächst abhängig von dessen Volumen in dem zehnfachen Volumen an CEB resuspendiert und für zehn Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Proben zu Beginn einmal mit dem Vortexer, dann durch regelmäßiges Anschnipsen gemischt wurden. Der CEB bewirkt eine selektive Permeabilisierung der Zellmembran, sodass lösliche zytoplasmatische Proteine freigesetzt werden konnten. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der die freigesetzten Zytoplasmaproteine enthielt, in ein neues, zuvor gekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Extraktion der Membranproteine wurde das verbliebene Pellet in dem zehnfachen Volumen an MEB resuspendiert und erneut unter Vortexen und Anschnipsen für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Dadurch konnten unlösliche Zytoplasmabestandteile sowie Zellorganellen lysiert werden, nur die Zellkerne blieben intakt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der nun die Membranproteine enthielt, in ein neues, zuvor gekühltes 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet aus dem letzten Zentrifugierschritt, das die intakten Zellkerne enthielt, wurde verworfen und die Überstandsproben mit den extrahierten Zytoplasma- und Membranproteinen zur Proteinbestimmung verwendet.

#### 2.4.2 Proteinbestimmung

Standardwert	Ultra Pure Water	Proteinstandard
0,1 mg/ml	65 µl	5 µl
0,2 mg/ml	60 µl	10 µl

**Tabelle 18:** Zusammensetzung der Standardreihe

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde zunächst eine Standardreihe als Referenzwert angesetzt. Die zu messenden Proben wurden mit Ultra Pure Water im Verhältnis 1:30 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 20 µl des Ultra Pure Waters, der beiden Standardwerte und der verdünnten Proben in Küvetten vorgelegt. Vor dem Pipettieren wurden diese gevortext. Zu den vorgelegten Substanzen wurden 980 µl der 1:5 verdünnten Färbelösung Dye Reagent hinzugegeben und die Küvetten gevortext, bevor sie für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Danach wurde die Absorption der Proben bei 595 nm am Photometer (Hitachi, Wiesbaden) gemessen.

Das Prinzip der Messung mithilfe der Dye-Reagent-Lösung beruht auf der Proteinbestimmung nach Bradford. Durch die Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des in der Dye-Reagent-Lösung enthaltenen Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 470 nm auf



595 nm, was eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten bewirkt. Photometrisch gemessen gegen die Extinktion des freien Farbstoffs im Leerwert mit Ultra Pure Water kann aus der Zunahme der Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden. Dazu wurde die unten beschriebene Gleichung verwendet. Für die Berechnung wurde der Standardwert ausgewählt, dessen Absorption näher an der der Probe lag.

$$K \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Absorption (Probe)} \times \text{Konzentration (Standard)}}{\text{Absorption (Standard)}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

**Gleichung 1:** Gleichung zur Konzentrationsbestimmung

Aus der Konzentration wurde mittels Dreisatz ermittelt, welches Volumen einer Proteinmenge von 20 µg entsprach. Die Proben konnten direkt weiterverwendet werden oder zur Aufbewahrung zunächst bei -80 °C eingefroren werden.

### 2.4.3 Probenverdünnung

Für den Western Blot wurden 20 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Zum Protein wurden 2 µl 5x-Sample-Buffer hinzugegeben und die Probe mit Ultra Pure Water so aufgefüllt, dass das Gesamtvolumen 10 µl entsprach. In dem Fall, dass das benötigte Probenvolumen für 20 µg Protein größer war als 8 µl, wurde die Menge an Sample Buffer so erhöht, dass Probe und Sample Buffer weiterhin im Verhältnis 4:1 standen. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und für fünf Minuten bei 95 °C gekocht, um durch Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen. Bis zu ihrem Einsatz im Western Blot wurden die verdünnten Proben bei -80 °C aufbewahrt.

Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
Tris (pH auf 6,8 mit HCl)	312,5 mM
SDS	10 %
2-Mercapto-Ethanol	10 %
Glycerol	50 %
Bromphenolblau	einige Kristalle
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des 5x Sample Buffers

## 2.4.4 Western Blot

### 2.4.4.1 Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Das im Sample Buffer enthaltene anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladung der aufzutrennenden Proteine, sodass sie alle negativ geladen sind und im Gel Richtung Anode laufen. Je kleiner das Protein dabei ist, desto schneller läuft es durch die Maschen des Gels.

### 2.4.4.2 Gießen der Gele für Gelelektrophorese

Als Vorbereitung wurden zunächst das benötigte Rück- und Deckglas (Bio-Rad Laboratories, München) sowie der Kamm mit A. bidest. und 70 % Ethanol gereinigt. Die Scheiben wurden aufeinandergesetzt und in die Halterung (Mini PROTEAN® System Gelgießstand, Bio-Rad Laboratories, München) eingesetzt.

Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel, die durch radikalische Polymerisation mithilfe des Radikalstarters APS und dem Katalysator TEMED entstehen. Das Trenngel wurde entsprechend der unten stehenden Zusammensetzung in einem 15- oder 50-ml-Röhrchen angesetzt und vorsichtig geschüttelt, um die Polymerisierung zu aktivieren. Dann wurde das angesetzte Trenngel mithilfe einer Plastikpipette bis knapp unter den Querbalken der Halterung zwischen die Glasscheiben gefüllt und die Oberfläche durch Übersichten mit A. bidest. geglättet. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde das übergeschichtete Wasser abgegossen und das Sammelgel nach der oben genannten Zusammensetzung angesetzt und über das Trenngel geschichtet. Entstandene Luftblasen wurden mit der Plastikpipette entfernt und der Kamm (Bio-Rad Laboratories, München) zur Aussparung der Taschen in das Sammelgel eingesetzt. Nach einer erneuten Polymerisationszeit von 40 Minuten wurde der Kamm entfernt und das Gel mitsamt den beiden Glasscheiben aus der Halterung gelöst. Bis zur Verwendung konnte das Gel für bis zu 14 Tage in mit A. bidest. getränkten Tüchern luftdicht verpackt in einer Plastiktüte bei 4 °C aufbewahrt werden.

Inhaltsstoff	10 % Trenngel	12 % Trenngel	Sammelgel
Wasser	4,17 ml	3,5 ml	2,3 ml
Acrylamid	3,33 ml	4 ml	670 µl
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	-	1 ml
APS	50 µl	80 µl	30 µl
TEMED	9 µl	9 µl	9 µl
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>			

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese

Inhaltsstoff	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
Tris	72,7 g	24,2 g
A. bidest.	300 ml	150 ml
	mit 25 % HCl auf pH 8,8 einstellen	mit 25 % HCl auf pH 6,8 einstellen
SDS (10% Lösung)	16 ml	16 ml
A. bidest.	ad 400 ml	ad 400 ml
Bromphenolblau	-	einige Kristalle
<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>		

**Tabelle 21:** Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgelpuffers

#### 2.4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aus 100 ml der Stammlösung 10x Elektrophoresepuffer wurde mit 900 ml A. bidest. der 1x Elektrophoresepuffer hergestellt.

Die Gele wurden mit der kurzen Scheibe nach innen in die Halterung der Laufkammer (Subcell® GT Cell, Bio-Rad Laboratories, München) eingesetzt und die Laufkammer sowie der Bereich zwischen den Gelen mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Um Gelreste zu entfernen, wurden die Taschen des Gels mit 1x Elektrophoresepuffer gespült, bevor die verdünnten Proben sowie der Marker Chameleon Duo™ mit seinen bekannten Proteingrößen aufgetragen wurden. Daraufhin wurde die Laufkammer verschlossen und an den Power Supply (Bio-Rad Laboratories, München) angeschlossen. Die Proben wurden zunächst für 15 Minuten bei 100 V, dann bei 150 V aufgetrennt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte. Anschließend wurde die Halterung aus der Laufkammer entfernt und das Gel mithilfe eines Spatels aus den Glasscheiben gelöst.

Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
Tris (pH auf 8,3 mit HCl)	0,25 M
Glycin	2 M
SDS	0,03 M
<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>	

**Tabelle 22:** Zusammensetzung des 10x Elektrophoresepuffers (Stammlösung)

#### 2.4.4.4 Semi Dry Blot

Für den Semi Dry Blot wurden 12-prozentige Gele verwendet. Ziel war es, die Proteine des SDS-Gels auf eine Membran zu übertragen, damit diese anschließend durch spezifische Primärantikörper gebunden und durch Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden konnten.

Pro Gel wurden fünf Dreierstapel Whatmanpapier sowie eine Nitrozellulosemembran bereitgelegt. Die Puffer wurden 2 cm hoch in eine Glaswanne gefüllt. Die ersten beiden Dreierstapel Whatmanpapier wurden in Anodenpuffer 2 getränkt, kurz an der Wannenwand abgeschlagen und mithilfe der Walze zu einem luftblasenfreien Stapel geschichtet. Darauf kamen drei Whatmanpapiere in Anodenpuffer 1 sowie die ebenfalls in Anodenpuffer 1 aktivierte Membran. Auf die Membran wurde das Gel geschichtet, das mithilfe des in Kathodenpuffer getauchten Spatels geglättet und mit zwei Dreierstapeln Whatmanpapier in Kathodenpuffer bedeckt wurde. Der Stapel wurde erneut gewalzt und mit der Kathodenseite nach unten auf den Blotter (Phase, Lübeck) gelegt. Der Blotter wurde verschlossen und an den Power Supply (Bio-Rad Laboratories, München) angeschlossen, der das Gel mit einer Spannung von 20 V und einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 60 Minuten blottete. Nach Abschluss des Blottings wurde der Stapel auseinandergebaut und die Membran für die Weiterverarbeitung bereitgelegt.

Puffer	Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
Kathodenpuffer	Tris	25 mM
	Aminhexansäure	40 nM
	SDS	0,01 %
	Ethanol	20 %
Anodenpuffer 1	Tris	30 mM
	Ethanol	20 %
Anodenpuffer 2	Tris	300mM
	Ethanol	20 %
<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>		

**Tabelle 23:** Zusammensetzung der Pufferlösungen für den Semi Dry Blot

#### 2.4.4.5 Tank Blot

Im Tank Blot wurden 10-prozentige Gele verwendet mit dem Ziel, größere Proteine besser sichtbar zu machen.

Als Vorbereitung wurde eine Plastikwanne mit 1x Tank Blot Puffer gefüllt und das Tank Blot Insert (Bio-Rad Laboratories, München) sowie die zwei Schwämme in den Puffer gelegt. Auf der weißen Seite des Inserts wurde nun der Stapel bestehend aus einem Schwamm, zwei Whatmanpapieren, der Membran, dem Gel, zwei weiteren Whatmanpapieren und einem weiteren Schwamm aufgebaut. Die einzelnen Komponenten wurden zuvor in Tank Blot Puffer aktiviert und die zwischen den Schichten liegenden Luftblasen mithilfe der Walze entfernt. Dann wurde das Insert verschlossen und zusammen mit der Eiswanne in die Blotting Kammer (Bio-Rad Laboratories, München) eingesetzt. Das übrige Kammervolumen wurde mit 1x Tank Blot Puffer aufgefüllt und die Kammer anschließend verschlossen und an den Power Supply (Bio-Rad Laboratories, München) angeschlossen. Für das Blotting wurden eine Spannung von 100 V, eine Stromstärke von 400 mA und eine Zeit von 60 Minuten benötigt.

Inhaltsstoff	Menge
Glycerin	144 g
Tris	20 g
A. bidest.	auf 1 l Gesamtvolumen auffüllen
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 24:** Zusammensetzung 10x Tank Blot Puffer

Inhaltsstoff	Menge
10x Tank Blot Puffer	100 ml
Ethanol	200 ml
A. bidest.	700 ml
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 25:** Zusammensetzung 1x Tank Blot Puffer

#### 2.4.4.6 Zuschneiden und Blockieren

Die Membran wurde mithilfe eines Skalpells in 1x Tris-buffered saline (TBS) zugeschnitten und kurz mit 1x TBS abgespült. Anschließend wurde sie für eine Stunde mit 4 ml Blocking Solution auf dem Schüttler (Polymax 2040, Heidolph, Kehlheim) blockiert.

#### 2.4.4.7 Inkubation, Waschen und Scannen

Nach Entfernung der Blocking Solution wurde der Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler (Polymax 2040, Heidolph, Kehlheim) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran einmal mit 1x Tween-Tris-buffered saline (TTBS) abgespült und anschließend dreimal fünf Minuten in 1x TTBS gewaschen. Dann wurde der entsprechende Sekundärantikörper auf die Membran gegeben und abgedunkelt für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls entfernt und die Membran erneut mit 1x TTBS abgespült und dreimal für fünf Minuten abgedunkelt in 1x TTBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran abgedunkelt für fünf Minuten in 1x TBS gewaschen und am Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) gescannt.

Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
Tris	1 M
NaCl	1,5 M
A. bidest.	auf 800 ml auffüllen
HCl 25%	zur Einstellung des pHs auf 7,5
Tween 20	9 mM
A. bidest.	auf 1000 ml auffüllen
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 26:** Zusammensetzung 10x TTBS

## 2.5 Untersuchung der Genexpression mittels TaqMan-Assay

### 2.5.1 Herstellung von Zellpellets

Die Zellpellets wurden wie bei der Herstellung von Zelllysaten beschrieben hergestellt und bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.5.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das E.Z.N.A Total RNA Kit I (Omega bio-tek, Norcross, USA) verwendet.

Bestandteil	Beschreibung
HiBind® RNA Mini Column	Säule zur Zentrifugation
2 ml-Collection Tubes	Sammelgefäß zum Einsatz in Säule
TRK Lysis Buffer	Puffer zur Lyse von Zellen und Geweben
RNA Wash Buffer I	Waschpuffer
RNA Wash Buffer II	Waschpuffer
<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>	

**Tabelle 27:** E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega bio-tek, Norcross, USA)

Zu dem Zellpellet wurden zunächst 700 µl TRK Lysis Buffer, dann 700 µl 70 %iger Ethanol hinzugefügt und durch Vortexen vermischt. Der gesamte Inhalt wurde anschließend in eine Säule in einem Collection Tube gegeben und für eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Danach wurde die Probe erneut gewaschen und bei 10.000 g zentrifugiert, erst mit 500 µl Wash Buffer I für 30 Sekunden, dann zweimal mit 500 µl Wash Buffer II für eine Minute. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert und der gesamte Durchfluss im Collection Tube verworfen. Die Säule wurde in ein Reaktionsgefäß gestellt und für zwei Minuten mit je 40 µl DEPC Water bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie erneut für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Anschließend konnte die Säule entfernt und die RNA-Menge am Photometer gemessen werden.

### 2.5.3 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde photometrisch am NanoPhotometer (Implen, München) bestimmt. Als Referenzwert für die Absorptionsmessung bei 260 nm wurde das RNA-freie DEPC verwendet.

### 2.5.4 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription der extrahierten mRNA in komplementäre cDNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) verwendet.

Bestandteile	Menge zur Zusammensetzung des Mastermixes
10x RT-Buffer	2,0 µl
25x dNTP-Mix	0,8 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl
Multi Scribe RT	1,0 µl
RNAse-Inhibitor	1,0 µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	3,2 µl
<i>Bei -20 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 28:** High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt)

RT: Reverse Transkriptase, dNTP: desoxy-Nukleosidtriphosphat.

Zur Vorbereitung wurden die Kit-Anteile aufgetaut und auf Eis gelagert. Pro RNA-Probe wurde auf Eis ein Master Mix nach der oben beschriebenen Zusammensetzung angesetzt. Zu dem Master Mix wurden je 1000 ng der RNA-Probe hinzugegeben und die Probe mit Nuclease-freiem Wasser auf insgesamt 20 µl aufgefüllt. Durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Probe gemischt und danach kurz zentrifugiert. Bis zur reversen Transkription wurde die Probe auf Eis aufbewahrt.

Für die Reverse Transkription wurde der Thermocycler (T100™, Bio-Rad Laboratories, München) programmiert:

Step 1	25 °C	10 Minuten
Step 2	37 °C	120 Minuten
Step 3	85 °C	5 Minuten
Step 4	4 °C	∞

Die cDNA wurde bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

### 2.5.5 TaqMan-Assay

Mithilfe des TaqMan-Assays kann eine quantitative Aussage über die RNA-Expression der Zielgene getroffen werden. Der TaqMan-Assay nutzt dabei das Prinzip der Real-Time-PCR, bei der PCR-Amplifikation und –Nachweis in einem Schritt verbunden werden. Der verwendete TaqMan-Assay enthält dazu spezifisch für die entsprechende Ziel-RNA unmarkierte Vorwärts- und Rückwärtsprimer



sowie eine TaqMan-Sonde mit einer Fluoreszenzfarbstoffmarkierung und einem Quencher, der zunächst das Fluoreszenzsignal unterdrückt.

Die Real-Time PCR beginnt mit dem Binden von Primer und Sonde an ihre spezifischen Zielsequenzen. Die Taq-DNA-Polymerase synthetisiert daraufhin die komplementären Stränge. Bei Erreichen der Sonde wird diese durch eine Nuclease geschnitten und so der Fluoreszenzfarbstoff vom neutralisierenden Quencher getrennt. Das so entstehende Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge des Zielgens und wird mithilfe des Ct-Werts (Schwllwertzyklus) quantifiziert.

Die cDNA-Proben wurden vor Beginn 1:1 mit Nuclease-freiem Wasser vorverdünnt.

Inhaltsstoff	Menge
20x TaqMan-Assay	0,5 µl
2x TaqMan Universal Master Mix	5 µl
vorverdünnte cDNA	1 µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	3,5 µl
<i>Bei -20°C gelagert.</i>	

**Tabelle 29:** Zusammensetzung des Reaktionsmixes für eine Reaktion

Für jedes Assay wurden Doppelwerte für die Zielgene sowie eine Negativkontrolle ohne cDNA nach der oben stehenden Zusammensetzung angesetzt und auf in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Anschließend wurde die Platte versiegelt, gevortext und bei 200 g eine Minute zentrifugiert und zur Messung in den QuantStudio 7 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) eingesetzt.

## 2.6 Untersuchung der Proteinfreisetzung mittels ELISA

Ziel des HGF-ELISAs ist die quantitative Messung des HGF-Spiegels im Überstand der Zellkulturen. Der ELISA funktioniert dabei nach dem Sandwich-Prinzip: Auf eine Platte mit gebundenem HGF-Antikörper werden Standardwerte und Proben des Überstands pipettiert und das enthaltene HGF gebunden. Nachdem die ungebundenen Substanzen abgewaschen wurden, wird ein Enzym-gekoppelter HGF-Antikörper auf die Platte gegeben, der an das gebundene HGF bindet. Nach einer erneuten Waschung zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wird dessen Substrat dazugegeben und somit eine Farbreaktion proportional zur Menge an gebundenem HGF gestartet. Die Reaktion wird durch eine Stop-Lösung beendet und kann daraufhin photometrisch gemessen werden.

Für den HGF-ELISA wurde das Human HGF Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet. Zu Beginn wurden die benötigten Lösungen nach Herstellerangaben vorbereitet. In die Antikörper-beschichteten Wells der Streifen wurden 100 µl Assay Diluent sowie 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe gegeben, bevor sie versiegelt und für zwei Stunden auf einem Schüttler (Polymax 2040, Heidolph, Kehlheim) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Wells viermal mit der Waschlösung gewaschen und nach Zugabe von 200 µl des Enzym-gekoppelten Antikörpers HGF-Conjugate erneut versiegelt und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch vier weitere Waschgänge entfernt und die Proben für mit 200 µl Streptavidin-HRP 1 inkubiert, bevor letzteres erneut abgewaschen wurde. Die Wells wurden anschließend lichtgeschützt mit 200 µl Substrate Solution für 30 Minuten inkubiert, bevor die Farbreaktion durch 50 µl Stop Solution pro Well beendet wurde. Anschließend konnten die Proben am Tecan-Reader (Tecan, Crailsheim) bei 450 nm und Wellenlängen-Korrektur von 540 nm gemessen werden.

Bestandteile	Beschreibung
Human HGF Microplate	8-Well-Streifen beschichtet mit monoklonalem HGF-Antikörper
Human HGF Standard	humanes pro-HGF
Human HGF Conjugate	polyklonaler HGF-Antikörper gekoppelt an Horseradish-Peroxidase
Streptavidin-HRP 1	Streptavidin-konjugierte Horseradish-Peroxidase 1
Assay Diluent RD1W	Puffer
Calibrator Diluent RD5P Concentrate	Puffer, Verwendung 1:5 verdünnt
Wash Buffer Concentrate	Waschlösung, Verwendung 1:25 verdünnt
Color Reagent A	1:1 angesetzt zu Substrate Solution
Color Reagent B	
Stop Solution	zur Beendigung der Reaktion
Plate Sealers	Klebestreifen zur Versiegelung der Streifen
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 30:** Human HGF Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems, Wiesbaden)

Außerdem wurden mithilfe des Human IGF2 Quantikine® ELISA Kits (R&D Systems, Wiesbaden) die IGF2-Spiegel bestimmt. Die Durchführung ähnelte dabei dem HGF-ELISA mit einigen Abänderungen. Die Proben wurden vor Beginn mit je 50 µl Pretreatment G und H vorbehandelt und mit Calibrator

Diluent vorverdünnt. Anstelle des Assay Diluents wurden 50 µl Calibrator Diluent zu den Wells gegeben und für nur eine Stunde inkubiert. Das IGF2-Conjugate hingegen wurde für zwei Stunden inkubiert. Streptavidin und der dazugehörige Waschschrift wurden nicht benötigt.

Bestandteile	Beschreibung
Human IGF2 Microplate	8-Well-Streifen beschichtet mit monoklonalem IGF2-Antikörper
Human IGF2 Standard	humanes IGF2
Human IGF2 Conjugate Concentrate	konzentrierter polyklonaler IGF2-Antikörper gekoppelt an Horseradish-Peroxidase
Conjugate Diluent 33	Puffer
Calibrator Diluent RD5-42	Puffer
Pretreatment G und H	zur Vorbehandlung der Proben
Wash Buffer Concentrate	Waschlösung, Verwendung 1:25 verdünnt
Color Reagent A	1:1 angesetzt zu Substrate Solution
Color Reagent B	
Stop Solution	zur Beendigung der Reaktion
Plate Sealers	Klebestreifen zur Versiegelung der Streifen
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	

**Tabelle 31:** Human IGF2 Quantikine® ELISA Kits (R&D Systems, Wiesbaden)

## 2.7 Statistische Analyse

Alle hier beschriebenen Versuche wurden mindestens viermal wiederholt. Zur statistischen Analyse der Zählversuche wurde die Software GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, USA) verwendet. Nach der Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden zur Testung auf statistische Signifikanz Varianzanalysen (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Der  $\alpha$ -Fehler wurde auf 0,05 festgesetzt. Die Signifikanzniveaus wurden in den Abbildungen durch die Symbole „\*“, „\$“, „#“ und „x“ dargestellt, wobei ein Symbol (\*, \$, # oder x)  $p < 0,05$ , zwei Symbole (\*\*, \$\$, ## oder xx)  $p < 0,01$  und drei Symbole (\*\*\*, \$\$\$, ### oder xxx) einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  entsprechen.

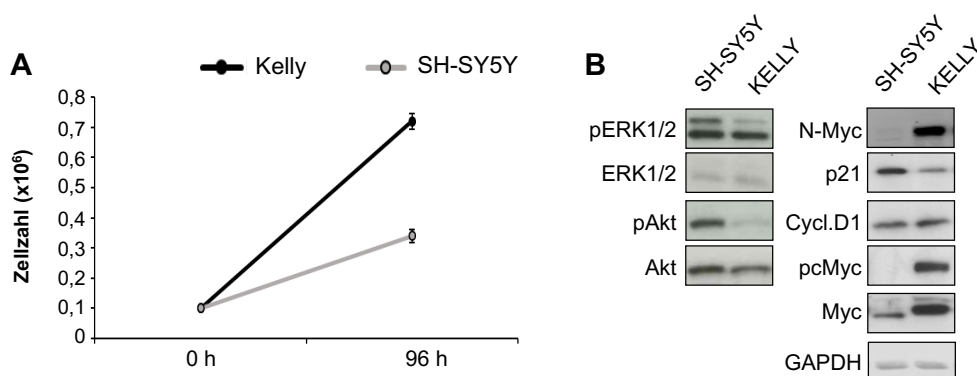
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der naiven Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Vollmedium

Zunächst wurden die beiden Zelllinien Kelly und SH-SY5Y unter optimalen Wachstumsbedingungen charakterisiert. Verschiedene Indikatoren für Überleben, Wachstum und Zelltod wurden untersucht und die Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression und Freisetzung von Wachstumsfaktoren verglichen. Durch gezielte Supplementation bzw. Inhibition von Wachstumsfaktoren wurde deren Bedeutung für die Zelllinien in Vollmedium überprüft.

##### 3.1.1 Verhalten der naiven Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen

Beide Zelllinien wurden mit  $0,1 \times 10^6$  Zellen auf 6-well-Platten ausgesät und unter optimalen Wachstumsbedingungen für 96 Stunden kultiviert, bevor ihre Zellzahl am CASY-Counter bestimmt wurde. Mittels DLB-Lyse und Western Blot wurden Proteinmenge und Aktivierung verschiedener Kinasen, Zellzyklusmarker und Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei diente die Phosphorylierung (p) als Nachweis der Aktivität, die normalisiert auf das nicht-phosphorylierte Protein bestimmt wurde. Kelly-Zellen zeigten hierbei im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen eine schnellere Proliferation ( $0,72 \times 10^6$  gegen  $0,34 \times 10^6$ ) bei geringerer Aktivierung der Kinasen ERK1/2 und Akt und geringerer Proteinmenge des Zellzyklusinhibitors p21. Für die Transkriptionsfaktoren c-Myc, N-Myc und pc-Myc sowie den Zellzyklusstimulator Cyclin D1 konnten höhere Proteinmengen in Kelly-Zellen festgestellt werden. GAPDH im Western Blot diente als Auftragskontrolle (Abb. 2).

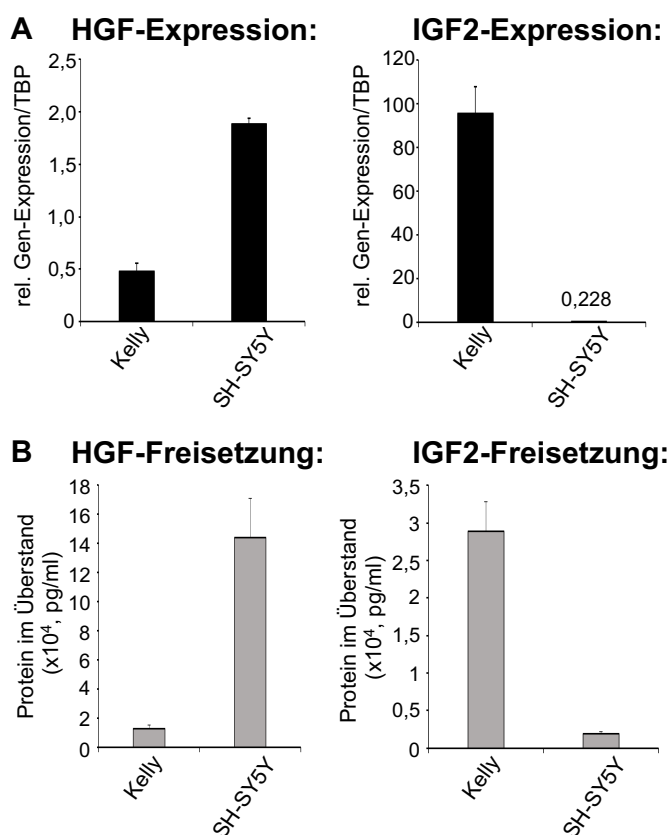


**Abbildung 2:** Wachstum naiver Zellen in Vollmedium, 96 h

**A:** Zellzählung der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mittels CASY-Counter vor und nach 96-stündiger Inkubation in Vollmedium unter optimalen Wachstumsbedingungen. Aussaat von  $0,1 \times 10^6$  Zellen, nach 96 Stunden (h)  $0,72 \times 10^6$  Kelly-Zellen und  $0,34 \times 10^6$  SH-SY5Y-Zellen.

**B:** Western Blot mit DLB-Lysaten nach 96-stündiger Inkubation von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen in Vollmedium. Dargestellt sind die inaktiven und aktiven (p) Formen der Kinasen ERK1/2 und Akt, die Transkriptionsfaktoren Myc, N-Myc und pc-Myc sowie die Zellzyklusproteine p21 und Cyclin D1 (Cycl. D1). GAPDH wurde als Auftragskontrolle verwendet.

Mittels TaqMan-Assays und ELISA wurden die Expression und Freisetzung der Wachstumsfaktoren EGF, IGF1, IGF2 und HGF unter optimalen Wachstumsbedingungen untersucht. Eine Expression von EGF und IGF1 konnte weder in Kelly- noch in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden. IGF2 und HGF konnten in beiden Zelllinien detektiert werden, es ergaben sich jedoch Unterschiede zwischen den Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene. IGF2 wurde stärker durch Kelly-Zellen exprimiert und freigesetzt, HGF hingegen stärker durch SH-SY5Y-Zellen (Abb. 3). EGF wurde zwar von keiner der beiden Zelllinien exprimiert, jedoch kann der EGF-Rezeptor kooperativ in die Signalwege von HGF und IGF2 eingebunden sein (Byeon et al. 2019). Daher wurde EGF zusätzlich zu HGF und IGF2 in den weiteren Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet.



**Abbildung 3:** Expression und Freisetzung von HGF und IGF2 im Vergleich

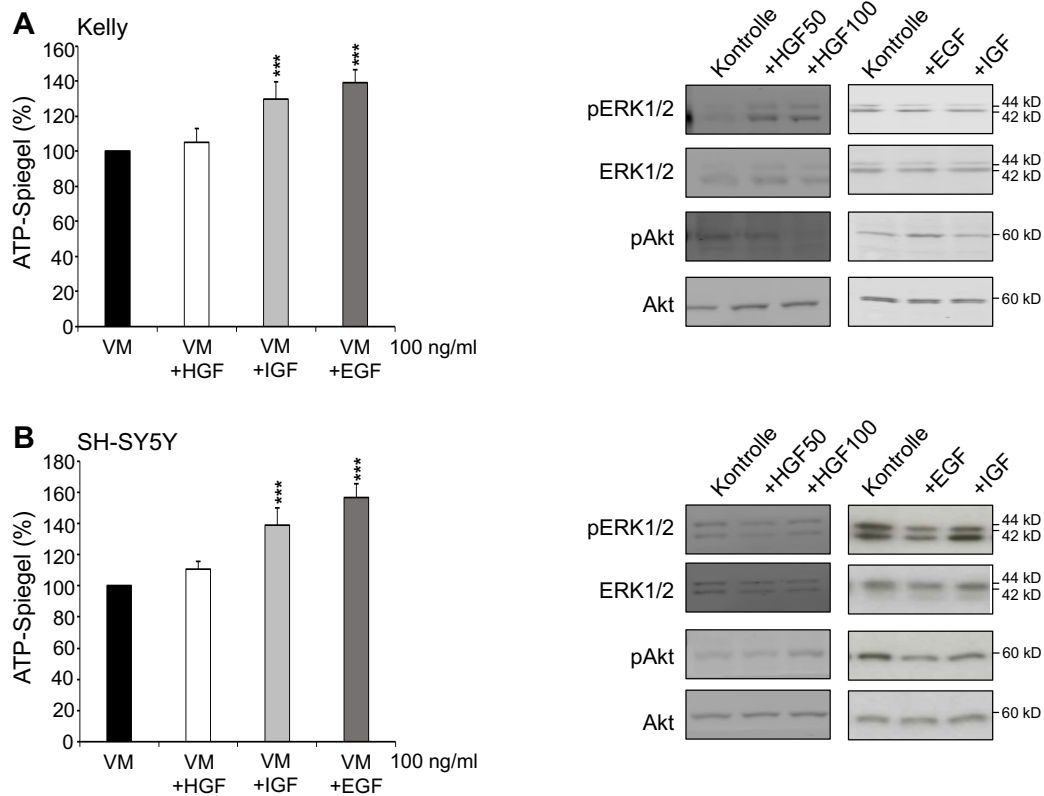
**A:** relative Darstellung der Genexpression von HGF und IGF2 im TaqMan-Assay in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen. TBP wurde als endogene Kontrolle verwendet.

**B:** Messung der Freisetzung von HGF und IGF2 im Überstand mittels ELISA in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen.

### 3.1.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren

Um die Funktion der Wachstumsfaktoren EGF, IGF2 und HGF unter optimalen Wachstumsbedingungen näher zu betrachten, wurden die naiven Zellen für 72 Stunden in Vollmedium mit Zugabe von jeweils 100 ng/ml HGF, IGF2 oder EGF inkubiert. Anhand der ATP-Spiegel wurden nach der CellTiter-Glo®-Methode Rückschlüsse auf die Anzahl lebender Zellen gezogen.

Bei beiden Zelllinien zeigte sich eine Erhöhung der Menge an lebenden Zellen durch Supplementation von IGF2 oder EGF, nicht aber durch HGF (Abb. 4, A und B). Obwohl die HGF-Gabe bei Kelly-Zellen nicht zu einer Erhöhung der Zellzahl führte, konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 festgestellt werden. Die Akt-Aktivität war nach HGF-Gabe sogar leicht reduziert. Dieses Phosphorylierungsmuster ließ sich bereits bei einer Konzentration von HGF von 50 ng/ml nachweisen. Eine Inkubation der Kelly-Zellen mit EGF führte lediglich zu einer erhöhten Akt-Phosphorylierung, während die ERK1/2-Phosphorylierung stabil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle blieb. Bei IGF2-Gabe blieb sowohl die Phosphorylierung von ERK1/2 als auch von Akt auf Kontrollniveau (Abb. 4, A). Die Proteinmengen wurden nicht verändert. Anders als bei den Kelly-Zellen konnte bei den SH-SY5Y-Zellen nach der Applikation von 100 ng/ml HGF eine erhöhte Phosphorylierung von Akt beobachtet werden, nicht jedoch von ERK1/2. Die Supplementation von EGF oder IGF2 reduzierten die Akt-Aktivität, im Fall von EGF auch die ERK1/2-Aktivität im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle (Abb. 4, B). Auch hier blieben die Proteinmengen während der Inkubation mit den Wachstumsfaktoren gleich.

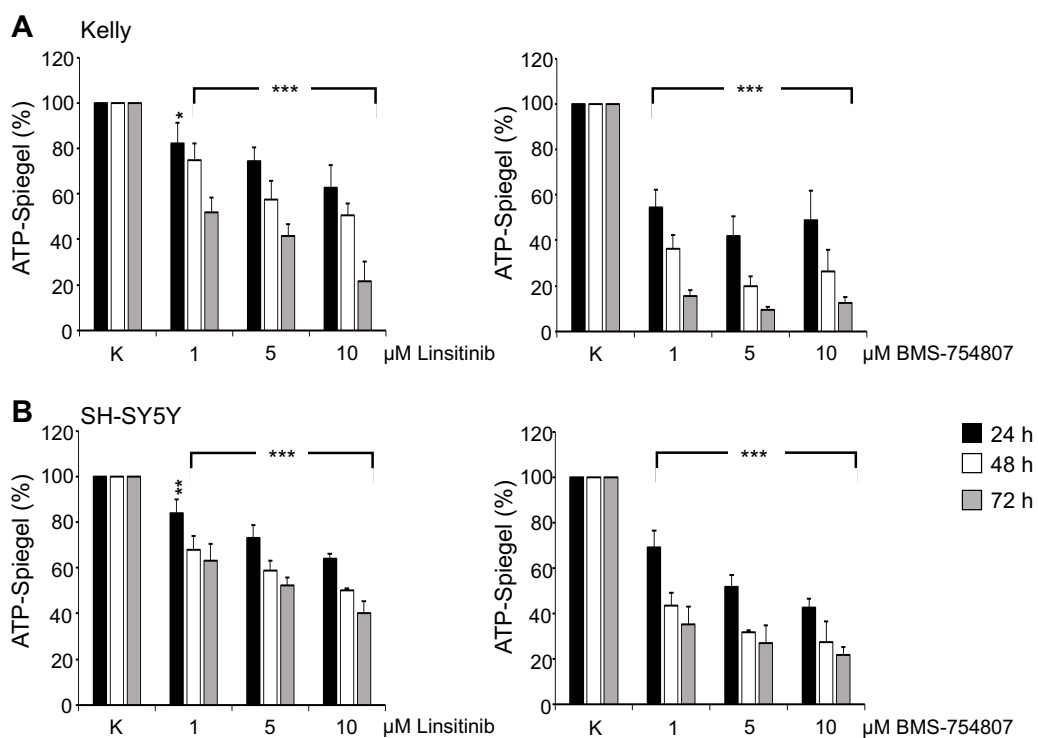


**Abbildung 4:** ATP-Spiegel und Kinase-Aktivierung nach Behandlung der Zellen mit HGF, IGF2 und EGF in Vollmedium für 72 h

ATP-Spiegel sowie Western Blot der Kinaseaktivität der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM) mit Zugabe von HGF, IGF2 oder EGF (jeweils 100 ng/ml). ATP-Spiegel in relativer Angabe zu unbehandelten Zellen in Vollmedium, Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium allein: \*\*\*  $p < 0,001$ . Im Western Blot mit DLB-Lysaten wurde zusätzlich HGF 50 ng/ml verwendet. Kontrolle = unbehandelte Zellen in Vollmedium.

### 3.1.3 Inhibitorexperimente

Mittels Gabe selektiver Inhibitoren der einzelnen Wachstumsfaktorrezeptoren wurde untersucht, welche Funktionen die jeweiligen Wachstumsfaktoren für die Zelllinien erfüllten. Verwendet wurden Linsitinib und BMS-754807 zur Inhibition des IGFR, Tepotinib und Crizotinib zur Inhibition des c-Met sowie Erlotinib zur Inhibition des EGFR. Die naiven Zellen wurden in Vollmedium mit den Inhibitoren für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert und die ATP-Spiegel mittels CellTiter-Glo®-Messung bestimmt. Die Inhibition des IGF2-Signalwegs zeigte bei beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der Menge an lebenden Zellen, vor allem bei Kelly-Zellen (Abb. 5).

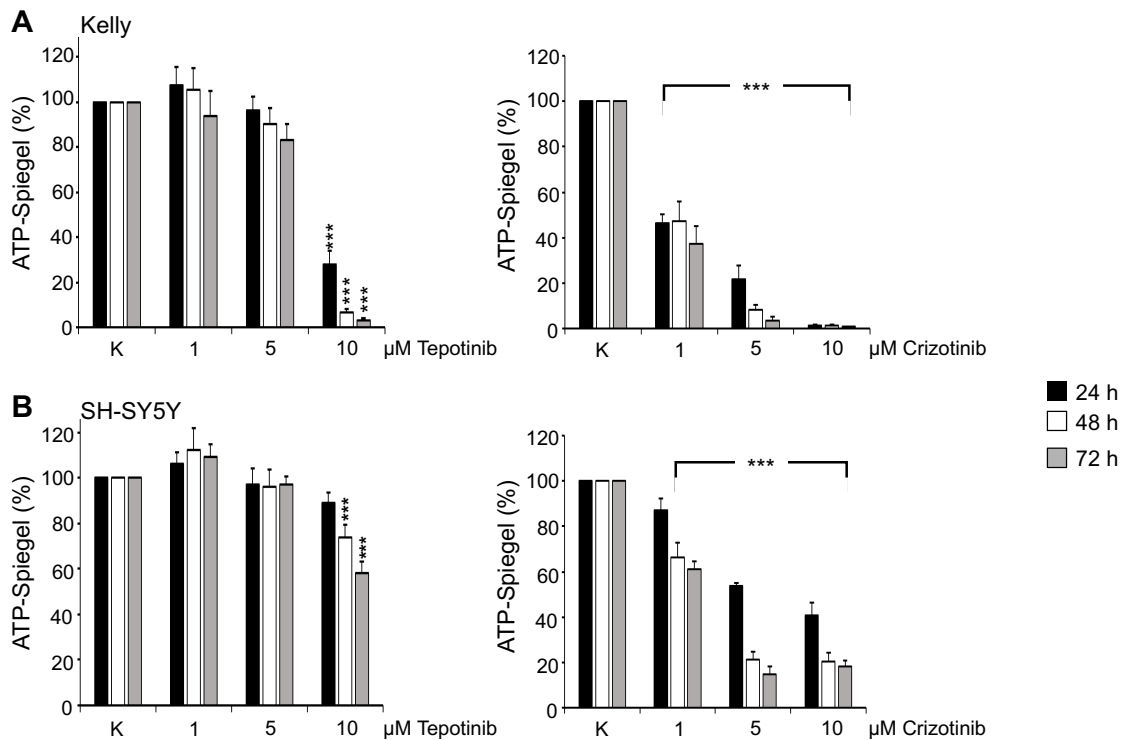


**Abbildung 5:** Inhibition des IGF2-Signalwegs mit Linsitinib und BMS-754807

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit dem IGFR-Inhibitor Linsitinib oder BMS-754807 in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Vollmedium. Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .



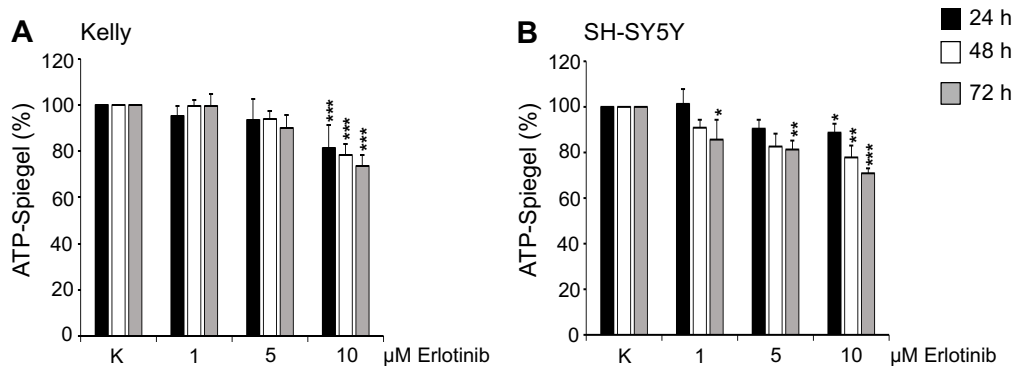
Auch die c-Met-Inhibition reduzierte die ATP-Spiegel besonders stark in Kelly-Zellen, durch Tepotinib jedoch erst unter Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  (Abb. 6, A). In SH-SY5Y-Zellen zeigte sich ein messbarer Effekt von 10  $\mu\text{M}$  Tepotinib erst nach 48 Stunden (Abb. 6, B). Crizotinib führte in beiden Zelllinien zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Reduktion der ATP-Spiegel, die bereits nach 24 Stunden sichtbar war (Abb. 6, A und B). Letzteres ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Crizotinib außer c-Met auch die *anaplastische Lymphomkinase* (ALK) hemmt.



**Abbildung 6:** Inhibition des HGF-Signalwegs mit Tepotinib und Crizotinib

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit dem c-Met-Inhibitor Tepotinib oder Crizotinib in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Vollmedium. Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ .

Der Effekt der EGF-Inhibition war weniger stark als bei IGF2 und HGF, eine signifikante Reduktion der Zellmenge konnte bei Kelly-Zellen erst bei 10  $\mu\text{M}$  und bei SH-SY5Y-Zellen bei niedrigen Konzentrationen nur nach 72 Stunden festgestellt werden (Abb. 7).

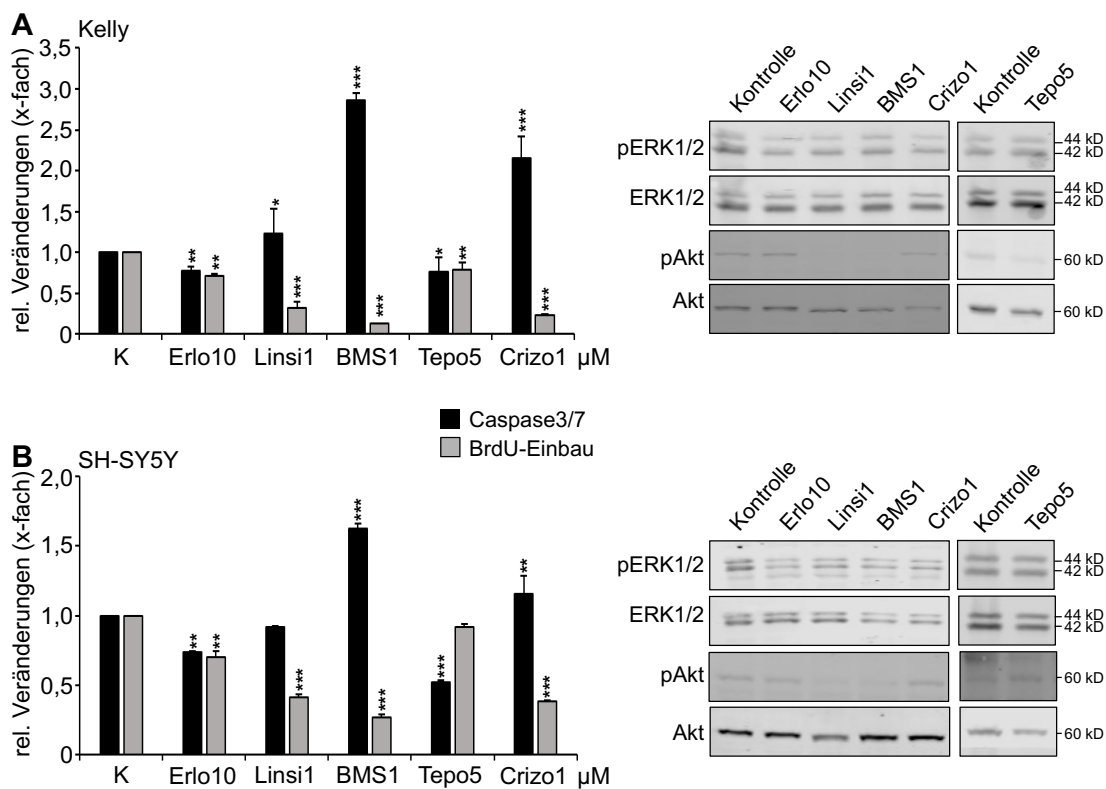


**Abbildung 7:** Inhibition des EGF-Signalwegs mit Erlotinib

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Vollmedium. Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Um die Wirkungsweise der Inhibitoren zu beurteilen, wurden die Zelllinien für 24 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert und mittels Caspase 3/7-Assay, BrdU-Einbau und Kinase-Aktivität auf Zelltod und Zellproliferation untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die reduzierte Zellzahl nach Inhibitor-Gabe eher durch eine beeinträchtigte Proliferation verursacht wurde. Eine signifikante Hemmung der Proliferation im BrdU-Assay konnte durch alle Inhibitoren festgestellt werden mit Ausnahme von Tepotinib bei SH-SY5Y-Zellen. Die Aktivierung der Caspasen als Zeichen für programmierten Zelltod bewirkten bei beiden Zelllinien nur BMS-754807 (1  $\mu\text{M}$ ) und Crizotinib (1  $\mu\text{M}$ ) sowie bei Linsitinib (1  $\mu\text{M}$ ) bei Kelly-Zellen (Abb. 8).

Da die Kinasen Akt und ERK1/2 nicht nur wichtig für Zellproliferation und Überleben sind, sondern auch als direkte Mediatoren in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren fungieren, wurde die Aktivität der beiden Proteine nach Inhibitorgabe untersucht. Im Western Blot der DLB-Lysate nach 24 Stunden zeigte sich bei Kelly-Zellen eine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 nach der Applikation aller Inhibitoren bis auf Tepotinib. Die Aktivität von Akt hingegen wurde nur nach Inkubation mit Erlotinib nicht reduziert (Abb. 8). In den Lysaten der SH-SY5Y-Zellen zeigte sich insgesamt ein ähnliches Phosphorylierungsmuster. Im Gegensatz zu den Kelly-Zellen konnte jedoch nach Tepotinib-Gabe weder eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 noch von Akt nachgewiesen werden. Auch Linsitinib bewirkte bei SH-SY5Y-Zellen eine geringere Aktivitätshemmung beider Kinasen (Abb. 8).



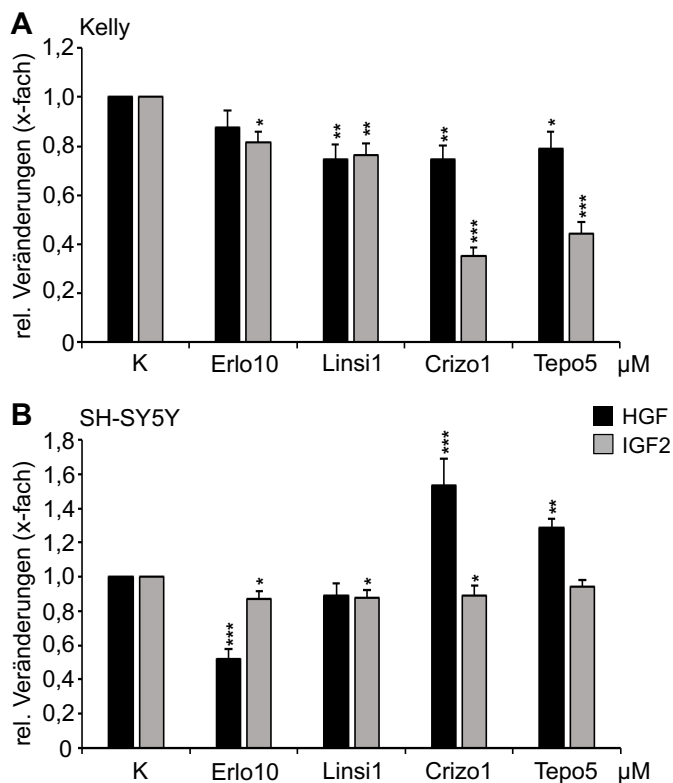
**Abbildung 8:** Analyse von Zelltod und Zellproliferation über Aktivität von Caspase 3/7, BrdU-Einbau und Kinase-Aktivität, 24 h

Caspase 3/7-Aktivität und BrdU-Einbau sowie Western Blot der Kinaseaktivierung von ERK1/2 und Akt in Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach 24-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren. ATP-Spiegel in relativer Angabe zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . Western Blot im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Kontrolle).

Inhibitoren: Erlotinib = Erlotinib 10 μM, Linsitinib = Linsitinib 1 μM, BMS1 = BMS-754807 1 μM, Tepotinib = Tepotinib 5 μM, Crizotinib = Crizotinib 1 μM.

Zusätzlich zu Zellzahl und Signaltransduktion sollte untersucht werden, ob und wie weit die unterschiedlichen Inhibitoren die Freisetzung der Wachstumsfaktoren HGF und IGF2 beeinflussten. Mittels ELISA wurden die Substanz-induzierten Veränderungen von HGF und IGF2 im Zellüberstand nach 72-stündiger Inkubation überprüft.

In Kelly-Zellen wurde insgesamt die Freisetzung von HGF und IGF2 reduziert. Nur nach der Gabe von Erlotinib blieb die Menge von HGF weitgehend stabil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 9, A). In SH-SY5Y-Zellen hatten die Inhibitoren unterschiedliche Effekte. Erlotinib konnte die Freisetzung beider Wachstumsfaktoren reduzieren, während nach der Inkubation mit Linsitinib nur IGF2 leicht vermindert war (Abb. 9, B). Die beiden c-Met-Inhibitoren Crizotinib und Tepotinib erhöhten sogar die HGF-Menge im Überstand, während die Freisetzung von IGF2 durch Crizotinib leicht reduziert wurde und nach Tepotinib unverändert blieb (Abb. 9, B).



**Abbildung 9:** Freisetzung von IGF2 und HGF nach Gabe der Inhibitoren im ELISA, 72 h

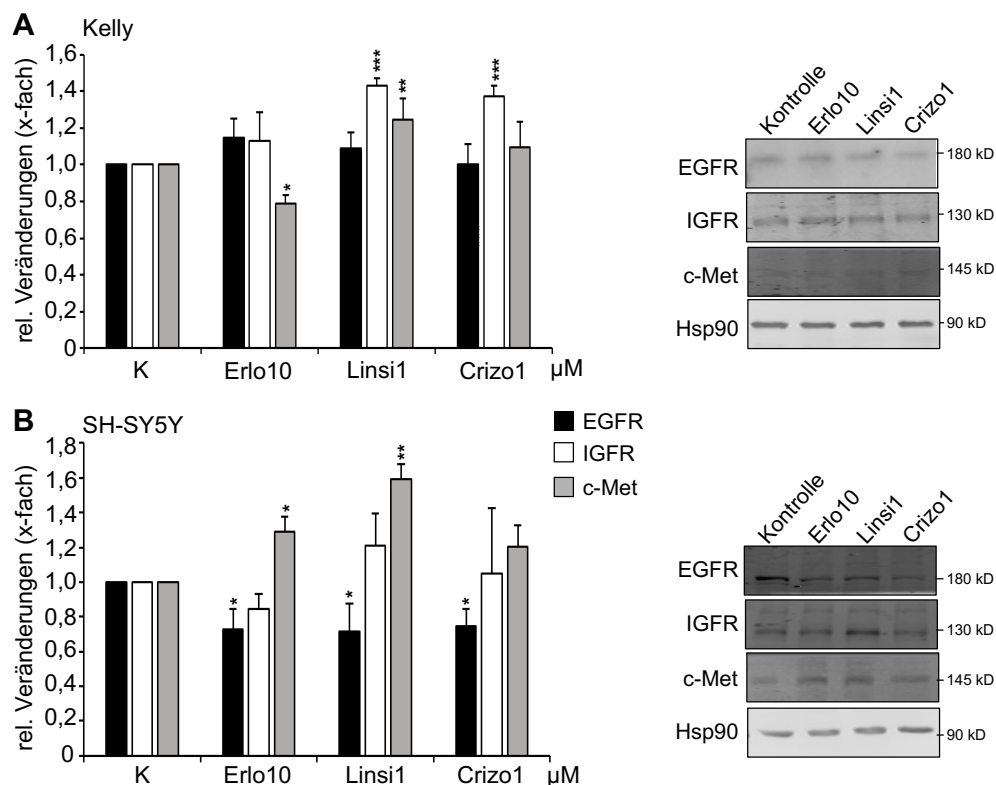
Freigesetzte Proteinmengen von IGF2 und HGF im Überstand der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) mittels ELISA nach 72-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Inhibitoren: Erlotinib 10 μM, Linsitinib 1 μM, Crizotinib 1 μM, Tepotinib 5 μM.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Inhibitoren auf die Expression und Proteinmengen der Wachstumsfaktorrezeptoren von EGF, IGF und HGF nach 72-stündiger Inkubation untersucht.

Kelly-Zellen stabilisierten die Rezeptormenge auf Proteinebene unter Inhibitorbehandlung, zum Teil durch Expressionsinduktion des IGFR durch Linsitinib und Crizotinib und des c-Met unter Linsitinib (Abb. 10, A).

SH-SY5Y-Zellen induzierten unter Linsitinib und Erlotinib die Expression von c-Met, was im Western Blot zu einer leicht erhöhten Proteinmenge des c-Met unter diesen Substanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte. Crizotinib veränderte weder die Expression noch die Proteinmenge des c-Met. Expression und Proteinmenge des EGFR wurde in SH-SY5Y-Zellen durch alle drei Inhibitoren reduziert. Der IGFR zeigte hingegen eine stabile Expression unter Erlotinib, Linsitinib und Crizotinib sowie nach Gabe von Linsitinib sogar eine erhöhte Proteinmenge (Abb. 10, B).

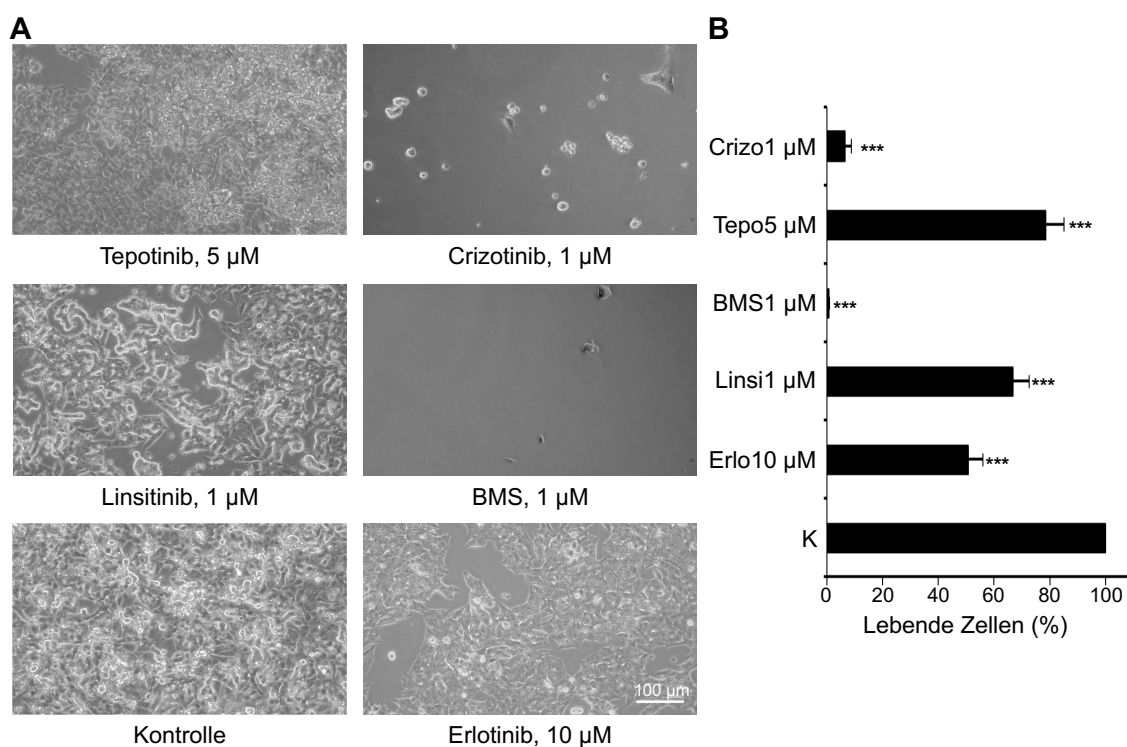


**Abbildung 10:** Expression (TaqMan-Assay) und Proteinmengen (Western Blot) der Wachstumsfaktorrezeptoren, 72 h

Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR und c-Met der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) im TaqMan-Assay sowie deren Proteinmenge im Western Blot mit DLB-Lysaten nach 72-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren. Darstellung der Expression relativ zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . Kontrolle im Western Blot = unbehandelte Zellen. Hsp90 wurde als Auftragskontrolle verwendet. Inhibitoren: Erlotinib = Erlotinib 10 μM, Linsitinib = Linsitinib 1 μM, Crizotinib = Crizotinib 1 μM.

Um zu untersuchen, ob sich die Zellen an die Inhibitorbehandlung adaptieren konnten, wurden diese auf 6-Well-Platten ausgesät und für zehn Tage mit den Inhibitoren inkubiert. Für die Auswertung wurden acht Aufnahmen fotografiert und mit ImageJ ausgezählt.

Beide Zelllinien waren in der Lage, unter Inhibitorbehandlung persistierende Zellen zu bilden. Kelly-Zellen zeigten unter Erlotinib, Linsitinib und Tepotinib persistierende Zellverbände, wenn auch mit signifikanter Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Unter den Zelltod-induzierenden Substanzen Crizotinib und BMS-754807 konnten die Kelly-Zellen allerdings nur noch vereinzelte Zellen aufrechterhalten (Abb. 11).



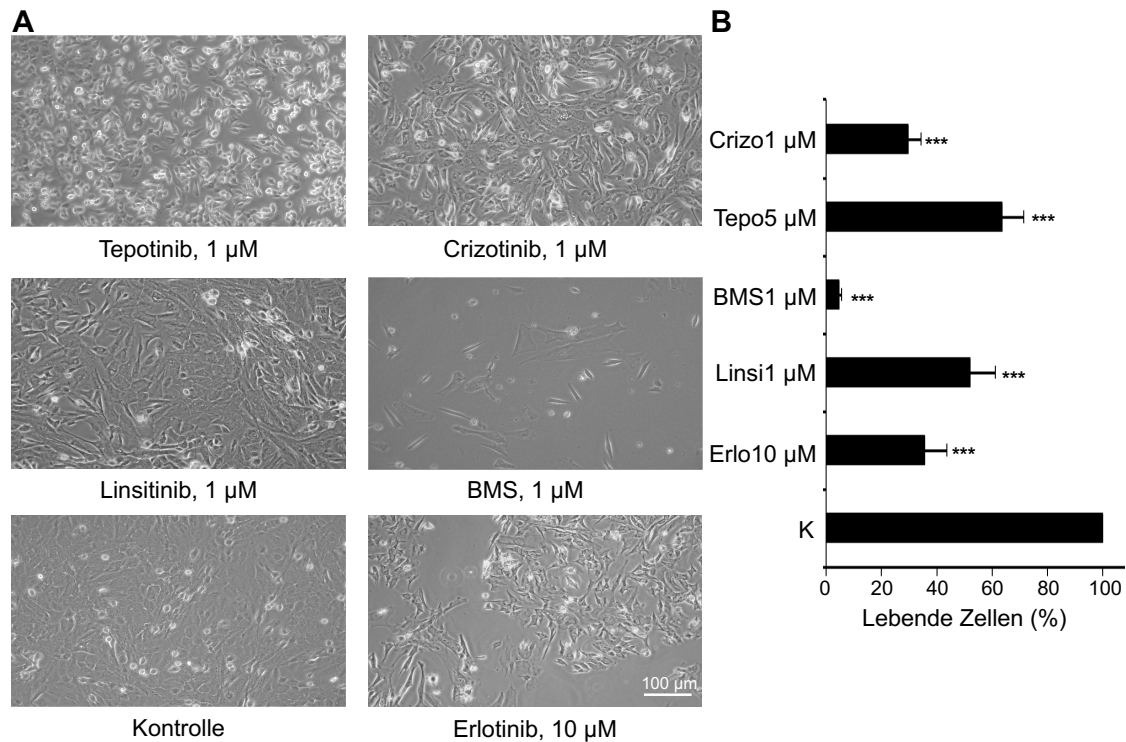
**Abbildung 11:** Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen, 10 d

**A:** Fotografien der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Vollmedium (Kontrolle) mit den jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ .

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10 µM, Linsi1 = Linsitinib 1 µM, BMS1 = BMS-754807 1 µM, Tepo5 = Tepotinib 5 µM, Crizo1 = Crizotinib 1 µM.

Auch bei den SH-SY5Y-Zellen bewirkte die zehntägige Inkubation mit den Inhibitoren die Bildung persistierender Zellen mit signifikant reduzierter Zellzahl verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz zu den Kelly-Zellen konnten die SH-SY5Y-Zellen jedoch unter Crizotinib und BMS-754807 sogar Zellverbände bilden (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen, 10 d

**A:** Fotografien der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Vollmedium (Kontrolle) mit den jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10 µM, Linsi1 = Linsitinib 1 µM, BMS1 = BMS-754807 1 µM, Tepo5 = Tepotinib 5 µM, Crizo1 = Crizotinib 1 µM.

### **3.2 Charakterisierung der naiven Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Medium ohne Serum**

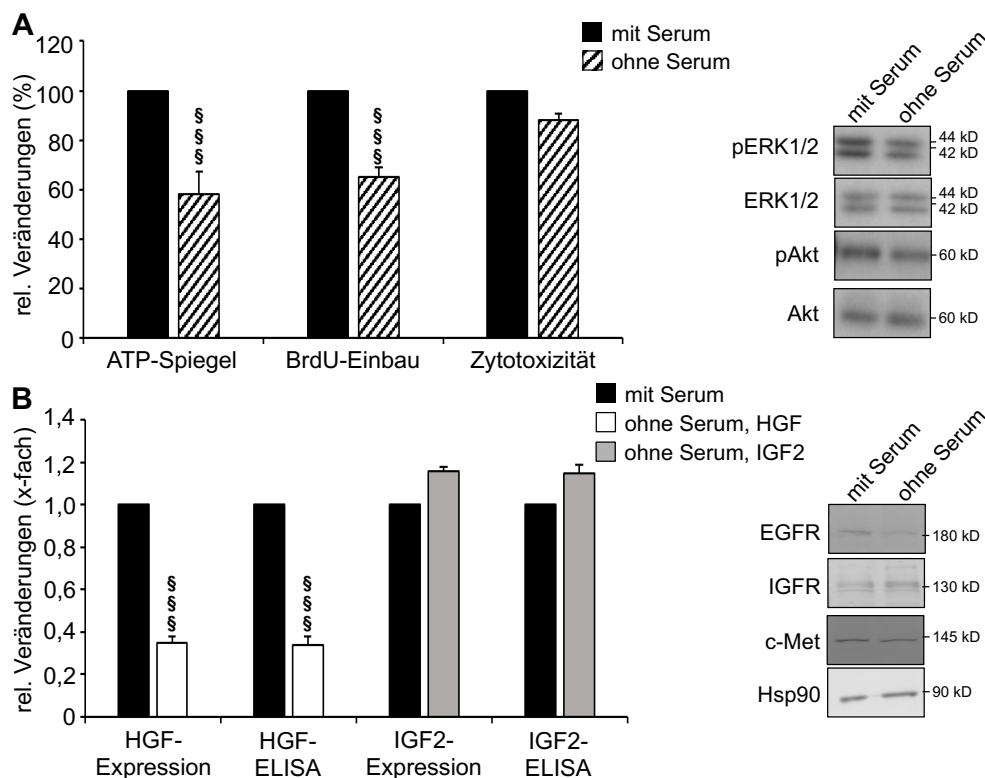
Um eine möglicherweise spezifische Rolle der einzelnen Wachstumsfaktoren für beide Zelllinien besser beurteilen zu können, wurden im Folgenden Versuche in Medium ohne fetales Kälberserum und damit ohne die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren durchgeführt. So konnten gezielt einzelne Wachstumsfaktoren oder Kombinationen supplementiert werden.



### 3.2.1 Verhalten naiver Zellen unter Serumentzug

Als Vergleichsgrundlage für die Effekte der Wachstumsfaktoren wurde zunächst das zelluläre Verhalten in Medium ohne Serum ohne zusätzliche Supplementation von Wachstumsfaktoren charakterisiert.

Der Serumentzug bewirkte bei Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation eine signifikante Reduktion des Wachstums, hier gezeigt am reduzierten ATP-Spiegel und BrdU-Einbau, ohne jedoch den Zelltod auszulösen (Abb. 13, A). Entsprechend war auch die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt reduziert. Die Proteinmenge blieb konstant (Abb. 13, A). Während die Expression und Freisetzung von HGF durch den Serumentzug signifikant reduziert wurden, konnten die Kelly-Zellen IGF2 auf im Vergleich zu Vollmedium stabilem Niveau halten. Die Proteinmengen der Rezeptoren für IGF2 und HGF blieben unter Serumentzug stabil, der EGFR wurde reduziert (Abb. 13, B).

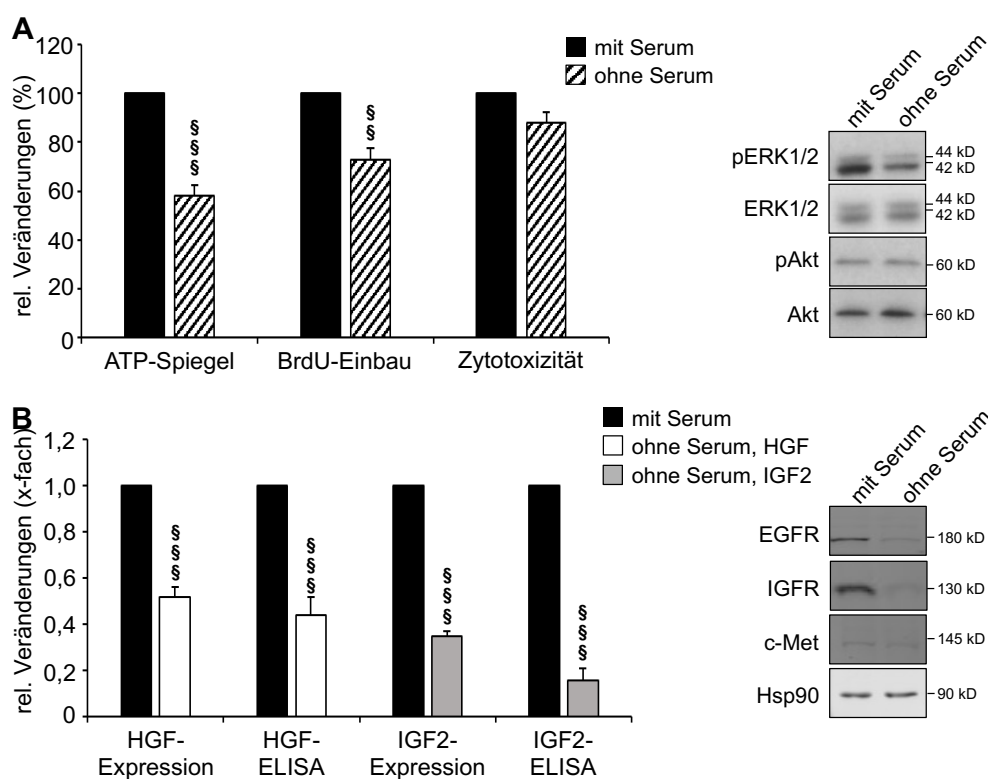


**Abbildung 13:** Kelly-Zellen nach Serum-Entzug, 72 h

**A:** ATP-Spiegel, BrdU-Einbau und Zytotoxizität sowie Western Blot der Kinaseaktivität von ERK1/2 und Akt der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Medium mit und ohne Serum. Darstellung relativ zu Zellen in Vollmedium, Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§  $p < 0,001$ .

**B:** Expression (TaqMan-Assay) und Freisetzung (ELISA) von HGF und IGF2 sowie Western Blot der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR und c-Met der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Medium mit und ohne Serum. Hsp90 wurde als Auftragskontrolle verwendet.

Auch die SH-SY5Y-Zellen reduzierten unter Serumentzug ihr Wachstum, ohne eine erhöhte Zytotoxizität aufzuweisen. Dabei war nur die Aktivität von ERK1/2 im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert, nicht jedoch die Phosphorylierung von Akt (Abb. 14, A). Im Gegensatz zu den Kelly-Zellen sank jedoch unter Serumentzug nicht nur die Expression und Freisetzung von HGF, sondern auch von IGF2 sowie die Proteinmenge des EGFR und IGFR (Abb. 14, B). SH-SY5Y-Zellen schienen daher für ihre eigene Produktion von Wachstumsfaktoren sowie für die Aufrechterhaltung der Rezeptormengen auf eine externe Zufuhr von Wachstumsfaktoren angewiesen zu sein.



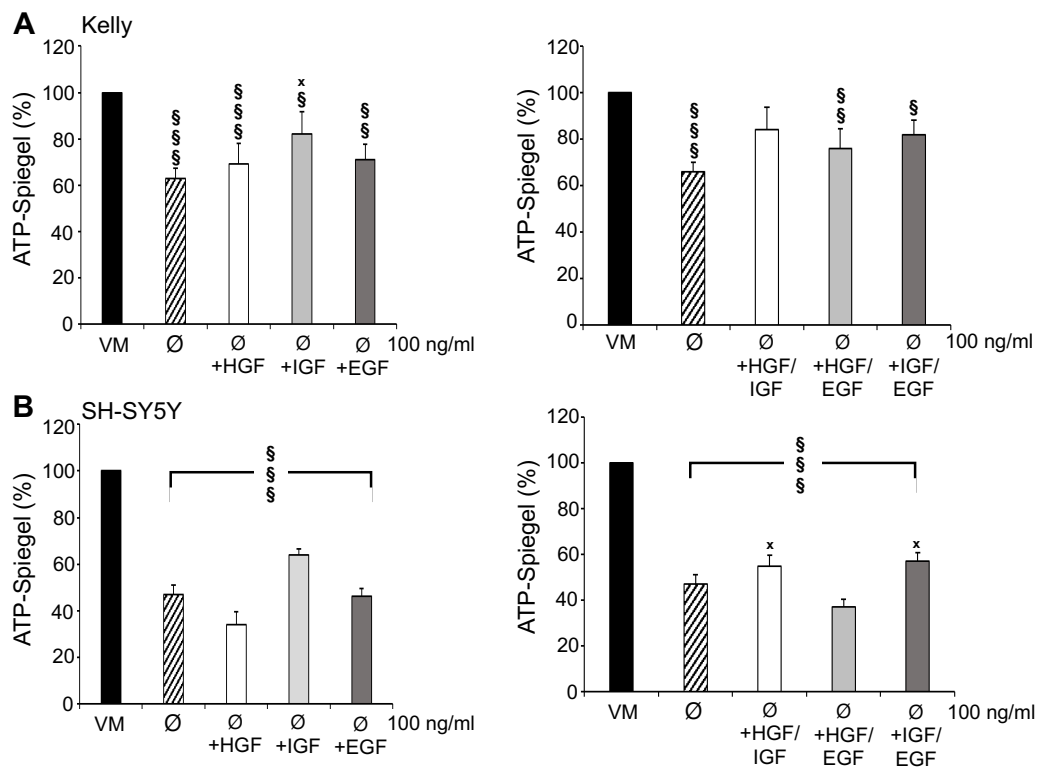
**Abbildung 14:** SH-SY5Y-Zellen nach Serum-Entzug, 72 h

**A:** ATP-Spiegel, BrdU-Einbau und Zytotoxizität sowie Western Blot der Kinaseaktivität von ERK1/2 und Akt der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Medium mit und ohne Serum. Darstellung relativ zu Zellen in Vollmedium, Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§  $p < 0,001$ , §§  $p < 0,01$ .

**B:** Expression (TaqMan-Assay) und Freisetzung (ELISA) von HGF und IGF2 sowie Western Blot der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR und c-Met der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Medium mit und ohne Serum. Hsp90 wurde als Auftragskontrolle verwendet.

### 3.2.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Effekte der gezielte Zusatz einzelner oder kombinierter Wachstumsfaktoren bei den serumdeprivierten Zellen bewirkte. Dabei zeigte sich im Vergleich zu Zellen in Vollmedium, dass weder bei den Kelly-Zellen noch bei den SH-SY5Y-Zellen einzelne zugeführte Wachstumsfaktoren den Entzug von Serum kompensieren konnten (Abb. 15, A und B). Die kombinierte Supplementation von HGF und IGF2 führte in Kelly-Zellen fast zu einem ATP-Spiegel wie in Vollmedium, während die anderen Zweifachkombinationen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant geringere Zellzahlen aufwiesen (Abb. 15, A). In SH-SY5Y-Zellen konnte keine der verwendeten Zweifachkombinationen die Serumdeprivation ausgleichen (Abb. 15, B).

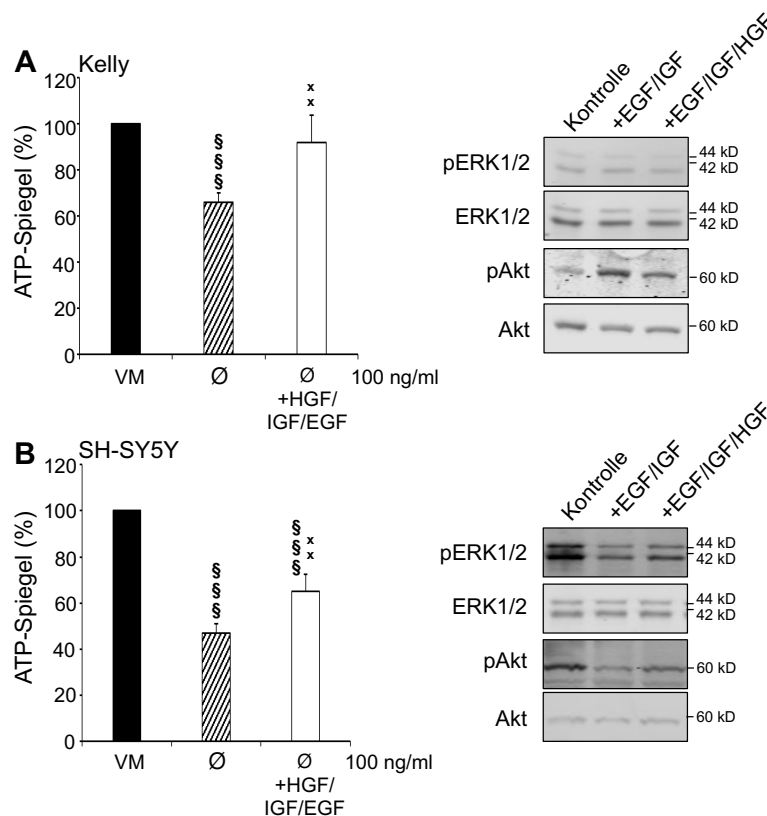


**Abbildung 15:** Gezielte Supplementation von Wachstumsfaktoren, 72 h

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation in Medium ohne Serum (Ø) mit einzelem oder kombiniertem Zusatz der Wachstumsfaktoren HGF, IGF und EGF (100 ng/ml). Darstellung relativ zu den ATP-Spiegeln in Vollmedium (VM). Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§ p < 0,001, §§ p < 0,01, § p < 0,05, verglichen mit Medium ohne Serum: x p < 0,05.

Deshalb wurde untersucht, ob eine Dreifachkombination die Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen stabil halten konnte. Im Gegensatz zu SH-SY5Y-Zellen gelang die Kompensation bei Kelly-Zellen unter der gleichzeitigen Supplementation von HGF, IGF und EGF (Abb. 16, A). In SH-SY5Y-Zellen wurde der ATP-Spiegel durch die Dreifachkombination zwar signifikant gegenüber der serumdeprivierten Kontrolle erhöht, erreichte jedoch nicht das Niveau der Zellen in Vollmedium (Abb. 16, B).

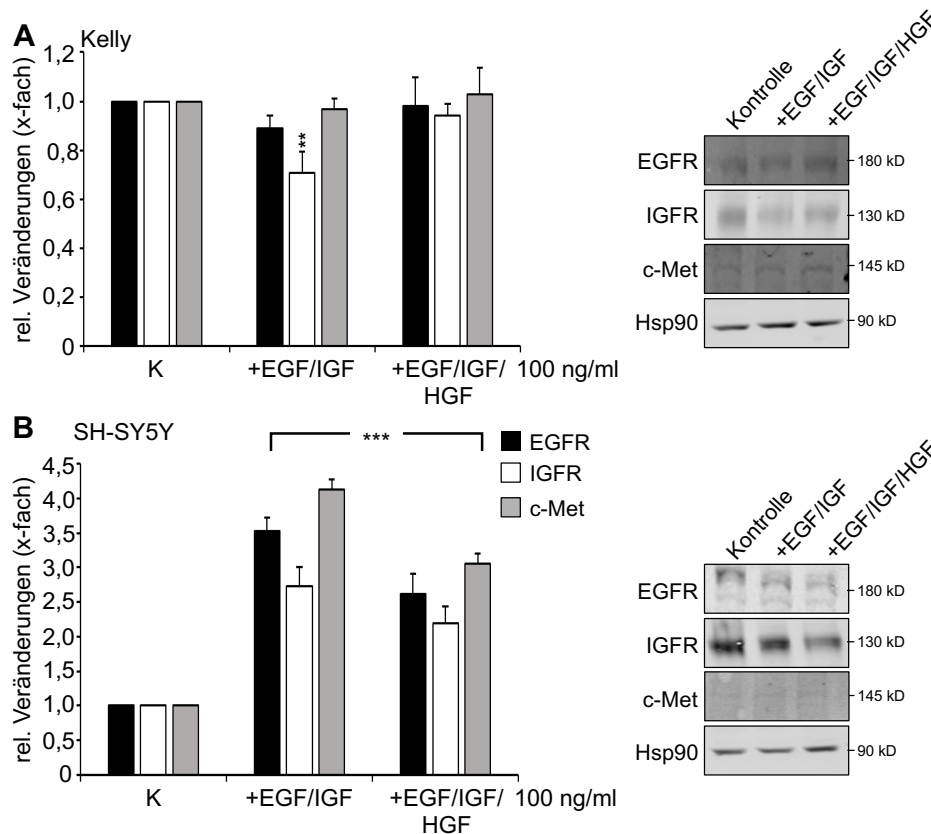
Bei der Analyse des Phosphorylierungsmusters von ERK1/2 und Akt zeigte sich, dass in Kelly-Zellen die selektive Gabe von Wachstumsfaktoren die Akt-Aktivität im Vergleich zu serumbehandelten Zellen erhöhte (Abb. 16, A). In SH-SY5Y-Zellen war die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt sowohl nach einer Zweifachkombination von EGF und IGF2 als auch nach der Dreifachkombination von EGF, IGF2 und HGF im Vergleich zur Serumkontrollen reduziert. Durch gleichzeitige Gabe der drei Wachstumsfaktoren konnte jedoch fast das Kontrollniveau erreicht werden (Abb. 16, B). Die Proteinmengen der untersuchten Kinasen veränderten sich nicht.



**Abbildung 16:** Gezielte Supplementation von Wachstumsfaktoren, 72 h

ATP-Spiegel sowie Western Blot der Kinaseaktivität der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation in Medium ohne Serum ohne (Ø) und mit kombiniertem Zusatz von HGF, IGF und EGF (je 100 ng/ml). ATP-Spiegel in relativer Angabe zu unbehandelten Zellen in Vollmedium (VM), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§  $p < 0,001$ , verglichen mit Medium ohne Serum: xx  $p < 0,01$ . Als Kontrolle im Western Blot dienten unbehandelte Zellen in Medium ohne Serum.

Zusätzlich wurden mögliche Veränderungen auf mRNA- und Proteinebene der beteiligten Wachstumsfaktorrezeptoren untersucht. In Kelly-Zellen wurden die Expression und Proteinmenge aller drei untersuchten Rezeptoren durch die Dreifachkombination stabilisiert. Bei Gabe der Zweifachkombination aus EGF und IGF2 wurde nur der IGFR leicht reduziert (Abb. 17, A). SH-SY5Y-Zellen zeigten nach Gabe der Wachstumsfaktoren eine höhere Expression, aber geringere Proteinmengen für EGFR und IGFR, während c-Met stabil blieb (Abb. 17, B).



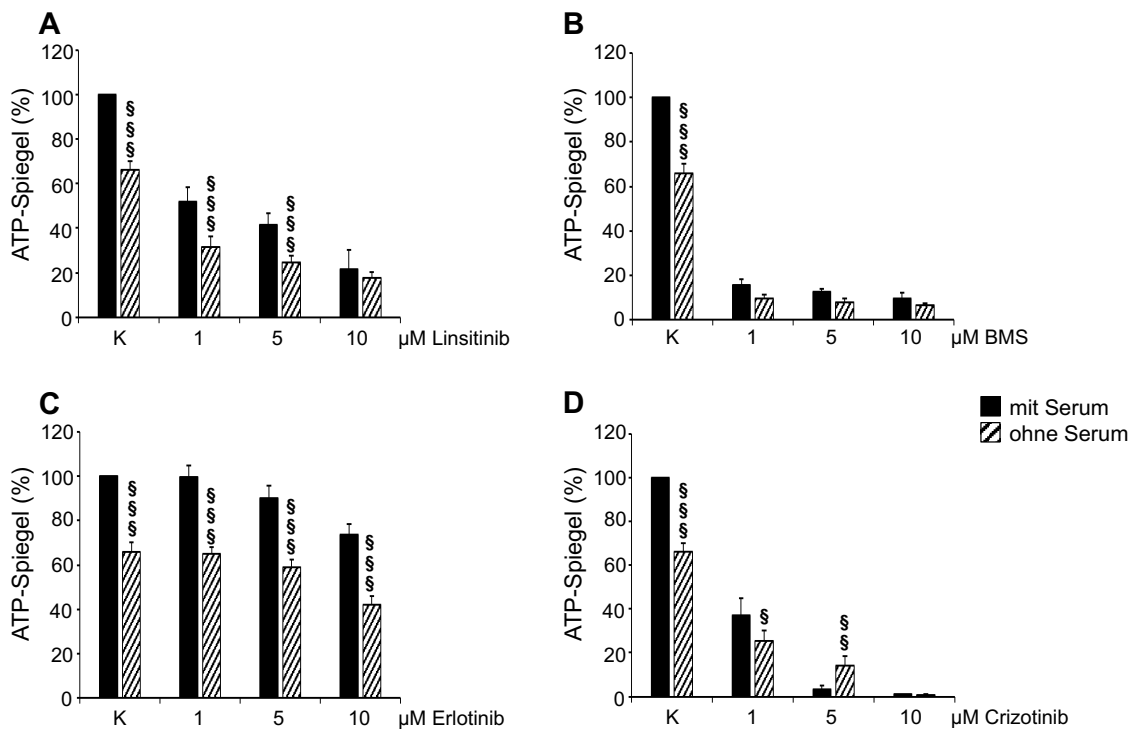
**Abbildung 17:** Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren nach gezielter Gabe von EGF, IGF2 und HGF, 72 h

Genexpression im TaqMan-Assay sowie Western Blot der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR und c-Met in Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach 72-stündiger Inkubation in Medium ohne Serum ohne (K, Kontrolle) sowie mit Zusatz der Wachstumsfaktoren EGF und IGF oder EGF, IGF und HGF (je 100 ng/ml). Expression in relativer Angabe zu unbehandeltem Kontrollzellen in Medium ohne Serum (K), Signifikanzniveau verglichen mit Medium ohne Serum: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Hsp90 wurde im Western Blot als Auftragskontrolle verwendet.

Beide Zelllinien waren also trotz Serumentzug in der Lage, Wachstumsfaktoren zu produzieren und die nachfolgenden Signalwege zu stabilisieren, wenn auch teilweise auf einem geringeren Aktivitätslevel. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welchen Effekt eine zusätzliche Hemmung der Wachstumsfaktorrezeptoren auf die Zellen hatte.

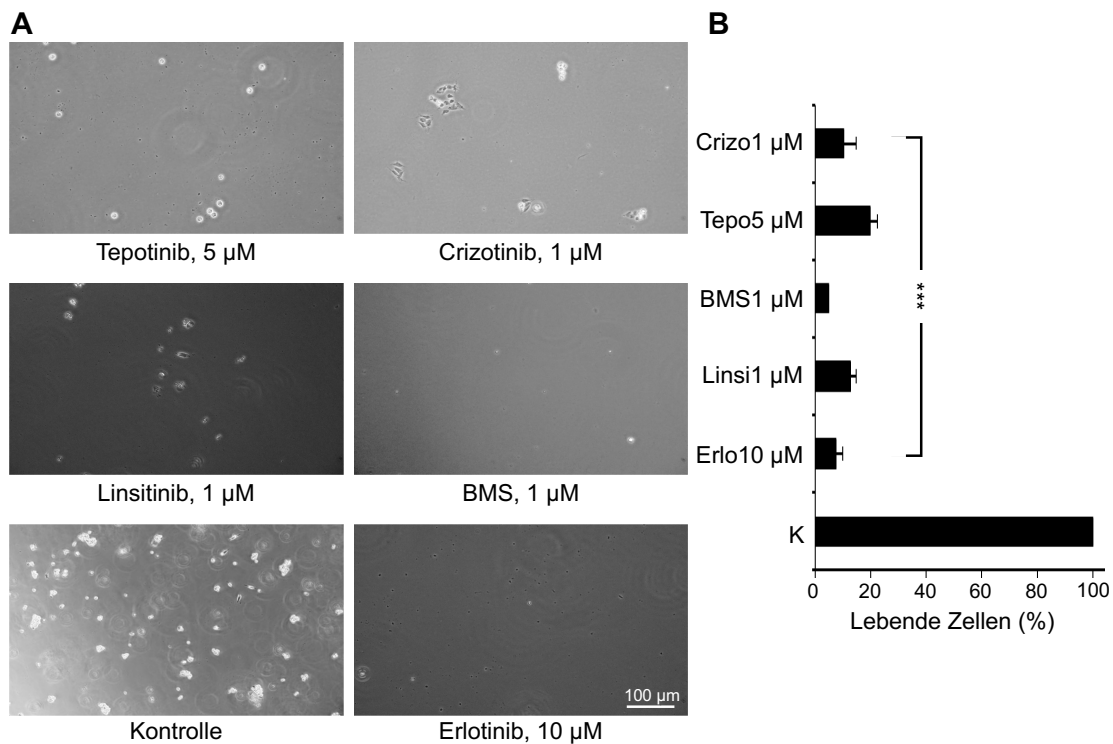
### 3.2.3 Inhibitorexperimente

Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den verschiedenen Inhibitoren der Wachstumsfaktorrezeptoren inkubiert, um anhand der ATP-Spiegel Rückschlüsse auf die Zellmenge zu ziehen. Im Vergleich zu den Vollmedium-Kontrollen waren Kelly-Zellen durch den Serumentzug insgesamt empfindlicher für die Inhibitoren, was sich an den signifikant reduzierten Zellmengen zeigte. Nur bei Crizotinib (1  $\mu$ M) ergab sich eine geringere Zellmenge der Vollmedium-behandelten, schneller proliferierenden Zellen (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Kelly-Zellen mit und ohne Serum und Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren, 72 h  
ATP-Spiegel der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Medium mit und ohne Serum ohne (K) sowie mit Zusatz der Wachstumsfaktorrezeptorinhibitoren Linsitinib (**A**), BMS-754807 (**B**), Erlotinib (**C**) und Crizotinib (**D**) in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu$ M. Darstellung relativ zu ATP-Spiegeln in Vollmedium ohne Inhibitorzusatz, Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium ohne Inhibitorzusatz: \$\$\$  $p < 0,001$ , \$\$  $p < 0,01$ , \$  $p < 0,05$ .

Bei Kultivierung in Vollmedium waren Kelly-Zellen in der Lage, unter zehntägiger Inhibitorbehandlung persistierende Zellen zu bilden; unter Erlotinib, Linsitinib und Tepotinib sogar in Form von Zellverbänden (vgl. Abb. 11). Bei Serumdeprivation war ihnen dies kaum noch möglich. Unter allen Inhibitoren konnten kaum noch persistierende Kelly-Zellen aufrechterhalten werden (Abb. 19). Dies bestätigt die erhöhte Empfindlichkeit der Kelly-Zellen für die Inhibitoren unter Serumentzug.



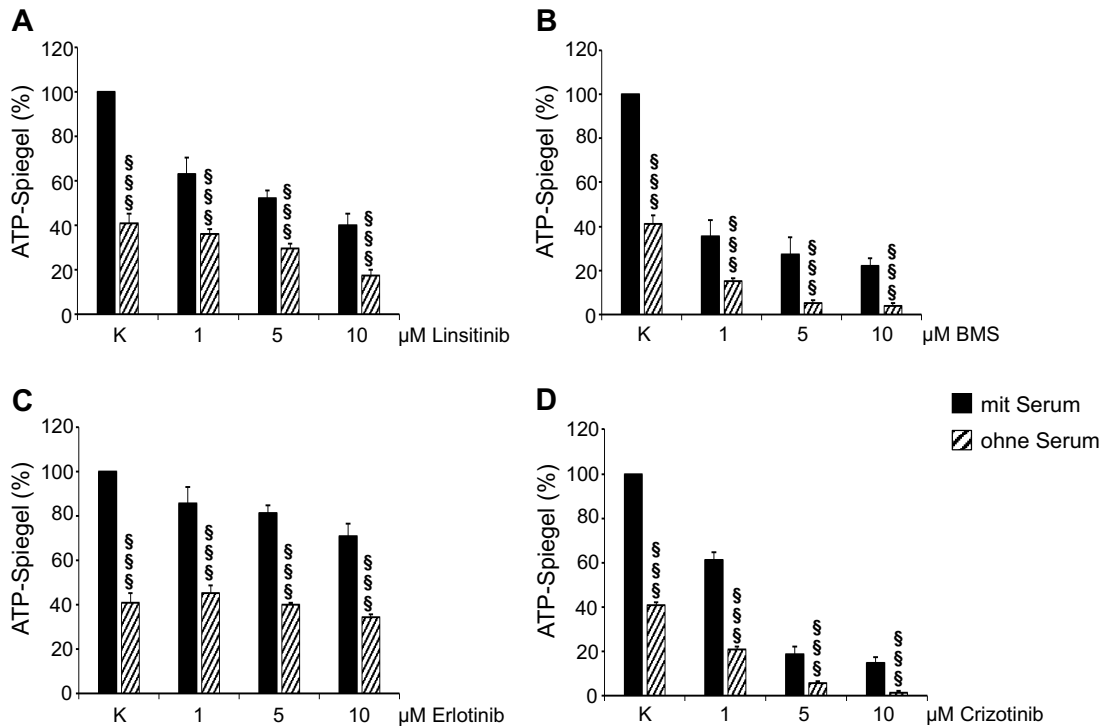
**Abbildung 19:** Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen, 10 d

**A:** Fotografien der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Medium ohne Serum ohne (Kontrolle) sowie mit Zusatz der jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung unter Serumentzug mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Medium ohne Serum(K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10  $\mu$ M, Linsi1 = Linsitinib 1  $\mu$ M, BMS1 = BMS-754807 1  $\mu$ M, Tepo5 = Tepotinib 5  $\mu$ M, Crizo1 = Crizotinib 1  $\mu$ M.

Auch die SH-SY5Y-Zellen zeigten durch den Serumentzug eine erhöhte Empfindlichkeit für alle Inhibitoren mit signifikant erniedrigten Zellmengen im Vergleich zur serumbehandelten Kontrolle (Abb. 20).

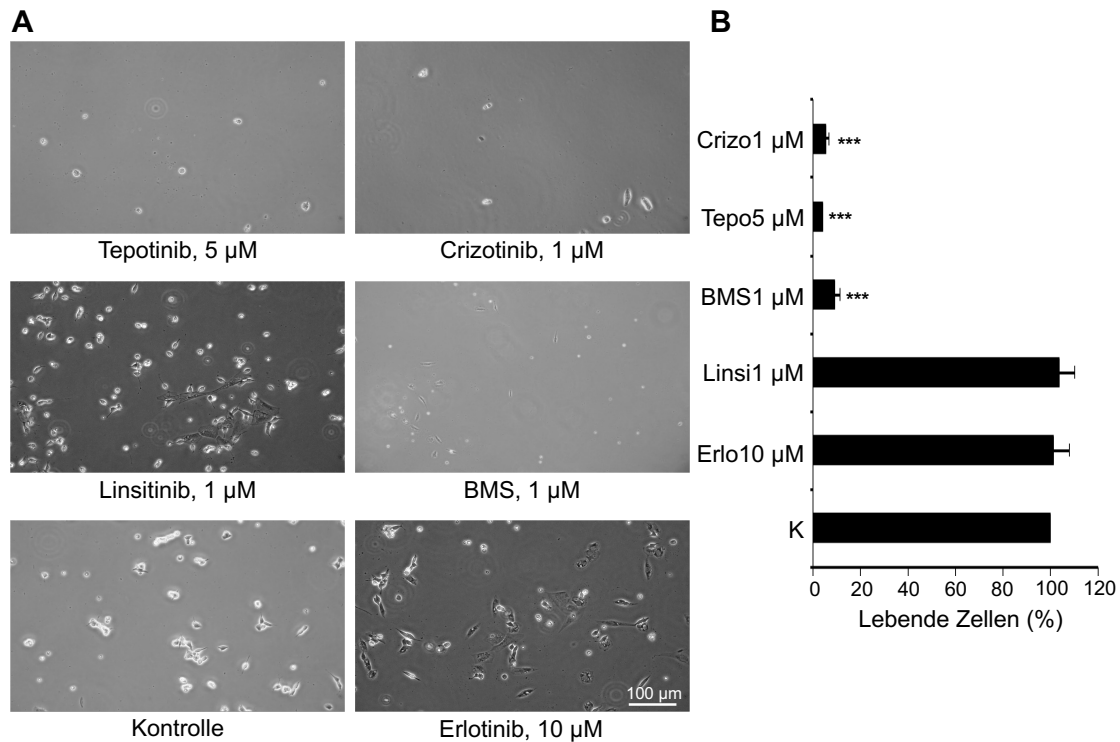


**Abbildung 20:** SH-SY5Y-Zellen mit und ohne Serum und Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren, 72 h

ATP-Spiegel der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Medium mit und ohne Serum ohne (K) sowie mit Zusatz der Wachstumsfaktorrezeptorinhibitoren Linsitinib (**A**), BMS-754807 (**B**), Erlotinib (**C**) und Crizotinib (**D**) in Konzentrationen von 1, 5 und 10 µM. Darstellung relativ zu ATP-Spiegeln in Vollmedium ohne Inhibitorzusatz, Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium ohne Inhibitorzusatz: §§§  $p < 0,001$ .



Die Bildung persistierender SH-SY5Y-Zellen unter Erlotinib 10  $\mu$ M und Linsitinib 1  $\mu$ M blieb jedoch möglich, während eine Hemmung des IGFR mit höherer Affinität (BMS-754807, 1  $\mu$ M) und des c-Met (Crizotinib, 1  $\mu$ M und Tepotinib, 5  $\mu$ M) die Zellzahl signifikant reduzierte (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen, 10 d

**A:** Fotografien der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Medium ohne Serum ohne (Kontrolle) sowie mit Zusatz der jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung unter Serumentzug mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Medium ohne Serum(K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10  $\mu$ M, Linsi1 = Linsitinib 1  $\mu$ M, BMS1 = BMS-754807 1  $\mu$ M, Tepo5 = Tepotinib 5  $\mu$ M, Crizo1 = Crizotinib 1  $\mu$ M.

### **3.3 Charakterisierung der Retinsäure-behandelten Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Vollmedium**

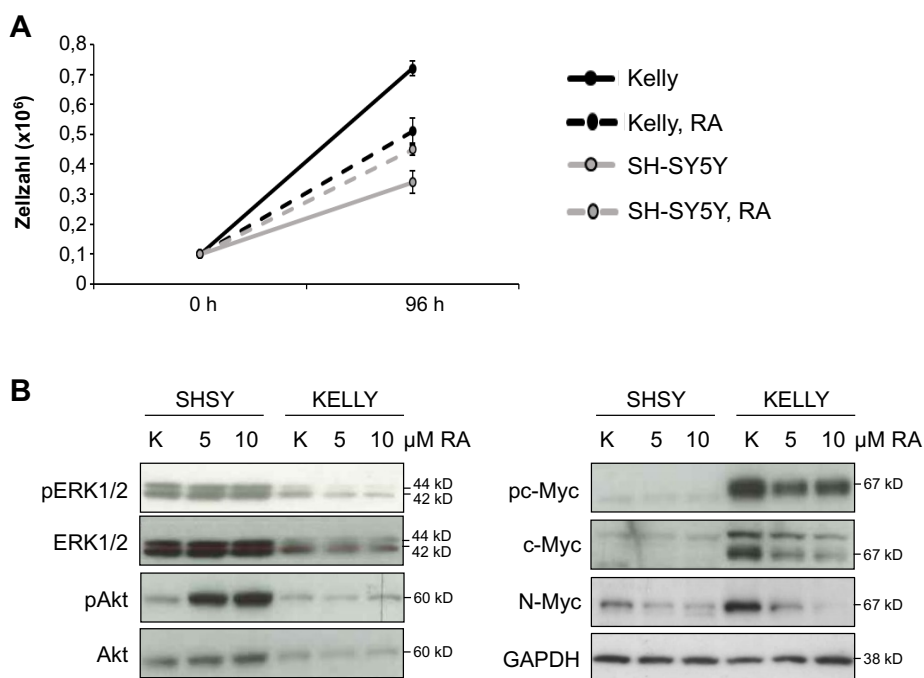
Das Morphogen Retinsäure kann die Differenzierung von Neuroblastomzellen beeinflussen und wurde daher lange Zeit therapeutisch eingesetzt (Seeger et al. 1982, Thiele et al. 1985). Neuere Studien konnten jedoch ein wechselhaftes Ansprechen auf die Retinsäuregabe feststellen, ein Überlebensvorteil der Retinsäure-behandelten Patienten gegenüber anderen Behandlungsstrategien blieb aus (Peinemann et al. 2016, Duffy et al. 2017). Diese klinischen Beobachtungen ließen sich auch im Zellmodell nachvollziehen. Neuroblastomzellen können eine inhärente Retinsäureresistenz aufweisen oder diese nach initialem Ansprechen entwickeln (Reynolds et al. 2003; Duffy et al. 2017). Durch den Eingriff der Retinsäure in die Signaltransduktion von Differenzierung, Wachstum und Zelltod ist auch eine Interaktion mit den untersuchten Wachstumsfaktoren zu erwarten. Daher sollte im Folgenden der Einfluss der Retinsäure auf die untersuchten Neuroblastomzelllinien und insbesondere der Zusammenhang mit den untersuchten Wachstumsfaktoren charakterisiert werden. Sofern nicht anders angegeben, wurde all-trans-Retinsäure der Konzentration 5  $\mu$ M verwendet.

#### **3.3.1 Verhalten der Retinsäure-behandelten Zellen**

Als Grundlage für die folgenden Versuche wurde zunächst untersucht, inwiefern sich die Retinsäure-behandelten Zellen von den naiven Zelllinien unterscheiden. Dazu wurden die Zelllinien für 96 Stunden mit Retinsäure inkubiert und anschließend ihre Zellzahl mittels CASY-Counter ermittelt. DLB-Lysate für den Western Blot wurden nach 72-stündiger Inkubation hergestellt.

Insgesamt bewirkte die Retinsäureinkubation bei Kelly-Zellen eine Reduktion der Zellzahl (Abb. 22, A). Im Western Blot der Kinasen, die als Mediatoren des Zellwachstums fungieren, zeigte sich eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2, während die Akt-Aktivität der Kelly-Zellen normalisiert auf die Proteinmenge konstant blieb. Die Signale der unphosphorylierten Kinasen blieben während der Inkubation mit Retinsäure unverändert (Abb. 22, B). Die Proteinmengen der Transkriptionsfaktoren c-Myc und N-Myc, die ebenfalls die Zellproliferation fördern (Bannasch et al. 1999), wurden in Kelly-Zellen durch die Gabe von Retinsäure reduziert. Entsprechend zeigte c-Myc auch ein geringeres Signal für das phosphorylierte Protein im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 22, B). Als Auftragskontrolle wurde GAPDH verwendet.

Im Gegensatz dazu zeigten SH-SY5Y-Zellen unter Retinsäure eine erhöhte Zellzahl sowie eine verstärkte Phosphorylierung von Akt (Abb. 22, A und B). Interessanterweise wurde die Proteinmenge von N-Myc ebenfalls nach der Gabe von Retinsäure reduziert, während die Signale von aktiviertem und unphosphoryliertem c-Myc im Vergleich zur Kontrolle konstant blieben (Abb. 22, B).



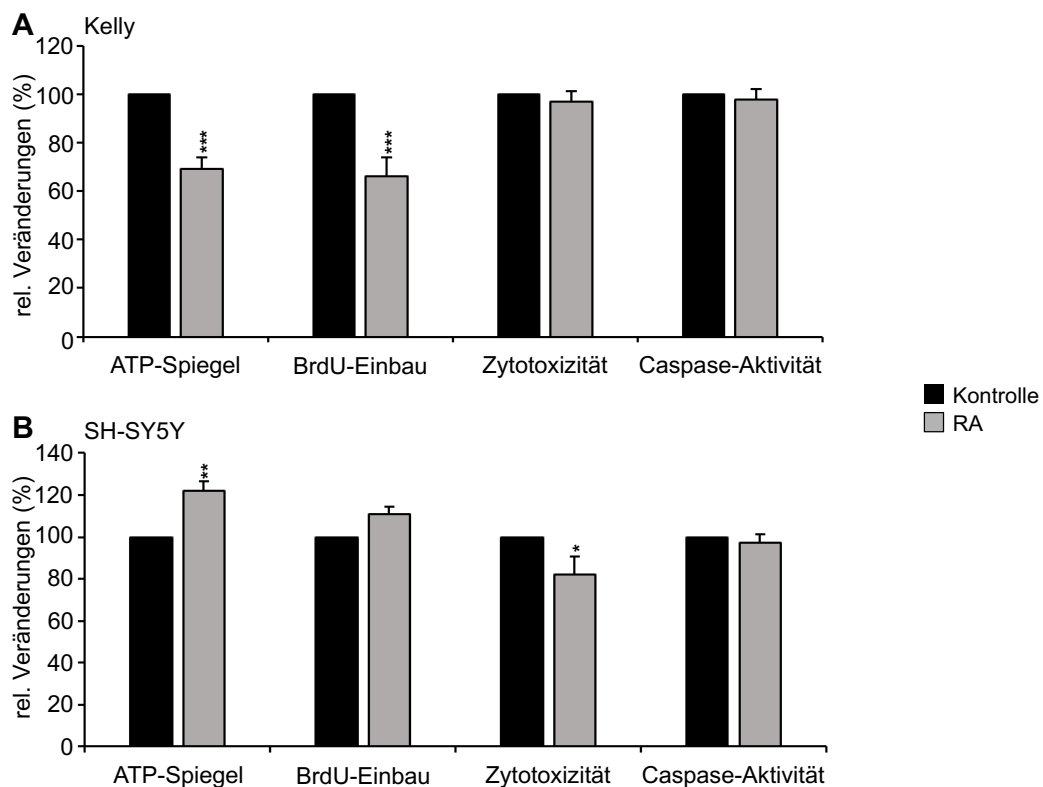
**Abbildung 22:** Effekte von Retinsäure (5  $\mu$ M) auf beide Zelllinien, 96 h

**A:** Zellzählung der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mittels CASY-Counter vor und nach 96-stündiger Inkubation in Vollmedium ohne und mit Retinsäure (RA, 5  $\mu$ M).

**B:** Western Blot mit DLB-Lysaten nach 96-stündiger Inkubation von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen in Vollmedium ohne (K) sowie mit Retinsäurezusatz (5 und 10  $\mu$ M). Dargestellt sind die inaktiven und aktiven (p) Formen der Kinasen ERK1/2 und Akt und die Transkriptionsfaktoren c-Myc, N-Myc und pc-Myc. GAPDH wurde als Auftragskontrolle verwendet.

Um zu verstehen, wie die veränderten Zellzahlen nach der Inkubation mit Retinsäure zustande kamen, wurde die Zellproliferation anhand des BrdU-Einbaus sowie der Zelltod anhand von Zytotoxizität und Caspase-Aktivität in beiden Zelllinien untersucht.

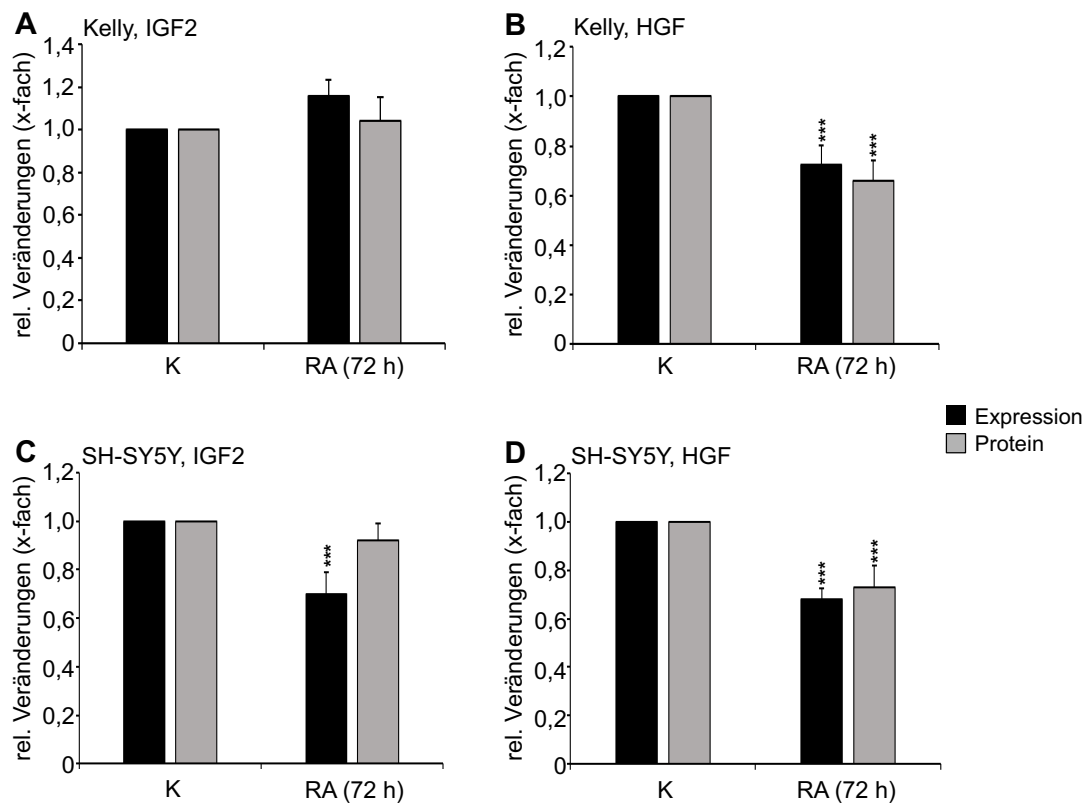
Es zeigte sich eine zelltypspezifische Regulation der Retinsäureeffekte. Die Kelly-Zellen reduzierten unter Retinsäure ihr Wachstum, während Zytotoxizität und Caspase-Aktivität sich nicht von den Kontrollzellen unterschieden (Abb. 23, A). Bei den SH-SY5Y-Zellen wurde die Proliferation durch die Retinsäuregabe nicht signifikant erhöht, es sank jedoch die Zytotoxizität, wodurch sich die erhöhte Zellmenge erklären ließ (Abb. 23, B).



**Abbildung 23:** Analyse von Zellproliferation und Zelltod nach Retinsäuregabe, 72 h

ATP-Spiegel, BrdU-Einbau, Zytotoxizität und Caspase-Aktivität der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation mit Retinsäure (RA) in Vollmedium in relativer Darstellung zu Vollmedium allein (Kontrolle). Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

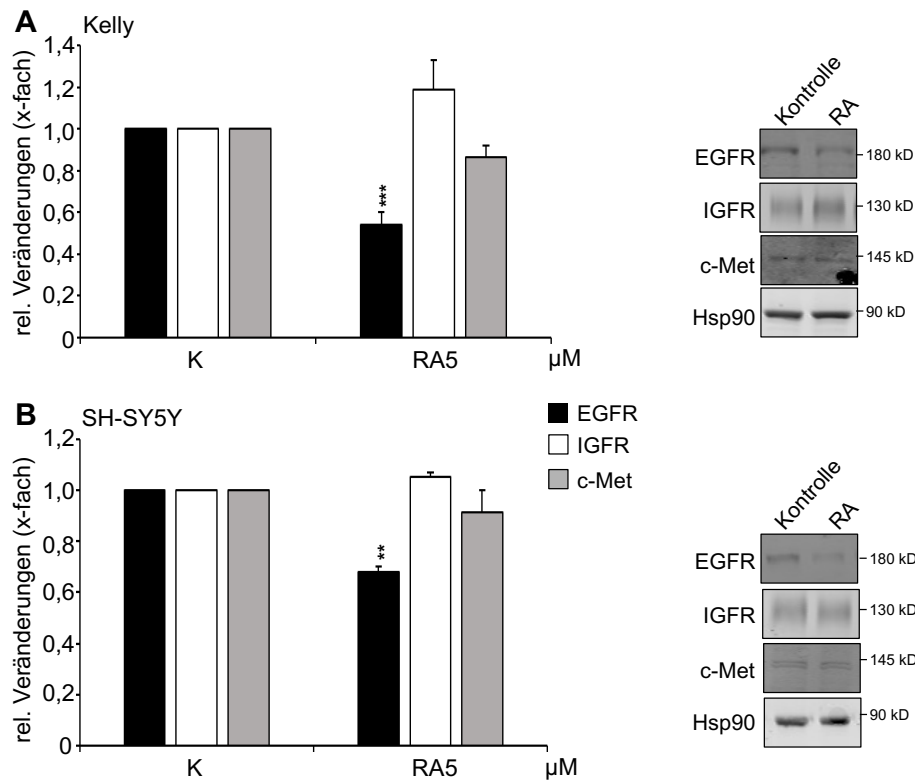
Die Behandlung mit Retinsäure führte auch zu veränderter Expression und Freisetzung der untersuchten Wachstumsfaktoren IGF2 und HGF. Kelly-Zellen stabilisierten unter 72-stündiger Inkubation mit Retinsäure die Expression und Freisetzung von IGF2, während diese bei HGF signifikant erniedrigt wurden (Abb. 24, A und B). Bei SH-SY5Y-Zellen reduzierte sich die Expression von IGF2 bei zunächst stabiler Proteinmenge. Die Expression und Freisetzung von HGF durch die SH-SY5Y-Zellen wurde unter Retinsäure ebenfalls reduziert (Abb. 24, C und D).



**Abbildung 24:** Einfluss von Retinsäure auf Expression und Proteinmengen von IGF2 und HGF, 72 h

Expression (TaqMan-Assay) und Proteinmenge (ELISA) von IGF2 und HGF in Kelly-Zellen (**A** und **B**) und SH-SY5Y-Zellen (**C** und **D**) nach 72-stündiger Inkubation mit Retinsäure in Vollmedium, dargestellt als relative Veränderung zu Vollmedium allein (K). Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium allein: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die Untersuchung der Wachstumsfaktorrezeptoren nach 72-stündiger Inkubation mit Retinsäure zeigte, dass in beiden Zelllinien nur der EGFR in Expression und Proteinmenge signifikant durch Retinsäuregabe reduziert wurde. IGFR und c-Met hingegen blieben stabil (Abb. 25, A und B).



**Abbildung 25:** Einfluss von Retinsäure auf die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren, 72 h

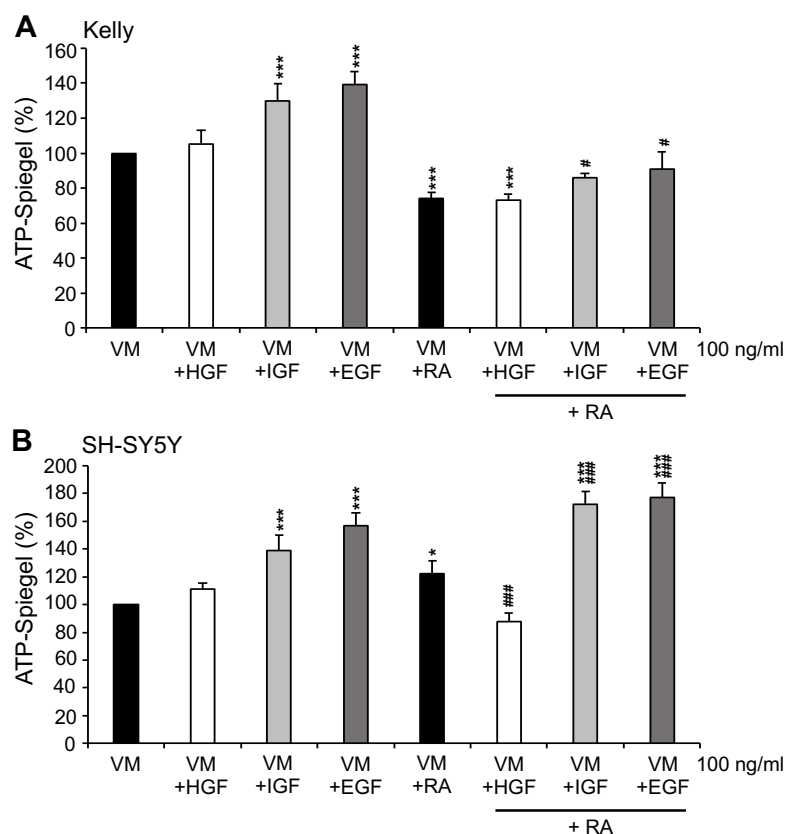
Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) im TaqMan-Assay sowie deren Proteinmenge im Western Blot mit Membranproteinen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium ohne (K, Kontrolle) und mit 5 μM Retinsäure (RA). Expression in relativer Darstellung zu unbehandelten Zellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Hsp90 wurde im Western Blot als Auftragskontrolle verwendet.

### 3.3.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Effekte der Retinsäure durch Supplementation von Wachstumsfaktoren verändern ließen. Dafür wurden die naiven und die Retinsäure-behandelten Zellen für 72 Stunden mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren inkubiert und ihre Zellmengen über die ATP-Spiegel gemessen.

Bei Kelly-Zellen ließ sich die unter Retinsäure reduzierte Zellmenge durch Supplementation von IGF2 oder EGF wieder bis fast auf Kontrollniveau anheben. Die Inkubation der retinsäurebehandelten Kelly-Zellen mit HGF bewirkte hingegen keine Steigerung der ATP-Spiegel im Vergleich zu ausschließlich retinsäurebehandelten Zellen (Abb. 26, A).

Die bei SH-SY5Y-Zellen unter Retinsäure ohnehin erhöhte Zellzahl konnte durch Supplementation von IGF2 oder EGF noch verstärkt werden, HGF hingegen führte zu einer Abnahme der ATP-Spiegel unter das Niveau der alleinigen Retinsäuresupplementation (Abb. 26, B).



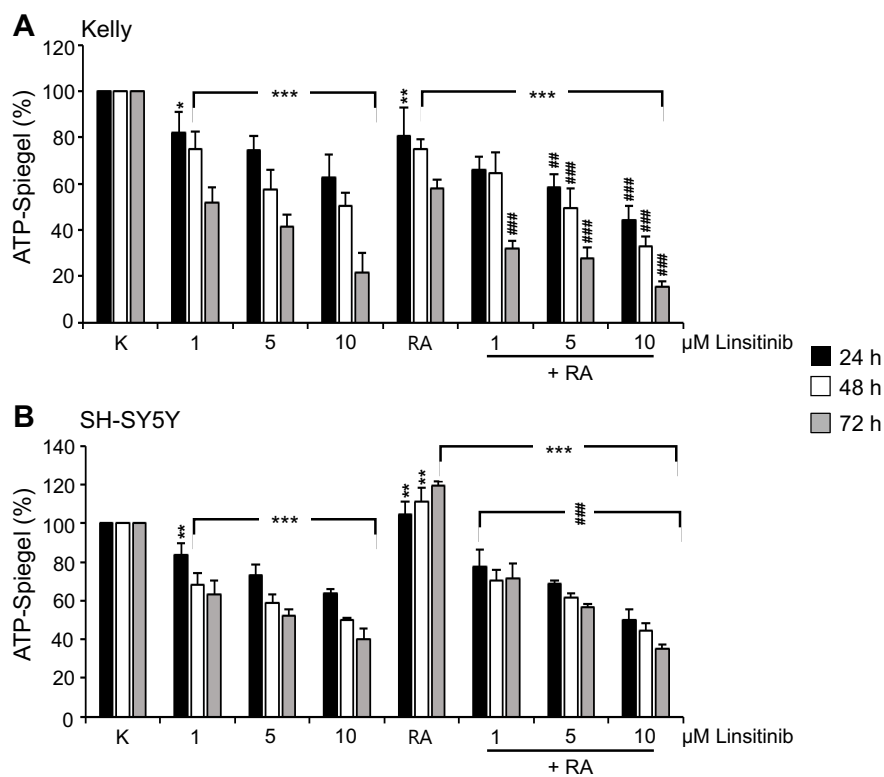
**Abbildung 26:** Effekt von Retinsäure und Wachstumsfaktoren auf Zellen in Vollmedium, 72 h

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM) ohne und mit 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) ohne und mit Zusatz der Wachstumsfaktoren HGF, IGF und EGF (je 100 ng/ml). Darstellung relativ zu den ATP-Spiegeln unbehandelter Zellen in Vollmedium, Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ .

### 3.3.3 Inhibitorexperimente

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen zelltypspezifischen Effekte der Retinsäure die Einflüsse der Wachstumsfaktoringhibitoren auf die Zelllinien veränderten. Es wurden unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen mit und ohne Retinsäure für einen Zeitraum von 24 Stunden bis 72 Stunden getestet.

Bei Kelly-Zellen wurde die Reduktion der Zellmenge durch die gleichzeitige Gabe von Linsitinib und Retinsäure verstärkt (Abb. 27, A). Bei SH-SY5Y-Zellen konnte der Retinsäureeffekt durch den Einsatz von Linsitinib vollständig blockiert werden (Abb. 27, B).

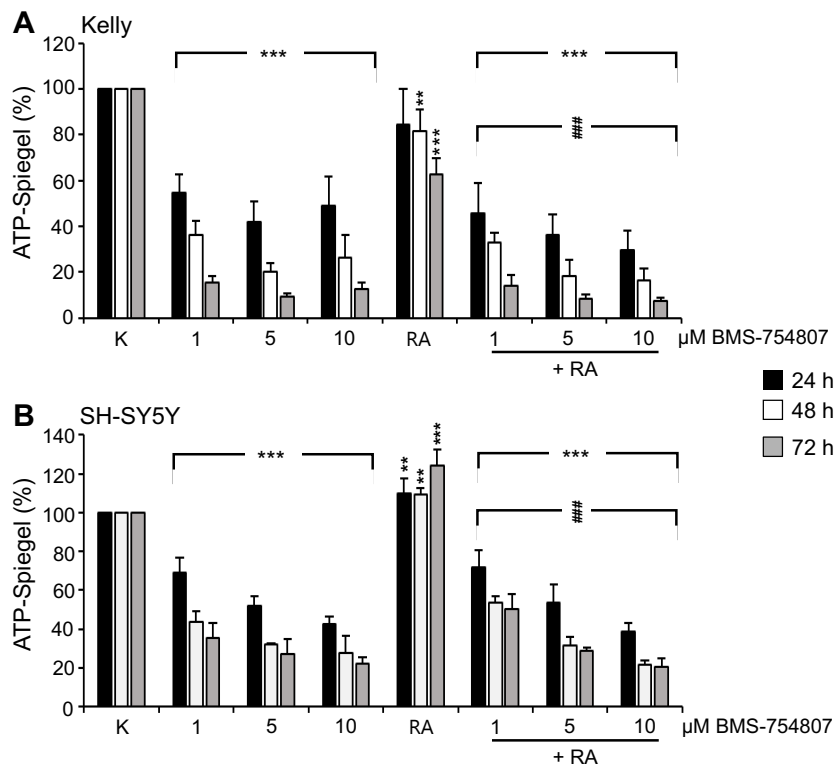


**Abbildung 27:** Effekt von Retinsäure und Linsitinib

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Linsitinib in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Vollmedium (K) und in Vollmedium mit 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA). Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .



Die Reduktion der Zellzahl durch alleinige Behandlung mit BMS-754807 in Kelly-Zellen war bereits so stark, dass die zusätzliche Retinsäure-Gabe keinen weiteren Effekt brachte (Abb. 28, A). Bei den SH-SY5Y-Zellen konnte unter BMS-754807 ähnlich wie unter Linsitinib kein stabilisierender Effekt von Retinsäure beobachtet werden. Es zeigten sich ATP-Spiegel wie bei naiven Zellen (Abb. 28, B).

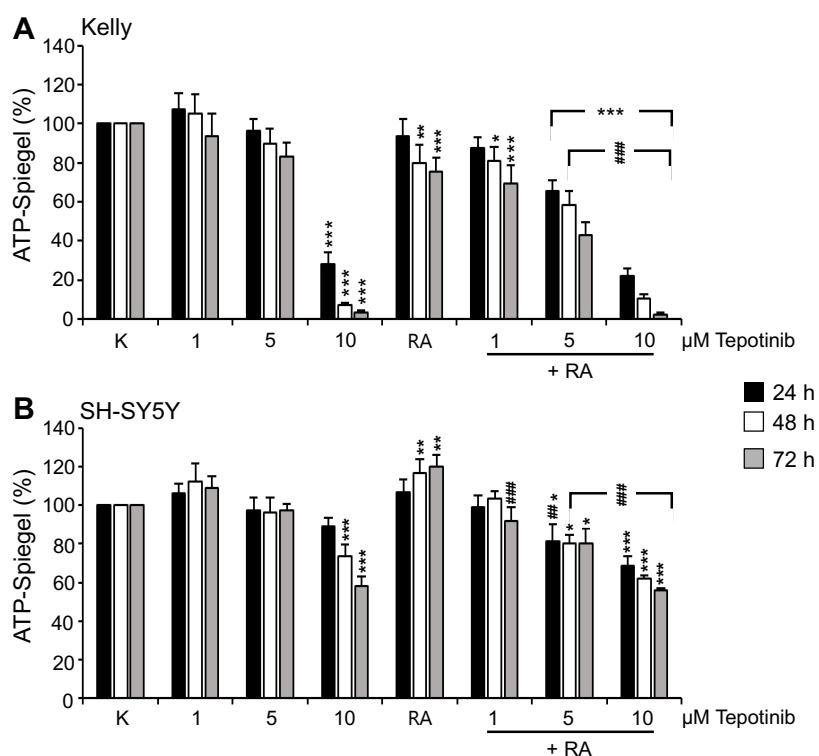


**Abbildung 28:** Effekt von Retinsäure und BMS-754807

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit BMS-754807 in Konzentrationen von 1, 5 und 10 µM in Vollmedium (K) und in Vollmedium mit 5 µM Retinsäure (RA). Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

Die Blockade von c-Met durch Tepotinib führte bei Kelly-Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit Retinsäure bereits in niedrigen Konzentrationen zu einer Reduktion der ATP-Spiegel, die sich nach 48 Stunden als signifikant erwies (Abb. 29, A). Wie auch für schon für Linsitinib ließ sich somit für Tepotinib ein sensibilisierender Effekt der Retinsäure in Kelly-Zellen nachweisen.

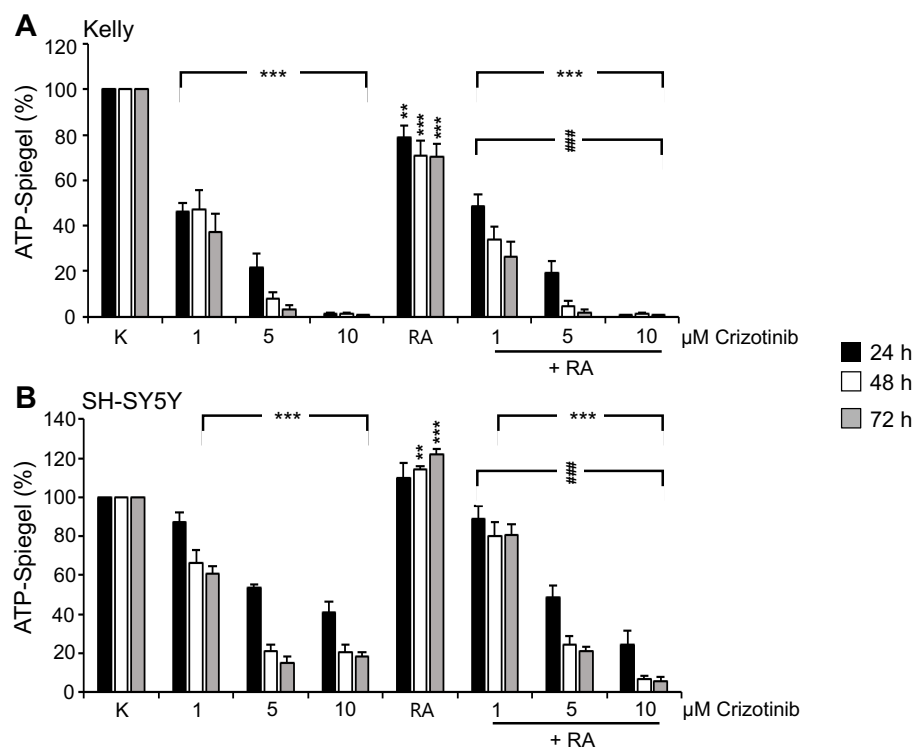
In geringerem Ausmaß wurden auch bei SH-SY5Y-Zellen unter Ko-Stimulation mit Tepotinib und Retinsäure signifikant geringere Zellzahlen ab einer 48-stündigen Behandlung mit mindestens 5  $\mu\text{M}$  Tepotinib nachgewiesen (Abb. 29, B).



**Abbildung 29:** Effekt von Retinsäure und Tepotinib

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Tepotinib in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Vollmedium (K) und in Vollmedium mit 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA). Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05, verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ### p < 0,001.

Ähnlich wie nach Stimulation mit BMS-754807 reduzierte die Gabe von Crizotinib die ATP-Spiegel in naiven Kelly-Zellen bereits so stark, dass kein zusätzlicher Effekt von Retinsäure zu beobachten war (Abb. 30, A). Auch in SH-SY5Y-Zellen blieben die ATP-Spiegel mit und ohne Retinsäure zu den gemessenen Zeitpunkten und bei den verwendeten Inhibitorkonzentrationen auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 30, B).

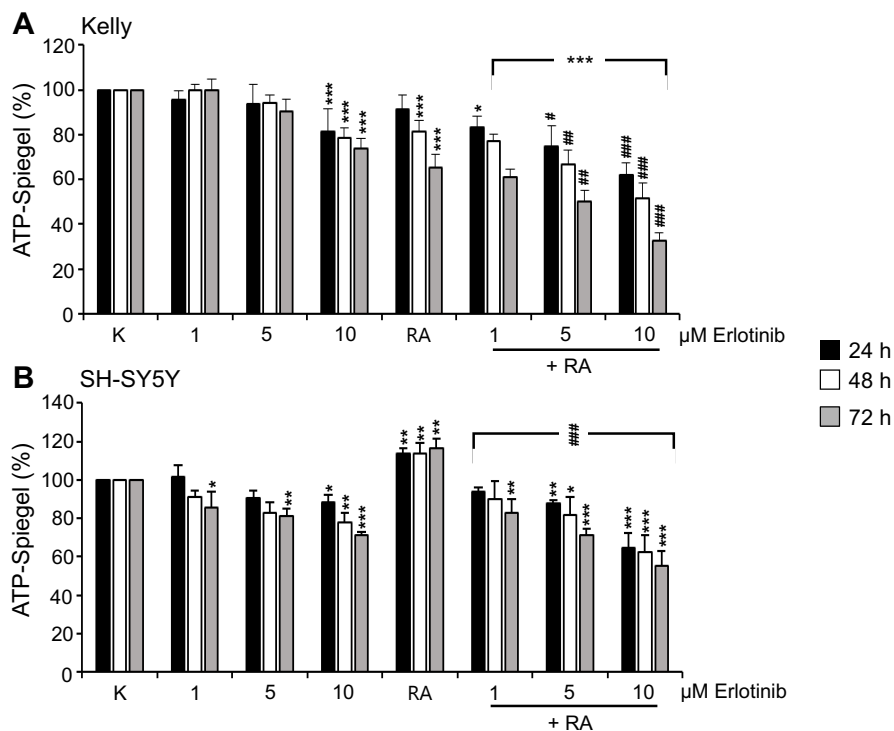


**Abbildung 30:** Effekt von Retinsäure und Crizotinib

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Crizotinib in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Vollmedium (K) und in Vollmedium mit 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA). Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ .

Wurden naive Kelly-Zellen mit Erlotinib behandelt, so konnten erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die ATP-Spiegel signifikant gesenkt werden (Abb. 31, A, vgl. auch Abb. 7, A). Bei gleichzeitiger Inkubation mit Retinsäure gelang dies bereits nach 24 Stunden mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Erlotinib. Wurden 5  $\mu\text{M}$  Erlotinib eingesetzt bei gleichzeitiger Retinsäure-Gabe, waren die ATP-Spiegel nicht nur gegenüber unbehandelten Kontrollen signifikant vermindert, sondern auch im Vergleich zu Zellen, die nur Retinsäure erhielten (Abb. 31, A). Demnach führte eine gleichzeitige Retinsäure-Gabe zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Kelly-Zellen für Erlotinib.

SH-SY5Y-Zellen zeigten bei gleichzeitiger Behandlung mit Retinsäure und Erlotinib bei einer Inhibitorkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  bereits nach 24 Stunden signifikant reduzierte ATP-Spiegel gegenüber unbehandelten Kontrollen, was für eine leicht erhöhte Empfindlichkeit durch den Einsatz von Retinsäure sprach (Abb. 31, B).



**Abbildung 31:** Effekt von Retinsäure und Erlotinib

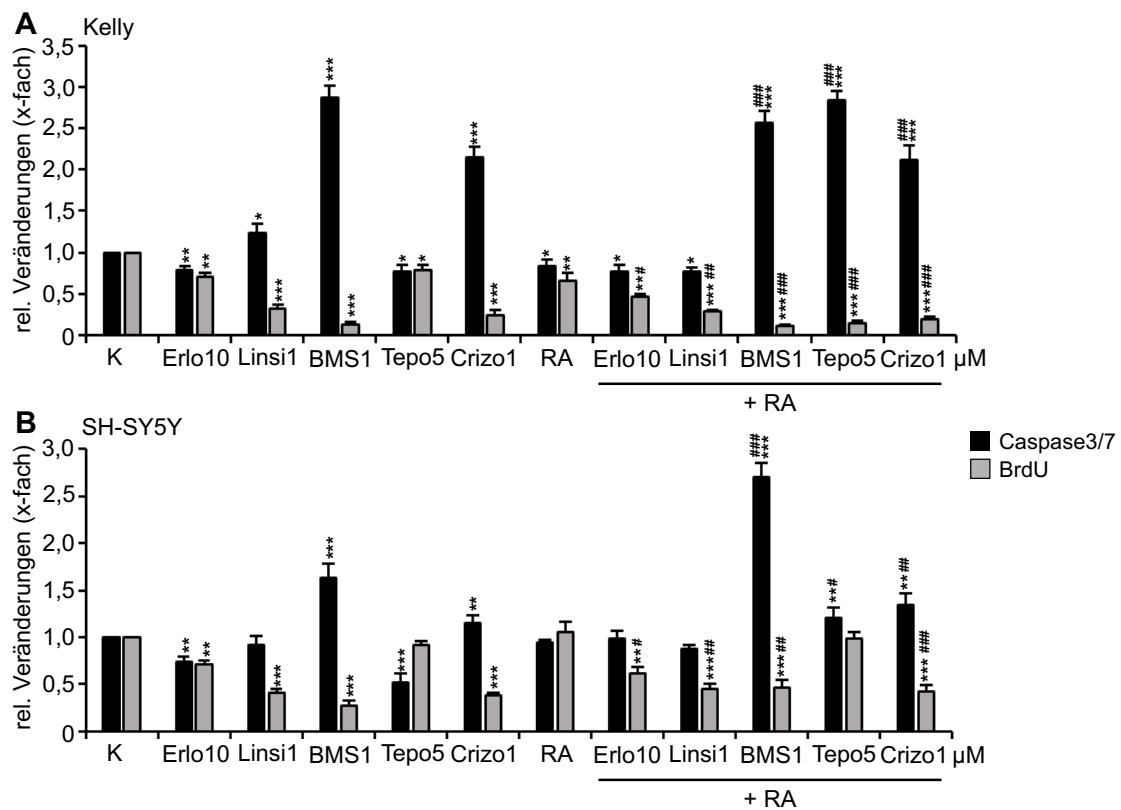
ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Erlotinib in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Vollmedium (K) und in Vollmedium mit 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA). Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ .

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass Retinsäure die Reduktion der viablen Zellen durch die untersuchten Wachstumsfaktoringhibitoren eher verstärkte. Dass Ko-Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure bei keinem der Inhibitoren einen stabilisierenden Effekt hatte, war angesichts der Wirkung von Retinsäure auf naive SH-SY5Y-Zellen überraschend.

Um zu untersuchen, worauf die Reduktion der Zellmenge unter Ko-Stimulation mit Retinsäure und Inhibitoren zurückzuführen war, wurden Proliferation und Zytotoxizität mittels BrdU-Einbau und Caspase-Aktivität bestimmt. Kelly-Zellen zeigten im BrdU-Einbau eine Abnahme der Proliferation durch alle Inhibitoren, die durch Zugabe von Retinsäure noch verstärkt wurde (Abb. 32, A; vgl. auch Abb. 8). Die Caspase-Aktivität bei Kelly-Zellen stieg ohne Retinsäure signifikant nur durch Linsitinib ( $p < 0,05$ ), BMS-754807 und Crizotinib (jeweils  $p < 0,001$ ) und veränderte sich durch zusätzliche Retinsäuregabe bei diesen Inhibitoren nicht. Bei Tepotinib-Behandlung der Kelly-Zellen konnte die Caspase-Aktivität durch zusätzliche Retinsäuregabe erhöht werden. Erlotinib alleine bewirkte bei Kelly-Zellen eine Erniedrigung der Caspase-Aktivität, die durch Ko-Stimulation mit Retinsäure kaum verändert wurde (Abb. 32, A).

SH-SY5Y-Zellen zeigten ebenfalls eine Reduktion der Proliferation im BrdU-Assay durch alle Inhibitoren mit Ausnahme von Tepotinib. Die Gabe von Retinsäure hatte keinen stabilisierenden Effekt, sodass auch bei Ko-Stimulation mit Retinsäure und den Inhibitoren die Proliferation herabgesetzt bzw. im Fall von Tepotinib konstant blieb (Abb. 32, B). Die Caspase-Aktivität der Inhibitor-behandelten SH-SY5Y-Zellen konnte durch Retinsäuregabe verstärkt werden. Die einzige Ausnahme bildete die Inhibition mit Linsitinib, bei der die Caspase-Aktivität trotz Retinsäurezugabe stabil blieb (Abb. 32, B).

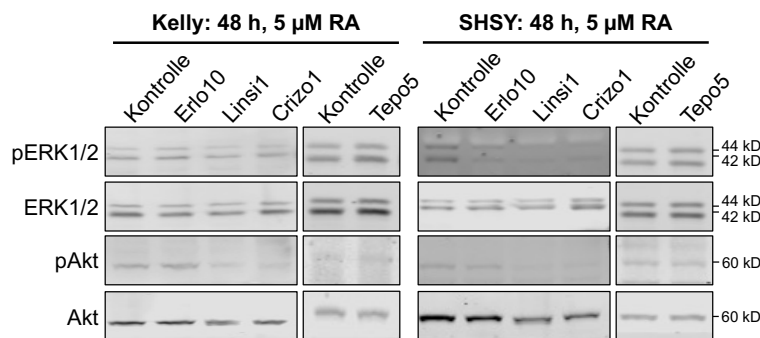
Für beide Zelllinien konnte also eine Verstärkung der Zytotoxizität der Inhibitoren unter Retinsäure nachgewiesen werden (Abb. 32). Gerade für SH-SY5Y-Zellen waren diese Ergebnisse überraschend, da Retinsäure allein den basalen Zelltod reduzierte (vgl. Abb. 23).



**Abbildung 32:** Analyse von Zelltod und Proliferation durch Retinsäure und Inhibitoren, 48 h

Zelltod mittels Caspase3/7-Assay und Zellproliferation mittels BrdU-Assay der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 48-stündiger Inkubation in Vollmedium ohne und mit Retinsäurezusatz (RA, 5  $\mu$ M) mit den Inhibitoren Erlotinib 10  $\mu$ M (Erlo10), Linsitinib 1  $\mu$ M (Linsi1), BMS-754807 1  $\mu$ M (BMS1), Tepotinib 5  $\mu$ M (Tepo5) und Crizotinib 1  $\mu$ M (Crizo1). Angabe relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

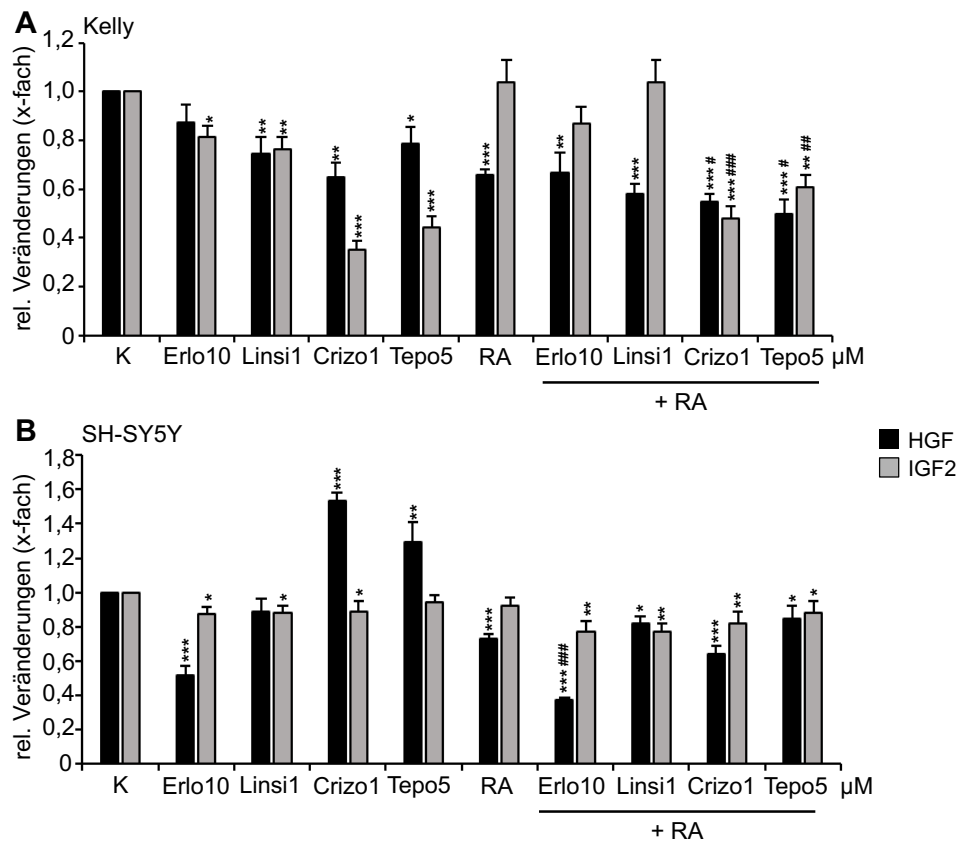
Im Western Blot der Kinasen nach 48-stündiger Inkubation mit Retinsäure und Inhibitoren zeigte sich insbesondere für das stark wirksame Crizotinib eine deutliche Reduktion der Akt-Phosphorylierung bei beiden Zelllinien (Abb. 33). Auch die Inkubation mit Linsitinib verminderte die Aktivität von Akt. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde in ko-stimulierten SH-SY5Y-Zellen durch die Gabe von Erlotinib, Linsitinib und Crizotinib im Vergleich zu Retinsäure-Kontrollen deutlich reduziert, in Kelly-Zellen jedoch nur durch Linsitinib (Abb. 33).



**Abbildung 33:** Kinase-Aktivität nach Retinsäure und Inhibitoren, 48 h

Western Blot mit DLB-Lysaten der Kinaseaktivität von ERK1/2 und Akt der Kelly-Zellen und SH-SY5Y-Zellen nach 48-stündiger Inkubation in Vollmedium mit 5 μM Retinsäure (RA) und den Inhibitoren Erlotinib 10 μM (Erlotinib), Linsitinib 1 μM (Linsitinib), Crizotinib 1 μM (Crizotinib) und Tepotinib 5 μM (Tepotinib). Als Kontrolle dienten Zellen in Vollmedium mit 5 μM Retinsäure.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch die Gabe von Retinsäure auch die Freisetzung der Wachstumsfaktoren HGF und IGF2 beeinflusst werden konnte. Bei Kelly-Zellen reduzierten alle Inhibitoren die Freisetzung der untersuchten Wachstumsfaktoren (vgl. Abb. 9). Durch alleinige Gabe von Retinsäure sank die Freisetzung von HGF (vgl. Abb. 24). Dieser Effekt konnte durch Crizotinib und Tepotinib verstärkt werden (Abb. 34, A). Bei der Freisetzung von IGF2 hingegen wirkte Retinsäure bei Erlotinib und Linsitinib stabilisierend, sodass IGF2 auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollzellen freigesetzt wurde. Nur bei Ko-Stimulation von Retinsäure und Crizotinib bzw. Tepotinib wurde weniger IGF2 im Überstand detektiert als in den Kontrollzellen oder den alleinig Retinsäure-behandelten Zellen (Abb. 34, A). SH-SY5Y-Zellen konnten die IGF2-Freisetzung unter allen Inhibitoren und unter alleiniger Retinsäuregabe nahezu stabil halten. Eine gleichzeitige Gabe von Retinsäure und den Inhibitoren führte jedoch zu einer Reduktion des detektierten IGF2 im Überstand (Abb. 34, B). Die HGF-Freisetzung wurde ohne Retinsäure durch Erlotinib reduziert, durch Crizotinib sowie Tepotinib hingegen induziert (vgl. auch Abb. 9). Alleinige Retinsäuregabe bewirkte einen Abfall von HGF. Die abnehmende HGF-Freisetzung unter Erlotinib wurde durch Retinsäure verstärkt, während die ohne Retinsäure beschriebene Induktion der HGF-Freisetzung unter Crizotinib und Tepotinib unter Retinsäuregabe nicht aufrechterhalten werden konnte (Abb. 34, B).

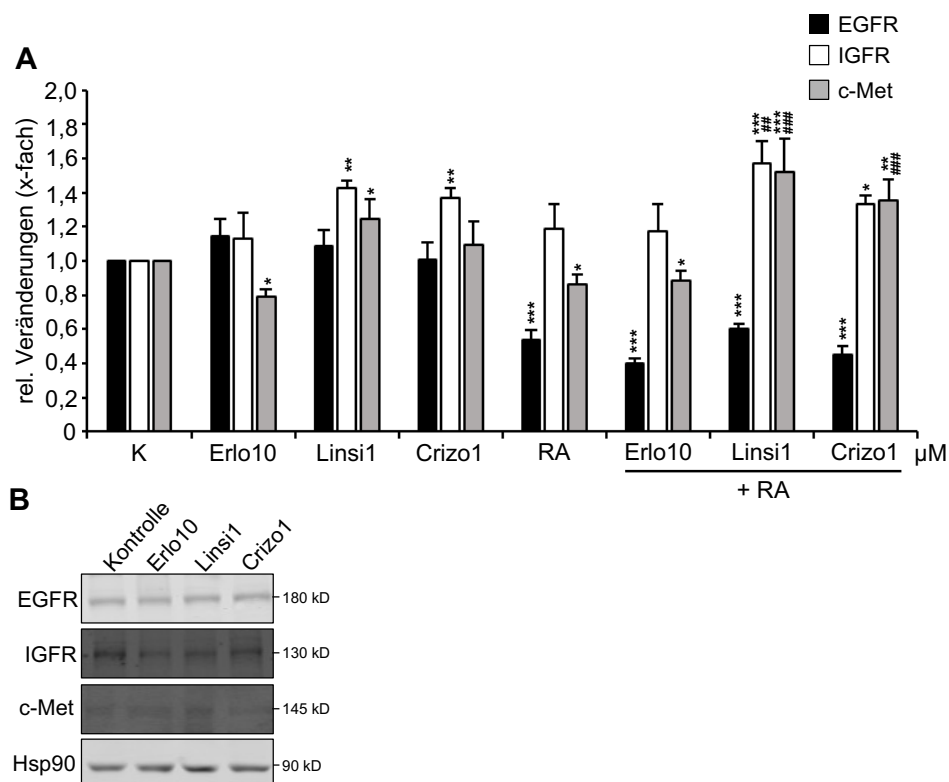


**Abbildung 34:** Freisetzung von HGF und IGF2 nach Retinsäure und Inhibitoren, 72 h

Freigesetzte Proteinmengen von HGF und IGF2 im Überstand der Kelly-Zellen (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) mittels ELISA nach 72-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren in Vollmedium ohne und mit Zusatz von 5  $\mu$ M Retinsäure (RA), Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ , #  $p < 0,05$ . Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10  $\mu$ M, Linsi1 = Linsitinib 1  $\mu$ M, Crizo1 = Crizotinib 1  $\mu$ M, Tepo5 = Tepotinib 5  $\mu$ M.



Die Retinsäuresupplementation hatte auch einen Einfluss auf die Wachstumsfaktorrezeptoren. Kelly-Zellen zeigten eine Stabilisierung der EGFR-Expression unter Inhibitorbehandlung, die durch Retinsäuregabe allein und vor allem in Ko-Stimulation mit Erlotinib oder Crizotinib signifikant reduziert wurde (Abb. 35, A). Die Proteinmenge blieb bei der Ko-Stimulation im Vergleich zu der Retinsäure-Kontrolle unverändert (Abb. 35, B). Die IGFR-Expression wurde durch Gabe von Linsitinib und Crizotinib induziert, bei Linsitinib ließ sich der Effekt durch zusätzliche Retinsäuregabe noch verstärken. C-Met zeigte ohne Retinsäure einen Expressionsabfall unter Erlotinib, eine Induktion unter Linsitinib und eine stabile Expression unter Crizotinib. Retinsäure allein senkte die c-Met-Expression, verstärkte aber die Expressionsinduktion bei zusätzlicher Gabe zu Linsitinib oder Crizotinib (Abb. 35, A). Die Proteinmengen der Rezeptoren im Western Blot blieben unter der Inhibitorbehandlung stabil (Abb. 35, B, vgl. auch Abb. 10, A).



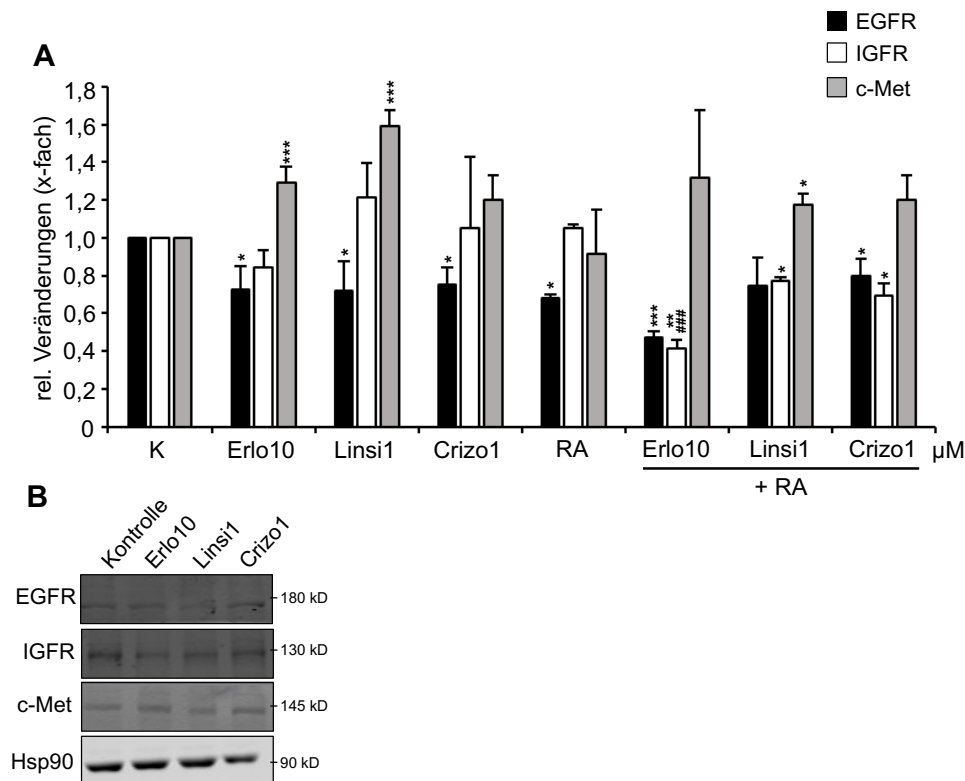
**Abbildung 35:** Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren nach Gabe von Retinsäure und Inhibitoren in Kelly-Zellen, 72 h

**A:** Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR und c-Met der Kelly-Zellen im TaqMan-Assay nach 72-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren in Vollmedium ohne und mit Zusatz von 5  $\mu$ M Retinsäure (RA), Darstellung relativ zur Expression in unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit Vollmedium mit Retinsäurezusatz: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ .

**B:** Proteinmenge der Rezeptoren im Western Blot mit DLB-Lysaten nach 72-stündiger Inhibitorbehandlung in Vollmedium mit 5  $\mu$ M Retinsäure. Als Kontrolle dienten Zellen in Vollmedium mit 5  $\mu$ M Retinsäure, Hsp90 wurde als Auftragskontrolle verwendet. Inhibitoren: Erlotinib 10  $\mu$ M, Linsitinib 1  $\mu$ M, Crizotinib 1  $\mu$ M.

SH-SY5Y-Zellen zeigten einen signifikanten Abfall der EGFR-Expression durch die Inhibitoren (vgl. auch Abb. 10, B) und Retinsäure (Abb. 36, A). Bei Zugabe zu Erlotinib reduzierte Retinsäure die EGFR-Expression zusätzlich, während bei Retinsäurezugabe zu Linsitinib oder Crizotinib die EGFR-Expression im Vergleich zur alleinigen Inhibitorbehandlung weitgehend stabil blieb (Abb. 36, A). Die IGFR-Expression der SH-SY5Y-Zellen blieb unter Inhibitorgabe weitgehend unverändert. Unter alleiniger Retinsäuregabe blieb die IGFR-Expression ebenfalls stabil, bei Retinsäure zusätzlich zu den Inhibitoren fiel sie jedoch ab, vor allem unter Erlotinib (Abb. 36, A). C-Met wurde nach der Inkubation mit Erlotinib und Linsitinib induziert, unter Crizotinib blieb die Expression des Rezeptors stabil (Abb. 36, A). Retinsäure alleine bewirkte eine c-Met-Expression auf Kontrollzellniveau und veränderte bei Ko-Stimulation das Expressionsniveau unter Erlotinib und Crizotinib nicht. Lediglich bei Ko-Stimulation mit Linsitinib reduzierte Retinsäure die Expressionsinduktion des c-Met im Vergleich zur alleinigen Linsitinib-Gabe, sodass die Expression des c-Met reduziert wurde.

Im Vergleich zwischen Retinsäure-Kontrollen und mit Inhibitoren kostimulierten Zellen zeigten sich im Western Blot reduzierte Signale für EGFR und IGFR nach Erlotinib und Linsitinib bei sonst unveränderten Banden (Abb. 36, B).



**Abbildung 36:** Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren nach Gabe von Retinsäure und Inhibitoren in SH-SY5Y-Zellen, 72 h

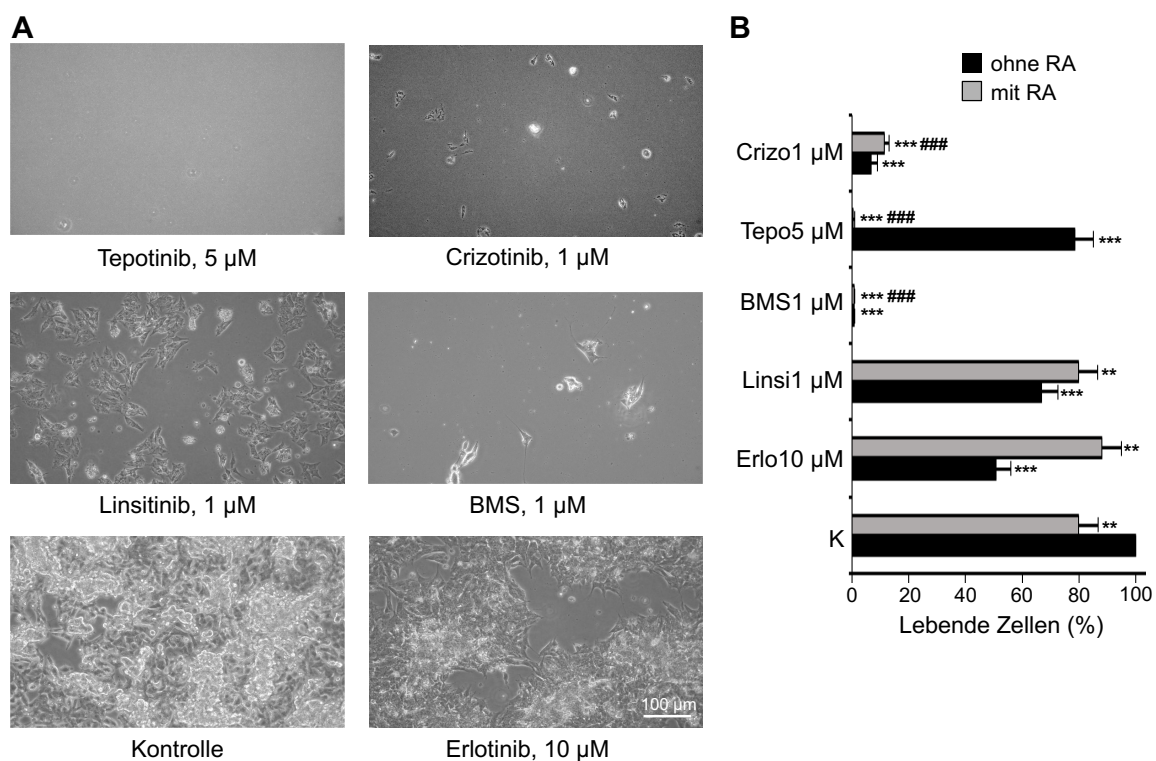
**A:** Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR und c-Met der SH-SY5Y-Zellen im TaqMan-Assay nach 72-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren in Vollmedium ohne und mit Zusatz von 5  $\mu$ M Retinsäure (RA), Darstellung relativ zur Expression in unbehandelten Kontrollzellen (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit RA: ###  $p < 0,001$ .

**B:** Proteinmenge der Rezeptoren im Western Blot mit DLB-Lysaten nach 72-stündiger Inhibitorbehandlung in Vollmedium mit 5  $\mu$ M Retinsäure. Als Kontrolle dienten Zellen in Vollmedium mit 5  $\mu$ M Retinsäure, Hsp90 wurde als Auftragskontrolle verwendet.

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10  $\mu$ M, Linsi1 = Linsitinib 1  $\mu$ M, Crizo1 = Crizotinib 1  $\mu$ M.

Um zu überprüfen, ob trotz Kombination aus Inhibitoren und Retinsäure persistierende Zellen gebildet werden konnten, wurden diese auf 6-Well-Platten ausgesät und für zehn Tage mit Inhibitoren und Retinsäure inkubiert.

Kelly-Zellen konnten unter alleiniger Retinsäuregabe persistierende Zellen auf im Vergleich zu den naiven Kontrollzellen leicht reduziertem Niveau bilden (Abb. 37, A und B). Dieses Niveau wurde durch Ko-Stimulation mit Erlotinib oder Linsitinib und Retinsäure nicht verändert. Damit war die persistierende Zellmenge für diese beiden Inhibitoren unter zusätzlicher Retinsäuregabe höher als ohne Retinsäurezusatz (Abb. 37, B). Wurden die Zellen jedoch gleichzeitig mit Tepotinib und Retinsäure inkubiert, waren nur noch vereinzelt Zellen nachweisbar und die Gesamtzahl daher signifikant geringer als bei unstimulierten Kontrollen oder Retinsäure-behandelten Zellen (Abb. 37, B). Die alleinige Inkubation mit den Zelltod-auslösenden Inhibitoren BMS-754807 und Crizotinib bewirkte bereits eine so starke Reduktion der Zellzahl, dass durch zusätzliche Retinsäuregabe keine weiteren Effekte erreicht wurden (Abb. 37, B).



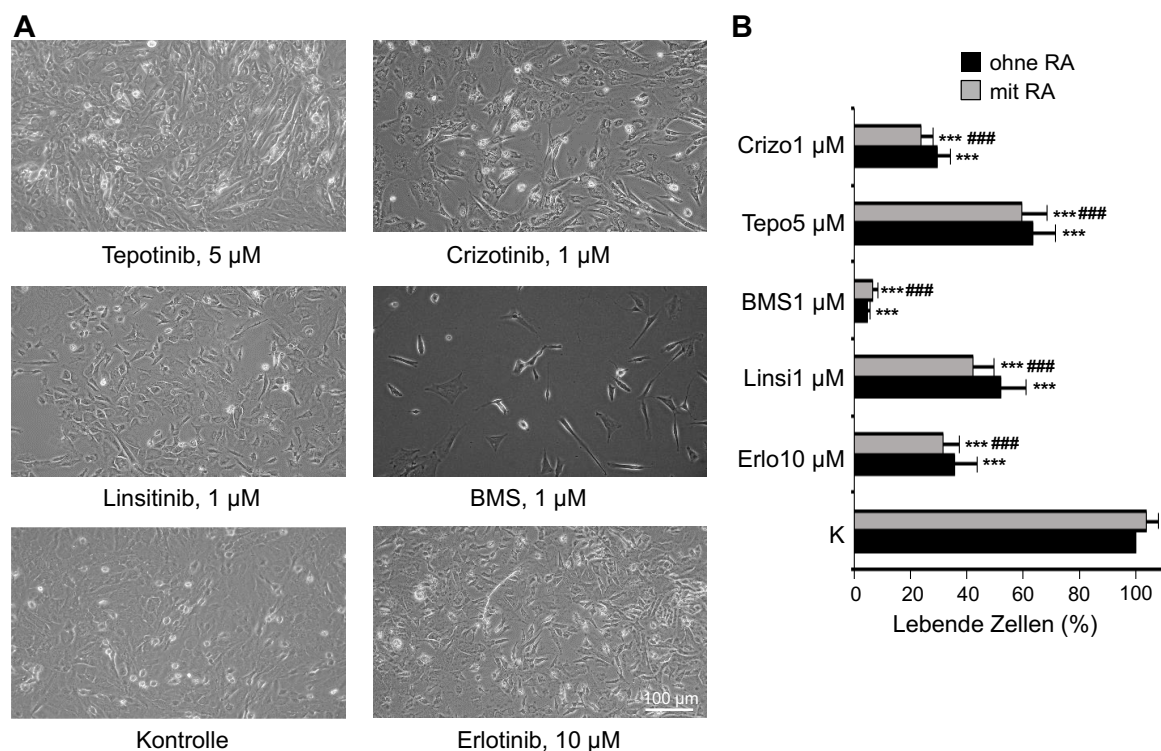
**Abbildung 37:** Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen in Vollmedium mit Retinsäurezusatz, 10 d

**A:** Fotografien der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Vollmedium mit 5 µM Retinsäure (Kontrolle) und den jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung in Vollmedium ohne und mit 5 µM Retinsäure (RA) mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium ohne Retinsäure (K), Signifikanzniveau verglichen mit K \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , verglichen mit RA: ###  $p < 0,001$ .

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10 µM, Linsi1 = Linsitinib 1 µM, BMS1 = BMS-754807 1 µM, Tepo5 = Tepotinib 5 µM, Crizo1 = Crizotinib 1 µM.

Bei SH-SY5Y-Zellen blieb die Zellzahl nach zehntägiger Inkubation mit Retinsäure im Vergleich zu den naiven Kontrollen weitgehend unverändert (Abb. 38, B). Wie bereits in der Messung der ATP-Spiegel über drei Tage angedeutet, führte dies jedoch nicht zu einer Stabilisierung der Zellen gegenüber der Inhibitorbehandlung (vgl. Abb. 27 bis 31). Entsprechend zeigte sich die Zellzahl unter Ko-Stimulation mit Retinsäure und Inhibitoren insgesamt deutlich reduziert auf dem Niveau der alleinigen Inhibitorbehandlung (Abb. 38, B).



**Abbildung 38:** Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen in Vollmedium mit Retinsäurezusatz, 10 d

**A:** Fotografien der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Vollmedium mit 5 µM Retinsäure (Kontrolle) und den jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung in Vollmedium ohne und mit 5 µM Retinsäure (RA) mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium ohne Retinsäure (K), Signifikanzniveau verglichen mit K \*\*\*  $p < 0,001$ , verglichen mit RA: ###  $p < 0,001$ .

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10 µM, Linsi1 = Linsitinib 1 µM, BMS1 = BMS-754807 1 µM, Tepo5 = Tepotinib 5 µM, Crizo1 = Crizotinib 1 µM.

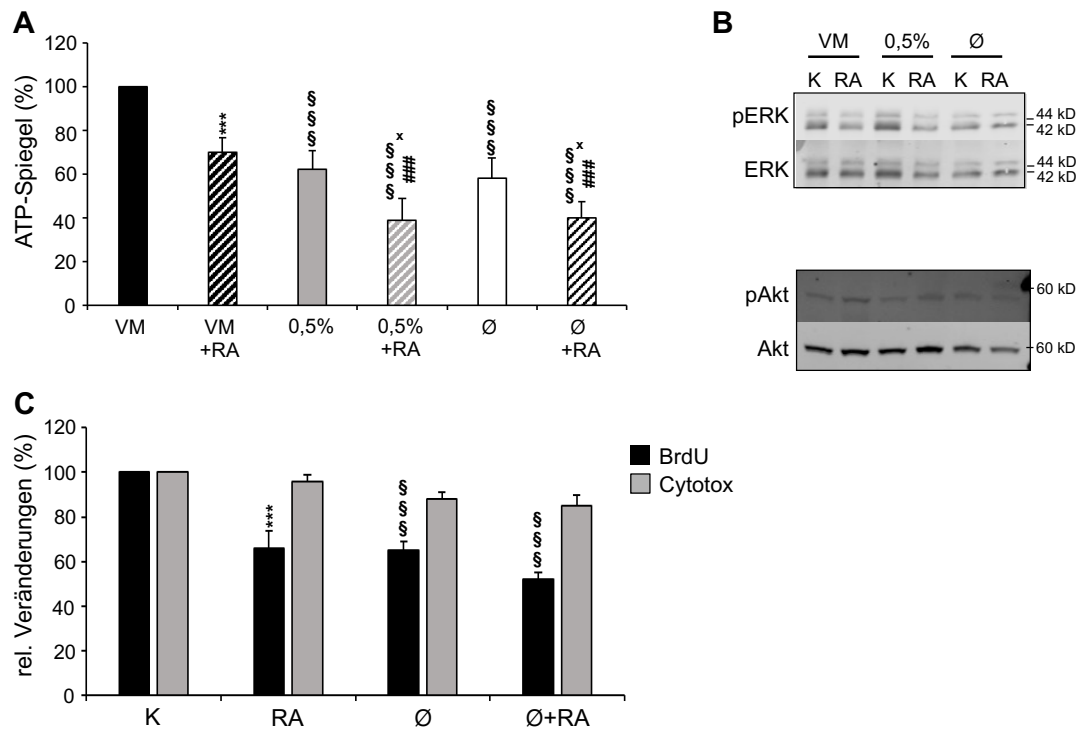
### **3.4 Charakterisierung von Retinsäure-behandelten Zellen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Medium ohne Serum**

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Bedeutung die einzelnen Wachstumsfaktoren in Retinsäure-behandelten Zellen einnehmen. Daher wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen in Medium ohne fetales Kälberserum, dafür aber mit einzelnen oder kombinierten Wachstumsfaktoren kultiviert und Retinsäure zugesetzt.

#### **3.4.1 Verhalten der Retinsäure-behandelten Zellen unter Serumentzug**

Zunächst wurden die Zelllinien in unterschiedlichen Medien ohne und mit Retinsäure für 72 Stunden inkubiert und ihre Zellmenge anhand der ATP-Spiegel sowie ihre Phosphorylierungsmuster der Kinasen ERK1/2 und Akt verglichen. Um besser nachvollziehen zu können, wodurch sich die ATP-Spiegel unter den verschiedenen Bedingungen veränderten, wurden außerdem separat Proliferation und Zelltod untersucht.

Bei den Kelly-Zellen ließ sich die Zellzahl durch Retinsäure im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit Vollmedium, 0,5-prozentigem Serum oder ohne Serum weiter senken. Die Ursache dafür bildete weiterhin keine Zytotoxizität, sondern reduziertes Wachstum, was sich am verringerten BrdU-Einbau ablesen ließ (Abb. 39, A und C). Die Phosphorylierung von ERK1/2 war in 0,5-prozentigem Medium im Vergleich zur Vollmedium-Kontrolle stabil, bei komplettem Serumentzug jedoch reduziert (Abb. 39, B). Die Gabe von Retinsäure verminderte die ERK1/2-Aktivität nur, solange die Zellen Serum zur Verfügung hatten. Die basale Phosphorylierung von Akt wurde durch den Serumgehalt des Mediums nicht beeinflusst. Wie auch in Vollmedium konnte durch Retinsäuregabe in Medium mit reduziertem Serumgehalt keine Akt-Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 39, B).



**Abbildung 39:** Kelly-Zellen in verschiedenen Medien mit und ohne Retinsäure, 72 h

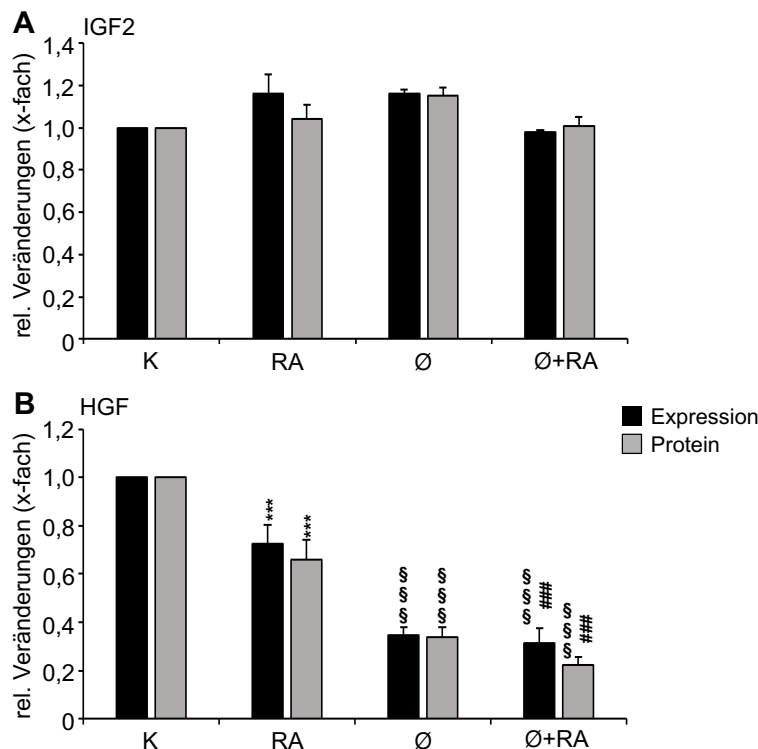
**A:** ATP-Spiegel der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM), Medium mit 0,5 % Serum (0,5 %) und Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA), Darstellung relativ zu unbehandelten Zellen in Vollmedium. Signifikanzniveau verglichen mit VM: \*\*\*  $p < 0,001$  und §§§  $p < 0,001$ , verglichen mit RA: ###  $p < 0,001$ , verglichen mit Ø: x  $p < 0,05$ .

**B:** Western Blot mit DLB-Lysaten der Kinaseaktivität von ERK1/2 und Akt der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM), Medium mit 0,5 % Serum (0,5 %) und Medium ohne Serum (Ø) ohne (K) und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA).

**C:** Proliferation im BrdU-Assay und Zytotoxizität der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (K) und Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA). Darstellung relativ zu unbehandelten Zellen in Vollmedium (K). Signifikanzniveau verglichen mit K \*\*\*  $p < 0,001$  und §§§  $p < 0,001$ .

Da die deutlichsten Veränderungen auftraten, wenn die Zellen komplett ohne Serum kultiviert und stimuliert wurden, wurden im Folgenden ausschließlich Zellen in Vollmedium oder Zellen ohne Serum miteinander verglichen.

Dass Expression und Freisetzung von IGF2 in Kelly-Zellen durch einen Serumentzug nicht beeinflusst wurden, wurde bereits beschrieben (vgl. Abb. 13, B). Auch unter Zugabe von Retinsäure änderten sich bei Kelly-Zellen weder Expression noch Freisetzung von IGF2 im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 40, A). Die unter Retinsäure in Vollmedium bereits signifikant reduzierte Expression und Freisetzung von HGF wurde durch Serumentzug und Retinsäuregabe signifikant weiter reduziert (Abb. 40, B).



**Abbildung 40:** Expression und Freisetzung von IGF2 und HGF in Kelly-Zellen mit und ohne Retinsäure und Serum, TaqMan-Assays und ELISA, 72 h

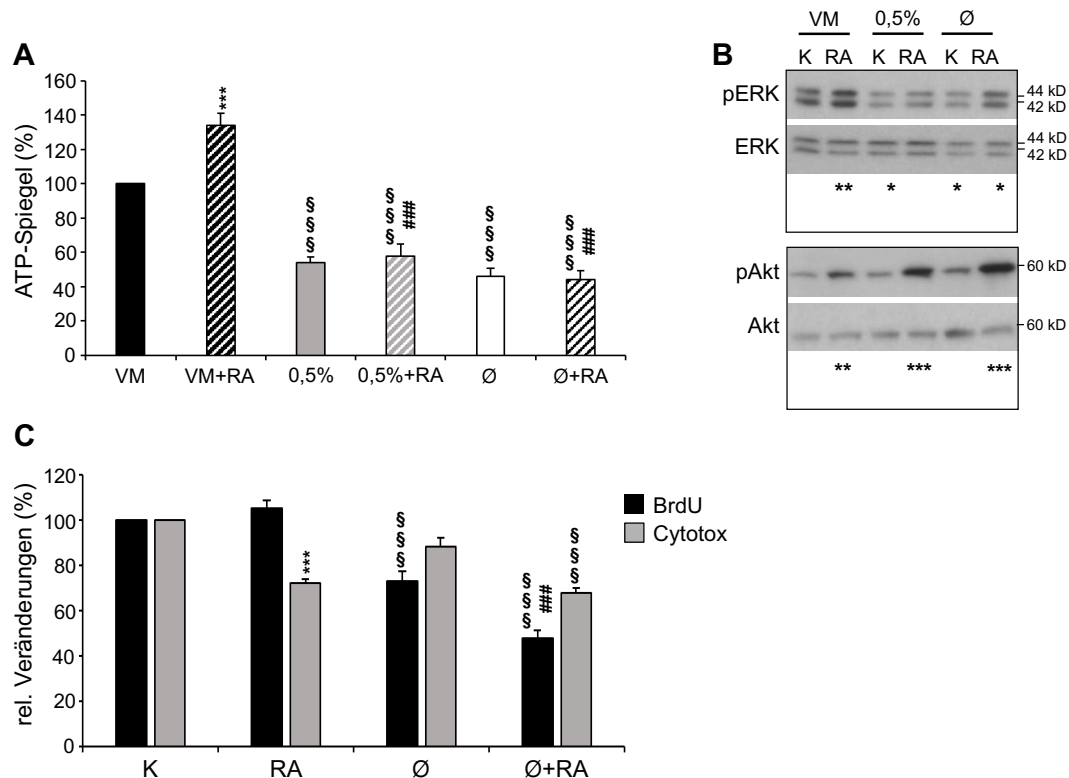
Expression (TaqMan-Assay) und Proteinmenge (ELISA) von IGF2 (**A**) und HGF (**B**) in Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (K) und Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA), dargestellt als relative Veränderung zu Vollmedium allein (K). Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$  und §§§  $p < 0,001$ , verglichen mit Retinsäure: ###  $p < 0,001$ .

Bei SH-SY5Y-Zellen bewirkte der Serumentzug (0,5-prozentiges Medium und vollständiger Serumentzug) eine signifikante Reduktion der Menge an lebenden Zellen, die sich durch Retinsäuregabe nicht veränderte (Abb. 41, A). Im Vergleich zu den Kontrollen in Vollmedium ergab sich eine geringere basale Aktivität von ERK1/2 in Zellen, die in 0,5-prozentigem Medium oder ganz ohne Serum kultiviert wurden. Die Inkubation mit Retinsäure verstärkte die Phosphorylierung, während die Proteinmenge von ERK1/2 konstant blieb (Abb. 41, B). Im Gegensatz dazu wurde die basale Aktivität von Akt nach Serumreduktion bzw. -deprivation eher erhöht und durch die Gabe von Retinsäure zusätzlich gesteigert (Abb. 41, B). Da sich die Reaktionen der Zellen in 0,5-prozentigem



Medium und Medium ohne Serum nicht wesentlich unterschieden, wurden auch hier in den folgenden Experimenten lediglich Zellen in Vollmedium mit Zellen ohne Serum verglichen.

Ursächlich für die geringere Zellzahl nach Serumentzug war eine Reduktion der Proliferation bei stabiler Zytotoxizität. Die Zytotoxizität ließ sich durch eine zusätzliche Retinsäuregabe signifikant reduzieren, aber auch die Proliferation wurde darunter reduziert, sodass die Zellmenge der serumdeprivierten retinsäurebehandelten Zellen im Vergleich zu alleinig serumdeprivierten Zellen konstant blieb (Abb. 41, A und C).



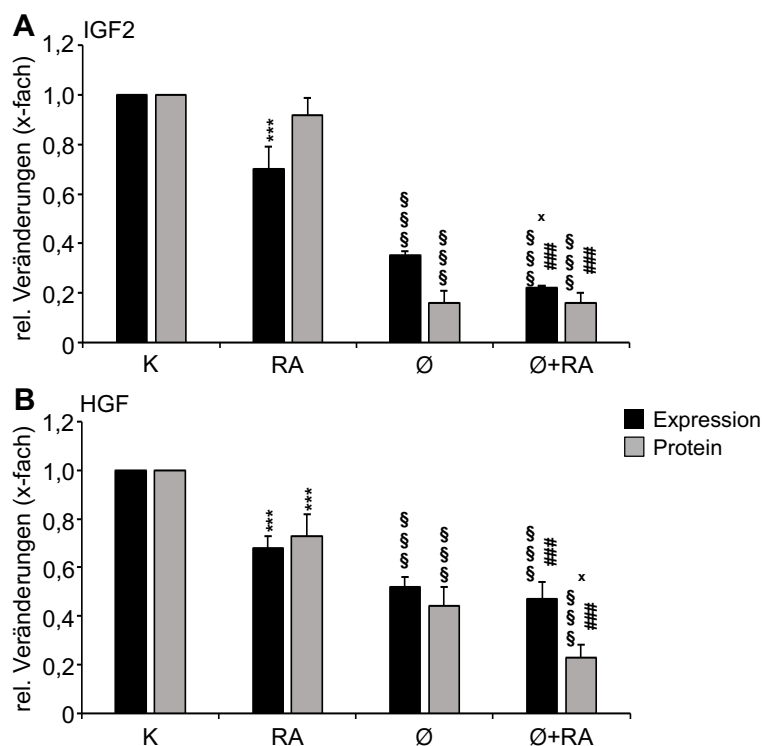
**Abbildung 41:** SH-SY5Y-Zellen in unterschiedlichen Medien mit und ohne Retinsäure, 72 h

**A:** ATP-Spiegel der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM), Medium mit 0,5 % Serum (0,5 %) und Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA), Darstellung relativ zu unbehandelten Zellen in Vollmedium. Signifikanzniveau verglichen mit VM: \*\*\*  $p < 0,001$  und §§§  $p < 0,001$ , verglichen mit RA: ###  $p < 0,001$ .

**B:** Western Blot mit DLB-Lysaten der Kinaseaktivität von ERK1/2 und Akt der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM), Medium mit 0,5 % Serum (0,5 %) und Medium ohne Serum (Ø) ohne (K) und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA). Signifikanzniveau verglichen mit K: \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  und \*\*\*  $p < 0,001$ .

**C:** Proliferation im BrdU-Assay und Zytotoxizität der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (K) und Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA). Darstellung relativ zu unbehandelten Zellen in Vollmedium (K). Signifikanzniveau verglichen mit K \*\*\*  $p < 0,001$  und §§§  $p < 0,001$ .

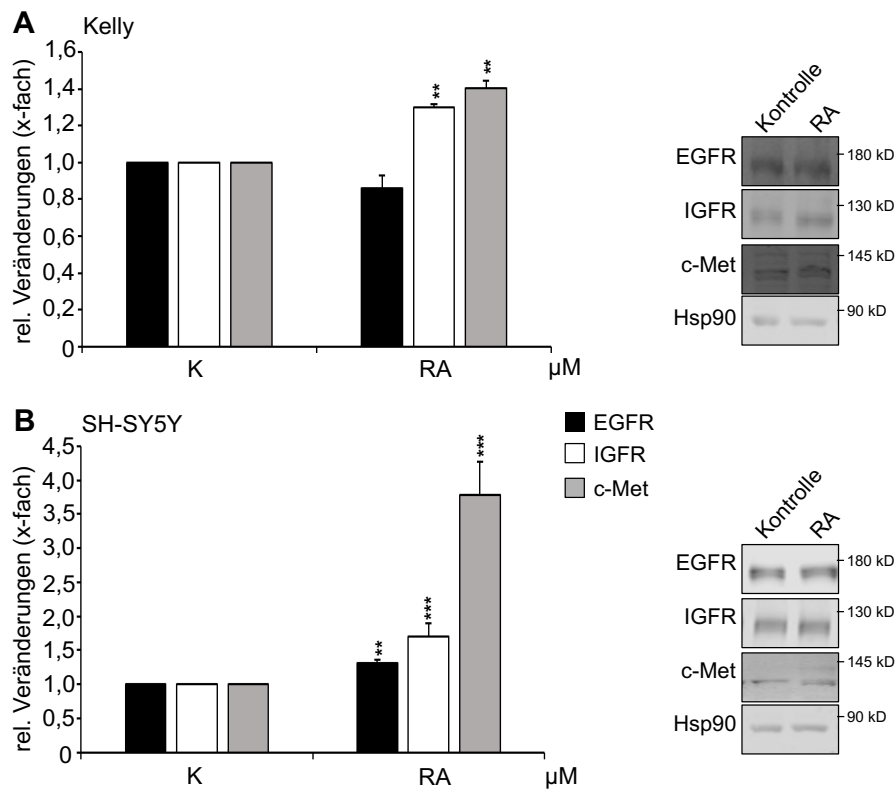
Wie bereits beschrieben, wurden unter Serumentzug die Expression und Freisetzung von IGF2 durch die SH-SY5Y-Zellen signifikant reduziert (vgl. Abb. 23, B). Eine zusätzliche Retinsäuregabe bewirkte unter Vollmedium und unter Serumentzug eine Reduktion der IGF2-Expression bei stabiler Proteinmenge, die sich ohne Serum auf sehr niedrigem Niveau befand (Abb. 42, A). Auch die exprimierte und freigesetzte HGF-Menge wurde in SH-SY5Y-Zellen sowohl durch Serumentzug als auch durch Inkubation Vollmedium-behandelter Zellen mit Retinsäure reduziert (vgl. Abb. 13, B und 24, D). Wurden serumdeprivierte SH-SY5Y-Zellen zusätzlich mit Retinsäure behandelt, konnte die HGF-Freisetzung weiter gesenkt werden, während die Expression im Vergleich zur serumdeprivierten Kontrolle konstant blieb (Abb. 42, B).



**Abbildung 42:** Expression und Freisetzung von IGF2 und HGF in SH-SY5Y-Zellen mit und ohne Retinsäure und Serum, ELISA, 72 h

Expression (TaqMan-Assay) und Proteinmenge (ELISA) von IGF2 (**A**) und HGF (**B**) in SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (K) und Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit Zusatz von 5 µM Retinsäure (RA), dargestellt als relative Veränderung zu Vollmedium allein (K). Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$  und \$\$\$\$  $p < 0,001$ , verglichen mit Retinsäure: ###  $p < 0,001$ , verglichen mit Ø: x  $p < 0,05$ .

Bei beiden Zelllinien (Ausnahme Kelly EGFR) ließ sich unter Serumentzug mit Retinsäuregabe eine erhöhte Expression aller untersuchten Wachstumsfaktorrezeptoren zeigen. Im Vergleich zwischen Kontrollzellen ohne Serum und retinsäurebehandelten Zellen ohne Serum zeigte sich für alle Rezeptoren eine stabile Proteinmenge im Western Blot (Abb. 43, A und B).



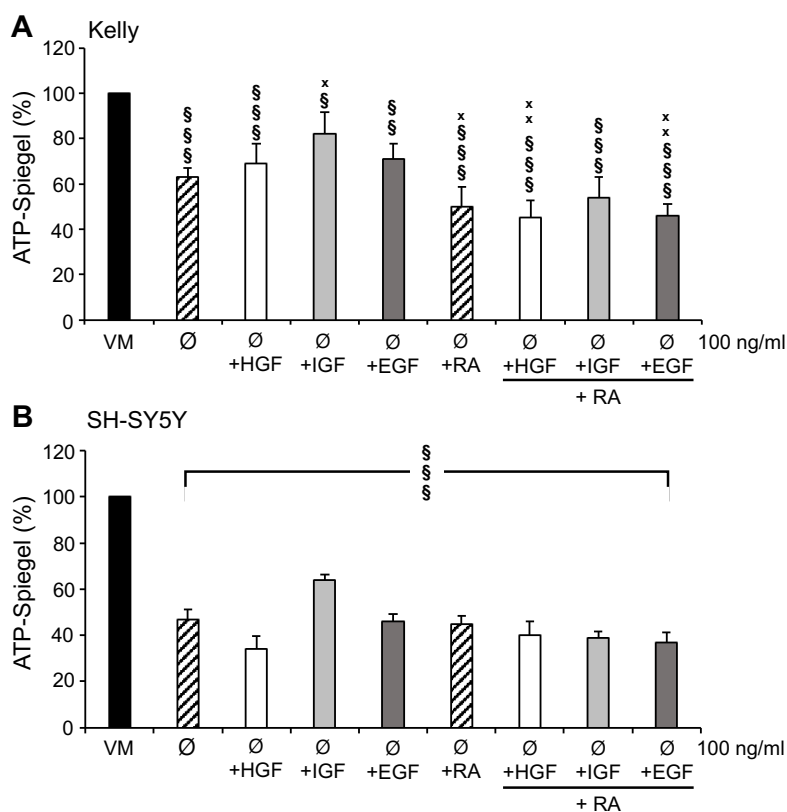
**Abbildung 43:** Regulation von Wachstumsfaktorrezeptoren nach RA und Serumentzug, 72 h

Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) im TaqMan-Assay sowie deren Proteinmenge im Western Blot mit DLB-Lysaten nach 72-stündiger Inkubation in Medium ohne Serum ohne (K, Kontrolle) und mit 5 µM Retinsäure (RA). Expression in relativer Darstellung zu unbehandelten Zellen in Medium ohne Serum (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ . Hsp90 wurde im Western Blot als Auftragskontrolle verwendet.

### 3.4.2 Gezielte Supplementation der Wachstumsfaktoren

Schon in den vorherigen Versuchen wurde nachgewiesen, dass sich die signifikante Reduktion der lebenden Zellen durch Serumentzug in beiden Zelllinien nicht durch Supplementation einzelner Wachstumsfaktoren kompensieren ließ (vgl. Abb. 15 und 16). Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass eine Retinsäuregabe unter Serumdeprivation eine weitere Reduktion der Menge lebender Kelly-Zellen bewirkte, während die Menge viabler SH-SY5Y-Zellen dadurch nicht verändert wurde (vgl. Abb. 39, A und 41, A). Daher sollte nun untersucht werden, inwiefern sich retinsäurebehandelte Zellen unter Serumentzug durch Supplementation von Wachstumsfaktoren beeinflussen ließen.

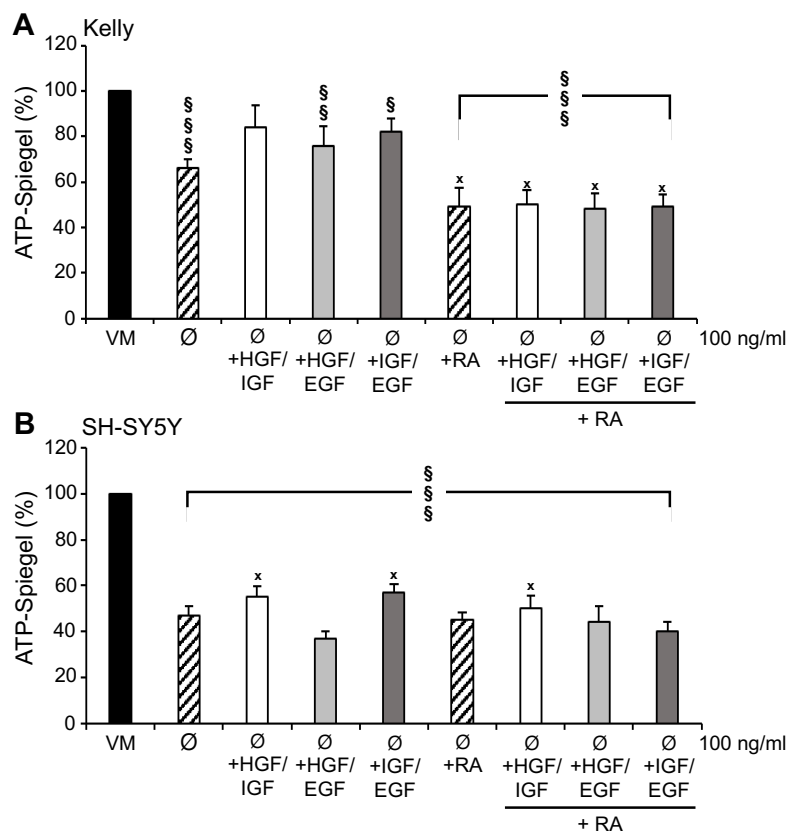
Wurden Kelly-Zellen unter Serumentzug und Retinsäuregabe einzelne Wachstumsfaktoren zugesetzt, sank der ATP-Spiegel durch HGF und EGF weiter ab, während die Zellzahl durch IGF2 leicht erhöht werden konnte (Abb. 44, A). Bei SH-SY5Y-Zellen bewirkte die Inkubation mit einzelnen Wachstumsfaktoren keine Veränderung der Menge viabler Zellen (Abb. 44, B).



**Abbildung 44:** Anzahl lebender Zellen nach Serumentzug, gezielte Gabe von Wachstumsfaktoren und Retinsäure, 72 h

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM) und Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit 5 µM Retinsäure (RA) und mit Zusatz der Wachstumsfaktoren HGF, IGF und EGF (je 100 ng/ml). Darstellung relativ zu den ATP-Spiegeln in Vollmedium, Signifikanzniveau verglichen mit Serum: §§§  $p < 0,001$ , §§  $p < 0,01$ , §  $p < 0,05$ , verglichen mit Ø: xx  $p < 0,01$ , x  $p < 0,05$ .

Durch kombinierte Supplementation mit IGF2 und HGF bei alleinigem Serumentzug ließ sich bei Kelly-Zellen eine Annäherung an das Kontrollniveau herstellen (vgl. Abb. 15, A; Abb. 45, A). Wenn jedoch Retinsäure hinzugegeben wurde, blieb dieser Effekt aus. Eine gleichzeitige Gabe von Retinsäure mit HGF und EGF bzw. IGF2 und EGF bewirkte hingegen keine Steigerung der ATP-Spiegel über das Niveau serumdeprivierter, retinsäurebehandelter Zellen hinaus und blieb somit unter dem Niveau der alleinig serumdeprivierten Zellen (Abb. 45, A). Bei SH-SY5Y-Zellen konnte keine Zweifachkombination von Wachstumsfaktoren nach Serumentzug das Kontrollniveau wiederherstellen. Diese Situation wurde durch Retinsäuregabe nicht verändert (vgl. Abb. 15, B; Abb. 45, B).

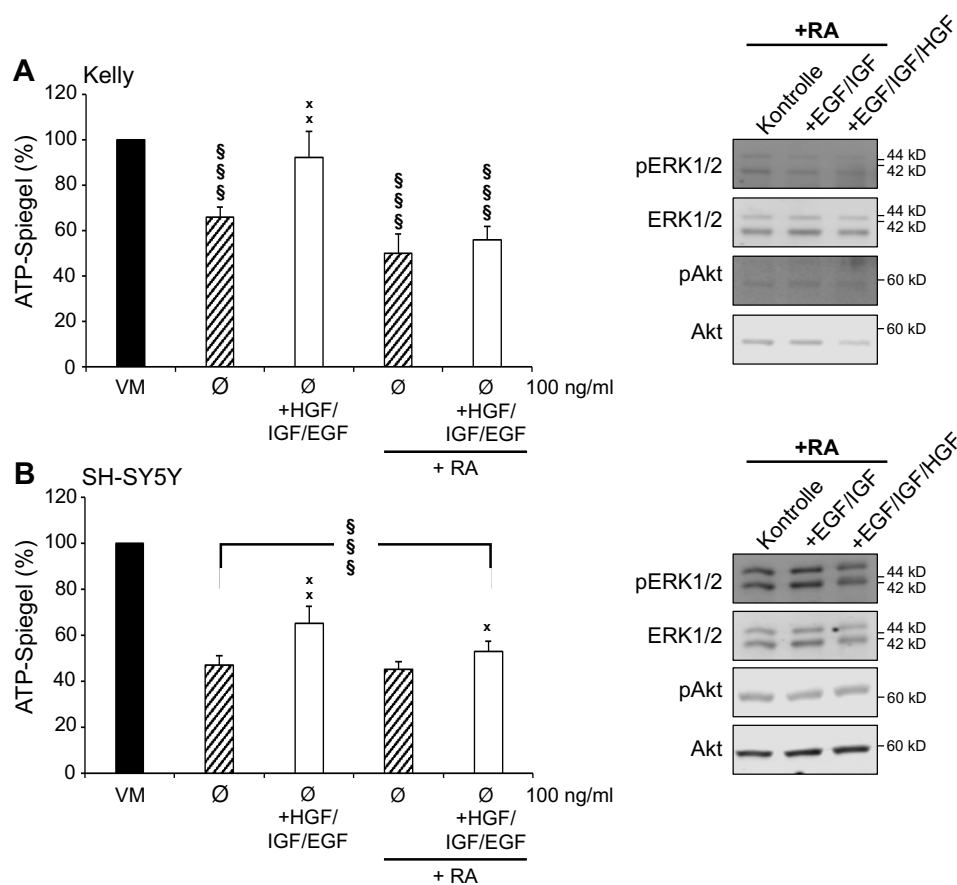


**Abbildung 45:** Anzahl lebender Zellen nach Serumentzug, gezielte Gabe von Wachstumsfaktorkombinationen und Retinsäure, 72 h

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation Vollmedium (VM) und in Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit 5 µM Retinsäure (RA) und mit kombiniertem Zusatz der Wachstumsfaktoren HGF, IGF und EGF (je 100 ng/ml). Darstellung relativ zu den ATP-Spiegeln in Vollmedium (VM), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§  $p < 0,001$ , §§  $p < 0,01$ , §  $p < 0,05$ , verglichen mit Ø: x  $p < 0,05$ .

Während der alleinige Serumentzug bei Kelly-Zellen durch die Dreifach-Supplementation von HGF, IGF und EGF kompensiert werden konnte (vgl. Abb. 16, A; Abb. 46, A), war dies bei zusätzlicher Gabe von Retinsäure zur Dreifachkombination nicht mehr möglich; die ATP-Spiegel konnten im Vergleich zum Serumentzug mit Retinsäure nicht mehr erhöht werden (Abb. 46, A). Dabei war die

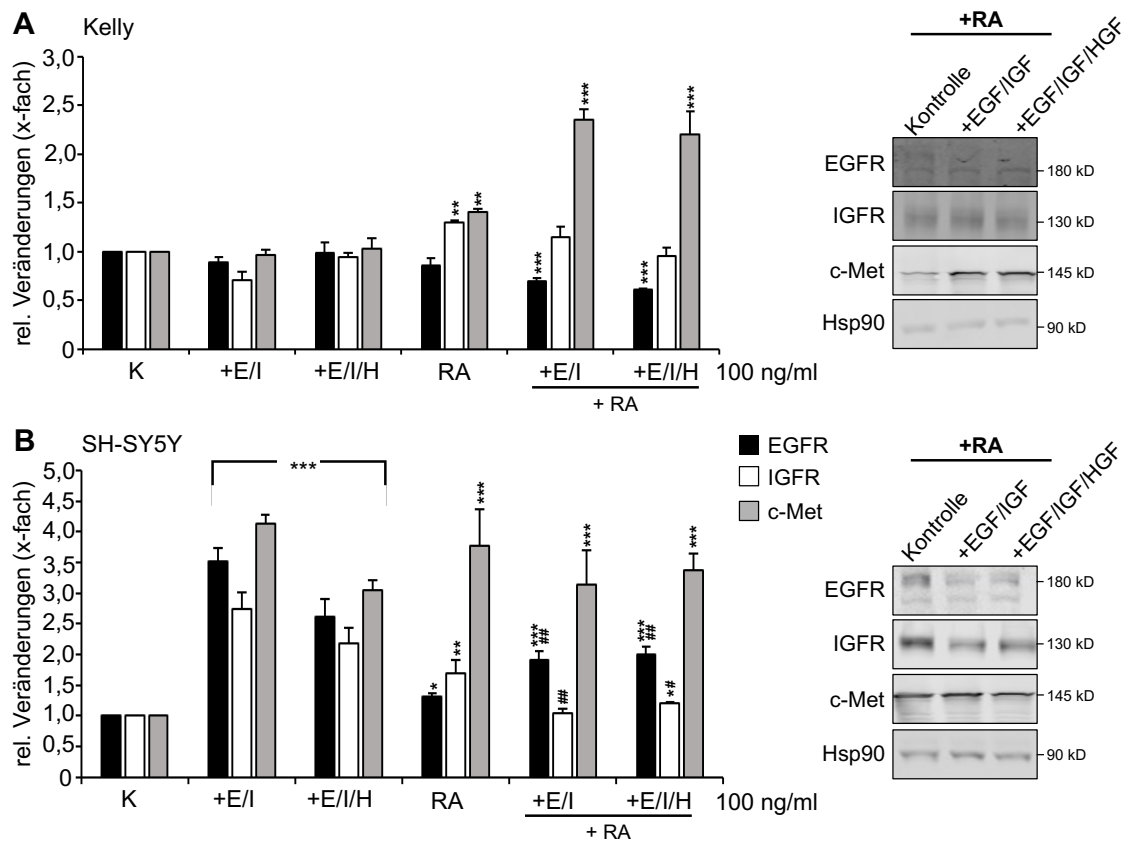
Phosphorylierung von ERK1/2 der serumdeprivierten Zellen, die mit Retinsäure und der Dreifachkombination behandelt wurden, sogar geringer als bei der Retinsäure-Kontrolle (Abb. 46, A). Die Aktivität von Akt sank nach Normalisierung mit der Akt-Proteinmenge nicht unter das Kontrollniveau. Die reduzierte SH-SY5Y-Menge unter alleinigem Serumentzug konnte durch die Dreifachkombination nicht kompensiert werden (vgl. Abb. 16, B; Abb. 46, B). Bei zusätzlicher Retinsäuregabe war der Effekt der Kombination noch geringer, sodass nur ein leichter Anstieg gegenüber den serumdeprivierten, retinsäurebehandelten Zellen durch die Dreifachkombination nachgewiesen werden konnte (Abb. 46, B). Die Aktivierung von ERK1/2 und Akt blieb nach Supplementation mit Wachstumsfaktoren und Retinsäure im Vergleich zur alleinigen Gabe von Retinsäure konstant (Abb. 46, B).



**Abbildung 46:** Anzahl lebender Zellen nach Serumentzug, gezielte Gabe von Wachstumsfaktorkombinationen und Retinsäure, 72 h

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation in Vollmedium (VM) und in Medium ohne Serum (Ø) ohne und mit 5 µM Retinsäure (RA) und mit kombiniertem Zusatz der Wachstumsfaktoren HGF, IGF und EGF (100 ng/ml). Darstellung relativ zu den ATP-Spiegeln in Vollmedium (VM), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§ p < 0,001, §§ p < 0,01, § p < 0,05, verglichen mit Ø: xx p < 0,01, x p < 0,05. Daneben die zugehörigen Western Blot mit DLB-Lysaten der Kinaseaktivität von ERK1/2 und Akt in Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) nach 72-stündiger Inkubation in Medium ohne Serum mit 5 µM Retinsäure ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von EGF und IGF oder EGF, IGF und HGF (je 100 ng/ml).

Wurden Kelly-Zellen, die ohne Serum kultiviert wurden, nicht nur Retinsäure zugesetzt, sondern auch noch Kombinationen aus Wachstumsfaktoren, so wurde die Expression von EGFR im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Serum reduziert (Abb. 47, A). Die Proteinmenge des EGFR blieb bezogen auf Zellen, die nur Retinsäure bekamen, konstant. Expression und Proteinmenge des IGFR wurden durch die Behandlung mit Wachstumsfaktoren nicht beeinflusst, während für c-Met auf mRNA- und Proteinebene eine Zunahme sichtbar wurde (Abb. 47, A). Bei SH-SY5Y-Zellen zeigte sich bei Serumentzug und Supplementation von Wachstumsfaktoren sowie Serumentzug und Retinsäuregabe eine signifikante Expressionsinduktion aller drei Rezeptoren (Abb. 47, B). Die Kombination von Serumentzug, Retinsäuregabe und Wachstumsfaktoren bewirkte eine Expressionsinduktion von EGFR im Vergleich zu Serumentzug und Retinsäure. Die mRNA-Menge von c-Met konnte durch die Kombination von Wachstumsfaktoren und Retinsäure bezogen auf Zellen, die nur Retinsäure erhalten hatten, nicht mehr gesteigert werden (Abb. 47, B). Die IGFR-Expression wurde unter zusätzlicher Wachstumsfaktorgabe reduziert. Obwohl die EGFR-Expression induziert wurde, zeigte sich im Western Blot eine reduzierte Proteinmenge. Auch die IGFR-Proteinmenge sank unter Serumentzug mit Retinsäure und Wachstumsfaktoren. C-Met blieb in seiner Proteinmenge trotz hoher Expression auf Kontrollniveau (Abb. 47, B).



**Abbildung 47:** Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren bei gezielter Gabe von Wachstumsfaktoren und Retinsäure in Zellen ohne Serum

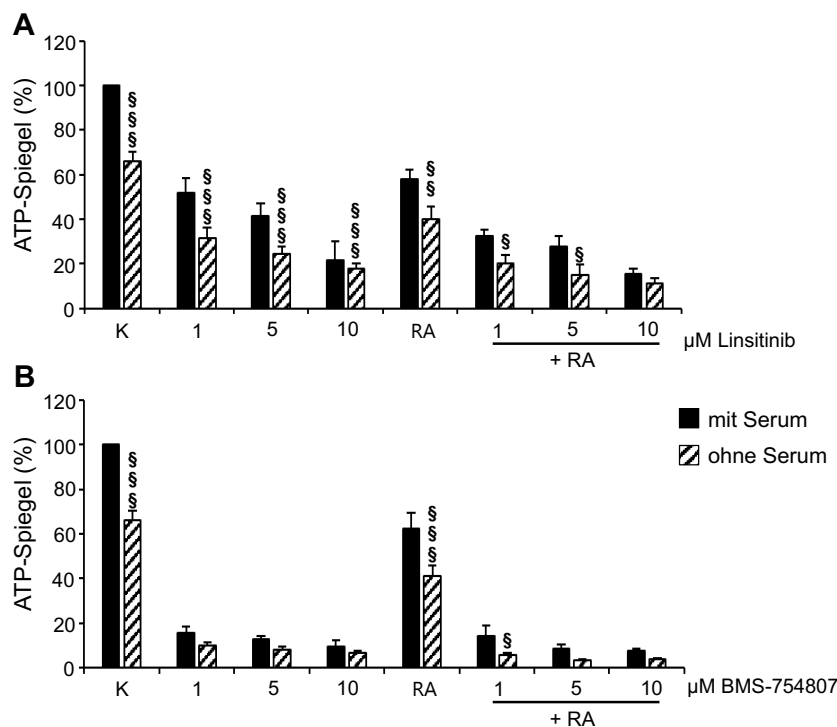
Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren der Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) im TaqMan-Assay sowie deren Proteinmenge im Western Blot mit DLB-Lysaten nach 72-stündiger Inkubation ohne und mit 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) in Medium ohne Serum ohne und mit Zusatz der Wachstumsfaktoren EGF (E), IGF (I) und HGF (H). Expression in relativer Angabe zu unbehandelten Zellen in Medium ohne Serum ohne RA oder Wachstumsfaktoren (K). Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , verglichen mit RA: ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ . Hsp90 wurde im Western Blot als Auftragskontrolle verwendet.



### 3.4.3 Inhibitorexperimente

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Serumentzug und die Gabe von Retinsäure die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den unterschiedlichen Inhibitoren beeinflussen konnten. Deshalb wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen für 72 Stunden in einem Medium ohne Serum mit verschiedenen Konzentrationen von Linsitinib, BMS-754807, Crizotinib und Erlotinib und jeweils Retinsäure inkubiert und mit Zellen verglichen, die mit denselben Bedingungen in Vollmedium kultiviert wurden.

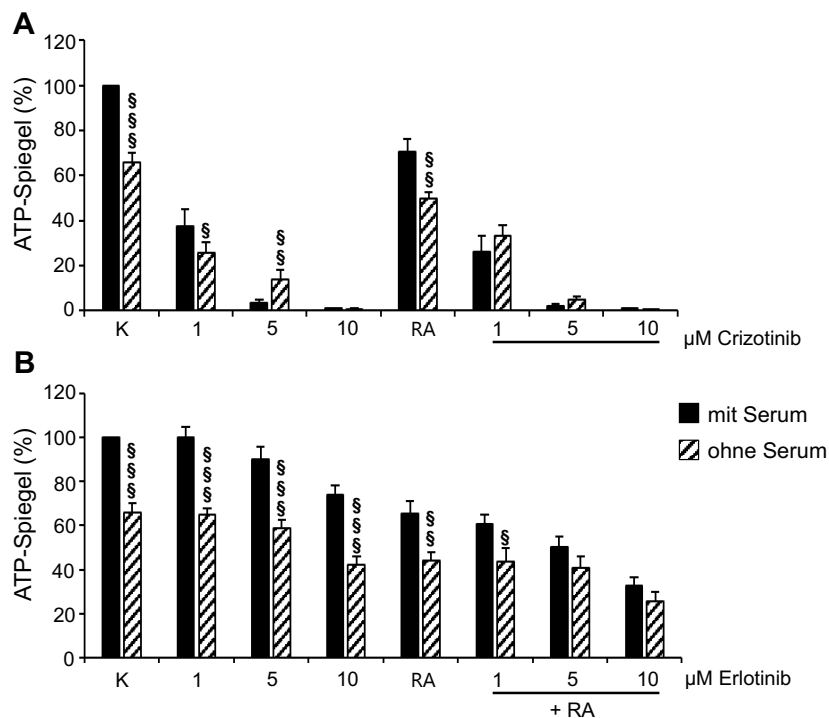
Wie bereits gezeigt, erhöhte Serumentzug das Ansprechen auf die Inhibitoren in Kelly-Zellen (vgl. Abb. 18). Eine zusätzliche Retinsäuregabe bewirkte nur bei niedrigkonzentriertem Linsitinib weiter reduzierte ATP-Spiegel (Abb. 48, A). Einen Unterschied zwischen Vollmedium und Serumentzug beim Einsatz von BMS-754807 zu detektieren, gelang nur bei 1  $\mu$ M unter Retinsäure (Abb. 48, B).



**Abbildung 48:** Effekte durch Linsitinib und BMS-754807 mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in Kelly-Zellen, 72 h

ATP-Spiegel der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Linsitinib (**A**) oder BMS-754807 (**B**) in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu$ M in Medium mit und ohne Serum ohne und mit 5  $\mu$ M Retinsäure (RA). Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: \$\$\$  $p < 0,001$ , \$\$  $p < 0,01$ , \$  $p < 0,05$ .

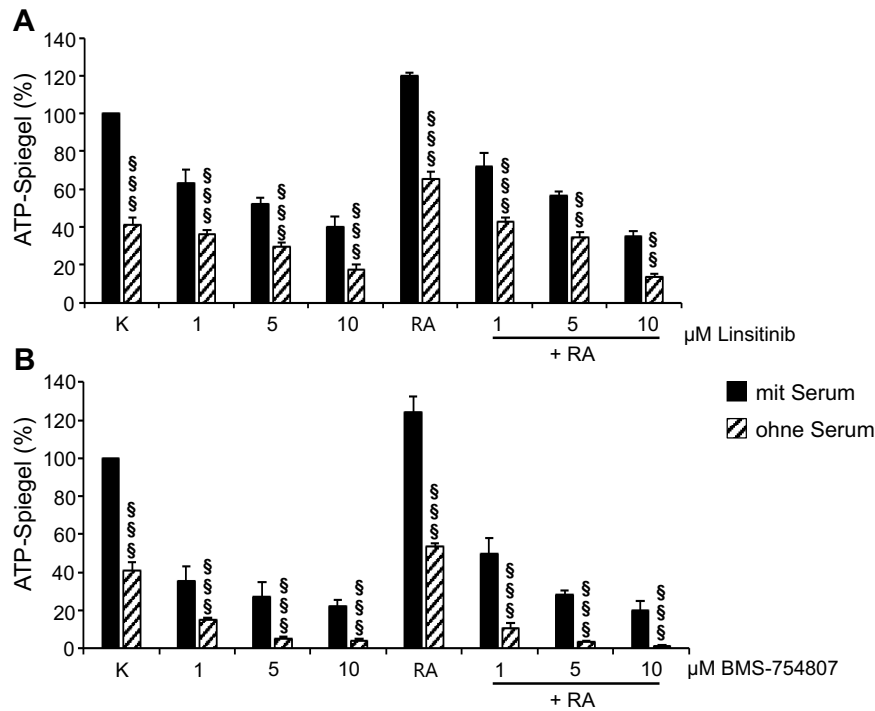
Wurde unter Serumdeprivation und Retinsäure mit Crizotinib behandelt, waren die ATP-Spiegel bei Inhibitorkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  noch vergleichbar mit Zellen in Vollmedium. Die höheren Konzentrationen reduzierten die Zellzahl jedoch so stark, dass kein Unterschied mehr messbar war (Abb. 49, A). Bei Erlotinib war ein ähnlicher Effekt sichtbar (Abb. 49, B). Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  verringerten zwar die Menge der retinsäurebehandelten Zellen, jedoch unter Serumentzug nicht stärker als bei Zellen in Vollmedium. Die Verstärkung der Inhibitorwirkung durch Serumentzug konnte somit unter Retinsäure nur noch für Linsitinib in Kelly-Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 49:** Effekte durch Crizotinib und Erlotinib mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in Kelly-Zellen, 72 h

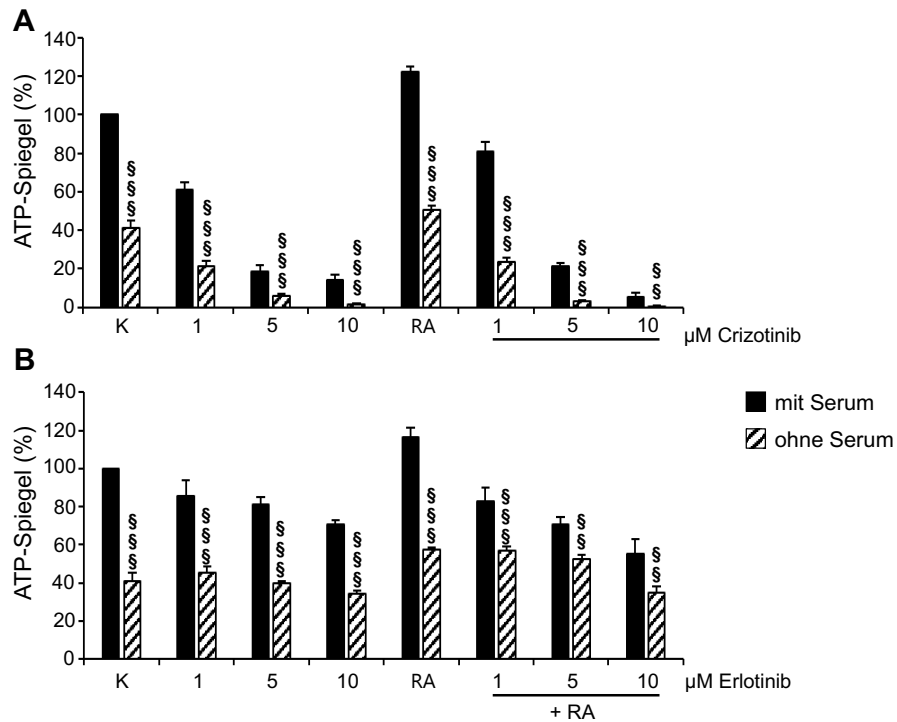
ATP-Spiegel der Kelly-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Crizotinib (**A**) oder Erlotinib (**B**) in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Medium mit und ohne Serum ohne und mit 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA). Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: \$\$\$  $p < 0,001$ , \$\$  $p < 0,01$ , \$  $p < 0,05$ .

Bei SH-SY5Y-Zellen bewirkte Retinsäure ein erhöhtes Wachstum. Außerdem senkten die Inhibitoren unter optimalen Wachstumsbedingungen die Zellzahl nicht so stark wie bei Kelly-Zellen. Unter Serumentzug zeigte sich eine deutlich verbesserte Wirkung der Inhibitoren, die auch bei Serumentzug unter Retinsäuregabe bestehen blieb. So ließen sich für alle untersuchten Inhibitoren in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  unter Serumentzug und Retinsäure signifikant erniedrigte ATP-Spiegel im Vergleich zu Retinsäure-behandelten Zellen in Vollmedium feststellen (Abb. 50 und 51).



**Abbildung 50:** Effekte durch Linsitinib und BMS-754807 mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen, 72 h

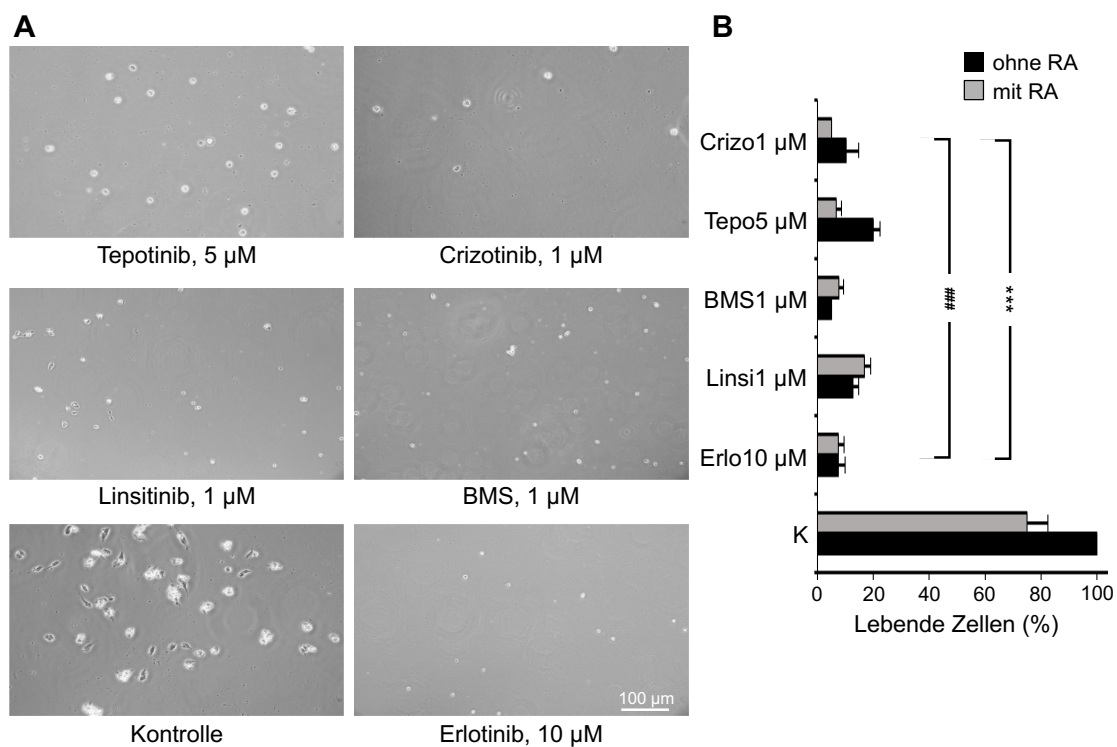
ATP-Spiegel der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Linsitinib (**A**) oder BMS-754807 (**B**) in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Medium mit und ohne Serum ohne und mit 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA). Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§  $p < 0,001$ , §§  $p < 0,01$ .



**Abbildung 51:** Effekte durch Crizotinib und Erlotinib mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen, 72 h

ATP-Spiegel der SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Crizotinib (**A**) oder Erlotinib (**B**) in Konzentrationen von 1, 5 und 10 μM in Medium mit und ohne Serum ohne und mit 5 μM Retinsäure (RA). Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Vollmedium (K), Signifikanzniveau verglichen mit Vollmedium: §§§  $p < 0,001$ , §§  $p < 0,01$ .

Zum Schluss sollte überprüft werden, ob es für die Neuroblastomzellen möglich war, unter Serumentzug, Retinsäuregabe und den bisher verwendeten Inhibitoren über zehn Tage persistierende Zellen zu bilden. Bei Kelly-Zellen war das Überleben unter diesen Bedingungen nur für vereinzelte Zellen möglich. Im Vergleich zu serumdeprivierten, retinsäurebehandelten Kelly-Zellen, hier als Kontrolle fotografiert, konnten bei zusätzlicher Inhibitorgabe kaum persistierende Zellen nachgewiesen werden (Abb. 52).



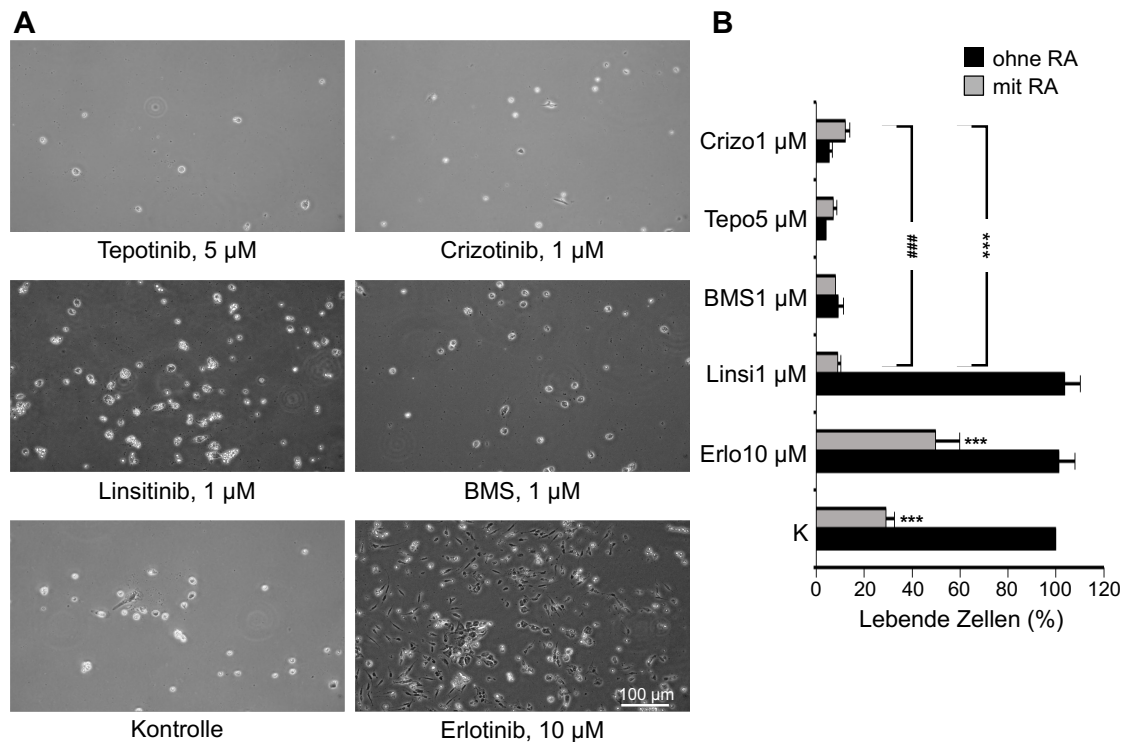
**Abbildung 52:** Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure, 10 d

**A:** Fotografien der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Medium ohne Serum mit 5 µM Retinsäure (Kontrolle) und den jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der Kelly-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung in Medium ohne Serum ohne und mit 5 µM Retinsäure mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Medium ohne Serum ohne Retinsäure (K), Signifikanzniveau verglichen mit K: \*\*\*  $p < 0,001$ , verglichen mit Retinsäure: ###  $p < 0,001$ .

Inhibitoren: Erlot10 = Erlotinib 10 µM, Linsi1 = Linsitinib 1 µM, BMS1 = BMS-754807 1 µM, Tepo5 = Tepotinib 5 µM, Crizo1 = Crizotinib 1 µM.

SH-SY5Y konnten unter Erlotinib bei Serumentzug und Retinsäuregabe persistierende Zellen bilden. Bei Linsitinib erhöhte die Gabe von Retinsäure das Ansprechen auf den Inhibitor deutlich. Die Inhibitoren BMS-754807, Crizotinib und Tepotinib waren unter Serumentzug nach zehn Tagen so stark wirksam, dass ein Unterschied durch Retinsäurebehandlung nicht messbar war (Abb. 53).



**Abbildung 53:** Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure, 10 d

**A:** Fotografien der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inkubation in Medium ohne Serum mit 5 µM Retinsäure (Kontrolle) und den jeweiligen Inhibitoren.

**B:** Zellzahl der SH-SY5Y-Zellen nach zehntägiger Inhibitorbehandlung in Medium ohne Serum ohne und mit 5 µM Retinsäure mittels Auszählung von acht ImageJ-Aufnahmen, Darstellung relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Medium ohne Serum ohne Retinsäure (K), Signifikanzniveau verglichen mit K \*\*\*  $p < 0,001$ , verglichen mit Retinsäure: ###  $p < 0,001$ .

Inhibitoren: Erlo10 = Erlotinib 10 µM, Linsi1 = Linsitinib 1 µM, BMS1 = BMS-754807 1 µM, Tepo5 = Tepotinib 5 µM, Crizo1 = Crizotinib 1 µM.

## 4 Diskussion

Trotz intensiver Therapie weisen Hochrisikoneuroblastome weiterhin eine schlechte Prognose auf, die neue, zielgerichtete Therapiestrategien erforderlich macht (Pinto et al. 2015; GPOH 2019). Daher sollte in dieser Arbeit die Rolle der Wachstumsfaktoren für das Neuroblastom eingeschätzt werden, um einen möglichen therapeutischen Nutzen abzuleiten. Untersucht wurden die Wachstumsfaktoren EGF, IGF und HGF in den Neuroblastomzelllinien Kelly und SH-SY5Y.

### 4.1 Relevanz von EGF, IGF und HGF für Wachstum und Überleben von Neuroblastomzellen

Um die Relevanz der untersuchten Wachstumsfaktoren für die Zelllinien zu charakterisieren, wurde zunächst betrachtet, welche Faktoren die Zellen selbst produzierten. Durch gezielte Zugabe zum Kulturmedium wurde zudem untersucht, welche zellulären Effekte die untersuchten Wachstumsfaktoren nach Bindung an den Rezeptor bewirkten. Darüber hinaus wurde die Regulation der assoziierten Wachstumsfaktorrezeptoren analysiert. Es wurden optimale Wachstumsbedingungen mit der Kultivierung in Medium ohne Serum verglichen.

Während die Wachstumsfaktoren EGF und IGF1 von keiner der Zelllinien exprimiert wurden, zeigten sich bei IGF2 und HGF Unterschiede auf mRNA- und Proteinebene zwischen Kelly- und SH-SY5Y-Zellen: Bei den schneller proliferierenden Kelly-Zellen wurde IGF2 verstärkt exprimiert und freigesetzt (Abb. 2 und 3), bei den langsamer wachsenden SH-SY5Y-Zellen hingegen HGF (Abb. 2 und 3).

Supplementation von EGF und IGF2 konnte die Zellzahl erhöhen, solange die Zellen in Gegenwart von Serum kultiviert wurden (Abb. 4). HGF dagegen hatte bei gleichzeitiger Serumgabe keinen Einfluss auf die Proliferation (Abb. 4). Wurden die Zellen in Medium ohne Serum kultiviert, reduzierte sich ihre Wachstumsrate; Zelltod wurde durch das Fehlen externer Wachstumsfaktoren jedoch nicht ausgelöst (Abb. 13 und 14). Bei den Kelly-Zellen konnte der Viabilitätsverlust unter Serumentzug durch kombinierte Gabe von EGF, IGF2 und HGF vollständig kompensiert werden (Abb. 16). Bei den SH-SY5Y-Zellen bewirkte die Dreifachkombination zwar eine Steigerung der Viabilität, reichte jedoch zur Kompensation des Serumentzuges nicht aus (Abb. 16). Diese differentiellen Effekte spiegelten sich auch in der Expression und Freisetzung von IGF2 und HGF, der Regulation der assoziierten Wachstumsfaktorrezeptoren und der nachgeschalteten Signaltransduktion wider. Im Folgenden werden die Eigenschaften der einzelnen Wachstumsfaktoren getrennt dargestellt.

### 4.1.1 EGF

Der *epidermale Wachstumsfaktor* EGF wird seit seiner Entdeckung in den 1960er-Jahren als wichtiger Mediator von Proliferation, Wachstum und Differenzierung in verschiedensten Zelllinien betrachtet (Cohen et al. 1987; Yarden und Slivkowski 2001; Sabbah et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde EGF durch keine der beiden untersuchten Zelllinien produziert. Auch in der Literatur ist dies nicht beschrieben. Der *EGF-Rezeptor* (EGFR) konnte dagegen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 10), wie bereits unterschiedliche Studien bestätigten (Janet et al. 1995; Ho et al. 2005; Megison et al. 2013). Ebenfalls in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen steigerte die Stimulation mit EGF die Anzahl von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen (Abb. 4), solange sie in Vollmedium kultiviert wurden (Janet et al. 1995; Ho et al. 2005). Als entscheidende Mediatoren der gesteigerten Zellzahl sind dabei die Kinasen ERK1/2 und Akt beschrieben (Ho et al. 2005), die mitogene und antiapoptotische Effekte aufweisen (Citri und Yarden 2006; Rozengurt 2007). In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Akt-Aktivierung in Kelly-Zellen nach EGF-Gabe gesteigert (Abb. 4, A), während die Phosphorylierung von ERK1/2 in beiden Zelllinien auf Kontrollniveau blieb (Abb. 4). Warum die Akt-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen durch EGF-Gabe erniedrigt wurde, konnte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Vorstellbar wäre eine Beteiligung des Proteins *ERBB receptor feedback inhibitor 1* (ERRFI1), das in Zellen mit hoher EGFR-Expression als negativer Regulator von EGFR fungieren und die Akt-Aktivität senken kann (Zhang et al. 2007; Cairns et al. 2018). Dass EGF-Gabe trotz gleichbleibender Phosphorylierung von ERK1/2 und reduzierter Akt-Aktivität die Viabilität von SH-SY5Y-Zellen erhöhte, deutet auf die Aktivierung weiterer Signalwege über den EGFR hin. Dazu gehört beispielsweise der Mediator STAT5, der das Wachstum fördern und den Zelltod verhindern kann (Citri und Yarden 2006; Ramaiah und Kumar 2021).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine supportive Rolle von EGF für die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren hin. Alleinige EGF-Supplementation unter Serumentzug bewirkte in Kelly-Zellen nur eine geringe Steigerung der Proliferation, in SH-SY5Y-Zellen erbrachte sie keinen Effekt (Abb. 15). Allerdings konnte die Zellviabilität nach Serumentzug in beiden Zelllinien am stärksten erhöht werden, wenn zusätzlich zu IGF2 und HGF auch EGF supplementiert wurde, auch wenn in SH-SY5Y-Zellen dadurch nicht das Kontrollniveau erreicht werden konnte (Abb. 16). Dass EGF die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren unterstützen kann, konnte bereits an anderen Neuroblastomzelllinien gezeigt werden. Beispielsweise wurde die Proliferation der Neuroblastomzelllinie SH-EP durch IGF2-Gabe nur gefördert, wenn auch EGF im Kulturmedium vorhanden war (Leventhal et al. 1995; Qi et al. 2013). Dabei sind verschiedenste Ebenen beschrieben, auf denen IGF2 und EGF interagieren können. Neben der Beeinflussung der Rezeptorverfügbarkeit sind direkte Rezeptorinteraktionen zwischen dem EGFR und IGFR wichtig, die die Wachstumsfaktor-vermittelten Wirkungen verstärken (van der



Veeken et al. 2009). Darüber hinaus sind supportive Beziehungen zwischen dem EGFR und c-Met beschrieben. Aktivierung des EGFR kann die c-Met-Phosphorylierung erleichtern und in verschiedenen Tumorzellen sogar in Abwesenheit von HGF den Rezeptor stimulieren (Jo et al. 2000; Corso und Giordano 2013).

Für eine aktive Beteiligung von EGF an der verbesserten Zellviabilität spricht auch die Regulation des EGFR nach EGF-Gabe, obwohl diese in den beiden Zelllinien unterschiedlich verlief. Bei den SH-SY5Y-Zellen reduzierte sich durch EGF-Gabe die Proteinmenge des EGFR (Abb. 17). Ursächlich dafür könnte seine Internalisierung und Degradierung sein, die nach Ligandenbindung beschrieben ist (Roepstorff et al. 2009). Um weiterhin EGFR bereitstellen zu können, wurde die Expression in SH-SY5Y-Zellen erhöht (Abb. 17, B). Kelly-Zellen hingegen hielten die Expression und Proteinmenge des EGFR nach Stimulation konstant (Abb. 17, A). Möglich ist diese Stabilisierung über ein Recycling des Rezeptors nach Internalisierung (Roepstorff et al. 2009).

Insgesamt schien EGF, obwohl er durch keine der beiden Zelllinien selbst produziert wurde, eine supportive Rolle für die Wirkung weiterer Wachstumsfaktoren zu spielen und damit essentiell an Zellwachstum und -überleben der untersuchten Neuroblastomzelllinien beteiligt zu sein.

#### 4.1.2 IGF

Der *Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor* IGF besitzt zwei Isoformen, IGF1 und IGF2, die nach Bindung an ihren gemeinsamen *IGF-1-Rezeptor* (IGFR) verschiedene Funktionen im Körper übernehmen (Weroha und Haluska 2008; Megison et al. 2013). Während IGF1 durch keine der untersuchten Zelllinien produziert wurde, konnte IGF2 in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 3). Kelly-Zellen zeigten dabei eine höhere Expression und Freisetzung von IGF2 als SH-SY5Y-Zellen (Abb. 3). Eine mögliche Erklärung dafür liefert die MYCN-Amplifikation im Genom der Kelly-Zellen. Durch ihr Genprodukt, den Transkriptionsfaktor N-Myc, kann die IGF2-Expression in Neuroblastomzellen stimuliert werden (Chambéry et al. 1999; Wittrock et al. 2002). Freigesetztes IGF2 kann wiederum im Sinne einer autokrinen Stimulation sowohl die Expression von N-Myc als auch die zelluläre Proliferationsrate erhöhen (Wittrock et al. 2002). Eine autokrine IGF2-Regulation wurde bereits für andere Neuroblastomzellen beschrieben und scheint auch bei den Kelly-Zellen wahrscheinlich (Martin et al. 1993; Qi et al. 2013). Der beschriebene Mechanismus könnte auch die konstanten IGF2-Spiegel selbst unter Serumentzug erklären (Abb. 13).

Neben N-Myc wird die IGF2-Expression über die Wachstumsfaktor-vermittelte Aktivierung von Kinasen wie ERK1/2 und Akt gelenkt, die den IGF2-Repressor Foxo3A phosphorylieren und damit inhibieren können (Santo et al. 2013; Luo et al. 2021). Dass beide Signalwege zur Aufrechterhaltung der IGF2-Menge beitragen können, konnte an SH-SY5Y-Zellen unter Serumentzug gezeigt werden

(Abb. 14). SH-SY5Y-Zellen besitzen im Gegensatz zu Kelly-Zellen keine MYCN-Amplifikation, mit der sie die IGF2-Expression aufrechterhalten können. Zudem wurde ihre ERK1/2-Aktivität durch den Serumentzug herabgesetzt (Abb. 14), sodass der IGF2-Repressor weniger inhibiert werden konnte und sich insgesamt unter Serumentzug eine starke Reduktion der IGF2-Freisetzung in SH-SY5Y-Zellen zeigte (Abb. 14).

Die Kinasen ERK1/2 und Akt sind nicht nur Vermittler der IGF2-Expression. Ähnlich wie beim EGFR wird ihnen außerdem eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion nach Bindung von IGF2 an den IGFR zugesprochen (Ho et al. 2005). Allerdings blieben in der vorliegenden Arbeit nach IGF2-Supplementation in Vollmedium die ERK1/2- und Akt-Aktivitäten der Kelly-Zellen konstant, während die Akt-Aktivität der SH-SY5Y-Zellen sogar reduziert wurde (Abb. 4). Trotzdem bewirkte die IGF2-Supplementation in Vollmedium bei beiden Zelllinien eine Steigerung der Viabilität (Abb. 4). Diese Diskrepanz kann mit Hilfe der vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden, lässt aber vermuten, dass weitere Signalwege, wie beispielsweise JAK2/STAT3, für die mitogenen Effekte verantwortlich sind (Himpe und Kooijman 2009; Benabbou et al. 2013). Dass auch in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen ERK1/2 und Akt durch die Stimulation mit IGF2 aktivierbar waren, zeigten die Experimente unter serumfreien Bedingungen, bei denen die Aktivität von Akt in Kelly-Zellen nach Stimulation bei gleichbleibender Phosphorylierung von ERK1/2 erhöht war (Abb. 16). In SH-SY5Y-Zellen erreichte die Phosphorylierung beider Kinasen zwar auch nach Stimulation mit allen drei untersuchten Wachstumsfaktoren nicht das Niveau der Kontrollen in Vollmedium, war aber höher als bei der gleichzeitigen Gabe von IGF2 und EGF (Abb. 16).

Supplementation von IGF2 bewirkte in beiden Zelllinien eine Steigerung der Anzahl lebender Zellen in Vollmedium (Abb. 4) und eine Stabilisierung der Zellzahl in Medium ohne Serum (Abb. 16).

Verglichen mit den anderen untersuchten Wachstumsfaktoren konnte durch IGF2-Supplementation unter Serumentzug eine stärkere Erhöhung der ATP-Spiegel bei den Kelly-Zellen gezeigt werden (Abb. 15, A). Die stärkste Wirkung von IGF2 wurde jedoch in Kooperation mit anderen Wachstumsfaktoren erreicht, wie bereits in anderen Neuroblastomzellen beschrieben (Leventhal et al. 1995; Desbois-Mouthon et al. 2006; van der Veecken et al. 2009; Qi et al. 2013). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass optimale Spiegel an Wachstumsfaktoren entscheidend für konstante Proteinmengen der assoziierten Rezeptoren waren. So war beispielsweise der EGFR in beiden Zelllinien nach Serumentzug reduziert (Abb. 13 und 14), wurde aber nach Wachstumsfaktorsupplementation wieder stabilisiert (Abb. 17). Mechanistisch ist gerade IGF2 dabei wichtig, da dessen Bindung an den IGFR eine Aktivierung verschiedener Kinasen bewirkt, die ihrerseits den Transkriptionsfaktor SP1 phosphorylieren können (Chou et al. 2011). Letzterer reguliert die EGFR-Expression (Chou et al. 2011), die somit unter anderem von einer funktionierenden IGF-Signaltransduktion abhängig ist

(Baserga 1995; Tan und Khachigian 2009). Daher war ein fehlender Anstieg der Zellzahl nach alleiniger EGF-Gabe unter Serumentzug in SH-SY5Y-Zellen, die in Medium ohne Serum kaum IGF2 produzierten, nicht verwunderlich.

Eine ähnliche Regulation zeigte sich für den IGFR, der im Einklang mit der Literatur (Ho et al. 2005; Megison et al. 2013) in beiden Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Abb. 10). Nach Serumentzug wurde die IGFR-Proteinmenge in beiden Zelllinien reduziert (Abb. 13 und 14). In Kelly-Zellen konnten Expression und Proteinmenge des IGFR erst durch Substitution der Dreifachkombination aus EGF, HGF und IGF2 wieder das Kontrollniveau erreichen (Abb. 17). Dies zeigte erneut, dass optimale Spiegel an Wachstumsfaktoren für die Aufrechterhaltung der Rezeptormengen erforderlich waren. In SH-SY5Y-Zellen wurde die IGFR-Expression nach Stimulation mit der Dreifachkombination erhöht, die Proteinmenge jedoch im Vergleich zur Serumkontrolle erniedrigt. Dies spricht dafür, dass der Rezeptor nach Ligandenbindung internalisiert und degradiert und die Transkription zur Aufrechterhaltung der Signaltransduktion verstärkt wurde (Rieger und O'Connor 2021).

IGF2 schien also, vor allem für die Kelly-Zellen, eine essentielle Rolle zu spielen. Für seine optimale Wirkung war jedoch die Kooperation mit weiteren Wachstumsfaktoren erforderlich.

#### **4.1.3 HGF**

Die Expression des *Hepatozyten-Wachstumsfaktors* HGF in beiden Zelllinien ist bereits beschrieben (Hecht et al. 2004; Crosswell et al. 2009). Dass in der vorliegenden Arbeit HGF in SH-SY5Y-Zellen stärker exprimiert und in größeren Mengen freigesetzt wurde als in Kelly-Zellen (Abb. 3), war jedoch überraschend, da in Patienten mit MYCN-amplifizierten Neuroblastomen eher erhöhte HGF-Spiegel nachgewiesen wurden (Sköldenberg et al. 2009). Eine mögliche Erklärung auf zellulärer Ebene liefert der Notch-Signalweg, der bei MYCN-Amplifikation, wie sie bei den Kelly-Zellen vorliegt, erhöht sein kann (Bettinsoli et al. 2017). Komponenten des Notch-Signalwegs können über einen negativen Feedback-Mechanismus die Aktivität der HGF-Kaskade reduzieren (Stella et al. 2005) und somit ein Grund für die reduzierte HGF-Freisetzung in Kelly-Zellen sein.

Für die generelle Regulation der Expression und Freisetzung von HGF gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Eine autokrine Steuerung ist zwar prinzipiell möglich (Huang et al. 2020), war in der vorliegenden Arbeit jedoch wenig wahrscheinlich, da die HGF-Produktion sowohl durch Serumentzug als auch durch die untersuchten Wachstumsfaktorrezeptorinhibitoren reduziert wurde (Abb. 9, 13 und 14). Die HGF-Menge schien damit abhängig davon zu sein, dass EGF oder IGF2 im Medium vorhanden waren. Die Wachstumsfaktoren können ERK1/2 oder Akt aktivieren (Tan und Khachigian

2009), die dann ihrerseits die für eine HGF-Expression wichtigen Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 phosphorylieren (Jiang et al. 1997).

Auch die zellulären HGF-Effekte deuteten auf eine enge Verknüpfung mit den Signalwegen von IGF2 und EGF hin, denn die alleinige Gabe von HGF konnte weder in Vollmedium noch unter Serumentzug die Zellzahl erhöhen (Abb. 4 und 15), wie in anderen Arbeiten für Neuroblastomzellen beschrieben (Hecht et al. 2004; Crosswell et al. 2009). Erst bei gemeinsamer Gabe von HGF, IGF2 und EGF konnte die Viabilität beider Zelllinien unter serumfreien Bedingungen gesteigert werden (Abb. 16). Ursache dafür könnten Interaktionen zwischen c-Met und anderen Wachstumsfaktorrezeptoren sein, wie bereits für EGFR und c-Met gezeigt (Jo et al. 2000; Corso und Giordano 2013). Auch die gemeinsame Aktivierung nachgeschalteter Mediatoren wie Akt und ERK1/2 kann die Effekte der rezeptorvermittelten Signaltransduktion zusätzlich verstärken (Ho et al. 2005; Huang et al. 2020). Nach HGF-Stimulation in Vollmedium konnte entsprechend in Kelly-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet werden (Abb. 4) und von Akt bei Serumentzug (Abb. 16). Bei SH-SY5Y-Zellen war das Aktivierungsmuster invers (Abb. 4 und 16).

Dass die Einzelstimulation mit HGF keinen messbaren zellulären Effekt hatte, könnte auch auf die geringe c-Met-Menge in beiden Zelllinien zurückzuführen sein. So wurde in Neuroblastomzellen gezeigt, dass HGF-vermittelte Reaktionen wie Proliferation, Überleben und Migration positiv mit der Rezeptormenge korrelierten (Crosswell et al. 2009). Wie in der vorliegenden Arbeit wurde für Kelly- und SH-SY5Y-Zellen eine geringe c-Met-Expression auf vergleichbarem Niveau beschrieben, jedoch nur in den Kelly-Zellen ein schwaches Proteinsignal für den Rezeptor (Hecht et al. 2004). In den hier durchgeführten Western Blots wurde c-Met in beiden Zelllinien detektiert (Abb. 10), was vermutlich auf methodische Unterschiede zurückzuführen ist. In der initialen Untersuchung zum c-Met-Gehalt in Neuroblastomzellen wurde das Verfahren zur Proteinextraktion nicht beschrieben. Das Nachweissystem im Western Blot war Chemolumineszenz-basiert (Hecht et al. 2004), was zwar eine hohe Sensitivität hat, aber in seinem dynamischen linearen Bereich eingeschränkt ist (Janes 2015). Außerdem kann die Verwendung von Filmen dazu führen, dass schwache Signale schlecht oder gar nicht wahrgenommen werden können (Janes 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper zusammen mit einem Detektionssystem verwendet, das die Fluoreszenzemission der angeregten Proteine im nahen Infrarotbereich misst und dadurch gerade bei schwachen Signalen deutlich sensitiver ist (Loebke et al. 2007; Janes 2015).

Außerdem unterstützen die durch HGF veränderten Aktivierungsmuster von Akt und ERK1/2 die Annahme, dass das c-Met-Protein in SH-SY5Y-Zellen nicht nur vorhanden, sondern auch funktional war. Nach HGF-Stimulation zeigte sich in SH-SY5Y-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung von Akt in Vollmedium und eine graduelle Aktivierung von ERK1/2 unter serumfreien Bedingungen (Abb. 4 und

16). Die geringe c-Met-Menge war möglicherweise durch die hohe HGF-Freisetzung in SH-SY5Y-Zellen auf einen negativen Feedback-Mechanismus zurückzuführen (Lee et al. 2018). Auf diese Regulation deutete auch hin, dass sich die c-Met-Menge in SH-SY5Y-Zellen erhöhte, wenn die HGF-Freisetzung mit den unterschiedlichen Inhibitoren der Wachstumsfaktorrezeptoren gesenkt wurde (Abb. 9 und 10).

Insgesamt schien HGF eine unterstützende Rolle bei der Wirkung weiterer Wachstumsfaktoren zu spielen und somit an Wachstumsprozessen der untersuchten Neuroblastomzelllinien beteiligt zu sein.

#### 4.1.4 Weitere Wachstumsfaktoren

Kombinierte Supplementation von EGF, IGF2 und HGF konnte den Serumentzug in SH-SY5Y-Zellen nicht vollständig kompensieren (Abb. 16, B). Dies legte nahe, dass in SH-SY5Y-Zellen weitere Wachstumsfaktoren an Zellwachstum und –überleben beteiligt sein könnten. Möglich wären der *Thrombozytenwachstumsfaktor* (PDGF) und der *vaskuläre Endothelwachstumsfaktor* (VEGF). Beide Faktoren sowie die zugehörigen Rezeptoren konnten in SH-SY5Y-Zellen bereits nachgewiesen werden (Pahlmann et al. 1992; Matsui et al. 1993; Meister et al. 1999; Beierle et al. 2002; Megison et al. 2013). PDGF-Substitution bewirkte in SH-SY5Y-Zellen zudem eine schwache Steigerung der Proliferation über die Aktivierung der Kinase Akt (Pola et al. 2003). Hier wären weitere Untersuchungen zu Interaktionen mit den in dieser Arbeit betrachteten Wachstumsfaktoren notwendig.

#### 4.1.5 Zusammenfassung: Wachstumsfaktoren

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen zur Relevanz der untersuchten Wachstumsfaktoren bei Kelly- und SH-SY5Y-Zellen treffen:

- EGF wurde durch keine der Zelllinien produziert; die Zellen besaßen jedoch den zugehörigen Rezeptor. Eine zusätzliche Steigerung der Zellviabilität durch EGF-Supplementation konnte nur in Vollmedium bzw. in Kombination mit IGF2 oder HGF nachgewiesen werden. Damit schien EGF eine supportive Rolle für die Wirkung der weiteren Wachstumsfaktoren zu spielen.
- IGF2 wurde vor allem durch die Kelly-Zellen exprimiert und ausgeschüttet, die die Produktion auch unter Serumentzug aufrechterhalten konnten. Dass IGF2-Supplementation als Einzelfaktor die Zellviabilität am stärksten erhöhen konnte, deutete zusätzlich auf dessen essentielle Rolle für die Zellen hin. Die optimale IGF2-Wirkung wurde jedoch nur in Kombination mit EGF und HGF erreicht, da diese die Rezeptoren stabilisierten.

- HGF wurde am stärksten durch SH-SY5Y-Zellen produziert. HGF-Supplementation konnte in Vollmedium und unter Serumentzug zwar keine Steigerung der Zellzahl bewirken, war aber essentiell für die Wirkung von EGF und IGF2.

Alle drei untersuchten Wachstumsfaktoren waren somit am Wachstum und Überleben der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen beteiligt. Gezielte Inhibition der zugehörigen Rezeptoren könnte daher einen möglichen therapeutischen Ansatz für das Neuroblastom darstellen.

## 4.2 Therapeutische Möglichkeiten durch Wachstumsfaktorrezeptorinhibitoren

Mithilfe von Wachstumsfaktorrezeptorinhibitoren sollten in der vorliegenden Arbeit einzelne Wachstumsfaktorsignalwege gezielt ausgeschaltet werden, um die Folgen für Zellwachstum und -überleben zu untersuchen und mögliche differentielle Effekte von EGF, IGF2 und HGF darzustellen. Verwendet wurden Erlotinib zur Blockade des EGFR, Linsitinib als IGFR-Inhibitor und Tepotinib, das HGF-vermittelte Signale hemmt. Darüber hinaus wurden zwei Substanzen eingesetzt, die mehrere zelluläre Angriffspunkte aufweisen: BMS-754807 als Inhibitor von IGFR, Insulinrezeptor, c-Met, *Tropomyosinrezeptorkinase A und B* sowie *Aurorakinase A und B* (Carboni et al. 2009) und Crizotinib zur Hemmung von c-Met sowie der *anaplastischen Lymphomkinase* (ALK) (Cui et al. 2011). Die unterschiedliche Breite der therapeutischen Zielstrukturen sollte bei der Einschätzung helfen, ob die Blockade einzelner Signalwege ausreichend war, um Proliferation und Überleben der Neuroblastomzellen einzuschränken. Zudem sollte abgeleitet werden, welche Wachstumsfaktoren präferentiell inhibiert werden sollten, um die Bildung resistenter Zellen zu vermeiden. Die untersuchten Inhibitoren werden im Folgenden getrennt betrachtet.

### 4.2.1 Erlotinib

Erlotinib senkte die Viabilität beider Zelllinien zeit- und konzentrationsabhängig im Verlauf der dreitägigen Stimulation, sodass die ATP-Spiegel nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Erlotinib über 72 Stunden bei ungefähr 70 Prozent des Kontrollniveaus lagen (Abb. 7). In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Ho et al. 2005; Mao et al. 2017; daRocha et al. 2021) konnte die verminderte Viabilität auf eine reduzierte Proliferationsrate unter Erlotinib zurückgeführt werden (Abb. 8). Ob dieser Effekt allein durch die Blockade der EGF-vermittelten Signaltransduktion verursacht wurde, war allerdings unklar, da die Erlotinib-Gabe zusätzlich die Freisetzung von IGF2 und HGF reduzierte (Abb. 9). Auch dies könnte die Proliferation weiter senken. Die Wirkung von Erlotinib auf die Produktion von IGF2 und HGF ist mechanistisch über die EGF-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und Akt zu erklären, die wiederum die Expression von IGF2 und HGF erhöhen können (Jiang et al. 1997; Tan und Khachigian 2009; Santo et al. 2013; Luo et al. 2021). Bei einer Hemmung der Kinasen wäre auch der

transkriptionelle Einfluss auf IGF2 und HGF herabgesetzt. Passend dazu wurde in der vorliegenden Arbeit nach Erlotinib-Gabe die Phosphorylierung von ERK1/2 reduziert (Abb. 8). Dies wurde auch an anderen Tumorzelllinien für Erlotinib und für andere EGFR-Inhibitoren wie Gefetinib und Afatinib gezeigt (Ho et al. 2005; Mao et al. 2017; daRocha et al. 2021). Die in anderen Arbeiten beobachtete Reduktion der Akt-Aktivität durch Erlotinib (Ho et al. 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit hingegen nicht gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür sind die unterschiedlichen Zeitpunkte nach Inhibitorgabe, zu denen die Aktivitätsanalyse durchgeführt wurde.

Bereits in 4.1 wurde diskutiert, dass die Signalwege von EGF, IGF2 und HGF bei Wachstum und Überleben in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen kooperierten. Dies wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass Kultivierung in serumfreiem Medium die Inhibitorwirkung verstärkte. Bei dreitägiger Stimulation wiesen die Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit für die Inhibitoren auf, wenn kein Serum im Medium vorhanden war (Abb. 18 und 20). Für Erlotinib war der Effekt allerdings nicht dauerhaft, sodass die SH-SY5Y-Zellen bereits nach zehn Tagen wieder die Zellzahl der nicht Inhibitor-behandelten Kontrollen erreicht hatten (Abb. 21). Mitverantwortlich für die Möglichkeit, die Inhibitorgabe zu überdauern oder sich sogar anzupassen, war die fehlende Induktion des Zelltods durch Erlotinib. So wurde die gemessene Caspase-Aktivität in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen durch 10 µM Erlotinib verringert (Abb. 8). In höheren Konzentrationen kann jedoch auch durch EGFR-Inhibition im Neuroblastomzellmodell Zelltod hervorgerufen werden, wie in einer anderen Arbeit mit Gefetinib beschrieben (Tamura et al. 2007).

Dass eine reduzierte Proliferation ohne die Induktion des Zelltods nicht ausreichte, um das Überleben langfristig zu verhindern, zeigten auch die zehntägigen Stimulationen mit Erlotinib in Vollmedium, nach denen noch 50 Prozent der Kelly-Zellen und 35 Prozent der SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden konnten (Abb. 11 und 12). Diese Beobachtungen legten nahe, dass die alleinige Verwendung von EGFR-Inhibitoren keine verlässliche therapeutische Option für das Neuroblastom ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Untersuchungen im Tiermodell, bei denen durch Erlotinib kein reduziertes Tumorwachstum des Neuroblastoms festgestellt werden konnte (Beaudry et al. 2008). Auch klinische Studien mit Erlotinib und Gefetinib in Monotherapie oder in Kombination mit Zytostatika zeigten variable Ergebnisse (Daw et al. 2005; Jakacki et al. 2008; Donfrancesco et al. 2010; Furman et al. 2012). Während bei einigen Patienten das Tumorwachstum langfristig reduziert war (Jakacki et al. 2008; Donfrancesco et al. 2010), wiesen andere nur ein geringes Ansprechen auf (Daw et al. 2005; Furman et al. 2012). Für eine sinnvolle Therapie des Neuroblastoms mit EGFR-Inhibitoren müssten demnach mindestens Biomarker für das Therapieansprechen gefunden und im Therapieverlauf reevaluiert werden (Johnsen et al. 2018).

### 4.2.2 Linsitinib

Die IGFR-Inhibition mittels Linsitinib führte unter den untersuchten Monokinaseinhibitoren kurzfristig zur stärksten Reduktion der Zellzahl beider Zelllinien, sodass bereits nach 24-stündiger Inkubation mit 1  $\mu$ M Linsitinib nur noch 80 Prozent der Kontrollzellen vorhanden waren (Abb. 5). Ähnlich wie bei Erlotinib wurde dies bei den Kelly-Zellen durch eine reduzierte Aktivität der Kinasen ERK1/2 und Akt (Abb. 8) und eine nachfolgend verminderte Freisetzung von IGF2 und HGF vermittelt (Abb. 9). Bei den SH-SY5Y-Zellen hingegen wurden sowohl die Aktivität von ER1/2 und Akt als auch die Freisetzung von IGF2 und HGF durch Linsitinib-Gabe kaum beeinflusst (Abb. 8 und 9). Die reduzierte Anzahl der lebenden Zellen muss demnach über weitere Signalwege wie beispielsweise den Mediator STAT5 vermittelt sein (Citri und Yarden 2006; Ramaiah und Kumar 2021).

Linsitinib senkte in beiden Zelllinien die Proliferationsrate (Abb. 8) und induzierte Apoptose in Kelly-Zellen (Abb. 8). Trotzdem waren beide Zelllinien in der Lage, eine zehntägige Inkubation mit Linsitinib zu überdauern. Überraschenderweise war die Zellzahl nach zehntägiger Inkubation mit Linsitinib sogar höher als mit Erlotinib (Abb. 11 und 12). Ein möglicher Kompensationsmechanismus der IGFR-Blockade durch Linsitinib ist die Expressionsinduktion von IGFR und c-Met, die für beide Zelllinien festgestellt werden konnte (Abb. 10). Resistenzentwicklung durch Überexpression der Zielstruktur, in diesem Fall IGFR, ist ein bekannter Mechanismus bei verschiedensten Wirkstoffen (Palmer und Kishony 2014). Ebenso kann durch die Hochregulierung nicht-inhibierter Rezeptoren und der zugehörigen nachgeschalteten Signalwege die Blockade eines Rezeptors kompensiert werden (Huang et al. 2014; Hou et al. 2011). So konnte beispielsweise eine verstärkte c-Met-Expression nach IGFR-Inhibition bei Mammakarzinom-Zellen nachgewiesen werden; hier wurde allerdings der Multikinaseinhibitor BMS-754807 verwendet (Hou et al. 2011). In anderen Untersuchungen konnte unter Linsitinib vor allem eine Steigerung der EGFR-Expression gezeigt werden (King et al. 2014), die hier jedoch auf Kontrollniveau blieb (Abb. 10).

Der Entzug von Serum erhöhte bei beiden Zelllinien kurzfristig die Linsitinib-Wirkung (Abb. 18 und 20). Gerade Kelly-Zellen waren unter fehlender externer Stimulation mit Wachstumsfaktoren nicht mehr in der Lage, die zehntägige Inkubation mit Linsitinib zu überdauern, sodass kaum noch persistierende Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 19). Unter Betrachtung der beschriebenen möglichen Resistenzmechanismen gegen Linsitinib war dies nicht überraschend. Bei Serumentzug wurden die endogene HGF-Produktion und die EGFR-Proteinmenge der Kelly-Zellen reduziert (Abb. 13), weshalb sie auf die IGF2-Signaltransduktion angewiesen waren. Wurde diese über Linsitinib blockiert, konnten die Zellen nicht mehr überleben (Abb. 18 und 19).

SH-SY5Y-Zellen hingegen konnten sich auch unter Serumentzug an die Linsitinib-Wirkung anpassen. Hier reduzierte der alleinige Serumentzug bereits die Expression und Freisetzung von IGF2 und HGF



sowie die Proteinmengen des EGFR und IGFR (Abb. 14), sodass die Gabe von Linsitinib langfristig keinen weiteren Effekt erbrachte. Entsprechend war nach zehntägiger Inkubation kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen unter Serumdeprivation festzustellen (Abb. 21).

Durchgeführte Studien zeigten *in vitro* und teilweise *in vivo* eine Wirksamkeit von Linsitinib gegen verschiedene Karzinome, darunter Kolon-, Bronchial-, Mamma- und Pankreaskarzinome (King und Wong 2012). An Neuroblastomzellen wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt. Die hier beschriebenen Möglichkeiten der untersuchten Zelllinien, sich an eine Linsitinibgabe anzupassen, lassen allerdings auch auf keinen sinnvollen Einsatz von Linsitinib als Monotherapie schließen.

### 4.2.3 Tepotinib

Der c-Met-Inhibitor Tepotinib hatte unter den untersuchten Inhibitoren den geringsten Einfluss auf die Zellviabilität (Abb. 6). Nur bei den Kelly-Zellen, nicht aber bei den SH-SY5Y-Zellen wurde die Proliferation durch Tepotinib reduziert. Eine Apoptoseinduktion konnte bei keiner der beiden Zelllinien detektiert werden (Abb. 8). In anderen Neuroblastomzelllinien, unter anderem H1993, SH-EP, SK-N-AS und SK-N-SH, konnte unter Tepotinib eine Apoptoseinduktion sowie ein reduziertes Tumorstadium beobachtet werden (Scorsone et al. 2014). Dabei wurden allerdings Konzentrationen bis zu 24  $\mu\text{M}$  getestet; für eine Reduktion der Zellzahl um 50 Prozent war eine Tepotinib-Konzentration von bis zu 8,5  $\mu\text{M}$  erforderlich (Scorsone et al. 2014). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Wirkung von Tepotinib auf die Neuroblastomzellen schien somit konzentrationsabhängig zu sein. Voraussetzung für eine Tepotinib-Wirkung ist die Expression von c-Met. Eine stärkere Proteinexpression korrelierte in anderen Untersuchungen jedoch nicht mit einer stärkeren Inhibitorwirkung (Scorsone et al. 2014).

Der Unterschied zwischen Kelly- und SH-SY5Y-Zellen könnte auf die veränderte Freisetzung der untersuchten Wachstumsfaktoren zurückzuführen sein. Dabei senkten die c-Met-Inhibitoren die IGF2-Freisetzung der Kelly-Zellen am stärksten, während die Reduktion der HGF-Spiegel vergleichbar mit dem Effekt der anderen Inhibitoren war (Abb. 9). Zusätzlich wurde die Akt-Phosphorylierung vermindert (Abb. 8). Dass die IGF2-Expression über die Wachstumsfaktor-vermittelte Aktivierung von Kinasen wie ERK1/2 und Akt reguliert werden kann, ist bereits bekannt (Santo et al. 2013; Luo et al. 2021), in diesem Zusammenhang jedoch trotzdem überraschend, da die IGF2-Freisetzung in Kelly-Zellen nach Serumentzug, Retinsäuregabe oder Applikation aller anderen Inhibitoren weniger gesenkt wurde (Abb. 9, 13 und 24). Entsprechend war die bloße Reduktion der HGF-Spiegel wie nach Serumdepletion (Abb. 13) nicht ausreichend für eine Veränderung der IGF2-Freisetzung, sondern erst eine gezielte Blockade von c-Met. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in die c-Met-Signalkaskade auch HGF-unabhängige Wege eingebunden sein können, wie am Bronchialkarzinom

gezeigt (Dulak et al. 2011; Miranda et al. 2018). Eine c-Met-Inhibition könnte damit eine stärkere Reduktion der IGF2-Expression bewirken als das bloße Fehlen von HGF.

Bei den SH-SY5Y-Zellen blieb die IGF2-Freisetzung nach Gabe von Tepotinib stabil, während die HGF-Ausschüttung stark induziert wurde (Abb. 9), was eine kompensatorische Regulation nahelegte. Für Tepotinib und HGF ist dieser Effekt zwar noch nicht beschrieben; eine Hochregulation der IGF2-Produktion zur Kompensation einer IGFR-Blockade ist jedoch beispielsweise für das Ewing-Sarkom bekannt (Garofalo et al. 2012). Die Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 blieb auf Kontrollniveau (Abb. 8), was insgesamt die relative schwache Wirkung von Tepotinib auf die Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen erklären könnte.

Trotz der Zelllinien-spezifischen Effekte waren Kelly- und SH-SY5Y-Zellen in der Lage, eine zehntägige Behandlung mit Tepotinib allein zu überdauern (Abb. 11 und 12). Eine Anpassungsmöglichkeit, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, ist die Expressionsinduktion des EGFR, die für Bronchialkarzinome unter Tepotinib bereits beschrieben wurde (Recondo et al. 2020). Wurden die Versuche jedoch in serumfreiem Medium durchgeführt, verstärkte sich die Inhibitorwirkung. Die Zelllinien waren nicht mehr in der Lage, sich an die Inhibitorbehandlung anzupassen, sodass unter Tepotinib und Serumentzug kaum noch persistierende Kelly- oder SH-SY5Y-Zellen vorhanden waren (Abb. 19 und 21). Die Zellen sind demnach auf weitere Wachstumsfaktoren angewiesen, um die reduzierte c-Met-Stimulation zu kompensieren. Damit zeigt sich erneut der kooperative Effekt der untersuchten Wachstumsfaktoren für das Zellüberleben (Tan und Khachigian 2009; Santo et al. 2013; Luo et al. 2021).

Klinische Anwendung findet Tepotinib zurzeit vor allem bei Bronchialkarzinomen (Fujino et al. 2021). Auch wenn bereits 2014 eine Wirksamkeit von Tepotinib gegen das Neuroblastom postuliert wurde (Scorsone et al. 2014), wurden noch keine klinischen Studien an Neuroblastompatienten durchgeführt. Vor dem Hintergrund der hier dargestellten Anpassungsmöglichkeiten der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen in Vollmedium scheint eine Tepotinib-Monotherapie jedoch auch nicht ausreichend.

#### **4.2.4 BMS-754807**

BMS-754807 reduzierte die Viabilität beider Zelllinien deutlich, vor allem die der Kelly-Zellen (Abb. 5). Dabei zeigten beide Zelllinien durch BMS-754807 eine reduzierte Kinaseaktivität von ERK1/2 und Akt, die ursächlich für die beobachtete reduzierte Proliferation und Apoptoseinduktion sein könnte (Abb. 8) (Ho et al. 2005; Citri und Yarden 2006; Rozengurt 2007). Bei zehntägiger Inkubation mit dem Inhibitor konnten die Kelly-Zellen daher kaum persistierende Zellen bilden (Abb. 11), den SH-SY5Y-Zellen gelang dies nur mit deutlich reduzierter Zellzahl (Abb. 12).

Durch Serumentzug konnte die BMS-754807-Wirkung auf die Zellen kurzfristig noch verstärkt werden (Abb. 18 und 20). Langfristig war BMS-754807 bereits in Vollmedium so stark wirksam, dass sich bei Serumentzug keine deutliche Wirkungsverstärkung mehr nachweisen ließ (Abb. 19 und 21).

Im Gegensatz zu den untersuchten Monokinaseinhibitoren schien BMS-754807 damit ein wirksamer Therapieansatz für das Neuroblastom zu sein. Auch andere Untersuchungen bestätigen die wirksame Wachstumsinhibition von Neuroblastomzellen durch BMS-754807 in vitro (Carboni et al. 2009). In vivo zeigte sich beim Neuroblastom jedoch eine intermediäre Wirksamkeit; nur zwei Drittel der untersuchten Tumor-Xenografts wiesen im Mausmodell unter BMS-754807 eine Wachstumsminde- rung auf (Kolb et al. 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten zumindest die SH-SY5Y-Zellen unter BMS-754807 persistierende Zellen bilden, was auf Anpassungsmöglichkeiten der Zellen hinweist. Für kolorektale Karzinome ist eine Resistenzentwicklung durch EGFR-Überexpression und Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege beschrieben (Ciardiello und Tortora 2008). Dies wäre auch für Neuroblastomzellen denkbar.

#### 4.2.5 Crizotinib

Der c-Met- und ALK-Inhibitor Crizotinib reduzierte bereits in einer Konzentration von 1  $\mu$ M signifikant die Anzahl von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen (Abb. 6). Bei beiden Zelllinien wurden durch Crizotinib-Gabe die Kinaseaktivitäten von ERK1/2 und Akt gesenkt, wodurch die Proliferation vermindert und Apoptose induziert wurde (Abb. 8). Allerdings war die kurz- und langfristige Wirkung bei Kelly-Zellen deutlicher (Abb. 6 und 11). Dies könnte ähnlich wie bei Tepotinib auf die unterschiedliche Regulation der Wachstumsfaktorfreisetzung zurückzuführen sein. So reduzierte Crizotinib in Kelly-Zellen die IGF2-Freisetzung unter allen untersuchten Inhibitoren am stärksten, während bei SH-SY5Y-Zellen die HGF-Freisetzung durch Crizotinib induziert wurde (Abb. 9). Letzteres könnte erklären, weshalb die SH-SY5Y-Zellen bei zehntägiger Inkubation mit Crizotinib in der Lage waren, persistierende Zellen zu bilden (Abb. 12).

Wurde den Zellen zusätzlich zur Inhibitorgabe das Serum entzogen, waren auch bei SH-SY5Y-Zellen nach zehn Tagen kaum lebende Zellen nachzuweisen (Abb. 21). Bei den Kelly-Zellen zeigten sich keine großen Unterschiede zur Situation in Vollmedium (Abb. 11 und 19).

Aufgrund der zusätzlichen Hemmung der ALK, deren Bedeutung für das Neuroblastom 2008 entdeckt wurde (Mossé et al. 2008), wurden mit Crizotinib bereits zahlreiche Studien durchgeführt. In Abhängigkeit von der ALK-Aktivität des Tumorsubtyps ergab sich in vivo insgesamt ein variables Ansprechen auf Crizotinib (Mossé et al. 2013; Della Corte et al. 2018; Foster et al. 2021; Berlak et al. 2022). Die Wirkung von Crizotinib auf c-Met und HGF wurde weniger betrachtet. Allein für das Bronchialkarzinom ist beschrieben, dass Crizotinib keinen Einfluss auf die HGF-Freisetzung der Zellen hat (Chen et al. 2020), was die hier gezeigten Ergebnisse für die SH-SY5Y-Zellen jedoch nicht

bestätigten (Abb. 9). Ähnlich wie schon bei Tepotinib könnte die induzierte HGF-Freisetzung der SH-SY5Y-Zellen unter Crizotinib einen Resistenzmechanismus darstellen, der gegen eine Monotherapie mit Crizotinib zur Behandlung des Neuroblastoms mit den Eigenschaften der SH-SY5Y-Zellen spricht. Aus der verstärkten Wirkung unter Serumentzug ergeben sich jedoch Möglichkeiten für eine Kombinationstherapie. Für Neuroblastome mit Eigenschaften der Kelly-Zellen scheint Crizotinib ein wirksamer Therapieansatz zu sein.

#### **4.2.6 Zusammenfassung: Inhibitoren**

Für alle untersuchten Inhibitoren konnte bei Inkubation mit beiden Zelllinien für bis zu 72 Stunden eine Reduktion der Zellzahl nachgewiesen werden. Unter den Monokinaseinhibitoren Erlotinib, Linsitinib und Tepotinib hatte die IGFR-Blockade durch Linsitinib kurzfristig den stärksten Effekt. Im Zusammenhang mit den in 4.1 diskutierten Ergebnissen (Abb. 3, 4 und 13, B) bestätigte dies, dass IGF2 für Wachstum und Überleben der Zellen eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Überraschenderweise war die Zellzahl nach zehntägiger Behandlung mit Linsitinib jedoch höher als nach Erlotinib-Behandlung, während Tepotinib über zehn Tage den geringsten Effekt hatte (Abb. 11 und 12). Dies könnte sich durch Anpassungsmöglichkeiten der Zelllinien an die Inhibition in Form von Rezeptorüberexpression (Abb. 10) und Induktion der Wachstumsfaktorfreisetzung (Abb. 9) erklären lassen. Aus den Anpassungsmöglichkeiten der Zelllinien lässt sich schließen, dass eine Anwendung von Erlotinib, Linsitinib oder Tepotinib in Monotherapie kein sinnvoller Therapieansatz für das Neuroblastom wäre.

Die Multikinaseinhibitoren BMS-754807 und Crizotinib hatten insgesamt die stärkste kurz- und langfristige Wirkung, wobei Kelly-Zellen empfindlicher waren als SH-SY5Y-Zellen (Abb. 5 und 6). Nach konstanter Gabe über zehn Tage konnten gerade bei BMS-754807 kaum noch Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12). Ursächlich für diesen Unterschied war die deutliche Induktion von Apoptose durch BMS-754807 und Crizotinib, während die Monokinaseinhibitoren meist ausschließlich die Proliferation reduzierten (Abb. 8). Eine therapeutische Anwendung dieser beiden Substanzen für das Neuroblastom wäre demnach eine Möglichkeit, die weiter untersucht werden sollte.

Der Entzug von Serum verstärkte den Effekt aller Inhibitoren bei dreitägiger Behandlung (Abb. 18 und 20). Wie bereits anhand der beschriebenen Anpassungsmöglichkeiten angedeutet, schien somit die Funktionsfähigkeit anderer Wachstumsfaktorsignalwege für die Kompensation der Inhibitorwirkung wichtig zu sein. Auch nach zehn Tagen waren bei den Kelly-Zellen kaum noch Zellen nachweisbar (Abb. 19). Daraus und aus der starken Wirksamkeit der Multikinaseinhibitoren lässt sich schließen, dass für eine optimale Wirksamkeit nicht nur ein Wachstumsfaktorrezeptor, sondern auch weitere Rezeptoren und Kinasen inhibiert werden müssen. Diese Erkenntnis konnte in anderen

Tumorentitäten bereits bestätigt werden. Kombinationen von EGFR-Inhibitoren wie Erlotinib, Gefetinib oder Osimertinib mit dem IGFR-Inhibitor Linsitinib zeigten eine verbesserte Wirksamkeit gegen Bronchial-, Mamma-, Ösophagus- und kolorektale Karzinome im Vergleich zur Monotherapie (Kang et al. 2022; Shao et al. 2022), da sie die anti-EGFR-Resistenz durch IGFR-Überexpression adressieren (Wang et al. 2020). Die verstärkte c-Met-Aktivität bei Bronchialkarzinomen unter Erlotinib konnte durch Kombination mit Tepotinib inhibiert und damit das Tumorwachstum reduziert werden (Frieze-Hamim et al. 2017). An Neuroblastomen wurden entsprechende Kombinationen noch nicht untersucht, erscheinen aber vielversprechend.

Im Gegensatz zu Kelly-Zellen konnten sich SH-SY5Y-Zellen unter Serumentzug an eine Erlotinib- und Linsitinib-Gabe anpassen (Abb. 21). Bereits in 4.1 wurde diskutiert, dass eine Beteiligung weiterer Wachstumsfaktoren bei SH-SY5Y-Zellen denkbar wäre, unter anderem VEGF. Für eine reine anti-VEGF-Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab konnte für SH-SY5Y-Zellen keine wirksame Wachstumsreduktion nachgewiesen werden (Beaudry et al. 2008). Dies gelang jedoch durch die Multikinaseinhibitoren Cabozantinib und Vandetanib mit ihrer Aktivität unter anderem gegen den VEGF-Rezeptor, c-Met und die Kinase RET (Beaudry et al. 2008; Zhang et al. 2015; Daudigeos-Dubus et al. 2017).

### **4.3 Wirkung von Retinsäure auf die Regulation von Wachstumsfaktoren und zusätzlich zur Wachstumsfaktorrezeptorinhibition**

Aufgrund ihrer Wirkung auf Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Neuroblastomzellen war Retinsäure lange Zeit Teil des multimodalen Therapiekonzeptes zur Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen (Peinemann et al. 2016; Chlapek et al. 2018). Berichte von Resistenzentwicklungen führten jedoch dazu, dass ihre Anwendung in den aktuellen Leitlinien zurückgestellt wurde (Peinemann et al. 2016). Kombinationen von Retinsäure mit anderen Therapeutika zur synergistischen Wirkung bleiben jedoch weiterhin vielversprechende Ansätze (Bayeva et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Differenzierung mit Retinsäure die Regulation der Wachstumsfaktoren und die Wirkung der Wachstumsfaktorinhibitoren beeinflussen konnte. Aufgrund der unterschiedlichen Effekte von Retinsäure auf die Zelllinien werden die Ergebnisse im Folgenden getrennt diskutiert.

#### **4.3.1 Kelly-Zellen**

In Kelly-Zellen reduzierte Retinsäure die Proliferationsrate, löste jedoch keinen Zelltod aus (Abb. 22 und 23), weshalb die Zellen die durchgängige Retinsäurebehandlung über zehn Tage überlebten

(Abb. 37). Vergleichbare Effekte wurden für Kelly-Zellen bereits früher beschrieben. Selbst die Gabe von 10  $\mu$ M Retinsäure über sechs Tage verminderte nur die Wachstumsrate, nicht jedoch die Viabilität (Preis et al. 1988). Die verminderte Proliferation wurde dabei vermutlich über die reduzierte Freisetzung von HGF vermittelt, die nach Retinsäuregabe in Kelly-Zellen zu beobachtet war (Abb. 24). In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die vorgeschaltete Signaltransduktion entscheidend dafür ist, wie eine Retinsäuregabe die HGF-Expression beeinflusst (Chattopadhyay et al. 2001; Takami et al. 2005). Ist die HGF-Produktion abhängig von anderen Wachstumsfaktoren, wie es die bisherigen Ergebnisse nahelegten (vgl. Abschnitt 4.1), wirkt Retinsäure als Inhibitor der HGF-Expression (Takami et al. 2005), wie es auch hier gezeigt werden konnte (Abb. 24). Außerdem führte die Inkubation mit dem c-Met-Inhibitor Tepotinib bei zehntägiger Inkubation zu einer vergleichbaren Reduktion der Proliferationsrate wie Retinsäure (Abb. 11 und 37). Dies unterstützt die Vermutung, dass das verlangsamte Wachstum der Kelly-Zellen unter Retinsäuregabe auf die reduzierte HGF-Produktion zurückzuführen war.

Interessanterweise blieben die Mengen von IGF2 auf mRNA- und Proteinebene während der Inkubation mit Retinsäure stabil (Abb. 24), obwohl die N-Myc-Proteinmenge und die Phosphorylierung von ERK1/2 abnahmen (Abb. 22). Dies ließ sich durch die stabile Aktivität der Kinase Akt unter Retinsäuregabe erklären (Abb. 22), die maßgeblich an der IGF2-Expression beteiligt sein kann (Santo et al. 2013; Luo et al. 2021).

Ob die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion bei Inkubation mit Retinsäure so funktional war wie in den Kontrollzellen, blieb jedoch fraglich, da durch Ko-Stimulation mit Retinsäure und EGF, HGF oder IGF2 nicht einmal das Kontrollniveau unbehandelter Zellen erreicht werden konnte (Abb. 26). Im Vergleich dazu konnte ohne Retinsäure das Wachstum durch EGF oder IGF2 deutlich über das Kontrollniveau gesteigert werden (Abb. 4). Eine Erklärung lieferte die Regulation der assoziierten Rezeptoren. So senkte Retinsäuregabe in Kelly-Zellen die Expression und Proteinmenge des EGFR (Abb. 25). Ein vergleichbarer Effekt der Retinsäure wurde bereits in anderen Tumorzellen beobachtet (Salvatori et al. 2011). Wie bereits beschrieben, bestehen zahlreiche Interaktionen zwischen den Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, IGFR und c-Met, die häufig das Tumorzellwachstum stimulieren. Aktivierung des EGFR fördert die Wachstumssteigerung durch IGF2 (Desbois-Mouthon et al. 2006) und kann auch c-Met aktivieren (Corso und Giordano 2013). Entsprechend konnte die hier beobachtete reduzierte Menge des EGFR zu der geringeren Funktionalität der Wachstumsfaktor-vermittelten Signaltransduktion beigetragen haben, sodass die Supplementation bei gleichzeitiger Retinsäuregabe weniger wirksam war.

Bei der gemeinsamen Verwendung von Retinsäure und Inhibitoren unterschiedlicher Wachstumsfaktorrezeptoren wurden substanz- und konzentrationspezifische Reaktionen

beobachtet. Nur bei Ko-Inkubation mit BMS-754807, das nicht nur die Proliferation hemmte, sondern auch am stärksten die Apoptose induzierte, hatte Retinsäure keinen zusätzlichen Effekt (Abb. 28 und 32). Für die anderen Inhibitoren war die additive Wirkung von Retinsäure konzentrationsabhängig. Bei Erlotinib und Linsitinib wurde die Viabilität durch die gemeinsame Gabe mit Retinsäure in allen Konzentrationen reduziert, bei Tepotinib in den Konzentrationen von 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M und bei Crizotinib für 1  $\mu$ M (Abb. 27 bis 31). Die Ursachen für die veränderten Zellzahlen waren wiederum substanzspezifisch, unterlagen jedoch einem gemeinsamen Muster. Da durch Retinsäure generell die Freisetzung von HGF reduziert wurde (Abb. 24), kam es für den endgültigen zellulären Effekt durch den jeweiligen Inhibitor darauf an, wie stark zusätzlich der IGF2-Spiegel gesenkt und welche Rezeptoren blockiert wurden. So führte die EGFR-Inhibition durch Erlotinib bei gemeinsamer Gabe von Retinsäure höchstens zu einer verminderten Proliferation (Abb. 32), da IGFR und c-Met noch funktionsfähig waren und die Freisetzung von IGF2 nicht signifikant gesenkt wurde (Abb. 34 und 35). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Ko-Inkubation von Retinsäure und EGFR-Inhibitoren wie Gefitinib sowie Erlotinib bereits beschrieben (Lainey et al. 2013; de Almeida et al. 2021).

Die alleinige Blockade des IGFR durch Linsitinib bei gleichzeitiger Inkubation mit Retinsäure reichte ebenfalls nicht aus, um den Zelltod auszulösen, da EGFR und c-Met weiterhin für ihre Liganden zur Verfügung standen und die Freisetzung von IGF2 auf Kontrollniveau verblieb (Abb. 34 und 35). Entsprechend wurde in Kelly-Zellen unter Linsitinib und Retinsäure lediglich die Proliferation reduziert (Abb. 32). Nach Ko-Stimulation mit BMS-754807 und Retinsäure konnte kein zusätzlicher Effekt von Retinsäure beobachtet werden (Abb. 28 und 32). Als Multikinase-Inhibitor blockierte BMS-754807 den IGFR, den Insulinrezeptor, c-Met, TrkA, TrkB, AurA sowie AurB (Carboni et al. 2009), was bis auf den EGFR alle untersuchten Rezeptoren einschloss. Deshalb wurde keine additive Wirkung von Retinsäure gemessen.

Überraschend stark war die Wirkung der gemeinsamen Gabe von Tepotinib und Retinsäure, die nicht nur die kurzfristige Viabilität reduzierte (Abb. 29), sondern auch deutlich die Caspase-Aktivität erhöhte (Abb. 32) und langfristig die Zellzahl senkte (Abb. 37), obwohl IGFR und EGFR nicht beeinflusst wurden. Allerdings war die Freisetzung von IGF2 deutlich reduziert (Abb. 34). Diese direkte Wirkung auf die IGF2-Spiegel durch die Inhibition von c-Met ist bislang noch nicht beschrieben. Denkbar wäre auch, dass durch die Inkubation mit Retinsäure in Kelly-Zellen nicht nur die Proliferation reduziert wurde, sondern auch Differenzierungsprozesse initiiert wurden, was bereits beschrieben ist (Preis et al. 1988). In differenzierten Zellen hat die HGF-/c-Met-Singalkaskade wichtige Funktionen für das neuronale Überleben (Desole et al. 2021), was durch Tepotinib in den vorliegenden Experimenten eingeschränkt wurde. Für eine entscheidende Rolle der c-Met-vermittelten Signaltransduktion in diesem Zusammenhang spricht auch, dass ein vergleichbarer

Effekt sowohl bei Crizotinib in Vollmedium detektiert wurde (Abb. 30 und 32) als auch für beide c-Met-Inhibitoren unter serumfreien Bedingungen (Abb. 49). Damit könnte die Hemmung von c-Met gemeinsam mit Retinsäure als therapeutisches Konzept getestet werden.

Auch die Frage, ob Apoptose durch die jeweiligen Inhibitoren in Kombination mit Retinsäure induziert wurde oder die Proliferation reduziert, war davon abhängig, wie stark die Spiegel beider Wachstumsfaktoren insgesamt gesenkt wurden. Lagen die Mengen beider Wachstumsfaktoren unterhalb des Kontrollniveaus, konnte eine Aktivierung der Caspase gemessen werden (Abb. 32 und 34), was auch die Zellzahl langfristig stark reduzierte (Abb. 37). Blieben die Spiegel von HGF und IGF2 im Bereich der Kontrollzellen, wurde nur das Wachstum vermindert, das Überleben über zehn Tage aber weniger stark gesenkt. Es zeigte sich also, dass die Spiegel von HGF oder IGF2 allein betrachtet nicht aussagekräftig waren für den endgültigen Effekt, sondern dass die Kombination aus beiden berücksichtigt werden musste.

Darauf deuten auch die heterogenen Meinungen der Literatur zur Eignung von IGF2 oder HGF als prognostischer Marker einer Krebserkrankung hin. IGF2 gilt bei vielen Tumorarten als Indikator für eine hohe Malignität mit reduzierter Überlebenswahrscheinlichkeit (Ribeiro und Latronico 2012; Dong et al. 2015; Guntiboina et al. 2019). Allerdings können hohe IGF2-Spiegel auch mit einer guten Prognose (Han et al. 2006) oder einem frühen Krankheitsstadium (Huang et al. 2014) assoziiert sein. Wird bei HGF nur die Expression im Tumor betrachtet, gelten erhöhte Werte als Marker für eine schlechte Prognose (Bharti et al. 2004; Dreikhausen et al. 2015). Bei zirkulierendem HGF allerdings ist die Situation nicht eindeutig. Die Mehrzahl der Untersuchungen ordneten hohe Spiegel einer aggressiven Erkrankung mit reduziertem Überleben zu (Moosavi et al. 2019), andere Studien konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Dreikhausen et al. 2015). Entsprechend der hier dargestellten Ergebnisse sollten beide Wachstumsfaktoren gemeinsam für eine prognostische Einschätzung betrachtet werden.

#### **4.3.2 SH-SY5Y-Zellen**

In SH-SY5Y-Zellen zeigte sich die Retinsäurewirkung abhängig vom Serumgehalt des Mediums, was bereits beschrieben wurde (Magalingam et al. 2020). In Vollmedium bedeutete dies eine Verstärkung der Akt-Aktivität durch Retinsäuregabe (López-Carballo et al. 2002; Waetzig et al. 2019) sowie eine kurzfristige Erhöhung der Zellzahl (Waetzig et al. 2019; Sami Issa et al. 2024). Außerdem wurde bei Ko-Inkubation mit mitogenen Stimuli wie EGF oder IGF2 die Viabilität weiter verbessert (Abb. 26). Bei gleichzeitiger Gabe von Retinsäure und HGF wurde die Zellzahl allerdings reduziert und blieb nicht wie bei alleiniger HGF-Applikation auf Kontrollniveau (Abb. 26). Die Menge des HGF-Rezeptors c-Met wurde dabei durch Retinsäure nicht verändert. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Salvatori et al. 2011) konnte durch Retinsäuregabe jedoch eine Reduktion der EGFR-Menge in SH-SY5Y-Zellen



beobachtet werden (Abb. 25). Wie bereits bei den Kelly-Zellen beschrieben, kann die reduzierte EGFR-Menge aufgrund seiner kooperativen Wirkung mit c-Met (Corso und Giordano 2013) die reduzierte Proliferation unter HGF-Gabe bewirkt haben.

Ähnlich wie bei den Kelly-Zellen wurde auch in SH-SY5Y-Zellen die HGF-Freisetzung nach Retinsäuregabe gesenkt (Abb. 24), was möglicherweise für die kurzfristig veränderten Effekte der Wachstumsfaktorrezeptorinhibitoren sorgte, allerdings nicht einheitlich, sondern substanzabhängig. Bei Ko-Stimulation von Retinsäure und Erlotinib, Tepotinib oder Crizotinib waren die HGF-Spiegel deutlich niedriger als nach Inhibitorgabe allein (Abb. 34), was die höhere Caspase-Aktivität und die verminderte Viabilität bei gleichzeitiger Inkubation von Retinsäure mit Erlotinib oder Tepotinib erklären kann (Abb. 29, 31 und 32). Warum bei gemeinsamer Gabe von Retinsäure und Crizotinib zwar eine gesteigerte Aktivierung von Caspase 3/7 detektiert wurde, aber eine erhöhte Zellzahl nach dreitägiger Inkubation (Abb. 30), konnte nicht mit Hilfe der durchgeführten Experimente geklärt werden. Eine Möglichkeit ist, dass die Behandlung mit Retinsäure zwar eine Caspase-Aktivierung auslöste, die jedoch keine apoptotische Funktion hatte. Gerade bei neuronalen Zellen können Caspasen stattdessen auch in Differenzierungsprozesse eingebunden sein (Madadi et al. 2019; Dehkordi et al. 2022), die nach Gabe von Retinsäure auch in SH-SY5Y-Zellen beschrieben wurden (Pählman et al. 1984).

Außerdem schien die Wirkung von Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen transient zu sein, da die Zellzahl nicht nur nach zehntägiger Inkubation mit Retinsäure wieder auf Kontrollniveau war, sondern auch die Ko-Stimulation mit den unterschiedlichen Inhibitoren nach zehn Tagen die Zellzahl nicht stärker reduzierte als die alleinige Substanzgabe (Abb. 38). Dieses vorübergehende Ansprechen kann auf die Bildung von Resistenzen zurückgehen, die in Neuroblastomen gegenüber Retinsäure beschrieben ist (Chlapek et al. 2018). Im Fall der SH-SY5Y-Zellen kann allerdings auch ein nur partielles Ansprechen der unterschiedlichen Zellpopulationen dafür verantwortlich sein, was es den undifferenzierten Zellen ermöglicht, weiter zu wachsen (Filograna et al. 2015).

Für eine vollständige Differenzierung durch Retinsäure wird daher begleitend ein reduzierter Serumgehalt des Mediums empfohlen (Magalingam et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit schien Retinsäure dabei die Effekte der fehlenden Wachstumsfaktoren zu verstärken. So blieb der basale Zelltod nach dreitägiger Retinsäuregabe zwar noch reduziert, allerdings verminderte sich durch den Serumentzug die Proliferation (Abb. 41). Da Serumentzug zusätzlich auch Apoptose auslösen kann (Rashid und Coombs 2019), war es wenig überraschend, dass nach zehntägiger Retinsäuregabe unter serumfreien Bedingungen die Zellzahl auf 29 Prozent im Vergleich zur alleinig serumdeprivierten Kontrolle gesunken war (Abb. 53). Was dazu beigetragen haben konnte, war die nach Serumentzug reduzierte Expression und Freisetzung von HGF und IGF2, die durch Retinsäure im Fall von HGF noch

weiter gesenkt wurde (Abb. 42). Warum nur das ausgeschüttete HGF-Protein betroffen war und nicht die Expression, blieb im Rahmen der vorliegenden Arbeit offen. Denkbar ist, dass eine Retinsäure-vermittelte Reduktion der intrazellulären Calcium-Spiegel zu einer herabgesetzten Freisetzung von HGF führte (Tatsumi 2010; Vesprini et al. 2015).

Das zelluläre Ansprechen auf exogen zugeführte Wachstumsfaktoren war durch Retinsäure unter serumfreien Bedingungen bei der Gabe von IGF2 allein und den Kombinationen aus IGF2 und EGF sowie IGF2, HGF und EGF im Vergleich zur Stimulation ohne Retinsäure reduziert (Abb. 44 bis 46), was auf eine Veränderung des IGF-Signalwegs hindeutete. Beobachtet wurde eine verminderte Proliferation nach Stimulation mit Retinsäure und IGF1 schon vorher (Wu et al 1997), allerdings ohne mechanistische Begründung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass nur die Kombination aus Retinsäure und Serumentzug zu diesem Effekt führten und nicht eine ausschließlich auf Retinsäure beruhende Veränderung der IGF-Signaltransduktion, wie es in anderen Tumorzellen beschrieben wurde (Freemantle et al. 2002; Cesi et al. 2004). Vorstellbar wäre eine Regulation über die veränderten Proteinmengen von EGFR und IGFR, die beide durch Serumdeprivation reduziert wurden (Abb. 14). Bei der Stimulation mit Wachstumsfaktoren unter serumfreien Bedingungen wurde die Induktion von EGFR und IGFR bei zusätzlicher Gabe von Retinsäure deutlich gesenkt, was auch zu geringeren Proteinmengen führte (Abb. 47). Damit wäre eine verminderte Reaktion auf exogen gegebene Wachstumsfaktoren erklärbar. Bekannt ist die Reduktion der EGFR-Expression durch Retinsäure (Salvatori et al. 2011), was zu einer Destabilisierung von IGFR beitragen kann (Riedemann et al. 2007) und damit die Wirkung von supplementiertem IGF2 herabsetzen würde.

Wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen mit den unterschiedlichen Inhibitoren und Retinsäure behandelt, war nach drei Tagen kein zusätzlicher Effekt von Retinsäure erkennbar. Eine Ausnahme bildete die gleichzeitige Inkubation von Tepotinib und Retinsäure, die die Zellzahl stärker reduzierte als Tepotinib allein (Abb. 48). In Vollmedium verstärkte die Gabe von Tepotinib die Freisetzung von HGF, während die ausgeschüttete Menge von IGF2 konstant blieb (Abb. 9). Sowohl Serumdeprivation als auch Retinsäure senkten die Spiegel beider Wachstumsfaktoren (Abb. 42), was bei zusätzlicher Stimulation mit Tepotinib die geringere Viabilität verursacht haben könnte.

Langfristig war das Überleben unter serumfreien Bedingungen bei gleichzeitiger Inkubation von Erlotinib und Linsitinib jeweils mit Retinsäure deutlich geringer als mit den Inhibitoren allein, während bei Ko-Stimulation von Crizotinib und Retinsäure etwas mehr Zellen vorhanden waren, allerdings auf sehr geringem Niveau (Abb. 50). Damit hatte die Kombination aus Serumentzug und Retinsäuregabe bislang den stärksten Effekt auf die langfristige Reduktion der Zellzahl. Da Serumdeprivation die Aktivität von ERK1/2 reduzierte und auch die zusätzliche Gabe von Retinsäure daran nichts änderte (Abb. 41), wurden nachgeschaltet die Freisetzung von HGF und IGF2 gesenkt

sowie die Proteinmengen von EGFR und IGFR (Abb. 42 und 43), was insgesamt die geringe Zellzahl erklärte (Jiang et al. 1997; Riedemann et al. 2007; Chou et al. 2011; Santo et al. 2013; Luo et al. 2021). Dass die Erlotinib-behandelten Zellen unter serumfreien Bedingungen nicht so stark betroffen waren wie die anderen Zellen könnte darauf zurückzuführen sein, dass SH-SY5Y-Zellen EGF nicht endogen freisetzen und deshalb eine Blockade von EGFR nur kooperative Interaktionen mit IGFR oder c-Met einschränkte, jedoch nicht die endogenen Wachstumsfaktorkaskaden vollständig blockierte.

#### **4.3.3 Zusammenfassung: Retinsäure**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Retinsäure allein sich nicht zur therapeutischen Nutzung bei Neuroblastomzellen wie Kelly- und SH-SY5Y-Zellen eignete, da kein Zelltod induziert wurde. Selbst bei einer zusätzlichen Blockade von einzelnen Wachstumsfaktorrezeptoren war kein einheitlicher und langfristiger Effekt zu beobachten. Gerade vor dem Hintergrund der zahlreichen unerwünschten Wirkungen ist deshalb fraglich, ob Retinsäure in Zukunft in der Neuroblastomtherapie einen Stellenwert haben wird.

## 5 Zusammenfassung

Neuroblastome sind maligne Tumoren des peripheren sympathischen Nervengewebes und stellen die zweithäufigste solide Tumorentität im Kindesalter dar. Die Prognose variiert von Spontanregression bis hin zu letalen Verläufen bei Hochrisikotumoren, die effektive Therapiestrategien benötigen. Ein Therapieansatz, der bei anderen Tumorentitäten bereits vielversprechend eingesetzt wird, richtet sich gegen Wachstumsfaktoren und ihre assoziierten Rezeptoren. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die Rolle der Wachstumsfaktoren für das Neuroblastom eingeschätzt und mögliche Therapieoptionen abgeleitet werden. Untersucht wurden die Wachstumsfaktoren EGF, IGF und HGF an den Neuroblastomzelllinien Kelly und SH-SY5Y.

Zunächst wurden die endogene Wachstumsfaktorproduktion, die Rezeptoren und die Folgen einer Wachstumsfaktorbindung unter optimalen Bedingungen und unter Serumentzug betrachtet. Die IGF-Isoform IGF2 wurde vor allem durch Kelly-Zellen produziert und auch unter Serumentzug aufrechterhalten. IGF2-Supplementation bewirkte von allen Wachstumsfaktoren die stärkste Wachstumssteigerung, auch eine autokrine Wirkung schien bei den Kelly-Zellen möglich. Für eine optimale Wirkung war jedoch die Kombination mit EGF und HGF erforderlich, die auf verschiedenen Ebenen mit IGF2 interagieren konnten. Dazu gehörten die gemeinsame Aktivierung der Kinasen ERK1/2 und Akt sowie die Aufrechterhaltung der Wachstumsfaktorrezeptoren. EGF wurde durch keine der beiden Zelllinien selbst produziert, HGF unter Optimalbedingungen vor allem durch SH-SY5Y-Zellen.

Mittels gezielter Inhibition der Wachstumsfaktorrezeptoren sollten einzelne oder mehrere Signalwege ausgeschaltet werden, um die Folgen für Zellwachstum und –überleben herauszustellen. Verwendet wurden die Monokinaseinhibitoren Erlotinib (EGFR), Linsitinib (IGFR) und Tepotinib (c-Met) sowie die Multikinaseinhibitoren BMS-754807 (IGFR) und Crizotinib (c-Met), die zusätzliche zelluläre Angriffspunkte besaßen. Unter den Monokinaseinhibitoren zeigte die IGFR-Inhibition durch Linsitinib kurzfristig den stärksten Effekt und bestätigt damit die wichtige Rolle von IGF2 für das Zellüberleben. Langfristig konnten sich jedoch beide Zelllinien durch Rezeptorüberexpression und Induktion der endogenen Wachstumsfaktorfreisetzung an die Monokinaseinhibitoren anpassen. Dies schließt sie für eine sinnvolle Therapie des Neuroblastoms aus. Die Multikinaseinhibitoren hingegen zeigten eine starke Wirksamkeit, unter anderem durch Auslösung der Apoptose. Dass die Inhibition mehrerer Rezeptoren und Kinasen einen wirksamen Therapieansatz darstellen kann, bestätigt auch die verbesserte Wirksamkeit der Monokinaseinhibitoren in Medium ohne Serum.

Retinsäure kann in Neuroblastomzellen Differenzierungsprozesse auslösen und wurde lange Zeit therapeutisch eingesetzt. Daher sollte ihr Einfluss auf die Wachstumsfaktoren und Inhibitoren bei den untersuchten Zelllinien mit betrachtet werden.

Retinsäuregabe bewirkte in beiden Zelllinien eine Reduktion der HGF-Freisetzung, die bei den Kelly-Zellen zu einer reduzierten Proliferation führte. Zudem wurde bei beiden Zelllinien die EGFR-Expression durch Retinsäure vermindert, sodass die Wirksamkeit der interagierenden Wachstumsfaktoren insgesamt herabgesetzt war. Trotzdem konnte nur bei den Kelly-Zellen die Wirkung der c-Met-Inhibitoren Tepotinib und Crizotinib durch Retinsäure verstärkt werden. Bei den SH-SY5Y-Zellen gelang eine Wirkverstärkung der Inhibitoren nur unter Serumentzug.

Insgesamt ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit folgende Therapieoptionen für das Neuroblastom: Die pleiotropen Substanzen BMS-754807 und Crizotinib zeigen eine gute Wirksamkeit. Ebenso sind Kombinationen der verschiedenen Inhibitoren von EGFR, IGFR und c-Met vielversprechend, auch weitere Wachstumsfaktoren kämen als Kombinationspartner in Betracht. Retinsäure könnte in Kombination mit den c-Met-Inhibitoren weiter getestet werden, sollte vor dem Hintergrund der uneinheitlichen Wirkung und ausgeprägten Nebenwirkungen jedoch zurückhaltend bewertet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Arora, A., Scholar, E. M. (2005): Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(3),971-9.

Bayeva, N., Coll, E., Piskareva, O. (2021): Differentiating neuroblastoma: a systematic review of the retinoic acid, its derivatives, and synergistic interactions. *J Pers Med.*, 11(3), 211.

Baserga, R. (1995): The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res*, 55, 249–52.

Bannasch, D., Weis, I., Schwab, M. (1999): Nmi protein interacts with regions that differ between MycN and Myc and is localized in the cytoplasm of neuroblastoma cells in contrast to nuclear MycN. *Oncogene*, 18(48), 6810-7.

Beaudry, P., Nilsson, M., Rioth, M., Prox, D., Poon, D., Xu, L., Zweidler-Mckay, P., Ryan, A., Folkman, J., Ryeom, S., Heymach, J. (2008): Potent antitumor effects of ZD6474 on neuroblastoma via dual targeting of tumor cells and tumor endothelium. *Mol Cancer Ther*, 7(2), 418-24.

Beierle, E. A., Strande, L. F., Chen, M. K. (2002): VEGF upregulates Bcl-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg*, 37(3), 467-71.

Benabbou, N., Mirshahi, P., Cadillon, M., Soria, J., Therwath, A., Mirshahi, M. (2013): Hospicells promote upregulation of the ATP-binding cassette genes by insulin-like growth factor-I via the JAK2/STAT3 signaling pathway in an ovarian cancer cell line. *Int J Oncol*, 43(3), 685-94.

Berlak, M., Tucker, E., Dorel, M., Winkler, A., McGearey, A., Rodriguez-Fos, E., da Costa, B. M., Barker, K., Fyle, E., Calton, E., Eising, S., Ober, K., Hughes, D., Koutroumanidou, E., Carter, P., Stankunaite, R., Proszek, P., Jain, N., Rosswog, C., Dorado-Garcia, H., Molenaar, J. J., Hubank, M., Barone, G., Anderson, J., Lang, P., Deubzer, H. E., Künkele, A., Fischer, M., Eggert, A., Kloft, C., Henssen, A. G., Boettcher, M., Hertwig, F., Blüthgen, N., Chesler, L., Schulte, J. H. (2022): Mutations in ALK signaling pathways conferring resistance to ALK inhibitor treatment lead to collateral vulnerabilities in neuroblastoma cells. *Mol Cancer*, 21(126).

Bettinsoli, P., Ferrari-Toninelli, G., Bonini, S. A., Prandelli, C., Memo, M. (2017): Notch ligand Delta-like 1 as a novel molecular target in childhood neuroblastoma. *BMC Cancer*, 17(1), 352.

Bharti, A., Ma, P. C., Maulik, G., Singh, R., Khan, E., Skarin, A. T., Salgia, R. (2004): Haptoglobin alpha-subunit and hepatocyte growth factor can potentially serve as serum tumor biomarkers in small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 24(2C), 1031-8.

Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B.A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33(11), 2643-52.

Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L.S. (1978): Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, 38(11), 3751-7.

Birchmeier, C., Gherardi, E. (1998): Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*, 8, 404-10.

Brisse, H. J., McCarville, M. B., Granata, C., Krug, K. B., Wootton-Gorges, S. L., Kanegawa, K., Giammarile, F., Schmidt, M., Shulkin, B. L., Matthay, K. K., Lewington, V. J., Sarnacki, S., Hero, B., Kaneko, M., London, W. B., Pearson, A. D., Cohn, S. L., Monclair, T.; International Neuroblastoma Risk Group Project (2011): Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the international neuroblastoma risk group project. *Radiology*, 261(1), 243-57.

Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R.P., D'Angio, G., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., Freeman, A. I. et al. (1988): International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 6(12), 1874-81.

Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R. P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., Hedborg, F. et al. (1993): Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*, 11(8), 1466-77.

Byeon, H. K., Ku, M., Yang, J. (2019): Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Exp Mol Med*, 51(1), 1-14.

Cairns, J., Fridley, B. L., Jenkins, G. D., Zhuang, Y., Yu, J., Wang, L. (2018): Differential roles of ERRF1 in EGFR and AKT pathway regulation affect cancer proliferation. *EMBO Rep*, 19(3), e44767.

Castillo, L., Etienne-Grimaldi, M. C., Fischel, J. L., Formento, P., Magné, N., Milano, G. (2004): Pharmacological background of EGFR targeting. *Ann Oncol*, 15(7), 1007-12.

Carboni, J. M., Lee, A. V., Hadsell, D. L., Rowley, B. R., Lee, F. Y., Bol, D. K., Camuso, A. E., Gottardis, M., Greer, A. F., Ho, C. P., Hurlburt, W., Li, A., Saulnier, M., Velaparthi, U., Wang, C., Wen, M. L., Westhouse, R. A., Wittman, M., Zimmermann, K., Rupnow, B. A., Wong, T. W. (2005): Tumor development by transgenic expression of a constitutively active insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res*, 65(9), 3781–7.

Carboni, J. M., Wittman, M., Yang, Z., Lee, F., Greer, A., Hurlburt, W., Hillerman, S., Cao, C., Cantor, G. H., Dell-John, J., Chen, C., Discenza, L., Menard, K., Li, A., Trainor, G., Vyas, D., Kramer, R., Attar, R. M., Gottardis, M.M. (2009): BMS-754807; a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR. *Mol Cancer Ther*, 8(12), 3341–9.

Cesi, V., Vitali, R., Tanno, B., Giuffrida, M. L., Sesti, F., Mancini, C., Raschellà, G. (2004): Insulin-like growth factor binding protein 5: contribution to growth and differentiation of neuroblastoma cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1028, 59-68.

Chambéry, D., Mohseni-Zadeh, S., de Gallé, B., Babajko, S. (1999): N-myc regulation of type I insulin-like growth factor receptor in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res*, 59(12), 2898–902.

Chattopadhyay, N., Butters, R. R., Brown, E. M. (2001): Agonists of the retinoic acid- and retinoid X-receptors inhibit hepatocyte growth factor secretion and expression in U87 human astrocytoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 87(1), 100-8.

Chen, H., Lin, C., Peng, T., Hu, C., Lu, C., Li, L., Wang, Y., Han, R., Feng, M., Sun, F., He, Y. (2020): Metformin reduces HGF-induced resistance to alectinib via the inhibition of Gab1. *Cell Death Dis*, 11(2), 111.

Cheung, Y. T., Lau, W. K., Yu, M. S., Lai, C. S., Yeung, S. C., So, K. F., Chang, R.C. (2009): Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30(1), 127-35.

Chlapek, P., Slavikova, V., Mazanek, P., Sterba, J., Veselska, R. (2018): Why differentiation therapy sometimes fails: molecular mechanisms of resistance to retinoids. *Int J Mol Sci*, 19(1), 132.

Chou, C. W., Wu, M. S., Huang, W. C., Chen, C. C. (2011): HDAC inhibition decreases the expression of EGFR in colorectal cancer cells. *PLoS One*, 6(3), e18087.



- Ciardiello, F., Tortora, G. (2008): EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*, 358(11), 1160-74.
- Citri, A., Yarden, Y. (2006): EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), 505-16.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1954): A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci USA*, 40(10), 1014-8.
- Cohn, S. L., Pearson, A. D., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldum, A., Hero, B., Iehara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V., Matthay, K. K.; INRG Task Force (2009): The international neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol*, 27(2), 289-97.
- Corso, S., Giordano, S. (2013): Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of HGF/MET-driven resistance to targeted therapies: from basic research to a clinical perspective. *Cancer Discov*, 3(9), 978-92.
- Crosswell, H. E., Dasgupta, A., Alvarado, C.S., Watt, T., Christensen, J. G., De, P., Durden, D. L., Findley, H. W. (2009): PHA665752, a small-molecule inhibitor of c-Met, inhibits hepatocyte growth factor-stimulated migration and proliferation of c-Met-positive neuroblastoma cells. *BMC Cancer*, 9, 411.
- Cui, J. J., Tran-Dubé, M., Shen, H., Nambu, M., Kung, P. P., Pairish, M., Jia, L., Meng, J., Funk, L., Botrous, I., McTigue, M., Grodsky, N., Ryan, K., Padrique, E., Alton, G., Timofeevski, S., Yamazaki, S., Li, Q., Zou, H., Christensen, J., Mroczkowski, B., Bender, S., Kania, R. S., Edwards, M. P. (2011): Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J Med Chem*, 54(18), 6342-63.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., Van Cutsem, E. (2004): Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 351(4), 337-45.

D'Angio, G. J., Evans, A. E., Koop, C. E. (1971): Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet*, 1(7708), 1046-9.

da Rocha, J. F., Bastos, L., Domingues, S. C., Bento, A. R., Konietzko, U., da Cruz, E., Silva, O. A. B., Vieira, S. I. (2021): APP binds to the EGFR Ligands HB-EGF and EGF, acting synergistically with EGF to promote ERK signaling and neuritogenesis. *Mol Neurobiol*, 58(2), 668-688.

Daudigeos-Dubus, E., Le Dret, L., Bawa, O., Opolon, P., Vievard, A., Villa, I., Bosq, J., Vassal, G., Geoerger, B. (2017): Dual inhibition using cabozantinib overcomes HGF/MET signaling mediated resistance to pan-VEGFR inhibition in orthotopic and metastatic neuroblastoma tumors. *Int J Oncol*, 50(1):203-211.

Davis, S. L., Eckhardt, S. G., Diamond, J. R., Messersmith, W. A., Dasari, A., Weekes, C. D., Lieu, C. H., Kane, M., Choon Tan, A., Pitts, T. M., Leong, S. (2018): A phase I dose-escalation study of linsitinib (OSI-906), a small-molecule dual insulin-like growth factor-1 receptor/insulin receptor kinase inhibitor, in combination with irinotecan in patients with advanced cancer. *Oncologist*, 23(12), 1409-e140.

Daw, N. C., Furman, W. L., Stewart, C. F., Iacono, L. C., Krailo, M., Bernstein, M. L., Dancey, J. E., Speights, R. A., Blaney, S. M., Croop, J. M., Reaman, G. H., Adamson, P. C.; Children's Oncology Group (2005): Phase I and pharmacokinetic study of gefitinib in children with refractory solid tumors: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*, 23(25), 6172-80.

de Almeida, L. Y., Pereira-Martins, D. A., Weinhäuser, I., Ortiz, C., Cândido, L. A., Lange, A. P., De Abreu, N. F., Mendonza, S., de Deus Wagatsuma, V. M., Do Nascimento, M. C., Paiva, H. H., Alves-Paiva, R. M., Bonaldo, C., Nascimento, D. C., Alves-Filho, J. C., Scheucher, P. S., Lima, A., Schuringa, J. J., Ammantuna, E., Ottone, T., Noguera, N. I., Araujo, C. L., Rego, E. M. (2021): The combination of gefitinib with ATRA and ATO induces myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia resistant cells. *Front Oncol*, 11, 686445.

Dehkordi, M. H., Munn, R., Fearnhead, H. O. (2022): Non-canonical roles of apoptotic caspases in the nervous system. *Front Cell Dev Biol*, 10, 840023.

Del Grosso, F., De Mariano, M., Passoni, L., Luksch, R., Tonini, G. P., Longo, L. (2011): Inhibition of N-linked glycosylation impairs ALK phosphorylation and disrupts pro-survival signaling in neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer*, 11, 525.

Della Corte, C. M., Viscardi, G., Di Liello, R., Fasano, M., Martinelli, E., Troiani, T., Ciardiello, F., Morgillo, F. (2018): Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Mol Cancer*, 17(1), 30.

Desbois-Mouthon, C., Cacheux, W., Blivet-Van Eggelpoël, M. J., Barbu, V., Fartoux, L., Poupon, R., Housset, C., Rosmorduc, O. (2006): Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer*, 119(11), 2557-66.

Desole, C., Gallo, S., Vitacolonna, A., Montarolo, F., Bertolotto, A., Vivien, D., Comoglio, P., Crepaldi, T. (2021): HGF and MET: from brain development to neurological disorders. *Front Cell Dev Biol*, 9, 683609.

Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., Aaronson, S. A. (1987): ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, 237(4811), 178-82.

Donfrancesco, A., De Ioris, M. A., McDowell, H. P., De Pasquale, M. D., Ilari, I., Jenkner, A., Castellano, A., Cialfi, S., De Laurentis, C., Dominici, C. (2010): Gefitinib in combination with oral topotecan and cyclophosphamide in relapsed neuroblastoma: pharmacological rationale and clinical response. *Pediatr Blood Cancer*, 54(1), 55–61.

Dong, Y., Li, J., Han, F., Chen, H., Zhao, X., Qin, Q., Shi, R., Liu, J. (2015): High IGF2 expression is associated with poor clinical outcome in human ovarian cancer. *Oncol Rep*, 34(2), 936-42.

Dreikhausen, L., Blank, S., Sisic, L., Heger, U., Weichert, W., Jäger, D., Bruckner, T., Giese, N., Grenacher, L., Falk, C., Ott, K., Schmidt, T. (2015): Association of angiogenic factors with prognosis in esophageal cancer. *BMC Cancer*, 15, 121.

DuBois, S. G., Kalika, Y., Lukens, J. N., Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Atkinson, J. B., Haase, G. M., Black, C. T., Perez, C., Shimada, H., Gerbing, R., Stram, D. O., Matthay, K. K. (1999): Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol*, 21(3), 181-9.

Duffy, D. J., Krstic, A., Halasz, M., Schwarzl, T., Konietzny, A., Iljin, K., Higgins, D. G., Kolch, W. (2017): Retinoic acid and TGF- $\beta$  signalling cooperate to overcome MYCN-induced retinoid resistance. *Genome Med*, 9(1), 15.

Dulak, A. M., Gubish, C. T., Stabile, L. P., Henry, C., Siegfried, J. M. (2011): HGF-independent potentiation of EGFR action by c-Met. *Oncogene*, 30(33), 3625-35.

Filograna, R., Civiero, L., Ferrari, V., Codolo, G., Greggio, E., Bubacco, L., Beltramini, M., Bisaglia, M. (2015): Analysis of the catecholaminergic phenotype in human SH-SY5Y and BE(2)-M17 neuroblastoma cell lines upon differentiation. *PLoS One*, 10(8), e0136769.

Folkman, J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21), 1182-6.

Foster, J. H., Voss, S. D., Hall, D. C., Minard, C. G., Balis, F. M., Wilner, K., Berg, S. L., Fox, E., Adamson, P. C., Blaney, S. M., Weigel, B. J., Mossé, Y. P. (2021): Activity of crizotinib in patients with ALK-aberrant relapsed/refractory neuroblastoma: a children's oncology group study (ADVL0912). *Clin Cancer Res*, 27(13), 3543-3548.

Freemantle, S. J., Kerley, J. S., Olsen, S. L., Gross, R. H., Spinella, M. J. (2002): Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene*, 21(18), 2880-9.

Friese-Hamim, M., Bladt, F., Locatelli, G., Stammberger, U., Blaukat, A. (2017): The selective c-Met inhibitor tepotinib can overcome epidermal growth factor receptor inhibitor resistance mediated by aberrant c-Met activation in NSCLC models. *Am J Cancer Res*, 7(4), 962-972.

Fujino, T., Suda, K., Mitsudomi, T. (2021): Lung cancer with MET exon 14 skipping mutation: genetic feature, current treatments, and future challenges. *Lung Cancer (Auckl)*, 12, 35-50.

Furman, W. L., McGregor, L. M., McCarville, M. B., Onciu, M., Davidoff, A. M., Kovach, S., Hawkins, D., McPherson, V., Houghton, P. J., Billups, C. A., Wu, J., Stewart, C. F., Santana, V. M. (2012): A single-arm pilot phase II study of gefitinib and irinotecan in children with newly diagnosed high-risk neuroblastoma. *Invest New Drugs*, 30(4), 1660-70.

Garofalo, C., Mancarella, C., Grilli, A., Manara, M. C., Astolfi, A., Marino, M. T., Conte, A., Sigismund, S., Carè, A., Belfiore, A., Picci, P., Scotlandi, K. (2012): Identification of common and distinctive mechanisms of resistance to different anti-IGF-IR agents in ewing's sarcoma. *Mol Endocrinol*, 26(9), 1603-16.

GPOH (2019): S1-Leitlinie Neuroblastom. [Online; zuletzt abgerufen am 14.09.2024].  
[https://register.awmf.org/assets/guidelines/025-008l\\_S1\\_Neuroblastom\\_2019-07\\_01.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/025-008l_S1_Neuroblastom_2019-07_01.pdf).

Guntiboina, V. A., Sengupta, M., Islam, N., Barman, S., Biswas, S. K., Chatterjee, U., Mishra, P. K., Roy, P., Mallick, M. G., Datta, C. (2019): Diagnostic and prognostic utility of SF1, IGF2 and p57 immunoexpression in pediatric adrenal cortical tumors. *J Pediatr Surg*, 54(9), 1906-12.

Han, J. Y., Choi, B. G., Choi, J. Y., Lee, S. Y., Ju, S. Y. (2006): The prognostic significance of pretreatment plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-2, and IGF binding protein-3 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 54(2), 227-34.

Hecht, M., Papoutsis, M., Tran, H. D., Wilting, J., Schweigerer, L. (2004): Hepatocyte growth factor/c-Met signaling promotes the progression of experimental human neuroblastomas. *Cancer Res*, 64(17), 6109-18.

Hero, B., Schleiermacher, G. (2013): Update on pediatric opsoclonus myoclonus syndrome. *Neuropediatrics*, 44(6), 324-9.

Himpe, E., Kooijman, R. (2009): Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors*, 35(1), 76-81.

Ho, R., Minturn, J. E., Hishiki, T., Zhao, H., Wang, Q., Cnaan, A., Maris, J., Evans, A. E., Brodeur, G. M. (2005): Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, 65(21), 9868-75.

Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., Cavenee, W. K. (1997): The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem*, 272(5), 2927-35.

- Huang, Y. F., Cheng, W. F., Wu, Y. P., Cheng, Y. M., Hsu, K. F., Chou, C. Y. (2014): Circulating IGF system and treatment outcome in epithelial ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer*, 21(2), 217-29.
- Huang, X., Li, E., Shen, H., Wang, X., Tang, T., Zhang, X., Xu, J., Tang, Z., Guo, C., Bai, X., Liang, T. (2020): Targeting the HGF/MET axis in cancer therapy: challenges in resistance and opportunities for improvement. *Front Cell Dev Biol*, 8, 152.
- Hou, X., Huang, F., Macedo, L. F., Harrington, S. C., Reeves, K. A., Greer, A., Finckenstein, F. G., Brodie, A., Gottardis, M. M., Carboni, J. M., Haluska, P. (2011): Dual IGF-1R/InsR inhibitor BMS-754807 synergizes with hormonal agents in treatment of estrogen-dependent breast cancer. *Cancer Res*, 71(24), 7597-607.
- Jakacki, R. I., Hamilton, M., Gilbertson, R. J., Blaney, S. M., Tersak, J., Krailo, M. D., Ingle, A. M., Voss, S. D., Dancey, J. E., Adamson, P. C. (2008): Pediatric phase I and pharmacokinetic study of erlotinib followed by the combination of erlotinib and temozolomide: a children's oncology group phase I consortium study. *J Clin Oncol*, 26(30), 4921-7.
- Janes, K. A. (2015): An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. *Sci Signal*, 8(371), rs2.
- Janet, T., Lüdecke, G., Otten, U., Unsicker, K. (1995): Heterogeneity of human neuroblastoma cell lines in their proliferative responses to basic FGF, NGF, and EGF: correlation with expression of growth factors and growth factor receptors. *J Neurosci Res*, 40(6), 707-15.
- Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, 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. (2008): Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 967-70.
- Jiang, J. G., Chen, Q., Bell, A., Zarnegar, R. (1997): Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor (HGF) gene by the Sp family of transcription factors. *Oncogene*, 14(25), 3039-49.

Jo, M., Stolz, D. B., Esplen, J. E., Dorko, K., Michalopoulos, G. K., Strom, S. C. (2000): Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem*, 275(12), 8806-11.

Johnsen, J. I., Dyberg, C., Fransson, S., Wickström, M. (2018): Molecular mechanisms and therapeutic targets in neuroblastoma. *Pharmacol Res*, 131, 164-176.

Kang, J., Guo, Z., Zhang, H., Guo, R., Zhu, X., Guo, X. (2022): Dual inhibition of EGFR and IGF-1R signaling leads to enhanced antitumor efficacy against esophageal squamous cancer. *Int J Mol Sci*, 23(18), 10382.

King, E. R., Wong, K.K. (2012): Insulin-like growth factor: current concepts and new developments in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 7(1), 14-30.

King, H., Aleksic, T., Haluska, P., Macaulay, V. M. (2014): Can we unlock the potential of IGF-1R inhibition in cancer therapy? *Cancer Treat Rev*, 40(9), 1096-105.

Kolb, E. A., Gorlick, R., Lock, R., Carol, H., Morton, C. L., Keir, S. T., Reynolds, C. P., Kang, M. H., Maris, J. M., Billups, C., Smith, M. A., Houghton, P. J. (2011): Initial testing (stage 1) of the IGF-1 receptor inhibitor BMS-754807 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer*, 56(4), 595–603.

Kovalevich, J., Langford, D. (2013): Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, 1078, 9-21.

LaBrosse, E. H. Com-Nougué, C., Zucker, J. M., Comoy, E., Bohuon, C., Lemerle, J., Schweisguth, O. (1980): Urinary excretion of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid by 288 patients with neuroblastoma and related neural crest tumors. *Cancer Res*, 40(6), 1995-2001.

Lainey, E., Wolfromm, A., Sukkurwala, A. Q., Micol, J. B., Fenaux, P., Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G. (2013): EGFR inhibitors exacerbate differentiation and cell cycle arrest induced by retinoic acid and vitamin D3 in acute myeloid leukemia cells. *Cell Cycle*, 12(18), 2978-91.

Lee, E. Y., Parry, G., Bissell, M. J. (1984): Modulation of secreted proteins of mouse mammary epithelial cells by the collagenous substrata. *J Cell Biol*, 98(1), 146-55.

Lee, N., Lee, J., Lee, S. H., Kim, S., Kim, S. (2018): Disproportionately high levels of HGF induce the degradation of the c-met receptor through the proteasomal degradation pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 505(3), 925-930.

Leibniz Institute DSMZ GmbH. Kelly-Zellen. [Online; zuletzt abgerufen am 14.09.2024]  
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-355>.

Leibniz Institute DSMZ GmbH. SH-SY5Y-Zellen. [Online; zuletzt abgerufen am 14.09.2024]  
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-209>.

Leventhal, P. S., Randolph, A. E., Vesbit, T. E., Schenone, A., Windebank, A., Feldman, E. L. (1995): Insulin-like growth factor-II as a paracrine growth factor in human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res*, 221(1), 179-86.

Loebke, C., Sueltmann, H., Schmidt, C., Henjes, F., Wiemann, S., Poustka, A., Korf, U. (2007): Infrared-based protein detection arrays for quantitative proteomics. *Proteomics*, 7(4), 558-564.

López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P., Barettino, D. (2002): Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 277(28), 25297-304.

Louis, C. U., Shohet, J. M. (2015): Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*, 66, 49-63.

Luo, L., Zhang, Z., Qiu, N., Ling, L., Jia, X., Song, Y., Li, H., Li, J., Lyu, H., Liu, H., He, Z., Liu, B., Zheng, G. (2021): Disruption of FOXO3a-miRNA feedback inhibition of IGF2/IGF-1R/IRS1 signaling confers herceptin resistance in HER2-positive breast cancer. *Nat Commun*, 12(1), 2699.

Madadi, Z., Akbari-Birgani, S., Monfared, P. D., Mohammadi, S. (2019): The non-apoptotic role of caspase-9 promotes differentiation in leukemic cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(12), 118524.



- Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A. K., Somanath, S. D., Md, S., Haleagrahara, N. (2020): Influence of serum concentration in retinoic acid and phorbol ester induced differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Mol Biol Rep*, 47(11), 8775-8788.
- Mao, X., Chen, Z., Zhao, Y., Yu, Y., Guan, S., Woodfield, S. E., Vasudevan, S. A., Tao, L., Pang, J. C., Lu, J., Zhang, H., Zhang, F., Yang, J. (2017): Novel multi-targeted ErbB family inhibitor afatinib blocks EGF-induced signaling and induces apoptosis in neuroblastoma. *Oncotarget*, 8(1), 1555-1568.
- Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R., Cohn, S. L. (2007): Neuroblastoma. *Lancet*, 369(9579), 2106-20.
- Martin, D. M., Singleton, J. R., Meghani, M. A., Feldman, E.L. (1993): IGF receptor function and regulation in autocrine human neuroblastoma cell growth. *Regul Pept*, 48(1-2), 225-32.
- Matsui, T., Sano, K., Tsukamoto, T., Ito, M., Takaishi, T., Nakata, H., Nakamura, H., Chihara, K. (1993): Human neuroblastoma cells express alpha and beta platelet-derived growth factor receptors coupling with neurotrophic and chemotactic signaling. *J Clin Invest*, 92(3), 1153-60.
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., Weiss, W. A. (2016): Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16078.
- Megison, M. L., Gillory, L. A., Beierle, E. A. (2013): Cell survival signaling in neuroblastoma. *Anticancer Agents Med Chem*, 13(4), 563-75.
- Meister, B., Grünebach, F., Bautz, F., Brugger, W., Fink, F. M., Kanz, L., Möhle, R. (1999): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer*, 35(3), 445-9.
- Miranda, O., Farooqui, M., Siegfried, J. M. (2018): Status of agents targeting the HGF/c-Met axis in lung cancer. *Cancers*, 10(9), 280.
- Moosavi, F., Giovannetti, E., Saso, L., Firuzi, O. (2019): HGF/MET pathway aberrations as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in human cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 56(8), 533-566.

Morgenstern, D. A., London, W. B., Stephens, D., Volchenboum, S. L., Simon, T., Nakagawara, A., Shimada, H., Schleiermacher, G., Matthay, K. K., Cohn, S. L., Pearson, A. D., Irwin, M. S. (2016): Prognostic significance of pattern and burden of metastatic disease in patients with stage 4 neuroblastoma: a study from the international neuroblastoma risk group database. *Eur J Cancer*, 65, 1-10.

Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N. J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., Rappaport, E., Devoto, M., Maris, J.-M. (2008): Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, 455(7215), 930-5.

Mossé, Y. P., Lim, M. S., Voss, S. D., Wilner, K., Ruffner, K., Laliberte, J., Rolland, D., Balis, F. M., Maris, J. M., Weigel, B. J., Ingle, A. M., Ahern, C., Adamson, P. C., Blaney, S. M. (2013): Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a children's oncology group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol*, 14(6), 472-80.

Mulvihill, M. J., Cooke, A., Rosenfeld-Franklin, M., Buck, E., Foreman, K., Landfair, D., O'Connor, M., Pirritt, C., Sun, Y., Yao, Y., Arnold, L. D., Gibson, N. W., Ji, Q. S. (2009): Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. *Future Med Chem*, 1(6), 1153-71.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M. et al. (1989): Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 342, 440-3.

Palmer, A. C., Kishony, R. (2014): Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms. *Nat Commun*, 5, 4296.

Påhlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., Esscher, T. (1984): Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*, 14(2), 135-44.

Pahlman, S., Johansson, I., Westermarck, B., Nistér, M. (1992): Platelet-derived growth factor potentiates phorbol ester-induced neuronal differentiation of human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ*, 3(11), 783-90.

Papaioannou, G., McHugh, K. (2005): Neuroblastoma in childhood: review and radiological findings. *Cancer Imaging*, 5(1), 116-27.

Park, J. R., Kreissman, S. G., London, W. B., Naranjo, A., Cohn, S. L., Hogarty, M. D., Tenney, S. C., Haas-Kogan, D., Shaw, P. J., Kraveka, J. M., Roberts, S. S., Geiger, J. D., Doski, J. J., Voss, S. D., Maris, J. M., Grupp, S. A., Diller, L. (2019): Effect of tandem autologous stem cell transplant vs single transplant on event-free survival in patients with high-risk neuroblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA*, 322(8), 746-755.

Peinemann, F., van Dalen, E. C., Berthold, F. (2016): Retinoic acid for high-risk neuroblastoma patients after autologous stem cell transplantation - cochrane review. *Klin Padiatr*, 228(3), 124-9.

Pinto, N. R., Applebaum, M. A., Volchenboun, S. L., Matthay, K. K., London, W. B., Ambros, P. F., Nakagawara, A., Berthold, F., Schleiermacher, G., Park, J. R., Valteau-Couanet, D., Pearson, A. D., Cohn, S. L. (2015): Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 33(27), 3008-17.

Pola, S., Cattaneo, M. G., Vicentini, L. M. (2003): Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells: involvement of Rac and MAP kinase activity. *J Biol Chem*, 278(42), 40601-6.

Preis, P. N., Saya, H., Nádasdi, L., Hochhaus, G., Levin, V., Sadée, W. (1988): Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res*, 48(22), 6530-4.

Puzanov, I., Lindsay, C. R., Goff, L., Sosman, J., Gilbert, J., Berlin, J., Poondru, S., Simantov, R., Gedrich, R., Stephens, A., Chan, E., Evans, T. R. (2015): A phase I study of continuous oral dosing of OSI-906, a dual inhibitor of insulin-like growth factor-1 and insulin receptors, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 21(4), 701-11.

Qi, L., Toyoda, H., Shankar, V., Sakurai, N., Amano, K., Kihira, K., Iwasa, T., Deguchi, T., Hori, H., Azuma, E., Gabazza, E. C., Komada, Y. (2013): Heterogeneity of neuroblastoma cell lines in insulin-like growth factor 1 receptor/Akt pathway-mediated cell proliferative responses. *Cancer Sci*, 104(9), 1162-71.

- Raitio, A., Rice, M. J., Mullassery, D., Losty, P. D. (2021): Stage 4S neuroblastoma: what are the outcomes? a systematic review of published studies. *Eur J Pediatr Surg*, 31(5), 385-389.
- Rajwanshi, A., Srinivas, R., Upasana, G. (2009): Malignant small round cell tumors. *J Cytol*, 26(1), 1-10.
- Ramaiah, M. J., Kumar, K. R. (2021): mTOR-Rictor-EGFR axis in oncogenesis and diagnosis of glioblastoma multiforme. *Mol Biol Rep*, 48(5), 4813-4835.
- Rashid, M. U., Coombs, K. M. (2019): Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *J Cell Physiol*, 234(6), 7718-7724.
- Recondo, G., Bahcall, M., Spurr, L. F., Che, J., Ricciuti, B., Leonardi, G. C., Lo, Y. C., Li, Y. Y., Lamberti, G., Nguyen, T., Milan, M., Venkatraman, D., Umeton, R., Paweletz, C. P., Albayrak, A., Cherniack, A. D., Price, K. S., Fairclough, S. R., Nishino, M., Sholl, L. M., Oxnard, G. R., Jänne, P. A., Awad, M. M. (2020): Molecular mechanisms of acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors in patients with MET exon 14-mutant NSCLC. *Clin Cancer Res*, 26(11), 2615-2625.
- Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Maurer, B. J. (2003): Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett*, 197(1-2), 185-92.
- Ribeiro, T. C., Latronico, A. C. (2012): Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 351(1), 96-100.
- Riedemann, J., Takiguchi, M., Sohail, M., Macaulay, V. M. (2007): The EGF receptor interacts with the type 1 IGF receptor and regulates its stability. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(3), 707-14.
- Rieger, L., O'Connor, R. (2021): Controlled signaling-insulin-like growth factor receptor endocytosis and presence at intracellular compartments. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 620013.
- Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L., Lerdrup, M., Grøvdal, L., Willumsen, B. M., van Deurs, B. (2009): Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*, 10(8), 1115-27.
- Ross, R. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. (1983): Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 71(4), 741-7.

Rozengurt, E. (2007): Mitogenic signaling pathways induced by g protein-coupled receptors. *J Cell Physiol*, 213(3), 589-602.

Sabbah, D. A., Hajjo, R., Sweidan, K. (2020): Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 20(10), 815-834.

Sadée, W., Yu, V. C., Richards, M. L., Preis, P. N., Schwab, M. R., Brodsky, F. M., Biedler, J. L. (1987): Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res*, 47(19), 5207-12.

Saletta, F., Seng, M. S., Lau, L. M. (2014): Advances in paediatric cancer treatment. *Transl Pediatr*, 3(2), 156-82.

Salvatori, L., Ravenna, L., Caporuscio, F., Principessa, L., Coroniti, G., Frati, L., Russo, M. A., Petrangeli, E. (2011): Action of retinoic acid receptor on EGFR gene transactivation and breast cancer cell proliferation: interplay with the estrogen receptor. *Biomed Pharmacother*, 65(4), 307-12.

Sami Issa, R., Kaehler, M., Pommert, N. S., Cascorbi, I., Waetzig, V. (2024): Enhancing retinoic acid-mediated effects through inhibition of CYP26A1, CYP26B1 and HGF signaling in neuroblastoma cells. *Anticancer Res*, 44(10), akzeptiert zur Publikation.

Santo, E. E., Stroeken, P., Sluis, P. V., Koster, J., Versteeg, R., Westerhout, E. M. (2013): FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma. *Cancer Res*, 73(7), 2189-98.

Sasaki, T., Okuda, K., Zheng, W., Butrynski, J., Capelletti, M., Wang, L., Gray, N. S., Wilner, K., Christensen, J. G., Demetri, G., Shapiro, G. I., Rodig, S. J., Eck, M. J., Jänne, P. A. (2010): The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res*, 70(24), 10038-43.

Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., Trent, J. (1983): Amplified dna with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 305(5931), 245-8.

Scorsone, K., Zhang, L., Woodfield, S. E., Hicks, J., Zage, P. E. (2014): The novel kinase inhibitor EMD1214063 is effective against neuroblastoma. *Invest New Drugs*, 32(5), 815-24.

Seeger, R. C., Siegel, S. E., Sidell, N. (1982): Neuroblastoma: clinical perspectives, monoclonal antibodies, and retinoic acid. *Ann Intern Med*, 97(6), 873-84.

Shao, M., Jiang, L., Meng, Z., Xu, J. (2022): Computational drug repurposing based on a recommendation system and drug-drug functional pathway similarity. *Molecules*, 27(4), 1404.

Simon, T., Hero, B., Schulte, J. H., 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): 2017 GPOH guidelines for diagnosis and treatment of patients with neuroblastic tumors. *Klin Padiatr*, 229(3), 147-167.

Sköldenberg, E. G., Larsson, A., Jakobson, A., Hedborg, F., Kogner, P., Christofferson, R. H., Azarbayjani, F. (2009): The angiogenic growth factors HGF and VEGF in serum and plasma from neuroblastoma patients. *Anticancer Res*, 29(8), 3311-9.

Stella, M. C., Trusolino, L., Pennacchietti, S., Comoglio, P. M. (2005): Negative feedback regulation of Met-dependent invasive growth by Notch. *Mol Cell Biol*, 25(10), 3982-96.

Swift, C. C., Eklund, M. J., Kraveka, J. M., Alazraki, A. L. (2018): Updates in diagnosis, management, and treatment of neuroblastoma. *Radiographics*, 38(2), 566-580.

Takami, Y., Yamamoto, I., Tsubouchi, H., Gohda, E. (2005): Modulation of hepatocyte growth factor induction in human skin fibroblasts by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1743(1-2), 49-56.

Tamura, S., Hosoi, H., Kuwahara, Y., Kikuchi, K., Otabe, O., Izumi, M., Tsuchiya, K., Iehara, T., Gotoh, T., Sugimoto, T. (2007): Induction of apoptosis by an inhibitor of EGFR in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 358(1), 226-32.

Tan, N. Y., Khachigian, L. M. (2009): Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol*, 29(10), 2483-8.

Tatsumi, R. (2010): Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim Sci J*, 81(1), 11-20.

- Thiele, C. J., Reynolds, C. P., Israel, M. A. (1985): Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature*, 313(6001), 404-6.
- Trahair, T., Sorrentino, S., Russell, S. J., Sampaio, H., Selek, L., Plantaz, D., Freycon, C., Simon, T., Kraal, K., Beck-Popovic, M., Haupt, R., Ash, S., De Bernardi, B. (2017): Spinal canal involvement in neuroblastoma. *J Pediatr*, 188, 294-298.
- van der Veeke, J., Oliveira, S., Schiffelers, R. M., Storm, G., van Bergen En Henegouwen, P. M., Roovers, R. C. (2009): Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 9(6), 748-60.
- Vesprini, N. D., Dawson, T. F., Yuan, Y., Bruce, D., Spencer, G. E. (2015): Retinoic acid affects calcium signaling in adult molluscan neurons. *J Neurophysiol*, 113(1), 172-81.
- Virchow, R. (1865): Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren. In: *Die Krankhaften Geschwülste*, Zweiter Band. August Hirschwald, Berlin, 148-150.
- Vo, K. T., Matthay, K. K., Neuhaus, J., London, W. B., Hero, B., Ambros, P. F., Nakagawara, A., Miniati, D., Wheeler, K., Pearson, A. D., Cohn, S. L., DuBois, S. G. (2014): Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. *J Clin Oncol*, 32(28), 3169-76.
- Waetzig, V., Haeusgen, W., Andres, C., Frehse, S., Reinecke, K., Bruckmueller, H., Boehm, R., Herdegen, T., Cascorbi, I. (2019): Retinoic acid-induced survival effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Cell Biochem*, 120(4), 5974-5986.
- Wang, R., Yamada, T., Kita, K., Taniguchi, H., Arai, S., Fukuda, K., Terashima, M., Ishimura, A., Nishiyama, A., Tanimoto, A., Takeuchi, S., Ohtsubo, K., Yamashita, K., Yamano, T., Yoshimura, A., Takayama, K., Kaira, K., Taniguchi, Y., Atagi, S., Uehara, H., Hanayama, R., Matsumoto, I., Han, X., Matsumoto, K., Wang, W., Suzuki, T., Yano, S. (2020): Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer. *Nat Commun*, 11(1), 4607.
- Wells, A. (1999): EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(6), 637-43.

- Weroha, S. J., Haluska, P. (2008): IGF-1 receptor inhibitors in clinical trials--early lessons. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13(4), 471-83.
- Witsch, E., Sela, M., Yarden, Y. (2010): Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, 25(2), 85-101.
- Wittrock, J., Schweizer, P., Girgert, R. (2002): Induction of N-myc in neuroblastoma by autocrine IGF-II depends on farnesylated Ras. Application of farnesyltransferase inhibitors. *Anticancer Res*, 22(6C), 4205-9.
- Wu, S., Donigan, A., Platsoucas, C. D., Jung, W., Soprano, D. R., Soprano, K. J. (1997): All-trans-retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G1. *Exp Cell Res*, 232(2), 277-86.
- Xu, L., Wang, F., Luo, F. (2022): MET-targeted therapies for the treatment of non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*, 12, 1013299.
- Yarden, Y., Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 127-37.
- Yarden, Y., Shilo, B. Z. (2007): SnapShot: EGFR signaling pathway. *Cell*, 131(5), 1018.
- Yu, A. L., Gilman, A. L., Ozkaynak, M. F., Naranjo, A., Diccianni, M. B., Gan, J., Hank, J. A., Batova, A., London, W. B., Tenney, S. C., Smith, M., Shulkin, B. L., Parisi, M., Matthay, K. K., Cohn, S. L., Maris, J. M., Bagatell, R., Park, J. R., Sondel, P. M. (2021): Long-term follow-up of a phase III study of ch14.18 (dinutuximab) + cytokine immunotherapy in children with high-risk neuroblastoma: COG study ANBL0032. *Clin Cancer Res*, 27(8), 2179-2189.
- Zhang, X., Pickin, K. A., Bose, R., Jura, N., Cole, P. A., Kuriyan, J. (2007): Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature*, 450(7170), 741-4.
- Zhang, L., Scorsone, K., Woodfield, S. E., Zage, P. E. (2015): Sensitivity of neuroblastoma to the novel kinase inhibitor cabozantinib is mediated by ERK inhibition. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76(5), 977-87.



## A Anhang

### A.1 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Stadieneinteilung nach INSS und INRG.....	4
<b>Tabelle 2:</b>	Risikogruppen und Einschlusskriterien.....	5
<b>Tabelle 3:</b>	Technische Ausstattung.....	14
<b>Tabelle 4:</b>	Verbrauchsmaterialien.....	16
<b>Tabelle 5:</b>	Chemikalien.....	16
<b>Tabelle 6:</b>	Kits.....	17
<b>Tabelle 7:</b>	Primärantikörper.....	18
<b>Tabelle 8:</b>	Sekundärantikörper.....	18
<b>Tabelle 9:</b>	TaqMan-Assays.....	19
<b>Tabelle 10:</b>	Zusammensetzung der Nährmedien zur Kultivierung der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen.....	20
<b>Tabelle 11:</b>	Zusammensetzung Stammlösung 10x PBS.....	21
<b>Tabelle 12:</b>	Gewünschte Zelldichte der Kulturschalen.....	21
<b>Tabelle 13:</b>	Zusammensetzung Stimulationsmedien (für einen 50-ml-Ansatz).....	22
<b>Tabelle 14:</b>	Verdünnung der Stimulationssubstanzen.....	22
<b>Tabelle 15:</b>	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Sigma, München).....	24
<b>Tabelle 16:</b>	Zusammensetzung des 2xDLB-Puffers.....	26
<b>Tabelle 17:</b>	Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt).....	26
<b>Tabelle 18:</b>	Zusammensetzung der Standardreihe.....	27
<b>Tabelle 19:</b>	Zusammensetzung des 5x Sample Buffers.....	28
<b>Tabelle 20:</b>	Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese.....	30
<b>Tabelle 21:</b>	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgelpuffers.....	30
<b>Tabelle 22:</b>	Zusammensetzung des 10x Elektrophoresepuffers (Stammlösung).....	31
<b>Tabelle 23:</b>	Zusammensetzung der Pufferlösungen für den Semi Dry Blot.....	32
<b>Tabelle 24:</b>	Zusammensetzung 10x Tank Blot Puffer.....	32
<b>Tabelle 25:</b>	Zusammensetzung 1x Tank Blot Puffer.....	33
<b>Tabelle 26:</b>	Zusammensetzung 10x TTBS (Tween-Tris-buffered saline).....	33
<b>Tabelle 27:</b>	E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega bio-tek, Norcross, USA).....	34
<b>Tabelle 28:</b>	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt).....	35

<b>Tabelle 29:</b>	Zusammensetzung des Reaktionsmixes für eine Reaktion.....	36
<b>Tabelle 30:</b>	Human HGF Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems, Wiesbaden).....	37
<b>Tabelle 31:</b>	Human IGF2 Quantikine® ELISA Kits (R&D Systems, Wiesbaden).....	38

## A.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Vereinfachte Darstellung des Wachstumsfaktor-Signalwegs am Beispiel des EGFR.....	9
<b>Abbildung 2:</b>	Wachstum naiver Zellen in Vollmedium, 96 h.....	39
<b>Abbildung 3:</b>	Expression und Freisetzung von HGF und IGF2 im Vergleich.....	40
<b>Abbildung 4:</b>	ATP-Spiegel und Kinase-Aktivierung nach Behandlung der Zellen mit HGF, IGF2 und EGF in Vollmedium für 72 h.....	42
<b>Abbildung 5:</b>	Inhibition des IGF2-Signalwegs mit Linsitinib und BMS-754807.....	43
<b>Abbildung 6:</b>	Inhibition des HGF-Signalwegs mit Tepotinib und Crizotinib.....	44
<b>Abbildung 7:</b>	Inhibition des EGF-Signalwegs mit Erlotinib.....	45
<b>Abbildung 8:</b>	Analyse von Zelltod und Zellproliferation über Aktivität von Caspase 3/7, BrdU-Einbau und Kinase-Aktivität, 24 h.....	46
<b>Abbildung 9:</b>	Freisetzung von IGF2 und HGF nach Gabe der Inhibitoren im ELISA, 72 h.....	47
<b>Abbildung 10:</b>	Expression (TaqMan-Assay) und Proteinmengen (Western Blot) der Wachstumsfaktorrezeptoren, 72 h.....	48
<b>Abbildung 11:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen, 10 d.....	49
<b>Abbildung 12:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen, 10 d.....	50
<b>Abbildung 13:</b>	Kelly-Zellen nach Serum-Entzug, 72 h.....	52
<b>Abbildung 14:</b>	SH-SY5Y-Zellen nach Serum-Entzug, 72 h.....	53
<b>Abbildung 15:</b>	Gezielte Supplementation von Wachstumsfaktoren, 72 h.....	54
<b>Abbildung 16:</b>	Gezielte Supplementation von Wachstumsfaktoren, 72 h.....	55
<b>Abbildung 17:</b>	Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren nach gezielter Gabe von EGF, IGF2 und HGF, 72 h.....	56
<b>Abbildung 18:</b>	Kelly-Zellen mit und ohne Serum und Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren, 72 h.....	57
<b>Abbildung 19:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen, 10 d.....	58
<b>Abbildung 20:</b>	SH-SY5Y-Zellen mit und ohne Serum und Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren, 72 h.....	59
<b>Abbildung 21:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen, 10 d.....	60

<b>Abbildung 22:</b>	Effekte von Retinsäure (5 $\mu$ M) auf beide Zelllinien, 96 h.....	62
<b>Abbildung 23:</b>	Analyse von Zellproliferation und Zelltod nach Retinsäuregabe, 72 h....	63
<b>Abbildung 24:</b>	Einfluss von Retinsäure auf Expression und Proteinmengen von IGF2 und HGF, 72 h.....	64
<b>Abbildung 25:</b>	Einfluss von Retinsäure auf die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren, 72 h.....	65
<b>Abbildung 26:</b>	Effekt von Retinsäure und Wachstumsfaktoren auf Zellen in Vollmedium, 72 h.....	66
<b>Abbildung 27:</b>	Effekt von Retinsäure und Linsitinib.....	67
<b>Abbildung 28:</b>	Effekt von Retinsäure und BMS-754807.....	68
<b>Abbildung 29:</b>	Effekt von Retinsäure und Tepotinib.....	69
<b>Abbildung 30:</b>	Effekt von Retinsäure und Crizotinib.....	70
<b>Abbildung 31:</b>	Effekt von Retinsäure und Erlotinib.....	71
<b>Abbildung 32:</b>	Analyse von Zelltod und Proliferation durch Retinsäure und Inhibitoren, 48 h.....	73
<b>Abbildung 33:</b>	Kinase-Aktivität nach Retinsäure und Inhibitoren, 48 h.....	74
<b>Abbildung 34:</b>	Freisetzung von HGF und IGF2 nach Retinsäure und Inhibitoren, 72 h...	75
<b>Abbildung 35:</b>	Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren nach Gabe von Retinsäure und Inhibitoren in Kelly-Zellen, 72 h.....	76
<b>Abbildung 36:</b>	Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren nach Gabe von Retinsäure und Inhibitoren in SH-SY5Y-Zellen, 72 h.....	78
<b>Abbildung 37:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen in Vollmedium mit Retinsäurezusatz, 10 d.....	79
<b>Abbildung 38:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen in Vollmedium mit Retinsäurezusatz, 10 d.....	80
<b>Abbildung 39:</b>	Kelly-Zellen in verschiedenen Medien mit und ohne Retinsäure, 72 h...	82
<b>Abbildung 40:</b>	Expression und Freisetzung von IGF2 und HGF in Kelly-Zellen mit und ohne Retinsäure und Serum, TaqMan-Assays und ELISA, 72 h.....	83
<b>Abbildung 41:</b>	SH-SY5Y-Zellen in unterschiedlichen Medien mit und ohne Retinsäure, 72 h.....	84
<b>Abbildung 42:</b>	Expression und Freisetzung von IGF2 und HGF in SH-SY5Y-Zellen mit und ohne Retinsäure und Serum, ELISA, 72 h.....	85
<b>Abbildung 43:</b>	Regulation von Wachstumsfaktorrezeptoren nach RA und Serumentzug, 72 h.....	86

<b>Abbildung 44:</b>	Anzahl lebender Zellen nach Serumentzug, gezielte Gabe von Wachstumsfaktoren und Retinsäure, 72 h.....	87
<b>Abbildung 45:</b>	Anzahl lebender Zellen nach Serumentzug, gezielte Gabe von Wachstumsfaktorkombinationen und Retinsäure, 72 h.....	88
<b>Abbildung 46:</b>	Anzahl lebender Zellen nach Serumentzug, gezielte Gabe von Wachstumsfaktorkombinationen und Retinsäure, 72 h.....	89
<b>Abbildung 47:</b>	Regulation der Wachstumsfaktorrezeptoren bei gezielter Gabe von Wachstumsfaktoren und Retinsäure in Zellen ohne Serum.....	91
<b>Abbildung 48:</b>	Effekte durch Linsitinib und BMS-754807 mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in Kelly-Zellen, 72 h.....	92
<b>Abbildung 49:</b>	Effekte durch Crizotinib und Erlotinib mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in Kelly-Zellen, 72 h.....	93
<b>Abbildung 50:</b>	Effekte durch Linsitinib und BMS-754807 mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen, 72 h.....	94
<b>Abbildung 51:</b>	Effekte durch Crizotinib und Erlotinib mit und ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen, 72 h.....	95
<b>Abbildung 52:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender Kelly-Zellen ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure, 10 d.....	96
<b>Abbildung 53:</b>	Mikroskopische Analyse persistierender SH-SY5Y-Zellen ohne Serum mit zusätzlich Retinsäure, 10 d.....	97

## Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung akzeptiert:

Pommert, N., Cascorbi, I., Waetzig, V. (2022, 07.03.): Resistance mechanisms circumventing the inhibition of IGF signaling in neuroblastoma cells. 88th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, DIGITAL.

Sami Issa, R., Pommert, N. S., Kaehler, M., Cascorbi, I., Waetzig, V. (2022, 07.03.): Dissecting pleiotropic effects of ketoconazole to identify specific targets in neuroblastoma. 88th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, DIGITAL.

Sami Issa, R., Kaehler, M., Pommert, N. S., Cascorbi, I., Waetzig, V. (2024): Enhancing retinoic acid-mediated effects through inhibition of CYP26A1, CYP26B1 and HGF signaling in neuroblastoma cells. Anticancer Res, 44(10), akzeptiert zur Publikation.

Murra, N., Pommert, N. S., Schmidt, B., Sami Issa, R., Kaehler, M., Bruckmueller, H., Tim, V., Cascorbi, I., Waetzig, V. (2024): Regulation and function of CCL2 and N-Myc in retinoic acid-treated neuroblastoma cells. Cancer Genomics & Proteomics, akzeptiert zur Publikation.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in fachlicher und persönlicher Hinsicht bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein vorrangiger Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. rer. nat. Vicki Wätzig für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung. Dein unermüdlicher Einsatz, deine Strukturiertheit und deine Geduld waren das Fundament dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi und seinem Stellvertreter Herrn Prof. Dr. med. Thomas Herdegen für die freundliche Aufnahme in das Institut und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel.

Bei Frau Irina Naujoks, Frau Britta Wolf, Frau Annika Mütze und Frau Anna Jürgensen möchte ich mich für die geduldige Einarbeitung und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche bedanken. Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. Henrike Bruckmüller, Frau Dr. rer. nat. Meike Kähler, Herrn Dr. med. Ruwen Böhm und allen aus dem Institut für Pharmakologie, die ich hier zu nennen vergessen habe, für die zahlreichen Hilfestellungen.

Vielen Dank an meine Mitdoktorandinnen im Labor, insbesondere an meine Freundinnen Reema Sami Issa und Nanke Murra. Laborarbeit ist Teamarbeit und mit euch war es eine Freude.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung und Ermutigung während meines Studiums und meiner Promotion bedanken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.