

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

**Die Rolle von Cytochrom-P450-Enzymen für das Überleben und die  
Differenzierung in Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen**

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

vorgelegt von  
Reema Sami Issa

aus Bagdad (Irak)

Kiel (2024)

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Vicki Wätzig, Institut für Experimentelle u. Klinische Pharmakologie

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med Katharina Heß, Health and Medical University

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.07.2025

gez.: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Vicki Wätzig

Meinen Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Neuroblastom .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Symptome .....	1
1.1.3 Pathologie .....	2
1.1.4 Diagnostik und Stadieneinteilung.....	6
1.1.5 Therapie und Prognose .....	9
1.2 Retinsäure .....	11
1.2.1 Funktion und Derivate.....	11
1.2.2 Molekularer Mechanismus der Retinsäurewirkung.....	13
1.2.3 Retinsäure-induzierte Effekte in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y-Zellen).....	14
1.2.4 Retinsäure-Resistenz in Neuroblastomzellen.....	15
1.3 Cytochrom-P450-Enzyme .....	15
1.3.1 Allgemeine Funktionen und Bedeutung für die Tumorentstehung .....	15
1.3.2 CYP26A1 und CYP26B1 .....	17
1.3.3 CYP3A5.....	18
1.3.4 CYP2J2 .....	20
1.3.5 CYP4V2.....	22
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	23
2 Material .....	24
2.1 Materialien und Geräte.....	24
2.2 Chemikalien .....	25
2.4 Taq-Man-Assays.....	28
2.5 Antikörper .....	28
2.6 Softwares.....	29
2.7 Statistik .....	29
3 Methoden .....	30
3.1 Zellkultur .....	30
3.1.1 Kultivierung.....	30
3.1.2 Passagieren.....	31

3.1.3 Einfrieren und Auftauen .....	32
3.1.4 Stimulation mit Retinsäure .....	32
3.1.5 Stimulationsschemata .....	32
3.1.6 Zell-Viabilitätsassay .....	33
3.1.7 BrdU-Inkorporation .....	33
3.1.8 CytoTox-Assay .....	34
3.1.9 ELISA-Assay .....	35
3.1.10 Calcium-Assay .....	36
3.1.11 Pellet-Herstellung .....	37
3.2 Proteinextraktion und Proteinanalyse .....	38
3.2.1 Denaturierende Ganzzelllyse .....	38
3.2.2 Caspase-Lyse .....	38
3.2.3 Membranprotein-Lyse .....	39
3.2.4 Proteinbestimmung .....	40
3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot .....	41
3.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	41
3.2.5.2 Western Blot .....	43
3.3 Molekularbiologie .....	46
3.3.1 RNA-Extraktion .....	46
3.3.2 RNA-Messung .....	47
3.3.3 Reverse Transkription .....	47
3.3.4 Quantitative real-time-polymerase-chain-reaction .....	48
3.3.5 Expressionsanalyse .....	49
4 Ergebnisse .....	52
4.1 Genexpression in Neuroblastomzellen, unbehandelt oder mit Retinsäure .....	52
4.2 Expression von Cytochrom-P450-Enzymen in naiven oder Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen .....	55
4.3 CYP26A1 und CYP26B1 als therapeutische Zielstrukturen für den Retinsäure-Metabolismus .....	57
4.4 Der additive Effekt bei der Wirkung von Retinsäure durch CYP3A5 .....	63
4.5 Der additive Effekt bei der Wirkung von Retinsäure durch PXR .....	68

4.6 Die Wirkung von Ketoconazol auf unbehandelte und Retinsäure-behandelte Neuroblastomzellen .....	70
4.7 Die Rolle von CYP2J2 in Neuroblastomzellen.....	85
4.8 Die Rolle von CYP4V2 in Neuroblastomzellen .....	102
5 Diskussion.....	108
5.1 Retinsäureresistenz in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen .....	108
5.2 Einordnung und Charakterisierung von CYP26A1, CYP26B1 und CYP3A5 als therapeutische Angriffspunkte in Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen .....	110
5.3 Die pleiotropen Effekte von Ketoconazol in Neuroblastomzellen.....	113
5.4 CYP2J2 als onkologisches Zieltarget in Neuroblastomzellen .....	115
5.5 CYP4V2 als mögliche Zielstruktur in der Retinsäure-Resistenz von Neuroblastomzellen .....	119
6 Zusammenfassung.....	122
7 Literaturverzeichnis .....	124
8 Anhang.....	144
Abbildungsverzeichnis .....	144
Tabellenverzeichnis .....	147
9 Veröffentlichungen .....	149
10 Danksagung .....	150
11 Eidesstattliche Erklärung .....	151

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
(c)RNA	(copy)Ribonukleinsäure
(ss)(c)DNA	(single stranded) (copy)Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
123I-mIBG	123Iod-meta-Iodbenzylguanidin
1 <sup>st</sup>	first
2 <sup>nd</sup>	second
AAF	Alanyl-alanyl-Phenylalanin
ABC	ATP-binding cassette
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALK	anaplastische Lymphomkinase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
APE	A plasmid Editor
APL	Akuten-Promyelozyten-Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	All-trans-Retinsäure
BAPTA/ BAPTA-AM	1,2-Bis(2-aminophenoxy)-ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethylester)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CEB	Cytoplasmic Extraction Buffer

CHAPS	3-3-Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat
cl.	cleaved
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cob	Cobicistat
CRABP	cellular retinoic acid-binding protein
CST	Cell Signalling Technology
CT	Computertomographie
CT	cycle-of-threshold
CYP	Cytochrom-P450-Enzym
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLB	Denaturing lysis buffer
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotide
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EET	Epoxyeicosatriensäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal regulated kinases
et al.	et alii
F/Flu	Flunarizin
FABP	Fatty acid binding protein
FCS	Fötales Kälberserum
Fen	Fenritinid
G	Differenzierungsgrad
Gy	Gray
h	Stunde
H/ HET/ HET-0016	N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamidine
HCL	Salzsäure



HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HGF	Hepatocyte growth factor
IGF2	Insuline like growth factor
IgG/IgM	Immunglobulin G/M
INPC	International Neuroblastoma Pathological Classification
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Proteinkonzentration
K	Kontrolle
kD	Kilodalton
Ket/Keto	Ketoconazol
L	Lokalisiert
LC-3/LC3B	Light chain 3/ 3B
LDH	Laktat-Dehydrogenase
Lia	Liarozol
LRAT	Lecithin-Acyl-Transferase
M	Metastasen
M	Molar
mA	Milliampere
MEB	Membrane Extraction Buffer
mg	Milligramm
MKI	Mitosis-Karyorrhexis-Index
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Metastasen im Alter unter 18 Monaten
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFKB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated b-cells
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NSE	neuronspezifische Enolase
p	Signifikanzniveau
p (Erk/Akt/JNK)	phosphoryliertes (Erk/Akt/JNK)
p. a.	pro analysis
pAK	Primärantikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	potentia hydrogenii
PHOX2B	paired-like homeobox 2b
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PXR	pregnane x receptor
q-rt-PCR	quantitative realtime polymerase chain reaction
RA	Retinsäure
RALDH	Retinalaldehyd-Dehydrogenase
Rap	Rapamycin
RAR	Retinoic acid receptor
RDH	Retinol-Dehydrogenase
rel.	relativ
Ri	Rifampicin
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
RXR	retinoic -receptor
S	Säuglingsalter
S.	Seite
sAK	Sekundärantikörper
SDS	Natriumdodecylsulfat
sEHs	Soluble Epoxid hydrolase

SPA/SPA 70	Specific PXR Antagonist 70
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T/Tel	Telmisartan
Tala	Talarozol
TBS	Tris-buffered saline
TdT	DNA-Nucleotidylexotransferase
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylenediamin
Tepo	Tepotinib
Tr	Troleandomycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTBS	Tween-Tris-buffered saline
u. a.	unter Anderem
UDG	Uracil- <i>DNA</i> Glycosylase
V	Volt
V/Vera	Verapamil
VIP	vasoactive intestinal peptide
X	-fach
YWHAZ	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta
z. B.	Zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroblastom

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Neuroblastom ist in der Pädiatrie der häufigste extrakranielle Tumor in Deutschland mit einer Prävalenz von 1:6000 unter 15 Jahren und einer Inzidenz von circa 7,7:100.000 im Säuglingsalter und 1,8:100.000 im Kleinkindalter (ein bis vier Jahren) (Steliarova-Foucher 2018). Jungen erkranken zu 40 % häufiger als Mädchen. Erkrankungen im reiferen Schulalter oder über 18 Jahren sind jedoch sehr selten (Pellegrino et al. 2012).

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, der aus dem sympathischen Nervengewebe entspringt. Die Primärtumoren präsentieren sich zu 35 % im Bereich des Retroperitoneums im Nebennierenmark, zu 30 – 35 % paravertebral im Grenzstrang und zu 20 % im Mediastinum (Papaioannou und McHugh 2005). Nur selten tritt der Primarius im Gehirn oder Halsbereich auf (Papaioannou und McHugh 2005; Simon 2019). Die Hälfte aller Kinder haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen, die sich in der Leber, in den Lymphknoten (Zweidrittel aller Erkrankten) (Kushner 2020), im Knochen oder im Knochenmark manifestieren können (Brisse et al. 2011).

Die meisten Fälle treten sporadisch auf. Lediglich 1 % aller Neuroblastome unterliegen einer familiären Häufung, die allerdings auf verschiedene Mutationen zurückgeht, wie beispielsweise auf eine Keimbahnmutationen im Gen für PHOX2B (*paired-like homeobox 2b*) oder für ALK (anaplastische Lymphomkinase) (Tonini und Capasso 2020). Prognostisch sehr entscheidend ist die MYCN-Onkogen-Amplifikation auf Chromosom 2p24, die in etwa 20 – 25 % der Neuroblastome vorliegt (Schleiermacher et al. 2014).

### 1.1.2 Symptome

Die Symptomatik des Neuroblastoms ist sehr vielfältig und unspezifisch. Je nach Lokalisation des Tumors und Vorhandensein von Metastasen können sich die klinischen Anzeichen unterscheiden. Zunächst können Schwellungen im Bereich des Mediastinums, Abdomens und Halses sichtbar oder palpabel sein. Bei einem größeren

Tumor kann dieser aufgrund der Komprimierung im thorakalen Bereich eine Skoliose oder Dyspnoe verursachen.

Bei einer Lokalisation im Bereich der Abdominalorgane können Obstipation, eine Überdehnung der Bauchwand, Koliken sowie Meteorismus und bei Lebermetastasen Aszites hervorgerufen werden. Weiterhin kann es durch Kompression der Harnleiter zu Harnstau und Blasenentleerungsstörungen kommen (Cai et al. 2020). Die vermehrte Produktion des Hormones VIP (*vasoactive intestinal peptide*) kann zu vermehrter Diarrhöe führen, die klinisch einer Malabsorption ähnelt. Durch Kompression der renalen Gefäße oder durch eine Überproduktion an Katecholaminen können Hypertensionen auftreten (Papaioannou und McHugh 2005; Swift et al. 2018).

Wenn das Neuroblastom dem sympathischen Grenzstrang entspringt, können neurologische Defizite aufgrund einer Spinalkanalstenose entstehen. Von Schmerzen, über motorische sowie sensorische Ausfälle, bis hin zu einem Querschnitt kann sich diese Symptomatik ausprägen. Spezifischere Hinweise auf ein Neuroblastom oder Metastasen im Bereich des Kopf- und Halsbereiches können ein „Brillenhämatom“, vorgetriebene Augäpfel (ein-/beidseitig), Lidexchymosen und ein Horner-Syndrom (Miosis, Ptosis, Enophthalmus) sein.

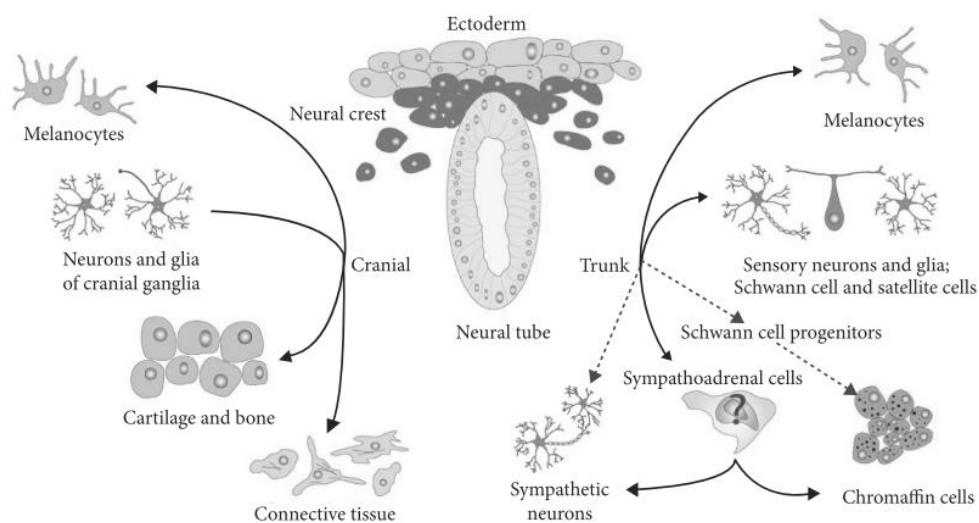
In zwei bis drei Prozent aller Fälle tritt in Form einer paraneoplastischen Immunreaktion eine Opsoklonus-Myoklonus-Ataxie auf. Hierzu gehören unkontrollierte Bewegungen der Augen, zuckende Bewegungen der Gliedmaßen und eine Ataxie (Swift et al. 2018).

Abhängig von der Tumorentität und des Diagnosealters können die Neuroblastome entweder schnell invasiv wachsen oder sich durch eine entsprechende Tumorthherapie oder spontan zurückbilden (Papaioannou und McHugh 2005; Niemeyer und Eggert 2017, S. 433).

### 1.1.3 Pathologie

Makroskopisch imponiert das Neuroblastom als unscharf abgegrenzter, weißlicher Tumor mit knotiger Struktur sowie teilweisen Einblutungen, zystischen Ausprägungen und Verkalkungen. Histologisch wird es zur Gruppe der „klein-blau-rundzelligen“ Tumoren gezählt (Riede und Werner 2017, S. 261).

Die Zellen des Nervensystems entstehen aus der Neuralleiste, die dem embryonalen Ektoderm entspringen und sich aus dem Neuralrohr entwickeln, nachdem es sich geschlossen hat. Diese Zellen differenzieren sich zu den entsprechenden anatomischen Strukturen, von Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystems über Melanozyten bis zu Knorpel- und Knochenzellen des Schädels, wie in Abbildung 1.1 dargestellt. Neuralleistenzellen unterziehen sich der epithelialen mesenchymalen Transition, um aus dem neuronalen Epithel zu emigrieren und sich in eine bewegliche Zellgruppe zu verwandeln (Bronner und Simões-Costa 2016).



**Abbildung 1.1: Entwicklung der Neuralleistenzellen; aus Kholodenko et al. (2018)**

Aus dem Ektoderm entsteht zunächst das Neuralrohr, aus dem dann wiederum Neuralleistenzellen auswandern. Cranial entwickeln sich daraus Melanozyten, Neuronal- und Gliazellen, Knorpel- und Knochenzellen sowie Bindegewebszellen. Kaudal gehen daraus Melanozyten, sensorische Neuronalzellen, Schwannzellen sowie sympathische Ganglionzellen hervor.

Neurogene Tumoren, die aus Ganglion-Zellen entspringen, lassen sich in Ganglioneurome, Ganglioneuroblastome sowie Neuroblastome einteilen. Die Hughes-Klassifikation gibt dabei den Differenzierungsgrad des Tumors an (Tabelle 1.1).

Differenzierungsgrad	Histologie
G3	Undifferenzierte Zellen ohne Reifungszeichen
G2	Mix aus undifferenzierten Zellen mit einem kleinen Anteil an teilweise differenzierten Ganglionzellen

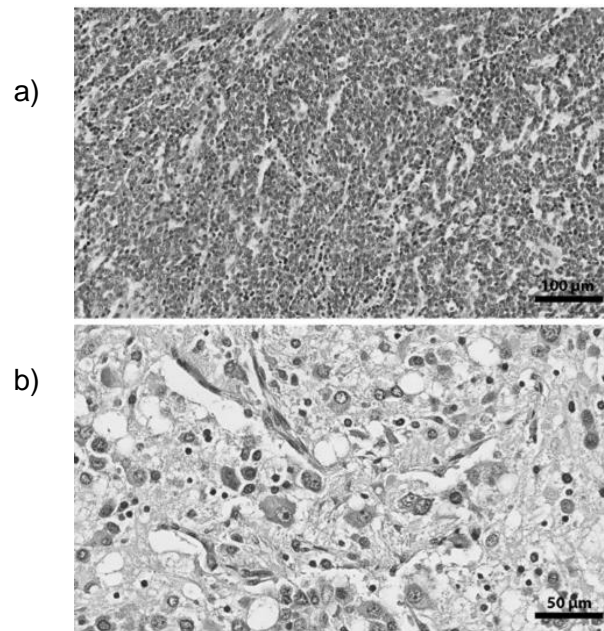
G1a	Diffuses Ganglioneuroblastom, diffuser Mix aus undifferenzierten und differenzierenden Zellen mit reifen Ganglionzellen
G1b	Ganglioneuroblastom zusammengesetzter Typ, Ganglioneurom mit Knoten mit Abschnitten an undifferenziertem Neuroblastomgewebe, mit abrupter Abgrenzung zwischen beiden Komponenten

**Tabelle 1.1: Differenzierungsgrad des Neuroblastoms; frei erstellt und übersetzt nach Hughes Klassifikation (Shimada et al. 1999)**

Die Tabelle zeigt die histologische Zusammensetzung von Neuroblastomen je nach Differenzierungsgrad von G1a - G3 mit zunehmender Entdifferenzierung bei einem höheren Differenzierungsgrad.

Ganglioneurome sind stets gutartig und bestehen aus reifen Schwannzellen, Ganglionzellen und Nervenfasern. Mit einer sehr guten Prognose ist hier eine chirurgische Exzision die alleinige Therapie. Ganglioneuroblastome hingegen sind je nach Ausprägung gutartig, semimaligne oder maligne. Histologisch betrachtet enthalten sie primitive Neuroblasten und reife Ganglionzellen (Rha et al. 2003).

Das Neuroblastom entsteht aus unreifen, undifferenzierten, kleinen und runden sympathischen Vorläuferzellen, die sich normalerweise zu sympathischen Ganglion-Zellen oder chromaffin-produzierenden Nebennierenzellen differenzieren würden. Die Neuroblastomzellen enthalten ein geringes Zytoplasma, dunkle Nuklei und kleine, unklare Nukleoli. Manchmal sind diese Zellen clusterförmig mit zentralem eosinophilem Neuropil angeordnet, die als "Horner-Wright"-Rosetten bezeichnet werden und typisch für das Neuroblastom sind (Papaioannou und McHugh 2005; Niemeyer und Eggert 2017, S. 421). In der Umgebung ausdifferenzierter Zellen lassen sich Neuropil und Neurite nachweisen. In der Immunhistochemie zeigen sich die Marker wie Chromogranin A, Gangliosid GD2, Neurofilamentproteine, NSE (neuronspezifische Enolase), Synaptophysin und Tyrosinhydroxylase nachweisbar (Niemeyer und Eggert 2017, S. 429).



**Abbildung 1.2: Histologisches Bild eines Neuroblastoms; aus Gürtl-Lackner et al. (2017)**

a) zeigt das Bild eines unreifen Neuroblastoms; b) zeigt verschiedene Neuroblasten

Die INPC (*International Neuroblastoma Pathological Classification*) basierend auf der Shimada-Klassifikation (seit 1984) (Niemeyer und Eggert 2017, S. 425) teilt die Tumoren in vier Untergruppen auf. Hierzu werden das Verhältnis des Stromas, der Schwannzellen, (Shimada et al. 1999), die neuroblastische Differenzierung und der MKI (Mitosis-Karyorrhexis-Index) unter Berücksichtigung des Patientenalters prognostisch evaluiert (Teshiba et al. 2014). Die histologischen Eigenschaften der INPC zeigen eine Korrelation mit genetischen Markern wie der MYCN-Amplifikation (Nakazawa et al. 2015).

International Neuroblastoma Pathological Classification		Shimada-Klassifikation	Prognose
<b>günstige Prognose des Neuroblastoms</b>	<b>Schwannzell-arm</b>	<b>Schwannzell-arm</b>	
< 1,5 Jahre	kaum bis stark differenziert niedriger bis moderater MKI	günstig	günstig
1,5 – 5 Jahre	differenziert geringer MKI		



<b>ungünstige Prognose des Neuroblastoms</b>	<b>Schwannzell-arm</b>	<b>Stroma-arm</b>	
< 1,5 Jahre	undifferenziert hoher MKI	ungünstig	ungünstig
1,5 – 5 Jahre	undifferenziert oder kaum differenziert  moderater oder hoher MKI		
>= 5 Jahre	jede Differenzierungsstufe		
Ganglioneuroblastom	Schwannzell-reich	Stroma-reich	günstig
Ganglioneurom	Schwannzell-dominierend	gut ausdifferenziert	günstig
Ganglioneuroblastom	Zusammengesetzt: Schwannzell-reich/-dominant und -arm	Stroma-reich	ungünstig

**Tabelle 1.2: Prognose des Neuroblastoms; frei erstellt und übersetzt nach Shimada et al. (1999)**

Die Tabelle zeigt die Prognose des Neuroblastoms abhängig vom Alter und von der histologischen Zusammensetzung basierend auf der INPC (International Neuroblastoma Pathological Classification) und Shimada-Klassifikation.

Eine MYCN-Amplifikation ist mit einer Therapieresistenz sowie einer schlechteren Prognose assoziiert, da sie zu beschleunigtem Zellwachstum (Fulda et al. 1999) und einer verstärkten Angiogenese führt (Qin et al. 2020). Das Vorhandensein einer MYCN-Amplifikation geht mit einem undifferenzierten, histologischen Bild sowie einer stark erhöhten mitotischen karyorrhetischen Aktivität einher (Suganuma et al. 2013). Der MKI gibt das Verhältnis von mitotisch aktiven Zellen zu karyorrhetischen Zellen (Kernfragmentierung und Zellzerfall) an. Mit unter 100 pro 5000 Zellen (niedrig), 100 – 200 pro 5000 Zellen (moderat) oder über 200 pro 5000 Zellen (hoch) wird die Prognose beeinflusst (Niemas-Teshiba et al. 2018; Fulda et al. 1999).

#### 1.1.4 Diagnostik und Stadieneinteilung

Zusätzlich zu eingehender Anamnese und körperlicher Untersuchung müssen Laborparameter herangezogen werden. Die Bestimmung der Katecholamin-Metabolite Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im 24-Stunden-Sammelurin, die bei einem Neuroblastom in 90 % der Fälle erhöht sind,

gehören zur initialen Routinediagnostik und dienen zusätzlich als Verlaufsparemeter. Sie weisen die höchste Sensitivität und Spezifität auf. Ergänzend kann die NSE (Neuronenspezifische Enolase) (Niemeyer und Eggert 2017, S. 429) im Serum für die Verlaufskontrolle bestimmt werden (Georgantzi et al. 2018), welche jedoch aufgrund von anderweitig bedingter Hämolyse erhöht sein kann (Simon 2019). Stark erhöhte NSE-Werte kombiniert mit hohen LDH-Werten sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert, da sie auf eine hohe Tumorlast hindeuten (Kaczówka et al. 2018).

An apparativer Diagnostik wird die Sonographie des Halses und Abdomens sowie eine Röntgenaufnahme des Thorax durchgeführt. Kann der Primärtumor in der Sonografie nicht lokalisiert werden, sollte ein MRT, ggf. ein CT, durchgeführt werden. Mittels der entsprechenden Schnittbilder können die exakte Lokalisation, Tumorgöße/-ausdehnung und vorhandene Metastasen bestimmt und dem Tumorstadium zugeordnet werden (Hart et al. 2019). Um die Tumoraktivität sowie ein Ansprechen auf die Therapie zu erfassen, ist eine Ganzkörperszintigraphie mit <sup>123</sup>I-mIBG (123Iod-meta-Iodbenzylguanidin) die Diagnostik der Wahl (Voss 2019). Für eine adäquate histologische und molekulargenetische Untersuchung sollten Biopsien des Tumors entnommen werden (Niemeyer und Eggert 2017, S. 432).

Das Ansprechen wird methodisch durch radiologische und histopathologische Untersuchungen festgestellt, um die Tumorfreiheit zu belegen (Orr und McHugh 2019). Die Heterogenität des Neuroblastoms stellt ein Merkmal und eine Herausforderung in der Risikostratifizierung dar (Pinto et al. 2015). Um die verschiedenen Risikofaktoren zu berücksichtigen, lässt sich das Neuroblastom nach den INSS (*International Neuroblastoma Staging System*), nach chirurgischer Intervention, und INRG (*International Neuroblastoma Risk Group*), klinischer Phänotyp vor Therapie, in unterschiedliche Stadien (Tabelle 1.3) entsprechend dem Risikoprofil einteilen (Simon 2019; Brisse et al. 2011; Lanza et al. 2019):

INSS-Tumorstadien		INRG-Tumorstadien	
Tumorstadium	Erläuterung	Tumorstadium	Erläuterung
1	Lokalisierter Tumor nach kompletter Resektion mit oder ohne mikroskopische Resterkrankung; ipsilaterale	L1	Lokalisierter Tumor ohne Invasion in lebenswichtige Strukturen

	Lymphknoten frei von Tumorzellen; am Tumor anliegende Lymphknoten können mit Tumorzellen besetzt sein.		
2a	Lokalisierter Tumor nach inkompletter Resektion; ipsilaterale Lymphknoten frei von Tumorzellen	L2	Lokal-regionaler Tumor mit mindestens einem IDRF (image-defined risk factor) *
2b	Lokalisierter Tumor nach kompletter oder inkompletter Resektion; ipsilaterale Lymphknoten mit Tumorzellen besetzt, kontralateral keine Tumorzellen in den Lymphknoten vorzufinden		
3	Nicht-resezierbarer einseitiger Tumor, der sich über die Körpermittellinie erstreckt; mit oder ohne regionale Lymphknoten-Infiltration; Tumor auf der Mittellinie, der bilateral invasiv wächst und Lymphknoten infiltriert	M	Fernmetastasen (Alter ab 18 Monate)
4	Primärtumor mit Ausbreitung in fernen Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut oder anderen Organen		
4 S**	Lokalisierter Tumor (entsprechend der Stadien 1, 2A, 2B) im Alter bis zu 1 Jahr mit Ausbreitung in der Haut, Leber und/oder Knochenmark (max. 10 % und nicht in der MIBG-Szintigraphie detektierbar)	M (S**)	Fernmetastasen in Haut, Leber, und/oder Knochenmark (Alter unter 18 Monaten)

**Tabelle 1.3: Definition der INSS (International Neuroblastoma Staging System) und der INRG (International Neuroblastoma Risk Group) anhand der Tumorstadien beim Neuroblastom nach Brisse et al. (2011); Lanza et al. (2019)**

Die INSS-Tumorstadien 1 – 4 (S) zeigen die Ausdehnung des Neuroblastom nach Resektion.

Die INRG-Tumorstadien L1 – L2 und M(S) zeigen das Vorhandensein von Fernmetastasen vor jeder therapeutischer Intervention. \* image defined risk factor steht für eine radiologische Struktur, die aufgrund der Lokalisation zu einer schlechteren Operabilität führt und daher mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Brisse et al. 2011). \*\* S steht für das Neuroblastom im Säuglingsalter.

### 1.1.5 Therapie und Prognose

Die Prognose hängt von verschiedenen Risikofaktoren ab: Ein Alter über 18 Monate bei Diagnosestellung, eine Amplifikation im MYCN-Onkogen und Metastasen stehen für eine ungünstige Prognose. Zusätzlich ist die Malignität vom Grad der Differenzierung in den Neuroblastomzellen abhängig (Papaioannou und McHugh 2005; Shimada et al. 1999). Die Therapiemöglichkeiten unterscheiden sich nach den Risikofaktoren der Patienten. Je nach Alter, Histopathologie, Tumorstadium, MYCN-Status oder genetischer Aberration werden sie einer niedrigen, mittleren und hohen Risikogruppe zugeteilt (Tabelle 1.4) (He et al. 2020):

Risikogruppe	Stadium	Alter	MYCN	Weitere Besonderheit
niedrig	1	jedes Alter	nicht vorhanden	ohne 1p Aberration
	2	jedes Alter	nicht vorhanden	ohne 1p Aberration
	3	unter 2 Jahren	nicht vorhanden	
	4 S	unter 1 Jahr	nicht vorhanden	
mittel	2	jedes Alter	nicht vorhanden	mit 1p Aberration
	3	unter 2 Jahren	nicht vorhanden	mit 1p Aberration
	3	über 2 Jahren	nicht vorhanden	
	4	unter 18 Monaten	nicht vorhanden	
hoch	3, 4	über 18 Monaten	vorhanden	

**Tabelle 1.4: Risikoeinteilung des Neuroblastoms**

Die Risikoeinteilung ist abhängig vom Tumorstadium, Alter, MYCN-Amplifikation oder weiteren Besonderheiten wie einer Aberration auf dem Chromosom 1p; frei erstellt nach Simon et al. (2004b); Simon (2019); Piccardo et al. (2020)

### Niedrige Risikogruppe

Eine operative Therapie dient in dieser Risikogruppe der Entnahme der Tumorprobe sowie einer symptomreduzierenden Therapie. Ebenfalls kann bei einem günstigen

Risikoprofil eine abwartende, beobachtende Strategie herangezogen werden, da das Neuroblastom spontan sistieren kann. Weitere Therapiemaßnahmen sind nicht zwingend notwendig (Rossa et al. 2019). Die Patienten unterliegen mehreren Kontrollen, um die Tumorgöße zu beobachten. Die spontane Regression ist nicht im Einzelnen verstanden, aber wird sowohl im Stadium 4 S als auch bei über Einjährigen beobachtet (Simon et al. 2004b).

Eine medikamentöse Therapie mit Zytostatika erfolgt bei Vorhandensein von Symptomen, vegetativen Funktionsausfällen oder bei einem Rezidiv (Rossa et al. 2019) bis zur Tumorregression oder bis zum Sistieren der Progression. Eine Strahlentherapie wird aufgrund des günstigen Risikoprofils in der Regel nicht durchgeführt.

### **Mittlere Risikogruppe**

Patienten mit einem Neuroblastom der mittleren Risikogruppe erhalten eine operative Tumoresektion mit einer anschließenden Chemotherapie aus Vincristin, Cyclophosphamid und Doxorubicin. Eine Strahlentherapie ist bei einem biologisch aktiven Resttumor indiziert. Hier erfolgt eine Bestrahlung von 36 und 40 Gy (Niemeyer und Eggert 2017, S. 432).

### **Hochrisikogruppe**

Patienten mit einem Neuroblastom der Hochrisikogruppe haben aufgrund des Alters und der molekulargenetischen Zusammensetzung wie der MYCN-Amplifikation eine schlechte Prognose (Kaczówka et al. 2018).

Sofern das Operationsrisiko abschätzbar ist, werden diese Tumoren chirurgisch entfernt. Darauf folgen eine Induktionstherapie mit beispielsweise Cyclophosphamid und Topotecan (Rujkijyanont et al. 2019) sowie eine intensive Hochdosistherapie mit fünf bis acht Zyklen aus Platin-, Alkyl- und Topoisomerase-Agenzien. Eine anschließende Stammzelltransplantation und eine zielgerichtete Immuntherapie sowie eine Bestrahlung lokaler Tumorregionen verbessern die Prognose und erhöhen die Wahrscheinlichkeit für das Überleben der Patienten. Ein Therapieversagen der Hochdosistherapie und der Stammzelltransplantation mit myeloablativer Therapie ist durch eine hohe Rezidivrate

und aggressiver Progression begründet (Yi et al. 2020). Hierauf kann eine hochdosierte Therapie mit  $^{131}\text{I}$ -Metaiodobenzylguanidin erfolgen, um den Tumorrückfall zu beseitigen (Kayano et al. 2020).

Zusätzlich wird eine Post-Konsolidierungs-Therapie mit Dinutuximab (Gangliosid GD2-Antikörper) empfohlen (Simon et al. 2004a). Eine Postkonsolidierungstherapie mit Retinsäure beim Neuroblastom war viele Jahre der Standard, jedoch zeigte sich bei etwa der Hälfte der Patienten eine geringe Wirksamkeit aufgrund von Resistenzen, was zu einer hohen Rezidivrate führte und die Verwendung von Retinsäure einschränkte (Hämmerle et al. 2013).

## 1.2 Retinsäure

### 1.2.1 Funktion und Derivate

Vitamin A (Retinol) und dessen Metabolite (Handberg-Thorsager et al. 2018), wie z. B. die Retinsäure (Abbildung 1.3), sind organische Verbindungen, die eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen wie der Embryogenese, Proliferation, Differenzierung und Apoptose spielen. Es handelt sich um ein essentielles Vitamin, welches über die Nahrung in Form von Carotinoiden oder Retinylestern aufgenommen werden muss (Purton 2007). Im klinischen Alltag werden die Retinsäure bzw. synthetische Retinoide zur Therapie der Acne vulgaris, des kutanen T-Zell-Lymphoms und der APL (Akute-Promyelozyten-Leukämie) angewandt (Melnik 2017). Seit Ende der 1980er Jahre wurde Retinsäure auch in der Postkonsolidierungstherapie des Neuroblastoms verwendet (Masetti et al. 2012), da in vitro und in vivo ein anti-tumoröser Effekt gezeigt werden konnte (Idres et al. 2002). Allerdings sprechen 50 % der Patienten nicht auf diese Therapieoption an und erleiden Rezidive, die auf diverse Resistenzmechanismen zurückzuführen sind (Armstrong et al. 2005). Als Nebenwirkung sind teratogene Effekte hervorzuheben, die zu einer kraniofaszialen Malformation führen. Ebenfalls können mukokutane Nebenwirkungen, sowie erhöhte Transaminasen und Triglyceride sowie seltener depressive Verstimmungen auftreten (Melnik 2017).

Ein Derivat der Retinsäure ist die ATRA (all-trans-Retinsäure), die durch nicht-enzymatische Reaktionen in 13-cis-Retinsäure oder 9-Cis-Retinsäure, sowie umgekehrt zurück zu ATRA, überführt werden kann (Chlapek et al. 2018). Klinisch relevant sind ATRA und 13-cis-Retinsäure.

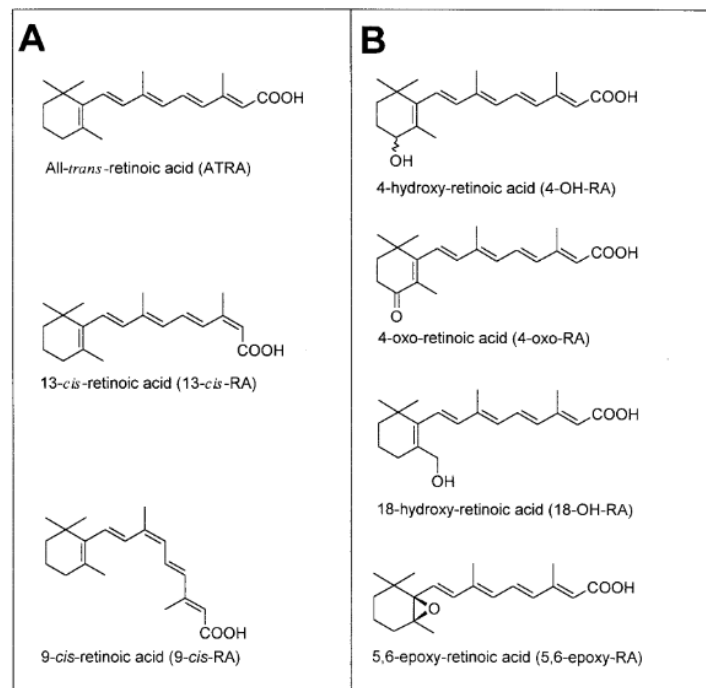
Beide Isomere zeigen ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine Ausdifferenzierung, Wachstumsarrest und eine MYCN-Reduktion in Neuroblastom-Zelllinien in vitro bei MYCN- und non-MYCN-amplifizierten Zellen (Sonawane et al. 2014). Im Gegensatz zu 13-cis-Retinsäure weist der aktive Metabolit ATRA eine höhere Bindungsaffinität zu Liganden-aktivierenden Transkriptionsfaktoren auf (Armstrong et al. 2005), weshalb ATRA in dieser Arbeit experimentell eingesetzt wurde.

ATRA wird von CYPs (Cytochrom-P450-Enzymen), speziell der CYP26-Gruppe, in der Leber zu wasserlöslichen Metaboliten wie 4-Oxo-Retinsäure, 4-Hydroxy-Retinsäure, 18-Hydroxy-Retinsäure und 5,6-Epoxy-Retinsäure (Abbildung 1.4) verstoffwechselt (Idres et al. 2002).



**Abbildung 1.3: Metabolisierung von Vitamin A (Retinol), frei erstellt nach Handberg-Thorsager et al. (2018)**

Retinol wird durch die RDH (Retinol-Dehydrogenase) zu Retinal und dieses durch die RALDH (Retinalaldehyd-Dehydrogenase) zur Retinsäure oxidiert, welche dann durch CYP26-Enzyme zu weiteren wasserlöslichen Metaboliten in der Leber verstoffwechselt wird (Bushue und Wan 2010).



**Abbildung 1.4: Chemische Strukturen der Retinsäure, aus Idres et al. (2002)**

A: Die Derivate der Retinsäure liegen als All-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure oder 9-cis-Retinsäure vor.

B: All-trans-Retinsäure wird durch die CYP26-Gruppe in verschiedene wasserlösliche Metabolite verstoffwechselt: 4-Oxo-Retinsäure, 4-Hydroxy-Retinsäure, 18-Hydroxy-Retinsäure und 5,6-Epoxy-Retinsäure.

### 1.2.2 Molekularer Mechanismus der Retinsäurewirkung

Retinsäure ist hydrophob und liegt intrazellulär gebunden an CRABP1 und CRABP2 (*cellular retinoic acid-binding protein 1* und 2) sowie an FABP5 (*fatty acid binding protein 5*) vor (Liu et al. 2016). CRABP1 und CRABP2 zeigen dabei eine gewebe- bzw. zellspezifische Expression (Bushue und Wan 2010). Nach Bildung eines Komplexes mit Retinsäure im Zytoplasma können CRABP1 und CRABP2 über eine Interaktion mit den abbauenden Enzymen zum Retinsäure-Metabolismus beitragen (Napoli 2017). Obwohl beide Bindeproteine nukleär nachgewiesen werden konnten, scheint hauptsächlich CRABP2 für den Transport in den Zellkern zu den Retinsäure-Rezeptoren verantwortlich zu sein (Dong et al. 1999). Die nukleären Rezeptoren RAR (*retinoic-acid-receptor*) und RXR (*retinoic-x-receptor*) gibt es in unterschiedlichen Isoformen (Kim et al. 2016). Nach Ligandenbindung regulieren sie als Homo- oder Heterodimere zusammen mit Ko-Aktivatoren die Expression von Retinsäure-abhängigen Genen (Hunsu et al. 2021). Dabei können RARs durch ATRA und 9-cis-Retinsäure aktiviert werden, während RXRs 9-cis-Retinsäure präferieren (Bushue und Wan 2010). Durch RAR und RXR wird die Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen zu spezifischen Gewebstypen, unter anderem zu neuronalem Gewebe reguliert (Janesick et al. 2015; Green et al. 2017).

Darüber hinaus kann RXR mit PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*), hauptsächlich mit PPAR  $\beta/\delta$ , Heterodimere bilden (Fonseca et al. 2020), was beispielsweise die Zellproliferation stimulieren kann (Berry und Noy 2007). Ein weiterer relevanter nukleärer Rezeptor ist der PXR (*pregnane-x-receptor*), der ebenfalls ligandenabhängig die Transkription für Phase-I- und Phase-II-Enzyme aktiviert, um bevorzugt den Abbau und die Elimination der Retinsäure zu erhöhen (Wang T. 2008). Dabei ist PXR ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Gruppe der CYP-Familie, besonders für die Subgruppe CYP3A (Tebbens et al. 2018).

Retinsäure erzeugt neben genomischen Effekten auch transkriptionell-unabhängige, nicht-genomische Effekte, indem es beispielsweise die Proteinkinase ERK1/2 aktiviert (Cañón et al. 2004).



### 1.2.3 Retinsäure-induzierte Effekte in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y-Zellen)

Neuroblastomzellen lassen sich *in vitro* in drei verschiedene Phänotypen unterteilen (Pezzini et al. 2017):

- N-Typ: klein, rundförmige neuroblastische Zellen mit kurzen Neuriten
- S-Typ: Substrat-adhärente Zellen mit einer flachen Morphologie
- I-Typ: Zwischentyp

Ein etabliertes *in-vitro* Modell für die Forschung an Neuroblastomzellen sind SH-SY5Y-Zellen, die sich im naiven Zustand dem S-Typ zuordnen lassen (Gordon und Amini 2021). Unter hohen Retinsäurekonzentrationen kann in SH-SY5Y-Zellen der Zellzyklus arretieren und eine metabolische Neuprogrammierung erfolgen (Girardi et al. 2019). Wenn in SH-SY5Y-Zellen eine Differenzierung induziert wird, verändern sich die elektrophysiologischen Eigenschaften der Plasmamembran. Synapsen und Neurite werden gebildet (Murillo et al. 2017), sodass diese dann dem N-Typ entsprechen (Gordon und Amini 2021). Die Expression der RARs, besonders RAR $\alpha$  und  $\gamma$ , werden in den SH-SY5Y-Zellen durch Retinsäure erhöht; die der RXRs (vorzugsweise RXR $\alpha$ ) sind erst in einem späteren Stadium verstärkt nachweisbar (Girardi et al. 2019). In niedrigerer Konzentration dagegen kann durch die Gabe von Retinsäure kein Proliferationsstopp in SH-SY5Y-Zellen hervorgerufen werden (Waetzig et al. 2019). Auch in anderen Zelllinien unterstützt Retinsäure die Proliferation und das Zellüberleben. Diese Effekte lassen sich unter anderem auf das CRABP2/FABP5-Verhältnis zurückführen, da CRABP2 ATRA zum RAR führt und proliferationsinhibierend wirkt, während FABP5 ATRA zu PPAR $\delta/\beta$  liefert, was das Wachstum stimuliert (Napoli 2017).

Darüber hinaus aktiviert Retinsäure die Proteinkinase Akt, welche ein Target der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) ist und eine wichtige Rolle in der Zellregulation und im Zellüberleben spielt (Cheung et al. 2009). Ein aktivierter PI3K/Akt-Signalweg ist für die Retinsäure-induzierte Differenzierung notwendig, da eine Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges die Differenzierung der Neuroblastomzellen unterdrückt (Hara 2012). Allerdings ist Akt auch ein wichtiger Mediator für Zellproliferation sowie -überleben und damit entscheidend für die Signaltransduktion von Tumorzellen, was ebenfalls für die Mitogen-aktivierte Kinase ERK1/2 zutrifft (Girardi et al. 2019).

Diese heterogenen Daten aus unterschiedlichen Zelllinien können auch die variablen Ergebnisse im klinischen Alltag erklären (Janesick et al. 2015).

#### 1.2.4 Retinsäure-Resistenz in Neuroblastomzellen

Induzierte Apoptose ist ein Mechanismus in der Tumorthherapie, welcher auch für Retinsäure als molekulare Eigenschaft beschrieben ist (Ronca et al. 1999). Insgesamt liegt der Fokus beim Einsatz von Retinsäure allerdings eher auf seinen differenzierungsfördernden Eigenschaften. Eine abgeschwächte Wirkung bis hin zur Resistenz in Neuroblastomzellen ist beschrieben und kann auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden: eine verringerte Aufnahme in die Zelle, ein aktivierter intrazellulärer Metabolismus, veränderte intrazelluläre Verfügbarkeit durch CRABP2 sowie ein erhöhter Efflux durch ABC-Transporter. Außerdem können eine verringerte RAR/RXR-Expression, abweichende Funktionen der Co-Transkriptionsfaktoren, eine veränderte Regulierung der Zielgene (Dobrotkova et al. 2018) und eine PXR-vermittelte Überexpression von CYPs, vorallem CYP3A, eine Resistenz gegen Retinsäure induzieren (Mensah-Osman et al. 2007).

Bestimmte Signalwege können ebenfalls Ursache für eine Retinsäureresistenz sein. Durch Akt und ERK1/2 wird der Zellzyklus Regulator p21 verstärkt exprimiert, welcher je nach intrazellulärer Lokalisation einen protektiven Effekt auf SH-SY5Y-Zellen hat. Dies führt zu einem verbesserten Zellüberleben und einer verstärkten Stresstoleranz (Waetzig et al. 2019).

### 1.3 Cytochrom-P450-Enzyme

#### 1.3.1 Allgemeine Funktionen und Bedeutung für die Tumorentstehung

Die CYPs (Cytochrom-P450-Enzyme) gehören zur Gruppe der Monooxygenasen und sind für den zellulären Metabolismus und die zelluläre Homöostase relevant (Manikandan und Nagini 2018). Sie sind in allen Geweben exprimiert, besonders stark in der Leber, im Dünndarm und in der Niere. Vorzufinden sind sie dabei hauptsächlich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Elfaki et al. 2018).

Die CYP-Isoenzyme werden von 57 CYP-Genen codiert, die sich in 18 Familien und 43 Subfamilien gruppieren lassen. Wenn sie eine Aminosäureähnlichkeit von mehr als

40 % aufweisen, gehören sie zur gleichen Familie (z. B. CYP2); wenn sie sich in 55 % der Struktur ähnlich sind, gehören sie zur gleichen Subgruppe (z. B. CYP2J). Anschließend erhält jedes CYP der Subgruppe eine spezifische Nummer (z. B. CYP2J2) (Elfaki et al. 2018). Die CYPs bestehen aus bis zu 500 Aminosäuren und einem Häm (Eisen-Protoporphyrin IX) als prosthetische Gruppe der Enzyme (Manikandan und Nagini 2018). Die CYPs katalysieren verschiedene Oxidations- und Reduktionsreaktionen. Substrate der CYPs sind beispielsweise Fremdstoffe, Arzneimittel sowie endogene Komponenten wie Cholesterol, Testosteron, Progesteron, Prostaglandine, Kortikosteroide, Retinsäure, Vitamin D3 und Arachidonsäure (Tabelle 1.5). Das Substrat wird im katalytischen Zentrum gebunden, woraufhin das Hämeisen durch NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) reduziert und Sauerstoff gebunden wird. Die lipophilen Substrate werden zu wasserlöslichen Produkten umgeformt, sodass der Körper diese ausscheiden kann. Diese Biotransformation lässt sich in zwei Phasen aufteilen, wobei die CYPs an der Phase-I-Reaktion beteiligt sind, bei denen es sich um Oxidationen, Reduktionen oder Hydrolysen handelt (Elfaki et al. 2018).

Substrate	CYP-Subgruppe
Sterine	1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1
Fremdstoffe	1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7
Fettsäuren	2J2, 4A11, 4B1, 4F12
Eicosanoide	4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1
Vitamine	2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1
Sonstige	2A7, 2S1, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4Z1, 20A1, 27C1

**Tabelle 1.5: Substrate der zugehörigen CYP-Gruppen**

Substrate wie Sterine, Fremdstoffe, Fettsäuren, Eicosanoide, Vitamine und Weitere werden von den zugehörigen CYP-Subgruppen metabolisiert; frei erstellt nach Guengerich (2008)

Bei intensiv metabolisierten Wirkstoffen müssen die Medikamentendosen individuell angepasst werden, damit weder die Wirkspiegel zu hoch und damit toxisch sind, noch die Arzneistoffkonzentrationen zu niedrig sind. Bestimmte CYP-Varianten oder Mutationen können zu einer *loss-of-function* oder *gain-of-function* führen:

Erstere reduziert den Abbau des Fremdstoffes und erhöht die Plasmaspiegel, Letztere ist für eine verstärkte Verstoffwechslung verantwortlich und reduziert die Plasmaspiegel. Polymorphismen in den CYP-Enzymen sind hauptverantwortlich für unterschiedliche Reaktionen auf den Arzneimittelstoffwechsel und Nebenwirkungen (Manikandan und Nagini 2018). Außerdem kann über Interaktionen mit anderen Medikamenten die Konzentration eines Wirkstoffes verändert werden.

Damit bieten die Funktionen von CYP-Enzymen unterschiedliche Angriffspunkte in der Tumorthherapie. Einmal können über die Blockade von Zytostatika-spezifischen CYPs Halbwertszeit und Konzentration des jeweiligen Wirkstoffes erhöht werden, was die Effizienz der Krebstherapie fördert (Panigrahy et al. 2010). Dann besteht die Möglichkeit, CYP-generierte und wachstumsfördernde Mediatoren zu hemmen.

### 1.3.2 CYP26A1 und CYP26B1

Der Abbau von Retinsäure wird hauptsächlich von CYPs katalysiert (Chen et al. 2000). Besonders wichtig dabei ist die Subgruppe der CYP26-Proteine, zu der CYP26A1, CYP26B1 und CYP26C1 gehören und dabei die Retinsäure durch Hydroxylierung inaktivieren (Isoherranen und Zhong 2019). CYP26A1 und CYP26B1 sind spezifisch für all-trans-Retinsäure, während CYP26C1 hauptsächlich 9-cis-Retinsäure metabolisiert (Topletz et al. 2012). Retinsäure wird durch CYP26-Enzyme zu weniger aktiven, hydrophilen Metaboliten wie 4-Oxo-Retinsäure, 4-Hydroxy-Retinsäure, 18-Hydroxy-Retinsäure und 5,6-Epoxy-Retinsäure verstoffwechselt (Abbildung 1.4). Diesen Metaboliten werden dennoch essentielle Eigenschaften in der Differenzierung von Zellen zugeschrieben (Shimshoni et al. 2012).

Die gewebe- und entwicklungsabhängigen Expressionsmuster der Enzyme unterscheiden sich deutlich. Während die höchste Expression von CYP26A1 in der Leber nachgewiesen werden konnte, waren die Spiegel von CYP26B1 in extrahepatischen Geweben höher (Isoherranen und Zhong 2019). Beide Proteine sind durch all-trans-Retinsäure induzierbar (Zolfaghari et al. 2019; Ross und Zolfaghari 2011) und vornehmlich im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Stevison et al. 2015).

Ein erhöhter Retinsäure-Abbau ist mit einer größeren Wahrscheinlichkeit für Karzinogenese assoziiert. Gerade in soliden Tumoren ist die verstärkte Expression von CYP26-Enzymen mit einer schlechteren Prognose, Retinsäureresistenz und der Erhaltung von Stammzeleigenschaften gekoppelt (Alonso et al. 2017). Für CYP26A1 sind onkogene Charakteristika wie verstärktes Zellüberleben bekannt (Osanai 2017). Beispielsweise hebt CYP26A1 die pro-apoptotische Aktivität von Retinsäure auf und verändert das Zellwachstum sowie den mitotischen Index (Osanai und Petkovich 2005).

Deshalb wurde die Inhibition von CYP26-Proteinen als therapeutische Möglichkeit untersucht, um endogene Retinsäure-Konzentrationen zu steigern und eine Therapieresistenz zu verhindern (Stevison et al. 2017). CYP26-spezifische Inhibitoren sind Talarozol und Liarozol, wobei Talarozol eine höhere Affinität zu CYP26A1 und CYP26B1 aufweist (Gomaa et al. 2012). Bereits nach einer einzelnen Dosis von Talarozol kann die Retinsäure Konzentration gesteigert werden (Gomaa et al. 2011), obwohl auch die Expression von CYP26A1 und CRABP2 regulatorisch erhöht wird (Fritzsche et al. 2010). Für Liarozol zeigte sich ebenfalls in einigen Experimenten eine Steigerung der Retinsäure-induzierten Effekte um das etwa Zweifache (Nelson et al. 2013). Weiterhin kann der Abbau von Retinsäure durch CYP26 auch durch den unspezifischen CYP-Inhibitor Ketoconazol inhibiert werden (Nelson et al. 2013).

### 1.3.3 CYP3A5

Die CYP3A-Subfamilie katalysiert metabolische Transformationen von Arzneimitteln und endogenen Molekülen wie Steroiden. Die wichtigsten Vertreter sind CYP3A4 und CYP3A5, wobei CYP3A4 für den größten Anteil des Arzneimittelmetabolismus verantwortlich ist (Werk und Cascorbi 2014). Der Anteil von CYP3A5 variiert in der Leber interindividuell zwischen 17 % und 50 %, was abhängig von Splice-Variante und interethnischem Genotyp ist. CYP3A5 kommt in der afrikanischen Bevölkerung im Vergleich zur westeuropäischen Bevölkerung häufiger als Variante vor (Daly 2006).

Am häufigsten sind CYP3A-Enzyme in Leberzellen und reifen Enterozyten des Dünndarms vorzufinden (Thummel et al. 2001). Insgesamt bestehen Unterschiede in den CYP3A4- und CYP3A5-Expressionen zwischen Individuen und in der Leber-Dünndarm-Verteilung (Elfaki et al. 2018).

Auch im Retinsäure-Metabolismus spielen die CYP3A-Enzyme eine entscheidende Rolle, wo Retinsäure durch diese oxidiert und dadurch inaktiviert wird (Wang R. 2008). Die verstärkte Expression von CYP3A4 oder CYP3A5 könnte demnach zu einer Retinsäureresistenz beitragen, was in Neuroblastomzellen bereits beschrieben ist (Wang T. 2008). Reguliert wird die Induktion der CYP3A-Enzyme in diesem Fall über eine Retinsäure-vermittelte Aktivierung von PXR, was nach Dimer-Bildung mit RXR die Transkription von CYP3A-Genen erhöht (Kliwer 2003). Möglicherweise können daher unterschiedliche CYP3A4- und CYP3A5-Polymorphismen einen Einfluss auf den Therapieerfolg in der Neuroblastom-Therapie haben (Darwish et al. 2015).

CYP3A4 und CYP3A5 sind auch in anderen Malignitäten wichtige prognostische Faktoren, wenn eine Arzneimittelresistenz als Ursache im Fokus steht oder das Tumorwachstum auf erzeugte Metabolite zurückzuführen ist (Oguro et al. 2011). Eine hohe Proteinexpression beider Enzyme ist mit Metastasen und einem verschlechterten Therapieansprechen assoziiert (Noll et al. 2016; Šemeláková et al. 2021).

Azol-Antimykotika wie Ketoconazol sind potente, nicht-kompetitive Inhibitoren von CYP3A4 und CYP3A5 sowie von CYP26-Enzymen, jedoch mit einer höheren Affinität zu CYP3A4 (Daly 2006; Hameed und el-Metwally 2008). Dadurch werden die Spiegel von CYP3A-verstoffwechselten Substanzen und deren Wirkung erhöht. So konnte in Neuroblastomzellen durch die Kombination mit Ketoconazol der antikanzerogene Effekt von Fenretinid gesteigert werden, einem synthetischen und über CYP3A4 bzw. CYP3A5 metabolisiertem Retinoid (Lopez-Barcons et al. 2017). Zudem zeigte sich eine verstärkte Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber zytotoxischen Arzneimitteln durch Ketoconazol-induzierte Inhibition von Effluxtransportern (Holownia und Cederbaum 2003). Die CYP3A-Expression kann durch die Gabe von Ketoconazol reduziert werden, indem die dafür notwendige Bindung zwischen dem nukleären Rezeptor PXR und seinen Ko-Faktoren gehemmt wird (Masuyama et al. 2016). Durch die Inhibition von PXR kann Ketoconazol unabhängig von CYP3A4 oder CYP3A5 die apoptotische Wirkung einiger Zytostatika erhöhen (Yasuda et al. 2019). In weiteren Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ketoconazol über die Inhibition der CYP51-Gruppe und damit einer reduzierten Cholesterol-Synthese, Apoptose in Tumorzellen induziert (Datta et al. 2018).

Auch in dieser Arbeit wurde Ketoconazol als Modellschubstanz zur Hemmung von CYP3A5, CYP26A1, CYP26B1 und PXR verwendet, um die Effekte auf eine mögliche Retinsäureresistenz zu untersuchen.

#### 1.3.4 CYP2J2

Die humane CYP2J-Subfamilie hat nur ein Gen, welches für CYP2J2 codiert. CYP2J2 ist in vielen Geweben und Zellen exprimiert, wie beispielsweise in kardialen Myozyten und in Endothelzellen, in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas und in einigen Gehirnregionen. In der Leber beträgt der CYP2J2-Anteil an allen CYP-Enzymen nur 1 %. CYP2J2 ist eine Epoxygenase und verstoffwechselt mehrfach ungesättigte Fettsäure wie Arachidonsäure (Panigrahy et al. 2010) zu vier unterschiedlichen EETs (Epoxyeicosatriensäuren): 5,6-, 8,9-, 11,12-, und 14,15-EET. Einerseits haben einige der CYP2J2-Produkte einen antiinflammatorischen sowie vaskulärprotektiven Effekt, indem inflammatorische Faktoren wie NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated b-cells*) inhibiert werden, andererseits sind sie für die Tumorgenese relevant (Zanger und Schwab 2013). EETs fördern in Karzinomzellen die Proliferation und verhindern die Apoptose. Die CYP2J2-Überexpression im Tumorgewebe kann durch EETs, besonders 14,15-EET, die Tumorprogression fördern (Guo et al. 2018) und Angiogenese (Hu et al. 2018) sowie Metastasierung begünstigen (Murray 2016).

Dies wird durch eine Aktivierung der Signalwege von PI3K/Akt und STAT3 verursacht. Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist wie Akt ein wichtiger Mediator von Wachstum in Tumorzellen (Odate et al. 2017).

Eine direkte Inhibition von CYP2J2 wäre als therapeutische Zielstruktur wünschenswert. Bekannte CYP2J2-Inhibitoren sind Flunarizin und Telmisartan, die hochselektiv CYP2J2 kompetitiv inhibieren, jedoch kein Substrat des CYP2J2 sind (Ren et al. 2013). Flunarizin ist ein Calcium-Kanal-Blocker, welcher im klinischen Alltag als Migräne-Prävention und zur Therapie von erhöhtem Augeninnendruck verwendet wird. Für Flunarizin ist bereits in vielen Karzinomzellen, besonders in humanen und murinen Myelom- und Lymphomzellen sowie in Neuroblastomzellen bekannt, dass Apoptose durch eine erhöhte Calciumfreisetzung induziert wird (Conrad et al. 2010; Schmeel et al. 2015). Zusätzlich inhibiert Flunarizin spannungsabhängige Natriumkanäle, die ein möglicher Angriffspunkt in der Anti-

Tumorthherapie sein können (Koltai 2015). Die vermehrte Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen in vielen (metastasierten) Karzinomzellen kann für eine Fehlregulation von intrazellulären Signalwegen verantwortlich gemacht werden und dadurch zur Tumorprogression führen (Koltai 2015). Neben einer spezifischen Kanalblockade kann Flunarizin Autophagie durch Aktivierung von LC-3 induzieren, was das Überleben von Tumorzellen beeinträchtigen kann (Zheng et al. 2018). Insgesamt war es möglich, mit Flunarizin Leukämiezellen, Lymphomzellen, Myelomzellen und Rhabdomyosarkomzellen für eine erhöhte zytotoxische Wirkung gegenüber Chemotherapeutika zu sensibilisieren (Schmeel et al. 2015). Zudem fördert Flunarizin eine suffizientere Oxygenierung im vaskularisierten Tumorbett, wodurch Zytostatika eine effektivere Reichweite haben können (Koltai 2015). Auch in Tiermodellen konnte für Flunarizin eine antilymphatische Aktivität nachgewiesen werden (Astin et al. 2014).

Eine Telmisartan-vermittelte CYP2J2-Inhibition führt zu intrazellulär geringeren EET-Spiegeln (Senda et al. 2015), was eine reduzierte Zellviabilität zur Folge hat (El-Serafi et al. 2015). Wie Flunarizin weist Telmisartan zusätzliche Zelleffekte neben einer CYP-Inhibition auf, wie beispielsweise eine Hemmung des AT1-Rezeptors (Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1), weshalb Telmisartan gegen arterielle Hypertonie therapeutisch eingesetzt wird. In Studien zeigte sich, dass eine Blockade des AT1-Rezeptors durch Telmisartan dosisabhängig zu einem reduzierten Tumorwachstum im Ösophagus-, Lungen-, Endometrium-, Urothel- und hepatozellulärem Karzinom führt (Matsui et al. 2019; Oura et al. 2017; Lee et al. 2018). Im Gegensatz dazu fördert eine Stimulation des Rezeptors das Zellüberleben durch Produktion anti-apoptotischer Moleküle wie Bcl-2 und eine Inhibition von Caspasen, was eine Aktivierung der Apoptose unterdrückt. Für den Rezeptor-Liganden Angiotensin II werden zellproliferative Effekte beschrieben (de Araújo 2015). Für resistente Melanomzellen konnte nachgewiesen werden, dass Telmisartan diese gegenüber dem zielgerichteten Medikament sensibilisiert (Grahovac et al. 2019). Ebenfalls erhöht Telmisartan die Permeabilität im Tumorbett für Zytostatika (Patel et al. 2016). Durch diese Vielzahl an Angriffspunkten kann Telmisartan in einigen Zellmodellen Apoptose induzieren und einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase initiieren (Zhang et al. 2018; Samukawa et al. 2017). Außerdem ist



Telmisartan ein PPAR $\gamma$ -Agonist, was zu einer Aktivierung von Tumorsuppressorgenen führt (To und Tomlinson 2013).

Eine Problematik in der Tumorforschung besteht darin, CYP2J2 und die dazugehörigen Produkte zu detektieren und den Einfluss auf das Tumorgewebe vorherzusagen. Ein weiteres Problem ist, dass ubiquitär vorkommende sEHs (lösliche Epoxid-Hydroxylasen) die EET-Aktivität in der Inflammation, Angiogenese und Kanzerogenese ebenfalls modulieren (Guo et al. 2018).

### 1.3.5 CYP4V2

Innerhalb der CYP4-Familie existieren elf Subgruppen, wobei lediglich sechs auch in Menschen vorkommen: CYP4A, CYP4B, CYP4F, CYP4V, CYP4X und CYP4Z (Jarrar und Lee. 2019). Die Gruppe der CYP4-Familie katalysiert den Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, allerdings durch  $\omega$ -Hydroxylierung, was zur Bildung von HETEs (Hydroxyeicosatetraensäuren) führt (Panigrahy et al. 2010). So kann Arachidonsäure von der CYP4-Gruppe in 20-HETE umgewandelt werden. Als Beispiel der CYP4-Familie hat CYP4V2 eine besondere Rolle, indem es ebenfalls mittellang-gesättigte Fettsäuren wie Palmitin- und Laurinsäure spaltet. Studien haben hier gezeigt, dass eine Dysfunktion von CYP4V2 mit einem erhöhtem Thromboserisiko einhergeht (Jarrar und Lee 2020). Da CYP4V2 vor allem in Makrophagen, Retina-Zellen und Hornhautzellen des Auges vorkommt, führen Mutationen in CYP4V2 zur Bietti-Kristalldystrophie, einer progredienten Erkrankung mit Lipidablagerungen in der Retina, und Ichthyosis (Kelly et al. 2011). Es gibt allerdings auch Hinweise auf eine Bedeutung für Krebszellen. Durch eine verstärkte Expression von CYP4-Enzymen wird eine Erhöhung von 20-HETE-Konzentrationen hervorgerufen, wodurch die Tumorangiogenese unterstützt werden kann, was wiederum zur Tumorprogression führen kann (Jarrar und Lee 2019). In diversen Krebserkrankungen wie beim Kolon-, Ovarial-, Mamma-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinom zeigte sich eine verstärkte Expression der Enzyme der CYP4-Subgruppe, insbesondere von CYP4V2 (Alnabulsi et al. 2017; Jarrar und Lee 2019), sodass CYP4V2 für einige Tumorarten eine mögliche therapeutische Zielstruktur sein kann. Ein bekannter Inhibitor ist HET-0016 (N-Hydroxy-N'-(4-Butyl-2 Methylphenyl) Formamidin), der die 20-HETE-Synthese blockiert (Miyata et al. 2001) und damit Zellproliferation reduziert (Borin et al. 2014). Ebenfalls zeigte sich HET-0016 in einigen Studien beim Lungenkarzinom

und Tendenzen zur Metastasierung prognostisch günstig (Liu et al. 2021). Auch wird der positive Effekt und Einsatz im Rahmen des Mammakarzinoms diskutiert (Liu et al. 2021), da CYP4V2 eine positive Korrelation mit dem Differenzierungsgrad und der Prognose aufweist (Murray et al. 2010). Auf Basis dieser Daten wurde CYP4V2 auch in der vorliegenden Arbeit untersucht.

## 1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Für Retinsäure-behandelte Neuroblastomzellen sind viele Resistenzmechanismen bekannt. Ein wichtiges Ziel ist es, die dafür verantwortlichen Veränderungen in der Signaltransduktion zu verstehen, um Retinsäure als Anti-Tumor-Medikament verwenden zu können. In dieser Arbeit wurde betrachtet, welche Rolle Cytochrom-P450-Enzyme in Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen haben und ob eine Retinsäureresistenz mit der Aktivität bestimmter CYP-Proteine assoziiert werden kann.

Als Zellmodell wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen verwendet. Folgende Aspekte wurden in dieser Arbeit untersucht:

- die Identifikation und Expression von verschiedenen Cytochrom-P450-Enzymen, die für den Retinsäure-Metabolismus bzw. das Überleben von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen relevant waren.
- die Untersuchung von CYP26A1, CYP26B1, CYP3A5, CYP2J2 und CYP4V2 als therapeutische Angriffspunkte in Neuroblastomzellen mittels Enzym-selektiver oder pleiotroper Inhibitoren.
- die Charakterisierung der zellulären Effekte nach Inhibition der unterschiedlichen Cytochrom-P450-Enzyme und die Auswirkung auf das Zellüberleben.

## 2 Material

Im folgenden Abschnitt sind die verwendeten Materialien, Chemikalien, Reagenzien, Kits, technischen Geräte und Softwares tabellarisch aufgelistet.

### 2.1 Materialien und Geräte

Hersteller	Material / Gerät
Ansell (Brüssel, Belgien)	Micro Touch® Nitra-Tex, nitril-/puderfreie Handschuhe
Bandelin (Berlin)	Sonopuls GM 70, Ultraschall-Homogenisator
Bio-Rad Laboratories (München)	Glasplatten (1,5 mm) Kamm (15-Well) Mini PROTEAN® Gelkammer Mini PROTEAN® System Gelgießstand Power Pac™ 300 Power Supply Subcell® GT Cell Elektrophoresekammer T100™ Thermocycler Tank Blot Insert Tank Blot Kammer
BODE Chemie (Hamburg)	Bode Sterilium® classic pure
Eppendorf (Hamburg)	Pipetten (0,1 µl – 1000 µl) Centrifuge 5424R, Zentrifuge Centrifuge 5418, Zentrifuge Thermomixer 5436
GFL (Burgwedel)	Wasserbad
Hecht-Assistent (Sondheim/Rhön)	Pasteurpipetten (23 cm Länge)
Heidolph (Schwabach)	Reax 2000, Vortexer Schüttler Polymax 2040
Heraeus (Osterode)	Hera Cell, Brutschrank LaminAir HB2448, Zellkulturbank
Hitachi (Düsseldorf)	Multifuge 3 S-R, Zentrifuge Varifuge 3.0, Zentrifuge Spectrophotometer U-2000
Hyland Scientific (Standwood, USA)	GeneAmp® PCR System 9700, Thermocycler
Implen (München)	NanoPhotometer
Integra BioScience (Biebertal)	PIPETBOY acu, Pipettierhelfer
Kimberly-Clark Professional (Koblenz-Rheinhafen)	KimTech <sup>Science</sup> , Präzisionswischtücher
LI-COR (Nebraska, USA)	

Liebherr (Bulle, Schweiz)	Odyssey CLx
LifeTechnologies (Gibco, Karlsruhe)	Kühlschrank, Gefrierschrank
neoLab (Berlin)	Power Supply 250 EX
	Rack
Olympus (Hamburg)	Mini Star Zentrifuge
Omnilab (Bremen)	Olympus CK2 (invers), Mikroskop
Pegasus (Lübeck)	Vakuumpumpe (KNF Miniport)
Roche innovatis (Basel, Schweiz)	Semi-dry-Blot-Apparatur
Sarstedt (Nümbrecht)	CASY TT®, Zellzahlzähler
	Kryogefäß (2 ml)
	Küvetten (10 cm x 4 cm x 5 cm)
	µStrip 8er Kette
	Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml), steril
	Pipettenspitze (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
	Reagiergefäß (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)
	Schraub-Röhre (15 ml, 50 ml)
	TC 96-Well-Platte, steril
	TC Schale 10 cm Ø, steril
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	Zellschaber (25 cm Länge)
	Affymetrix™ GeneChip® Scanner
	Affymetrix™ fluidics station 450
	Affymetrix™ hybridization oven 640
	MicroAmp® optical 96-Well-reaction-plate
Tecan (Crailsheim)	MicroAmp® optical adhesive film
	Nunc™ 96-Well-Platte, weiß, durchsichtiger Boden
TPP® (Trasadingen, Schweiz)	Nunc™ 96-Well-Platte, schwarz, durchsichtiger Boden
	QuantStudio™ 7 Flex, qPCR
	NanoQuant infinite M200
VWR™ (Darmstadt)	Kryobox
Whatman (Maidstone, UK)	Röhrchengestell
	Küvettenständer
	Filterpapier

**Tabelle 2.1: Verwendete Materialien und Geräte mit den Herstellern**

## 2.2 Chemikalien

In der folgenden Tabelle haben alle verwendeten Chemikalien den Reinheitsgrad pro analysis (p. a.).

Hersteller	Chemikalien
Absource (München)	Tepotinib
AppliChem (Darmstadt)	Bis-/Acrylamid-Lösung (30 %)
Bio&Sell (Nürnberg)	FCS (Fötales Kälberserum)
Biomol GmbH (Hamburg)	SPA70
Bio-Rad Laboratories (München)	Bio-Rad Protein Assay Standard II
Biowest (Nuaille, Frankreich)	ultra-pure-Wasser
Carl Roth (Karlsruhe)	Aprotinin
	Roti®-Nanoquant Dye Reagent
	Ethanol (70 %)
	Glycin
	HCl (Salzsäure)
	Kaliumchlorid
	Kaliumdihydrogenphosphat
	Leupeptin
	Magnesiumchlorid
	β-Mercaptoethanol
	Natriumchlorid
	Pepstatin
	PIPES/NaOH (Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)), (pH 6,5)
	PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
	SDS (Natriumdodecylsulfat)
	TEMED (N, N, N, N-Tetramethylethylenediamin)
	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
LI-COR (Nebraska, USA)	Chamäleon Duo Größenmarker
	Odyssey blocking buffer
Life Science, Gibco (Karlsruhe)	DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)
	PBS (Phosphat-gepufferte-Salzlösung)
	Penicillin/Streptomycin-Lösung
	RPMI 1640
	APS (Ammoniumpersulfat)
Merck (Darmstadt)	Bromophenolblau
	CHAPS (3-3-Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat)
	Di-Natriumhydrogenphosphat
	DMSO (Dimethylsulfoxid)
	DTT (Dithiotreitol)
	Tween-20
PAN-Biotech (Aidenbach)	Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat)
Qiagen (Hilden)	RNAse-free water

Santa Cruz (Heidelberg)	Cobicistat
	Flunarizin
	HET-0016
	Ketoconazol
	Telmisartan
	Troleandomycin
Schärfe System (Hamburg)	CASYton isotonische Salzlösung
Sigma (München)	BSA (Bovines Serumalbumin)
	Phosphatase Inhibitor Cocktail II
	Talarozol
Tocris (Wiesbaden)	all-trans-Retinsäure
	Liarozol
	BAPTA
	Lidocain
	Verapamil
	Rifampicin
	Fenretinid
	Rapamycin

**Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien mit den Herstellern**

## 2.3 Kits

In der folgenden Tabelle sind alle Kits aufgelistet, die für die unter 3 *Methoden* beschriebenen Versuche verwendet wurden:

Hersteller	Kit
Omega bio-tek (Norcross, USA)	E.Z.N.A. Total RNA Kit
Promega (Mannheim)	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay
	CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay
	Cell Proliferation ELISA/ BrdU Assay
R&D Systems (Minneapolis, USA)	Human IGF-II/IGF2 Quantikine ELISA Kit
Sigma Aldrich (Taufkirchen)	Human HGF Quantikine ELISA Kit
Thermo Fisher Science (Darmstadt)	Fluo-4 NW Calcium Assay Kit
	GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit
	GeneChip® WT Hybridization, Wash and Stain Kit
	High capacity cDNA Reverse Transcription Kit
	Subcellular Protein Fractionation Kit

**Tabelle 2.3: Verwendete Kits mit den Herstellern**

## 2.4 Taq-Man-Assays

Folgende Tabelle zeigt alle Taq-Man-Assays, die der Firma Thermo Fisher Scientific aus Darmstadt entstammen. Diese wurden für die 3.3.4 *Quantitative realtime-polymerase-chain-reaction* eingesetzt:

Katalognummer	Genname
Hs00275636_m1	CRABP2 (cellular retinoic acid-binding protein 2)
Hs00356035_m1	CYP2J2
Hs00241417_m1	CYP3A5
Hs00175627_m1	CYP26A1
Hs01011223_m1	CYP26B1
Hs0651645_m1	CYP4V2
Hs03044281_g1	YWHAZ

**Tabelle 2.4: Verwendete Taq-Man-Assays mit den Katalognummern**

## 2.5 Antikörper

Im Folgenden sind alle verbrauchten Primärantikörper (pAK) und Sekundärantikörper (sAK) gezeigt, die für unterschiedliche Ansätze in 3.2.3 *Western Blots* eingesetzt wurden.

Hersteller	pAK *	Verdünnung und Puffer **	sAK *	Verdünnung und Puffer	Lagerungs-temperatur
Santa Cruz	CYP3A4/5	1:500	mouse	1:5000	4 °C
MyBiosource	CYP26A1	1:500	rabbit	1:5000	-20 °C
Santa Cruz	CYP26B1	1:1000	mouse	1:5000	4 °C
Santa Cruz	CYP2J2	1:1000	mouse	1:5000	4 °C
Santa Cruz	CYP4V2	1:500	mouse	1:5000	4 °C
Santa Cruz	Beta-Actin	1:1000	mouse	1:5000	4 °C
CST ***	phospho-Akt	1:1000	rabbit	1:5000	-20 °C
Santa Cruz	Akt	1:1000	mouse	1:5000	4 °C
CST	phospho-ERK1/2	1:2500	rabbit	1:5000	-20 °C
Santa Cruz	ERK 1/2	1:750	mouse	1:5000	4 °C
CST	Cleaved Caspase 3	1:1000	rabbit	1:5000	-20 °C
Santa Cruz	Caspase 3	1:1000	rabbit	1:5000	4 °C
Santa Cruz	JNK	1:1000	mouse	1:5000	4 °C
Promega	Phospho-JNK	1:1000	rabbit	1:5000	-20 °C
CST	LC3B	1:1000	rabbit	1:5000	-20 °C

**Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper für Western Blots**

\* pAK = Primärantikörper; sAK = Sekundärantikörper, mouse (Maus), rabbit (Kaninchen);

\*\* verwendeter Puffer: blocking solution mit Tween; \*\*\* CST = Cell Signalling Technology

## 2.6 Softwares

Die angegebenen Softwares und Internetseiten wurden zur Auswertung der Versuchsansätze herangezogen.

Hersteller	Software
Bioinformatics Resource Portal (Lausanne, Schweiz)	<a href="https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_2092">https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_2092</a> (zuletzt aufgerufen am 15.05.2024) <a href="https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0019">https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0019</a> (zuletzt aufgerufen am 15.05.2024)
GraphPad (La Jolla, USA)	Prism 7.0
LI-COR (Nebraska, USA)	Image-Studio Software
Microsoft (Redmond, USA)	Excel
Tecan (Crailsheim)	i-Control 1.7 Software
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	Affymetrix® Expression Console QuantStudio™ Real-Time PCR Software Transcriptome Analysis Console

**Tabelle 2.6: Verwendete Softwares und Websites**

Die Softwares wurden mit dem Betriebssystem Windows ausgeführt

## 2.7 Statistik

Die Versuchsauswertung erfolgte, sofern es in den Methoden nicht anders beschrieben wurde, mit der Statistiksoftware *GraphPad Prism*, indem eine ANOVA-Testung mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde. Mit  $p < 0,05$  wurde das Signifikanzniveau festgelegt. Alle Versuche wurden mindestens in drei Versuchsansätzen durchgeführt.



### 3 Methoden

Bei den humanen Neuroblastomzelllinien Kelly und SH-SY5Y handelt es sich um adhärenzte Zellen, die in einem Monolayer auf unbeschichteten Kunststoffplatten wachsen. Die Kelly-Zelllinie wurde aus dem Neuroblastom eines einjährigen Mädchens etabliert, die SH-SY5Y-Zelllinie aus dem Neuroblastom eines vierjährigen Mädchens (Pezzini et al. 2017).

#### 3.1 Zellkultur

Kunststoffplatten mit einem Durchmesser von 10 cm wurden für die Haltung sowie für alle anderen Versuche verwendet mit Ausnahme der 3.1.9 *Viabilitätsassays*, die in 96-Well-Platten durchgeführt wurden. Folgende Zellzahlen wurden für die unterschiedlichen Versuchsansätze benötigt:

Versuch	Kelly-Zellen	SH-SY5Y-Zellen
Haltung	0,3 - 0,6 x 10 <sup>6</sup> (1 Woche)	1,2 - 1,8 x 10 <sup>6</sup> (1 Woche)
Lysen und RNA-Isolation *	1 - 1,8 x 10 <sup>6</sup> (Lyse nach 2 - 4 Tagen)	1,8 - 2 x 10 <sup>6</sup> (Lyse nach 2 - 4 Tagen)
96-Well Platte *	0,01 - 0,045 x 10 <sup>6</sup>	0,03 - 0,045 x 10 <sup>6</sup>

**Tabelle 3.1: Zellzahl der Neuroblastomzellen je nach Versuch**

\* Die Zellzahlen variierten abhängig von der Inkubationszeit vor Stimulation

##### 3.1.1 Kultivierung

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank, die ordnungsgemäß 30 Minuten vor Benutzung eingeschaltet und mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurde. Die Versuchsplatten lagerten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid. Zur Beurteilung des Zellwachstums, der Differenzierung oder Kontamination wurden die Zellkulturplatten unter dem Mikroskop untersucht. Die Nährmedien (Tabelle 3.1.1), welche bei 4 °C gelagert wurden, wurden 30 Minuten vor Benutzung im 37 °C Wasserbad erwärmt, bevor das Medium auf den unbeschichteten 10-cm-Kunststoffplatten mit einem Volumen von 7 ml alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde.

Kelly-Zellen	SH-SY5Y-Zellen
500 ml RPMI-1640	500 ml DMEM
10 % FCS	20 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin	1 % Penicillin/Streptomycin

**Tabelle 3.1.1: Zusammensetzung der Nährmedien für Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

### 3.1.2 Passagieren

Einmal pro Woche konnten die Zelllinien ab einer Konfluenz entsprechend von 75 – 80 % umgesetzt werden. Um die Kelly- und SH-SY5Y-Zellen in die nächste Passage zu überführen, wurden die 7 ml Nährmedium von den Zellen mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die 10-cm-Kunststoffplatten wurden mit 2 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen der 2 ml PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA versetzt, woraufhin die Kelly-Zellen sechs Minuten und die SH-SY5Y-Zellen 10 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Leistung im Brutschrank inkubiert wurden. Um die Reaktion des Trypsins zu stoppen, wurde den Zellen nach Inkubation 5 ml entsprechendes Nährmedium zugegeben. Die Hälfte der Flüssigkeit wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt, während die Restflüssigkeit in der Kunststoffplatte resuspendiert wurde, um die übrigen Zellen vom Schalenboden zu lösen. Nach Überführung der Restflüssigkeit in das 15-ml-Röhrchen wurde dieses bei 1000 rpm zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet wurde zunächst in 2 ml frischem Medium und anschließend mit weiteren 5 ml Medium nochmals resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 25 µl in 5 ml isotonischer CASY-Ton-Lösung pipettiert und am CASY-Gerät gezählt. Das Gerät enthält eine mit Spannung angelegte Messkapillare, in welcher der Widerstand der Zellen gemessen wird, um somit auf die Viabilität und Zellgröße zu schließen. Viable Zellen besitzen einen größeren Widerstand als tote Zellen. Das Gerät gibt die Zellzahl pro ml Medium an. Damit das passende Volumen an Zellsuspension für die neuen Haltungsplatten, unterschiedliche Versuchsbedingungen oder 96-Well-Platten ermittelt werden konnte, wurde mittels folgender Gleichung verfahren:

$$\text{Volumen(ml) der Zellsuspension} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{Zellzahl ermittelt durch CASY}}$$

Für die 10-cm-Kunststoffplatten wurde das entsprechende Volumen Zellsuspension auf die 7 ml neues Medium zugegeben. Das berechnete Volumen für ein Well einer 96-Well-Platte wurde mit 100 multipliziert und die Differenz zu 11 ml wurde mit dem Nährmedium aufgefüllt, um dann 100 µl Zellsuspension in ein Well zu überführen.

Um die Veränderung der Zellen zu minimieren und damit die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurden Zellen in den Passagen 1 bis 20 verwendet.

### 3.1.3 Einfrieren und Auftauen

Um beide Zelllinien einzufrieren und auf Vorrat zu halten, wurden die Zellen von den Platten gelöst und durch Zentrifugieren pelletiert (3.1.11 *Pelletherstellung*). Die Zellen einer Platte wurden mit 2 ml Einfriermedium (Nährmedium mit zusätzlich 10 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und anschließend in sterile Kryogefäße mit jeweils 500 µl der Zellsuspension gefüllt. Zunächst wurden die Zellen jeweils für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend auf Eis inkubiert und für 45 Minuten bei –20 °C eingefroren, um danach bei –80 °C gelagert zu werden.

Zur Benutzung in der Zellkultur wurden die eingefrorenen Zellsuspensionen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. In einer 10-cm-Kunststoffplatte wurden die Zellen zu 7 ml Nährmedium, ebenfalls bei 37 °C erwärmt, hinzugefügt und im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde 24 Stunden später gewechselt, woraufhin die Zellen für die Haltung und Versuche standardmäßig umgesetzt wurden.

### 3.1.4 Stimulation mit Retinsäure

Beide Zelllinien wurden in allen Versuchen mit 5 µM all-trans-Retinsäure stimuliert und für 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden oder zehn Tage inkubiert.

### 3.1.5 Stimulationsschemata

Für verschiedene Versuchsansätze wurden die Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit verschiedenen Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen zu bestimmten Inkubationszeiten stimuliert (Tabelle 3.1.2). Dabei erfolgte die Stimulation in 96-Well Platten für diverse Assays oder in 10-cm-Kunststoffplatten für 3.2. *Proteinextraktionen und Proteinlysen* und den daraus folgenden 3.2.6. *Western Blots*.

Substanz	Konzentrationen	Inkubationszeiten
BAPTA-AM	1 µM, 5 µM, 10 µM	24 h, 48 h, 72 h *
Cobicistat	10 µM	72 h
Fenretinid	2 µM, 5 µM	72 h
Flunarizin	10 µM, 15 µM, 20 µM, 50 µM	24 h, 48 h, 72 h
HET-0016	1 µM, 5 µM, 10 µM	24 h, 48 h, 72 h
Ketoconazol	1 µM, 10 µM	24 h, 48 h, 72 h

Liarozol	1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	24 h, 48 h, 72 h
Lidocain	1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	24 h, 48 h, 72 h
Rapamycin	1 $\mu$ M	24 h, 48 h, 72 h
Rifampicin	10 $\mu$ M	72 h
SPA70	1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	72 h
Talarozol	1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	24 h, 48 h, 72 h
Telmisartan	10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M	24 h, 48 h, 72 h
Tepotinib	5 $\mu$ M	72 h
Troleandomycin	10 $\mu$ M	72 h
Verapamil	10 $\mu$ M	24 h, 48h, 72h

**Tabelle 3.1.2: Stimulation der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit unterschiedlichen Substanzen**

\* h: Stunden

### 3.1.6 Zell-Viabilitätsassay

Das CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wurde durchgeführt, um die Anzahl an viablen Zellen zu bestimmen. Dies erfolgte, nachdem die Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit all-trans-Retinsäure und unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen Substanzen (Tabelle 3.1.2) stimuliert wurden. Die Zellen wurden durch das CellTiter-Glo®-Reagenz lysiert, woraufhin zelluläres ATP freigesetzt wurde. Über die Katalyse durch die Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase reagierten Luciferin und ATP zu Oxyluciferin und AMP, wobei die Menge des Oxyluciferin luminometrisch bestimmt wurde. Das kurzfristig verwendete Reagenz lagerte bei 4 °C und musste vor jeder Verwendung in zehn Minuten bei Raumtemperatur leicht erwärmt werden. Unter der sterilen Arbeitsbank wurden 40  $\mu$ l von dem Reagenz zu den stimulierten Zellen mit 100  $\mu$ l Medium pro Well pipettiert. Nach zehn Minuten abgedunkelter Inkubation wurden die insgesamt 140  $\mu$ l Suspension in eine weiße Nunc™-96-Well-Platte überführt. Die Messung erfolgte im NanoQuant infinite M200 mittels der zugehörigen Software i-Control 1.7.

### 3.1.7 BrdU-Inkorporation

Mittels dem Cell Proliferation ELISA/BrdU-Assay kann der Umsatz von DNA-Synthese, und damit die Zellproliferation, gemessen werden. Als Thymidin-Analogon wird BrdU (Bromodesoxyuridin) während der Synthesephase im Zellzyklus in die DNA eingebaut. Folgende Lösungen waren im Kit enthalten und wurden bei 4 °C gelagert:

Lösung	Verdünnung
labeling solution	1:100 mit Medium der Kelly-Zellen verdünnt
FixDenat	unverdünnt
anti-BrdU-POD working solution	1:100 mit Aqua dest. verdünnt
washing solution	1:10 mit PBS verdünnt
substrate solution	unverdünnt

**Tabelle 3.1.3: Substanzen des Cell Proliferation ELISA/ BrdU Assays**

Das Assay wurde an zwei Tagen durchgeführt. Am ersten Tag wurden 10 µl pro Well von der verdünnten *labeling solution* auf die stimulierten 96-Well-Platten gegeben. Der Überstand wurde nach 24 Stunden abgesaugt und die Wells wurden mit jeweils 150 µl FixDenat versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Wells wurden mit jeweils 100 µl anti-BrdU-POD *working solution* versetzt. Der Lösung wurde nach weiteren 90 Minuten Inkubation abgesaugt und die Wells wurden dreimal mit 150 µl der verdünnten *washing solution* versetzt und abgesaugt. Nach dem letzten Waschdurchgang wurden 100 µl der *substrate solution* auf die Wells pipettiert. Die Messung konnte nach 15 Minuten Inkubation im NanoQuant infinite M200 mittels der zugehörigen Software i-Control 1.7 bei einer Wellenlänge von 370 nm (Referenzwellenlänge 492 nm) erfolgen.

### 3.1.8 CytoTox-Assay

Mithilfe des CytoTox-Glo™-Assays kann die Zytotoxizität in Zellen durch den Anteil an toten Zellen bestimmt werden. Hierzu wird das AAF-Glo™ *substrate* (Alanyl-alanyl-phenylalanyl-Aminoluciferin) genutzt, welches von den Proteasen der Zellen gespalten wird, die ihre Membranintegrität verloren haben und ihre Proteasen ins Medium freigesetzt haben. AAF-Glo™ *substrate* kann die Membran von lebenden Zellen nicht passieren. Das aus den Proteasen resultierende Produkt Aminoluciferin wird durch eine Luciferase (Ultra-Glo™ *recombinant luciferase*) umgesetzt, was ein luminometrisch messbares Signal erzeugt. Im Kit enthalten waren das AAF-Glo™ *substrate* und das *assay buffer*, welche bei - 20 °C gelagert wurden.

Zu Beginn wurden die Lösungen des Assays im 37 °C Wasserbad aufgewärmt. Daraufhin wurde das *assay buffer* dem AAF-Glo™ *substrate* zugesetzt und ausreichend vermischt. Die für das CytoTox-Glo™-Assay zu untersuchenden Zellen

wurden auf einer weißen 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät. Pro Well wurden 50 µl aus der Mischung des *assay buffer* und dem AAF-Glo™ *substrate* pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Lumineszenz im NanoQuant infinite M200 mittels der zugehörigen Software i-Control 1.7 gemessen (Anregung bei 560 nm und Referenz 590 nm).

### 3.1.9 ELISA-Assay

Mittels ELISA-Assay können durch eine chromogene Antikörper-Substrat-Reaktion quantitativ gezielte Substanzen in den Zellen nachgewiesen werden. Für diese Arbeit wurden das Human HGF Quantikine ELISA Kit und Human IGF-II/IGF2 Quantikine ELISA Kit verwendet, um die Spiegel der Wachstumsfaktoren HGF und IGF2 im Zellkulturüberstand zu bestimmen. Folgende Reagenzien waren im Kit jeweils enthalten:

HGF Assay	IGF2 Assay
wash buffer (20 ml wash buffer auf 480 ml Aqua bidest.)	wash buffer (20 ml wash buffer auf 480 ml Aqua bidest.)
substrate solution (color reagents A+B Verdünnung 1:1)	substrate solution (color reagents A+B Verdünnung 1:1)
calibrator diluent RD5P	calibrator/assay diluent RD5-42
assay diluent RD1-38	human IGF2 conjugate (1X)
humaner HGF Standard	humaner IGF2 Standard
12 x 8 Polypropylene Wells	12 x 8 Polypropylene Wells
stop solution	stop solution
	pretreatment G
	pretreatment H

**Tabelle 3.1.4: Reagenzien der ELISA-Assays für HGF und IGF2**

In beiden Assays kommt das Prinzip des „*Sandwich-ELISA*“ zur Anwendung. Dazu werden 96-Well-Platten verwendet, deren Wells bereits mit Antikörpern gegen den jeweiligen Wachstumsfaktor beschichtet sind. Die Wells dieser Platten wurden mit jeweils 100 µl *assay diluent* RD 1-38 (HGF) oder 50 µl *calibrator diluent* RD5-42 (IGF2) versetzt. Zur Erstellung der Standardreihe wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mittels humanen HGF-Standards bzw. humanen IGF2-Standard eine Verdünnungsreihe angesetzt (die Verdünnung erfolgte mit RD5P bzw. RD5-42). Für das HGF-Assay

erfolgte für Kelly keine Verdünnung des Überstands, für SH-SY5Y wurde der abgenommene Zellkulturüberstand mit RD5P im Verhältnis 1:1 versetzt.

Für das IGF2-Assay wurden 50 µl des Überstandes von beiden Zelllinien mit 50 µl einer *pretreatment*-G-Lösung versetzt, zehn Minuten inkubiert und mit 50 µl einer *pretreatment*-H-Lösung neutralisiert. Vom Kelly-Überstand wurden 10 µl dieses vorbehandelten Überstandes mit 50 µl RD5-42 verdünnt, der SH-SY5Y-Überstand blieb unverdünnt. Daraufhin wurden für beide Assays jeweils 50 µl vom Standard bzw. von dem Zellkulturüberstand in die Wells gegeben und für zwei (HGF) bzw. eine (IGF2) Stunde(n) auf dem Schüttler Polymax 2040 inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und mit 400 µl eines *wash buffers* dreimal gewaschen. Die Wells wurden jeweils mit 200 µl humanem HGF/IGF2 *conjugate* versetzt und eine (HGF) bzw. zwei (IGF2) Stunde(n) auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Wells erneut dreimal gewaschen. Die HGF-Reihe wurde mit 200 µl Streptavidin-HRP versetzt und für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang mit dem *wash buffer* wurden 200 µl der *substrate solution* für beide Assays zugegeben und für 30 Minuten abgedunkelt inkubiert. Mit 50 µl einer *stop solution* erfolgte ein Farbumschlag von blau zu gelb. Im NanoQuant infinite M200 mittels der zugehörigen Software i-Control 1.7 wurden die Wells innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 540 nm (Referenzwellenlänge 450 nm) gemessen.

### 3.1.10 Calcium-Assay

Mittels dem Fluo-4-NW-Calcium-Assay-Kit kann die Menge an intrazellulärem Calcium mittels Fluoreszenz gemessen werden. Die Stimulation der Zellen erfolgte in schwarzen 96-Well-Platten, in denen die Zellen auch ausgesät wurden (Tabelle 3.1.2). Es wurden folgende Materialien für die Durchführung der Calciummessung benötigt:

Reagenz	Menge
Fluo-4 NW dye mix	1 Flasche pro Platte
Probenecid stock solution	250 µl in 1 ml Assay Buffer
assay buffer	10 ml pro Platte
dye loading solution	10 ml Assay buffer und 100 µl Probenecid stock solution

**Tabelle 3.1.5: Reagenzien des Fluo-4 NW-Calcium-Assay-Kits**

Zu Beginn wurde die Färbelösung angesetzt, indem 10 ml *assay buffer* mit 100 µl Probenicid *stock solution* in einer Flasche Fluo-4 NW *dye mix* gemischt wurden. Danach wurde der Überstand in den 96-Well-Platten abgesaugt, die Zellen mit jeweils 100 µl *dye loading solution* pro Well versetzt und zunächst für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für weitere 30 Minuten wurde die Platte bei Raumtemperatur gelagert, bevor die Stimulation erfolgte. Zum Abschluss wurde die Messung im NanoQuant infinite M200 mittels der zugehörigen Software i-Control 1.7 bei einer Wellenlänge von 494 nm (Anregung) und 516 nm (Emission) durchgeführt.

### 3.1.11 Pellet-Herstellung

Für eine RNA-Isolierung mit mindestens  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen oder DNA-Isolierung mit mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen wurden Zellpellets benötigt. In den 10-cm-Kunststoffplatten wurden die 7 ml Medium entfernt und die Zellen mit 800 µl PBS gespült. Nach erneuter Gabe von 800 µl PBS wurden die Zellen mit einem Schaber von den Platten gelöst und die Zellsuspension in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Zellsuspension bei 4 °C fünf bis zehn Minuten und bei 1200 rpm zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde bei -80 °C eingefroren, sodass es zu jedem beliebigen Zeitpunkt verwendet werden konnte.



## 3.2 Proteinextraktion und Proteinanalyse

Für die Ganzzelllysate wurde eine Zellzahl von  $1 - 2 \times 10^6$  benötigt. Die Zellen wurden vor der Aufarbeitung mit unterschiedlichen Substanzen stimuliert (Tabelle 3.1.2).

### 3.2.1 Denaturierende Ganzzelllyse

Die Ganzzelllyse mittels DLB (*denaturing lysis buffer*) diente der Extraktion der zellulären Proteine von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen, die für 3.2.4.2 *Western Blots* verwendet wurden.

Menge [ml] / Konzentration	Reagenz
2 %	SDS
20 mM	Tris (pH 7,4)

**Tabelle 3.2.1: Zusammensetzung des zweifachen DLB-Lysispuffers**

Lagerung bei Raumtemperatur

Der zweifache DLB-Lysis-Puffer (Tabelle 3.2.1) wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit *ultra-pure*-Wasser verdünnt, welcher direkt vor jeder Lyse mit 1 % (10 µl pro ml) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II versetzt wurde. Nach einmaligem Waschen mit 800 µl PBS wurden die Zellen in einem Volumen von 800 µl PBS von den Platten abgeschabt, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, woraufhin das Pellet, abhängig von der Größe, mit 30 – 100 µl DLB-Puffer resuspendiert wurde.

Nach fünfminütigem Kochen im Heizblock bei 95 °C, einer 2 x 5-sekündigen Lyse mittels Ultraschallstab und 15-minütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand der Lysate in neue 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Dieser Überstand wurde für die 3.2.3 *Proteinbestimmung* benötigt.

### 3.2.2 Caspase-Lyse

Die Caspase-Lyse diente dem Nachweis von aktivierter Caspase 3, um somit Apoptose als Zelltod in den behandelten Zellen zu bestätigen. Als Lysispuffer wurde *chaps cell extract buffer* verwendet, der sich wie folgt zusammensetzt:

Menge [ml] / Konzentration	Reagenz
50 mm	PIPES / NaOH (pH 6,5)
2 mm	EDTA
0,1 %	Chaps

**Tabelle 3.2.2: Zusammensetzung des *Chaps cell extract buffers***

Lagerung bei 4 °C

Weitere Substanzen wurden ergänzend auf 1 ml *chaps cell extract buffer* zugefügt:

Menge [ml] / Konzentration	Reagenz
10 µl (1 mm)	PMSF
4 µl (20 µg pro ml)	Leupeptin
5 µl (5 mm)	DTT
1 µl (10 µg pro ml)	Aprotinin
5 µl (10 µg pro ml)	Pepstatin

**Tabelle 3.2.3: Ergänzende Reagenzien zum *Chaps cell extract buffers***

Lagerung bei –20 °C

Um die Oxidation von Disulfidbrücken der Proteine zu verhindern, wurde DTT zugegeben. Die anderen Reagenzien (Tabelle 3.2.3) dienen der Inhibition von Proteasen in den Zellen.

Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen und mit 800 µl PBS abgeschabt wurden, wurden diese in einer Tischzentrifuge pelletiert, woraufhin der Überstand verworfen wurde. Je nach Pelletgröße wurden 25 µl bis 50 µl des Puffers zugegeben, um das Pellet dann zu resuspendieren. Zur Zerstörung der Zellmembran und Freisetzung der intrazellulären Proteine wurden die Zellen insgesamt dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Daraufhin wurde die Zell-Puffer-Suspension für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, um so die 3.2.3 *Proteinmenge* bestimmen und im 3.2.4.2 *Western Blot* auftragen zu können.

### 3.2.3 Membranprotein-Lyse

Mittels Membranprotein-Lyse können die Zellbestandteile nach einer zytoplasmatischen, membranösen und restlichen (Kernanteile, mikrosomale Anteile) Fraktion getrennt werden. Dafür wurde das Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells verwendet. Alle im Kit enthaltenen Pufferlösungen wurden volumenanteilig mit 1 % eines Phosphatase- und Protease-Inhibitors versetzt.

Zunächst wurden die Zellen mit PBS (4 °C) gespült, mit 800 µl PBS von der Platte abgeschabt und mittels Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde für den zytoplasmatischen Anteil in 200 µl mit dem im Kit enthaltenen Puffer CEB resuspendiert, zehn Minuten auf Eis inkubiert und dabei vorsichtig drei- bis viermal gevortext. Nach kurzer Zentrifugation (fünf Minuten, 500 x g), wurde der Überstand, der der zytoplasmatischen Fraktion entsprach, in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 200 µl MEB resuspendiert, zehn Minuten auf Eis inkubiert und während dieser Zeite mehrfach vorsichtig gevortext. Nach erneuter Zentrifugation (fünf Minuten, 3000 x g) wurde der Überstand, entsprechend der membranösen Fraktion, in ein weiteres 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Im verbliebenen Pellet waren die restlichen zellulären Fraktionen enthalten, die mit Hilfe der DLB-Lyse (3.2.1 *Denaturierende Ganzzelllyse*) aufgearbeitet wurden.

### 3.2.4 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden zwei Standard-Proteinlösungen mit definierter Konzentration, BSA-Lösung mit 1,4 mg/ ml, hergestellt. Der Standard 1 entsprach einer Konzentration von 0,1 mg/ ml aus 65 µl *ultra-pure*-Wasser mit 5 µl Proteinstandard und der Standard 2 entsprach einer Konzentration von 0,2 mg/ ml aus 60 µl *ultra-pure*-Wasser und 10 µl Proteinstandard. Von den Lysaten wurde eine Verdünnung von 1:50 mit *ultra-pure*-Wasser hergestellt. Die Messung erfolgte in Plastikküvetten. Dazu wurden jeweils 20 µl *ultra-pure*-Wasser (Leerwert), 20 µl der beiden Standards sowie 20 µl der verdünnten Lysate in eine Küvette pipettiert und mit 980 µl einer Färbelösung gemischt, die zuvor mit Aqua bidestillata aus einer fünfmal konzentrierten Lösung hergestellt wurde. Anschließend wurden die befüllten Küvetten mit dem Reax 2000 gevortext und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblau verändert sich von 465 nm zu 595 nm, wenn es unspezifisch an Aminosäuren im Lysat bindet. Die Proteinkonzentration wurde im Photometer durch die Absorption, abzüglich des Leerwerts, mittels folgender Gleichung ermittelt:

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

Der Verdünnungsfaktor entsprach 50; als Standardwert wurde jener einkalkuliert, dessen Absorption der Absorption der Probe am ähnlichsten war. Anschließend

wurden die Proteinüberstände bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, nachdem diese mit Stickstoff eingefroren wurden.

### 3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

#### 3.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können im Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt werden, wenn sie zuvor mit SDS behandelt wurden. Dadurch werden die Proteine denaturiert und verfügen über entsprechend viele negative Ladungen proportional zu ihrem Molekulargewicht. Das Auftrennen erfolgt über ein Trenngel (Tabelle 3.2.5).

Mittels des Mini-Protean®Tetrasystems, einem Kammersystem, wurden die Gele hergestellt. Nach der Reinigung der zwei für das Kammersystem benötigten Glasplatten mit Aqua bidestillata und 70%igem Ethanol wurden diese in der Halterung der Kammer befestigt. Anschließend wurden die Bestandteile für das Sammel- (Tabelle 3.2.4) und Trenngel (Tabelle 3.2.5) jeweils in einem 15-ml-Schraubröhrchen gemischt. Dabei reagieren Acrylamid und Bisacrylamid miteinander, wenn TEMED diese Reaktion startet und APS katalysiert. Die Ansätze für das Trenn- und Sammelgel wurden nach der TEMED-Zugabe schnell zwischen den Glasplatten (Breite 8,5 mm und Dicke 1,5 mm) gegossen. Je nach Größe des Zielproteins betrug der Acrylamidanteil 10 %, 12 % oder 15 % (Tabelle 3.2.5). Als Erstes wurde das Trenngel angesetzt, zwischen die Glasplatten gegossen und mit Aqua bidestillata zum Glätten überschichtet. Nach 30 Minuten wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel (inkl. TEMED) auf das polymerisierte Trenngel gegeben. Nach Einsetzen eines Kammes in das Sammelgel erfolgte die Polymerisation.

Reagenz	Volumen
Acrylamid <sup>1</sup>	670 $\mu\text{l}$
Aqua bidestillata	2,3 ml
Sammelgelpuffer (4X) <sup>2</sup>	1,0 ml
APS (10 %) <sup>3</sup>	30 $\mu\text{l}$
TEMED	9 $\mu\text{l}$

**Tabelle 3.2.4: Zusammensetzung des Sammelgels (insgesamt 6 ml)**

<sup>1</sup> Acrylamid/bis-acrylamid Lösung (im Verhältnis 37,5:1, Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

<sup>2</sup> 4  $\times$  Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris (pH auf 6,8 mit HCl), 0,4 % SDS

<sup>3</sup> 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in Aqua bidestillata, abgedunkelte Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Acrylamid <sup>1</sup>	Aqua bidest.	Trennpuffer (4X) <sup>2</sup>	APS (10 %) <sup>3</sup>	TEMED
10 %-Gel (> 60 kDA)	3,33 ml	4,17 ml	2,5 ml	50 µl	9 µl
12 %-Gel (30 - 60 kDA)	4 ml	3,5 ml	2,5 ml	80 µl	9 µl
15 %-Gel (10 - 30 kDA)	5,025 ml	2,48 ml	2,48 ml	80 µl	9 µl

**Tabelle 3.2.5: Zusammensetzung des Trenngels (insgesamt 10 ml)**

<sup>1</sup> Acrylamid/bis-acrylamid Lösung (im Verhältnis 37,5:1, Lagerung bei 4 °C)

<sup>2</sup> 4 × Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (pH auf 8,8 mit HCl), 0,4 % SDS

<sup>3</sup> 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in Aqua bidestillata, abgedunkelte Lagerung bei 4 °C

Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Gele bei 4 °C gelagert oder direkt in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese wurde mit Elektrophoresepuffer (Tabelle 3.2.6) aufgefüllt. Mögliche Gelreste wurden über das Spülen mit einer Pipette aus den Geltaschen entfernt.

Menge [ml] / Konzentration	Reagenz
0,25 M	Tris (pH auf 8,3 mit HCl)
2 M	Glycin
0,03 M	SDS

**Tabelle 3.2.6: Zusammensetzung des 10X Elektrophoresepuffers**

Lagerung bei Raumtemperatur; vor Einsatz wurde der Elektrophoresepuffer mit Aqua bidestillata im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Um die Proteinproben gleichmäßig auftragen zu können, wurde das benötigte Volumen für 20 µg Protein pro Probe auf 8 µl mit *ultra-pure*-Wasser aufgefüllt, woraufhin 2 µl (5-fach) *sample buffer* (Tabelle 3.2.7) zugefügt wurde. Nach der Probenverdünnung wurden diese in einem Heizblock für 5 Minuten bei 95 °C gekocht.

Menge [ml] / Konzentration	Reagenz
312,5 mm	Tris (pH auf 6,8 mit HCl)
10 %	SDS
10 %	2-Mercapto-Ethanol
50 %	Glycerol
einige Kristalle	Bromophenolblau

**Tabelle 3.2.7: Zusammensetzung des fünffachen *sample buffers***

Lagerung bei 4 °C

Die insgesamt 10 µl pro Probe wurden kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. In die erste Geltasche wurden 5 µl des farblichen Größenmarker Chamäleon Duo (vorher nicht erhitzt) eingebracht, um die Banden und das entsprechende Molekulargewicht der Proteine im Western Blot ablesen zu können. Nach dem Auftragen der Proteine fügten diese sich im Sammelgel zu einer Lauffront zusammen, die sich daraufhin im Trenngel nach ihrer Proteingröße auftrennten. Mit einer durchgehenden Spannung von 100 Volt wanderten die Proteine im Zeitraum von 15 - 20 Minuten durch das Sammelgel, bis sie das Trenngel erreichten. Ab dem Punkt wurde die Spannung für die verbleibende Laufzeit auf 150 Volt erhöht.

### 3.2.5.2 Western Blot

Um bestimmte Proteine aus dem SDS-Gel mit spezifischen Antikörpern nachweisen zu können, mussten die Proteine auf eine Membran übertragen werden. Die Antikörperreaktion danach besteht aus IgG-Primärantikörpern der Spezies Maus oder Kaninchen, die an das Zielprotein binden und einem zum Primärantikörper zugehörigen Sekundärantikörper (Tabelle 2.5), welcher ein Fluoreszenz-Signal nach Bindung erzeugt.

#### Semi-Dry-Blot:

Nach der SDS-Page wurde zunächst eine Glasplatte entfernt, sodass das Sammelgel mit einem Spatel vom Trenngel abgetrennt werden konnte. Das Blotten erfolgte mittels der Sandwich-Methode. Hierfür wurden 15 Whatman-Filter (9 cm x 6 cm) und eine Nitrocellulose-Membran (9 cm x 6 cm) zugeschnitten. Die Whatman-Filter wurden in folgender Reihenfolge in den Anodenpuffer 2, Anodenpuffer 1 und Kathodenpuffer (Tabelle 3.2.8) gelegt und auf einer Plexiglasplatte luftblasenfrei übereinandergeschichtet:

6 Filter mit Anodenpuffer 2

3 Filter mit Anodenpuffer 1

In Anodenpuffer 1 aktivierte Nitrocellulose-Membran

Trenngel in Kathodenpuffer tauchen und auf die Membran stapeln

6 Filter mit Kathodenpuffer

Der Stapel wurde um 180° gedreht, mit der Kathodenpufferseite nach unten, in eine Semi-Dry-Blot-Apparatur auf die Kathodenplatte überführt. Der Proteintransfer fand in 60 Minuten bei höchstens 20 V (0,8 mA/cm<sup>2</sup>, 43 mA pro Gel) statt.

Puffer	Reagenz	Konzentration / Menge [ml]
Anodenpuffer 2	Tris	300 nm
	Ethanol 100 %	20 %
Anodenpuffer 1	Tris	30 nm
	Ethanol 100 %	20 %
Kathodenpuffer	Tris	25 nm
	Aminhexansäure	40 nm
	SDS	0,01 %
	Ethanol 100 %	20 %

**Tabelle 3.2.8: Zusammenstellung der Pufferlösungen für die Western Blots**

Lagerung bei Raumtemperatur

#### Tank-Blot:

Mittels Tank-Blot können Proteine nachgewiesen werden, die im Semi-Dry-Verfahren eine geringe Übertragungseffizienz haben. Nach der SDS-Page wurde zunächst eine Glasplatte entfernt (analog zum Semi-Dry-Blot). Zur Vorbereitung wurde eine Wanne mit einfach verdünntem Tank-Blot Puffer (Tabelle 3.2.9) gefüllt und zwei Schwämme sowie vier Whatman-Filter benetzt. Danach erfolgte das Stapeln auf dem Tank-Blot Insert wie folgend:

Schwamm  
2 Filter  
Membran (nach kurzer Equilibrierung im Puffer)  
Trenngel  
2 Filter  
Schwamm

Der Blot wurde im Insert zusammengebaut, geschlossen und in die Tank-Blot-Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit einfachem Tank-Blot-Puffer und Eis zum Kühlen aufgefüllt, damit die Kammer aufgrund der Laufzeit und Spannung nicht überhitzen konnte. Der Proteintransfer fand in 60 Minuten bei höchstens 100 V und 400 mA statt.

Puffer	Reagenz	Konzentration
10X Tank-Blot Puffer	Tris	20 g
	Glycin	144 g
	Aqua dest.	Ad 1 Liter
1X Tank-Blot Puffer	10X Tank-Blot Puffer	100 ml
	Ethanol 100 %	200 ml
	Aqua dest.	Ad 1 Liter

**Tabelle 3.2.9: Zusammenstellung der Pufferlösung für Tank Blot-Puffer**

Lagerung bei 4 °C

Nach dem Blotten:

Nach dem Proteintransfer wurde der Blot abgebaut und die Membran auf eine mit einfacher TBS-Lösung benetzte Plexiglasplatte gelegt. Für die weiteren Schritte wurden die Seiten der Membran oberhalb der 90-kDa-Markierung und unterhalb der 15-kDa-Markierung zurechtgeschnitten. Die Beschriftung der Membran wurde mit Bleistift vorgenommen. Die Membran wurde in eine Plexiglaswanne überführt, mit TBS (Tabelle 3.2.10) gewaschen, mit ca. 4 ml Odyssey *blocking buffer* versetzt und für 60 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut mit 1X TBS gewaschen, der Primärantikörper zugegeben und bei 4 °C über Nacht abgedeckt auf dem Schüttler inkubiert.

Lösung	Reagenz	Menge/Konzentration	Lagerung
10X TBS	Tris/HCL	1 M, pH 7,5	4 °C
	NaCl	1,5 M	
	TBS	1:10 verdünnt	
1X TTBS	Tris/HCL	1 M, pH 7,5	4 °C
	NaCl	1,5 M	
	TBS	1:10 verdünnt	
	Tween-20	0,1 %	Raumtemperatur

**Tabelle 3.2.10: Zusammenstellung der Inkubationslösungen TBS/TTBS**

Nach einer mindestens zwölfstündigen Inkubation mit dem Primärantikörper, wurde dieser mit Hilfe einer Pipette von der Blot-Membran entfernt und eingefroren zur Wiederverwendung aufbewahrt oder verworfen. Die Membran wurde dreimal für fünf Minuten mit 1 x TTBS (Tabelle 3.2.10) gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden IRDye-Antikörper für die Detektion bei 700 nm oder 800 nm verwendet (1:5000 in TTBS verdünnt). Für die darauffolgenden Arbeitsschritte mussten die Blot-Membranen



möglichst vor Licht geschützt werden. Die Inkubationsdauer mit dem Sekundärantikörper betrug 60 Minuten. Danach wurde der Sekundärantikörper verworfen und die Membran weitere dreimal mit 1X TTBS und einmal mit 1X TBS gewaschen, bevor das Signal auf dem Odyssey CLx Scanner mit Hilfe der Image-Studio Software detektiert werden konnte.

### 3.3 Molekularbiologie

#### 3.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus den Kelly- und SH-SY5Y-Zellen erfolgte mit dem E.Z.N.A Total RNA Kit I. Die folgende Tabelle zeigt die dazu notwendigen Komponenten des Kits:

Materialien	Chemikalien
Säule	TRK Lysis Puffer
collection tube	wash buffer 1
	wash buffer 2
	DEPC water

**Tabelle 3.3.1: Chemikalien und Materialien aus dem E.Z.N.A Total RNA Kit I**

Zuvor hergestellte Zellpellets wurden in ihren 1,5-ml-Reaktionsgefäßen mit 350 µl TRK Lysis Puffer versetzt und anschließend 30 Sekunden gevortext. Daraufhin wurden 350 µl 70%igem Ethanol (nicht im Kit enthalten), dazugegeben und das Reaktionsgefäß wurde erneut 30 Sekunden gevortext. Eine Säule wurde in ein *collection tube* gestellt und der gesamte Inhalt wurde aus dem Reaktionsgefäß auf die Säule überführt. Diese wurde eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat im *collection tube* verworfen.

Die Säule wurde in ein neues *collection tube* gestellt und nach Gabe von 500 µl *wash buffer 1* wurde diese 30 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat im *collection tube* verworfen. Dann wurden 500 µl *wash buffer 2* hinzugefügt und die Säule wurde mit dem *collection tube* eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, woraufhin erneut das Filtrat verworfen wurde. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Um Restflüssigkeit zu entfernen, wurde die Säule mit dem *collection tube* eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (hier 16.873 rpm) trocken zentrifugiert.

Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und 40 µl DEPC water wurden hinzugefügt, bevor die Säule zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen blieb. Schließlich wurde die Säule zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und entfernt. Im Reaktionsgefäß blieb die isolierte RNA, die gemessen werden konnte (3.3.2 RNA-Messung) und anschließend bei –80 °C aufbewahrt werden konnte.

### 3.3.2 RNA-Messung

Die 3.3.1 RNA-Extraktion wurde für die 3.3.3 reverse Transkription und 3.3.5 Expressionsanalyse benötigt. Zur quantitativen und qualitativen Kontrolle wurde die isolierte RNA im NanoPhotometer bei einer Absorption von 260 nm gemessen. Zunächst wurde ein Leerwert des DEPC-water (3 µl) bestimmt, der von allen RNA-Werten in der Berechnung abgezogen wurde. Für das NanoPhotometer wurden 3 µl der RNA-Proben benötigt. Der Wert entsprach der Einheit ng/µl. Um die RNA auf Reinheit zu überprüfen, berechnete das NanoPhotometer den Quotienten (RNA/ DNA) aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm, welcher zwischen 1,7 und 2,1 liegen musste.

### 3.3.3 Reverse Transkription

Ausgangsmaterial für die reverse Transkription waren 1 µg isolierte mRNA, die mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben wurde, um diese für die 3.3.4 quantitative real-time-PCR zur Verfügung zu stellen. Für die reverse Transkription wurde das High capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet und der gesamte Versuchsansatz erfolgte bei 4 °C auf Eis.

Volumen	Reagenz
2 µl	10X RT buffer
0,8 µl	25X dNTPMix
2 µl	10X random primers
4,2 µl	Nuclease-freies Wasser *
1 µl	multiscribe reverse Transkriptase

**Tabelle 3.3.2: Zusammensetzung des High capacity cDNA Reverse Transcription Kit**

\* nicht im Kit enthalten

Der mRNA wurden die Reagenzien aus Tabelle 3.3.2 in angegebener Reihenfolge zugegeben. Nach anschließendem Zentrifugieren für eine Minute bei 1200 rpm inkubierte der Versuchsansatz nach dem folgenden Programm im Thermocycler, bevor die fertige cDNA bei –20 °C eingefroren wurde:

Temperatur	Zeit
25 °C	10 Minuten
37 °C	120 Minuten
85 °C	5 Minuten
4 °C	haltend

**Tabelle 3.3.3: Programm im Thermocycler für High capacity cDNA Reverse Transcription Kit**

### 3.3.4 Quantitative real-time-polymerase-chain-reaction

Mittels der quantitativen *real-time-polymerase-chain-reaction* können quantitative Aussagen bezüglich der Expression eines Kandidatengenes gemacht werden. Durch den Vergleich mit *housekeeping genes*, in allen Zellen vorkommende und unregulierte mRNAs, konnte die Expression validiert werden. Hier wurde als *housekeeping gene* YWHAZ und als Kandidatengene CYP3A5, CYP26A1, CYP26B1, CYP4V2, CYP2J2 und CRABP2 verwendet. Die Kelly- und SH-SY5Y-Zelllinien waren in zwei Ansätzen entweder unbehandelt (Kontrollen) oder mit 5 µM All-trans-Retinsäure stimuliert. Zur Detektion wurden Taqman-Assays der gesuchten Gene und *housekeeping genes* (Tabelle 2.4) sowie die revers transkribierte cDNA verwendet. Die Taqman-Assays enthalten eine Sonde mit einem Fluorophor als Farbstoff, der abgespalten wird und fluoresziert, wenn die einsträngige cDNA durch das ebenfalls enthaltene Primerpaar zu doppelsträngiger cDNA bindet. Ausgewertet wurde die Anzahl an Amplifikaten mit dem *cycle-of-threshold*-Wert (CT-Wert). Dieser gibt an, ab welchem Zyklus in der PCR das erste Mal ein Fluoreszenzsignal zu detektieren ist. Je niedriger der CT-Wert ist, desto höher ist die Expression des gesuchten Kandidatengenes.

Nach Isolierung der mRNA und Synthese von cDNA wurden Doppelversuchsansätze mit dazugehörigen Negativkontrollen (*ultrapure water*) in 96-Well-Platten in folgender Reihenfolge pipettiert:

Volumen	Reagenz
5 µl	TaqMan Universal Master Mix
2 µl	cDNA (aus Kelly-/ SH-SY5Y-Zellen)

0,5 µl  
Add 10 µl

20X TaqMan Assay  
TaqMan Wasser

**Tabelle 3.3.4: Komponenten der q-RT-PCR mittels TaqMan-Assays**

Nach Abdeckung mit einer selbstklebenden Folie (MicroAmp® *optical adhesive film*) wurden die Platten eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert und im QuantStudio™ 7 Flex mit dem dazugehörigen Programm quantifiziert. Die Daten konnten in Excel exportiert und ausgewertet werden. Um den relativen Expressionswert zu ermitteln, wurden  $\Delta CT$ -Werte berechnet und von den  $\Delta CT$ -Werten der Kontrollen abgezogen (=  $\Delta\Delta CT$ ).

$$\Delta CT = (CT\text{-Wert von Kandidatengen}) - (MW^* \text{ aus } CT\text{-Werten von } housekeeper)$$

\*MW = Mittelwert

Durch  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ergab sich der relative Expressionswert, der zusätzlich gegen den Kontrollwert normalisiert und in Prism 7.0 quantitativ ausgewertet werden konnte.

### 3.3.5 Expressionsanalyse

Mittels humanem Clariom™ D Assay wurde die Genexpression in unbehandelten Kontrollen sowie Retinsäure-stimulierten Neuroblastomzellen untersucht. Verwendet wurden pro Zelllinie jeweils zwei biologische Replikate mit jeweils zwei technischen Duplikaten von Kontrollen und Retinsäure-behandelten Zellen. Ausgangsmaterial waren für ein *template* 100 ng zugehörige mRNA (3.3.1 *RNA-Extraktion*). Sofern nicht anders angegeben, sind alle verwendeten Materialien und Kits in dieser Methode von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt). Die nächsten Versuchsschritte erfolgten nach dem Protokoll des GeneChip™ WT Plus Reagent Kit (Tabelle 3.3.5):

Tag 1: Reagenzien	Tag 1: Thermocycler-Programm*
Poly A control stock	
Poly A control diluting buffer	
nuclease-free-water	
1 <sup>st</sup> strand buffer	
1 <sup>st</sup> strand enzyme	1 <sup>st</sup> strand cDNA: 25 °C 60 Minuten, 42 °C 60 Minuten, 4 °C mind. 2 Minuten
2 <sup>nd</sup> strand buffer	
2 <sup>nd</sup> strand enzyme	2 <sup>nd</sup> strand cDNA: 16 °C 60 Minuten, 65 °C 10 Minuten, 4 °C mind. 2 Minuten
IVT buffer	

IVT enzyme	cRNA: 40 °C 16 Stunden, 4 °C hold
<b>Tag 2: Reagenzien</b>	<b>Tag 2: Thermocycler-Programm*</b>
nuclease-free-water	65°C 10 Minuten
Ethanol 80 % und 100 % (nicht im Kit enthalten)	
beats	
2 <sup>nd</sup> cycle Primer	2 <sup>nd</sup> cycle primer annealing: 70 °C 5 Minuten, 25 °C 5 Minuten, 4 °C 2 Minuten
2 <sup>nd</sup> cycle ss cDNA buffer	
2 <sup>nd</sup> cycle ss cDNA enzyme	2 <sup>nd</sup> cycle ss cDNA: 25 °C 10 Minuten, 42 °C 90 Minuten, 70 °C 10 Minuten, 4 °C hold
RNase H	RNA-Hydrolyse: 37 °C 45 Minuten, 95 °C 5 Minuten, 4 °C hold
10X cDNA fragmentation buffer	
UDG	
APE	fragmenting ss cDNA: 37 °C 60 Minuten, 93 °C 2 Minuten, 4 °C hold
5X TdT buffer	
DNA labeling reagent	labeling fragmentated ss cDNA: 37 °C 60 Minuten, 70 °C 10 Minuten, 4 °C hold
control Oligo B2	
20X hybridization controls (bio B, bio C, bio D, cre)	65 °C 5 Minuten
2X hybridization Mix	
DMSO	99 °C 5 Minuten
<b>Tag 3: Reagenzien</b>	
stain Cocktail 1	-
stain Cocktail 2	-
array holding Buffer	-

**Tabelle 3.3.5: Reagenzien des GeneChip™ WT Plus Reagent Kit**

Aufgelistet ist das jeweils dazugehörige Thermocycler-Programm; \* es wurde der GeneAmp® PCR-System 9700 Thermocycler verwendet

Am ersten Tag wurde die mRNA in ihre komplementäre cDNA umgeschrieben und der Gegenstrang synthetisiert, bevor sie erneut in cRNA umgeschrieben und inkubiert wurde. Am zweiten Tag wurde diese cRNA aufgereinigt, mit Primern markiert und erneut in ss-cDNA umgeschrieben. Überschüssige RNA wurde denaturiert, woraufhin die ss-cDNA aufgereinigt wurde. Erst dann konnte die ss-cDNA fragmentiert, gelabelt und auf die WT *hybridization arrays* aufgetragen werden. Nach 16-stündiger Inkubationszeit bei 45 °C im Affymetrix™ *hybridization oven* 640 wurden die *arrays* am

dritten Tag mit dem GeneChip *hybridization wash and stain* Kit in der Affymetrix™ *fluidics station* 450 gewaschen und gefärbt, bevor sie im Affymetrix™ GeneChip® Scanner zur Analyse bereit waren.

Die Auswertung erfolgte mit der Software Transcriptome Analysis Console.

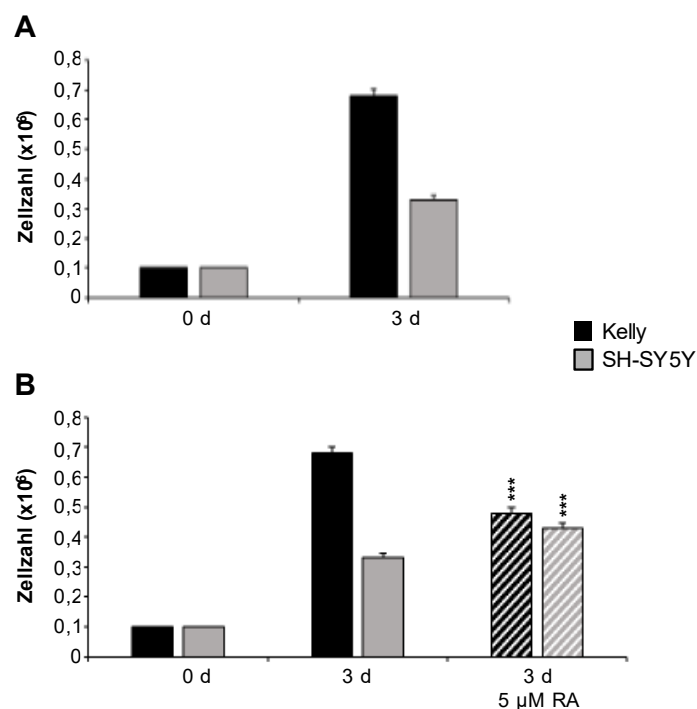
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genexpression in Neuroblastomzellen, unbehandelt oder mit Retinsäure

Für diese Arbeit wurden die Versuche an den Zellreihen Kelly und SH-SY5Y durchgeführt.

Wenn Kelly- und SH-SY5Y-Zellen unter Wachstumsbedingungen kultiviert wurden, konnte nach drei Tagen eine Zunahme der Kelly-Zellen um das etwa Siebenfache ( $0,68 \times 10^6$  vs.  $0,1 \times 10^6$ ) festgestellt werden, bei den SH-SY5Y-Zellen um das Dreifache ( $0,33 \times 10^6$  vs.  $0,1 \times 10^6$ ) (Abbildung 4.1.1 A). Eine Behandlung mit Retinsäure (RA) erfolgte mit  $5 \mu\text{M}$  des Isomers all-trans-Retinsäure (ATRA). Darunter zeigte sich bei den Kelly-Zellen eine geringfügige Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ( $0,48 \times 10^6$  vs.  $0,68 \times 10^6$ ), wohingegen bei den SH-SY5Y-Zellen ein Zellanzstieg nachzuweisen war ( $0,43 \times 10^6$  vs.  $0,33 \times 10^6$ ) (Abbildung 4.1.1 B).

**Zellzahl in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**



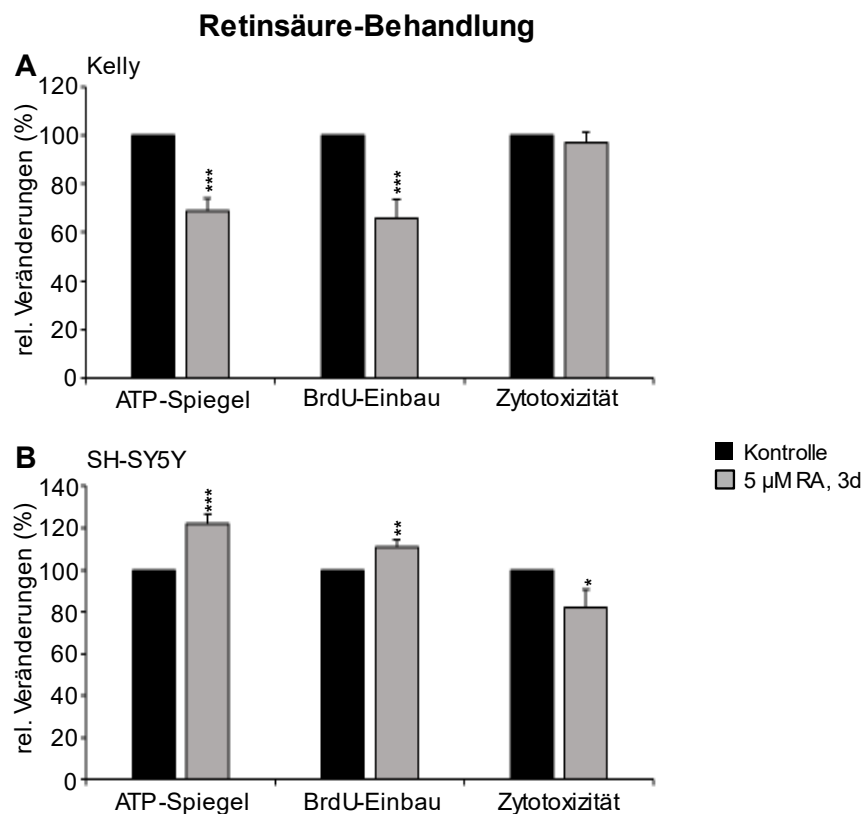
**Abbildung 4.1.1: Ausgangssituation als Vergleich zwischen Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

**A:** Vergleich der Zellzahl von unbehandelten Kelly- und SH-SY5Y-Zellen nach drei Tagen (3 d). Zellzählung der Zellen mittels CASY-Counter vor und nach dreitägiger Inkubation in Vollmedium unter optimalen Wachstumsbedingungen; Aussaat von  $0,1 \times 10^6$  Zellen.

**B:** Vergleich zusätzlich mit Stimulation von 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA) nach 3 Tagen (3 d). Zellzählung der Zellen mittels CASY-Counter vor und nach dreitägiger Inkubation mit und ohne Retinsäure in Vollmedium; Aussaat von  $0,1 \times 10^6$  Zellen.

Signifikanzniveau von RA-behandelten Zellen verglichen mit unbehandelten nach 3 d: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Um zu verstehen, wodurch die Retinsäure-induzierten Veränderungen der Zellzahl in beiden Neuroblastomzelllinien zustande kamen, wurden Parameter wie Anzahl der viablen Zellen (ATP-Spiegel), Proliferation (BrdU-Einbau) und Zelltod (Zytotoxizitätsassay) analysiert (Abbildung 4.1.2).



**Abbildung 4.1.2: Behandlungseffekte durch 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA)**

Vergleich der Behandlungseffekte (in %) in Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) mit und ohne Stimulation von 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA) nach drei Tagen (3 d): Verglichen wurden die relativen (rel.) Veränderungen der Zellviabilität (ATP-Spiegel), die Zellproliferation (BrdU-Einbau) sowie die Zytotoxizität (CytoTox-Glo™ Assay).

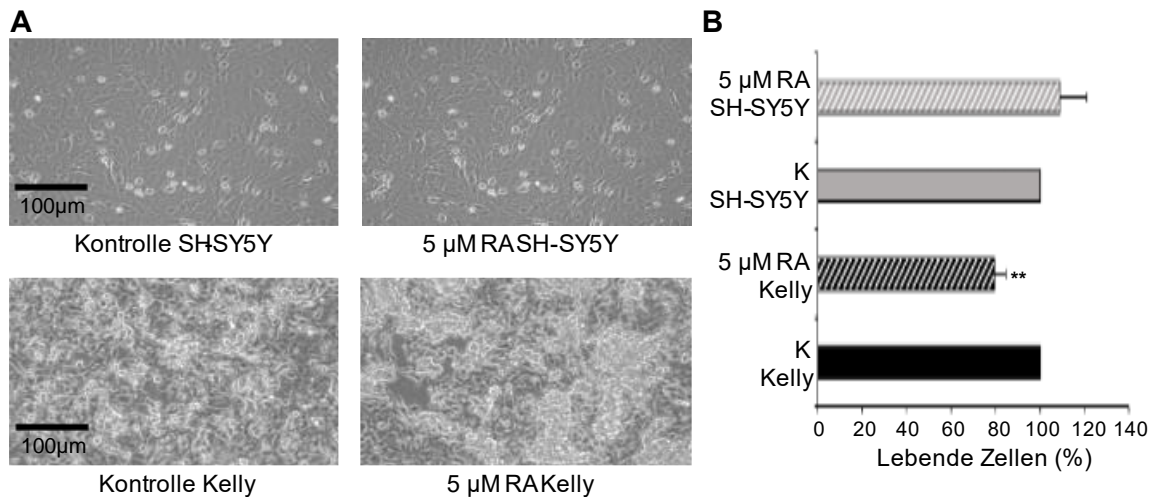
Signifikanzniveau verglichen mit den Kontrollzellen: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Es zeigte sich insgesamt in den Kelly-Zellen, dass die verminderte Zellzahl (Abbildung 4.1.1 B) in einem auf 69 % reduzierten ATP-Gehalt der Zellen abgebildet wurde. Diese Reduktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ging auf eine herabgesetzte Proliferation, gemessen durch den BrdU-Einbau zurück (66 % verglichen mit Kontrollzellen), während keine Zytotoxizität erkennbar war



(Abbildung 4.1.2 A). In SH-SY5Y-Zellen waren im Gegensatz dazu die ATP-Spiegel durch Retinsäure auf 122 % erhöht (Abbildung 4.1.2 B). Dabei konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht nur ein auf 111 % gesteigerter Einbau von BrdU beobachtet werden, sondern auch eine um 18 % verminderte Zytotoxizität (Abbildung 4.1.2 B).

### 10 Tage Inkubation mit Retinsäure



### Abbildung 4.1.3: Langzeitviabilität nach Retinsäure-Behandlung

**A:** Exemplarische mikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung mit und ohne Stimulation von 5 µM Retinsäure (RA) in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen nach zehn Tagen Inkubation.

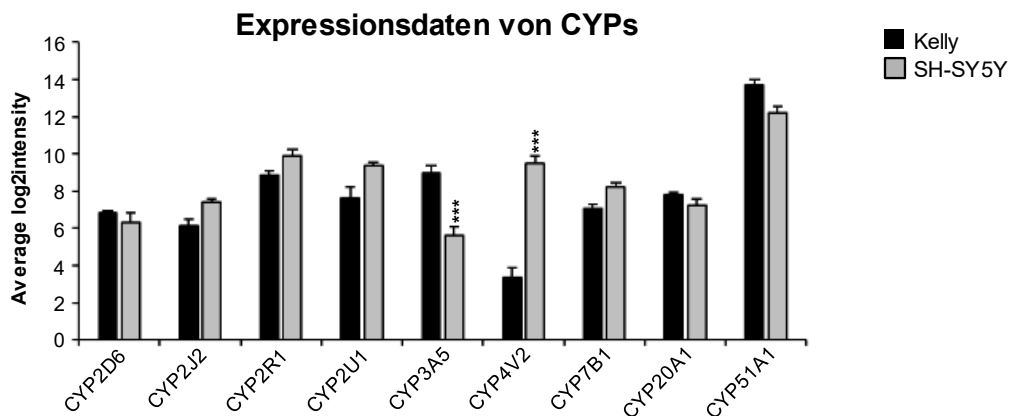
**B:** Auswertung der Zellzählung: Verglichen wurde der Anteil (in %) unbehandelter lebender Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit den Zellen, die für zehn Tage mit 5 µM RA inkubiert wurden.

Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen (K; 100 %): \*\*  $p < 0,01$ .

Um zu sehen, wie sich die Retinsäuregabe längerfristig auswirkte, wurden die Zellen für zehn Tage mit jeweils 5 µM Retinsäure behandelt und danach wurden mikroskopische Bilder aufgenommen. Sowohl von den unstimulierten Kontrollzellen als auch von den Retinsäure-behandelten Zellen wurden jeweils acht Aufnahmen ausgezählt. Eine Inkubation mit Retinsäure für zehn Tage zeigte eine Abnahme der Zellzahl bei Kelly-Zellen um 21 %, während bei SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure die Anzahl an lebenden Zellen mit 109 % nach zehn Tagen auf Kontrollniveau lag (Abbildung 4.1.3 B).

## 4.2 Expression von Cytochrom-P450-Enzymen in naiven oder Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen

Auf die Tatsache gestützt (Darwish et al. 2015), dass Cytochrom-P450-Enzyme (CYP) am Retinsäure-Metabolismus in Neuroblastomzellen beteiligt bzw. generell wichtige Mediatoren für das Überleben von Tumorzellen darstellen können, wurde eine Expressionsanalyse mittels humanem Clariom™ D Assays durchgeführt, um darin involvierte CYPs zu ermitteln. Es wurden zunächst diejenigen CYPs in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen ausgewählt, die eine Expressionsschwelle von mindestens fünf zeigten (Abbildung 4.1.4). Hierzu zählten CYP2D6, CYP2J2, CYP2R1, CYP2U1, CYP3A5, CYP4V2, CYP7B1, CYP20A1 und CYP51A1.



**Abbildung 4.1.4: Expressionsdaten von ausgewählten Cytochrom-P450-Enzymen (CYPs) im Vergleich beider Zelllinien**

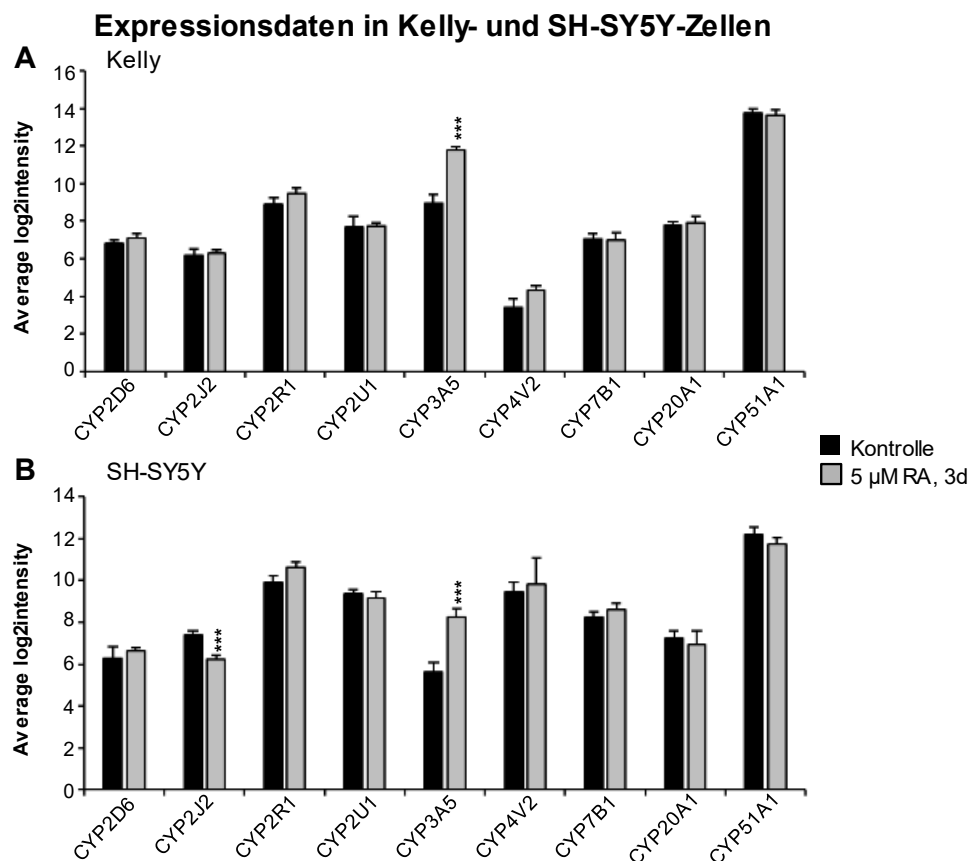
Transkriptomanalyse naiver Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mittels Microarrays in humanem Clariom™ D Assay. Die Auswertung erfolgte mit der Software Transcriptome Analysis Console. Verglichen wurde die Expression von CYPs in beiden Zelllinien, welche als fold change durch die average log2intensity dargestellt sind.

Signifikanzniveau verglichen mit der jeweiligen CYP-Expression der Kelly-Zellen: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die Expression der unterschiedlichen CYP-Enzyme war meist vergleichbar in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen. Nur bei CYP3A5 wurde in den Kelly-Zellen ein stärkeres Signal detektiert (8,97 versus 5,63 in SH-SY5Y-Zellen). Dagegen war die Expression von CYP4V2 in Kelly-Zellen geringer (3,39 versus 9,47 in SH-SY5Y-Zellen).

Es wurden außerdem die Expressionsdaten der identifizierten CYPs nach dreitägiger Inkubation mit Retinsäure erhoben und im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollzelllinie spezifisch dargestellt (Abbildung 4.1.5). Dabei fiel auf, dass nur die Expression von CYP3A5 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen durch die Gabe von Retinsäure

erhöht wurde: bei Kelly-Zellen von 8,97 auf 11,78, bei SH-SY5Y-Zellen von 5,63 auf 8,23. Die Expression von CYP2J2 wurde durch die Gabe von Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen reduziert (von 7,4 auf 6,24), während das Signal in Kelly-Zellen konstant blieb (Abbildung 4.1.5 A und B). Für die weiteren Analysen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswahlkriterien der CYPs entsprechend angepasst. Da zum einen der Unterschied zwischen Kelly- und SH-SY5Y-Zellen hinsichtlich der Reaktion auf Retinsäure untersucht werden sollte und zum anderen die Ursache, warum SH-SY5Y-Zellen auch unter dem Einfluss von Retinsäure weiterwachsen konnten, waren folgende Aspekte für die Auswahl entscheidend: ein zelllinien-basierter Expressionsunterschied sowie eine Retinsäure-vermittelte Regulation der Expression. Mit Hilfe dieser Kriterien wurden für die weiteren Analysen die Enzyme CYP2J2, CYP4V2, CYP26A1, CYP26B1 und CYP3A5 ausgewählt.



**Abbildung 4.1.5: Expressionsdaten der ausgewählten Cytochrom-P450-Enzyme (CYPs); Vergleich von unbehandelten und Retinsäure-behandelten Zellen**

Transkriptomanalyse mittels Microarrays in humanem Clariom™ D Assay nach dreitägiger Inkubation (3 d) von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit oder ohne Retinsäure (RA). Die Auswertung erfolgte mit der Software Transcriptome Analysis Console.

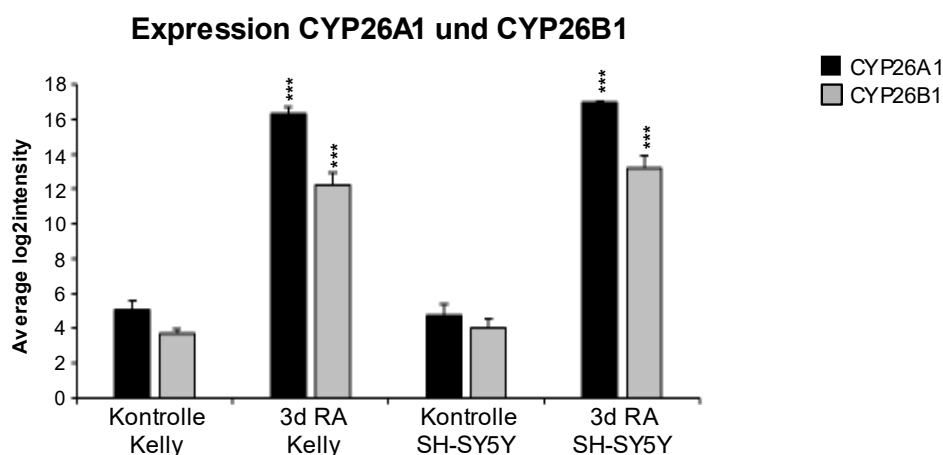
**A:** Expression von CYPs in unbehandelten und mit RA stimulierten Kelly-Zellen, welche als fold change durch die average log2intensity dargestellt sind.

**B:** Expression von CYPs in unbehandelten und mit RA stimulierten SH-SY5Y-Zellen, welche als fold change durch die average log2intensity dargestellt sind.

Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen: \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 4.3 CYP26A1 und CYP26B1 als therapeutische Zielstrukturen für den Retinsäure-Metabolismus

In unbehandelten Kelly- und SH-SY5Y-Zellen war die Expression von CYP26A1 und CYP26B1 gering und fast durchgängig unter der Schwelle von fünf (Kelly-Zellen: 5,05 für CYP26A1, 3,68 für CYP26B1; SH-SY5Y-Zellen: 4,77 für CYP26A1 und 4,02 für CYP26B1). Eine dreitägige Inkubation mit 5  $\mu$ M Retinsäure erhöhte jedoch signifikant das Expressionsniveau beider Enzyme in beiden Zelllinien (Kelly-Zellen: auf 16,34 für CYP26A1 und 12,22 für CYP26B1; SH-SY5Y-Zellen: auf 17 für CYP26A1 und 13,22 für CYP26B1) (Abbildung 4.2.1).



**Abbildung 4.2.1 Expression von CYP26A1 und CYP26B1 in unbehandelten und Retinsäure-behandelten Kelly- bzw. SH-SY5Y-Zellen**

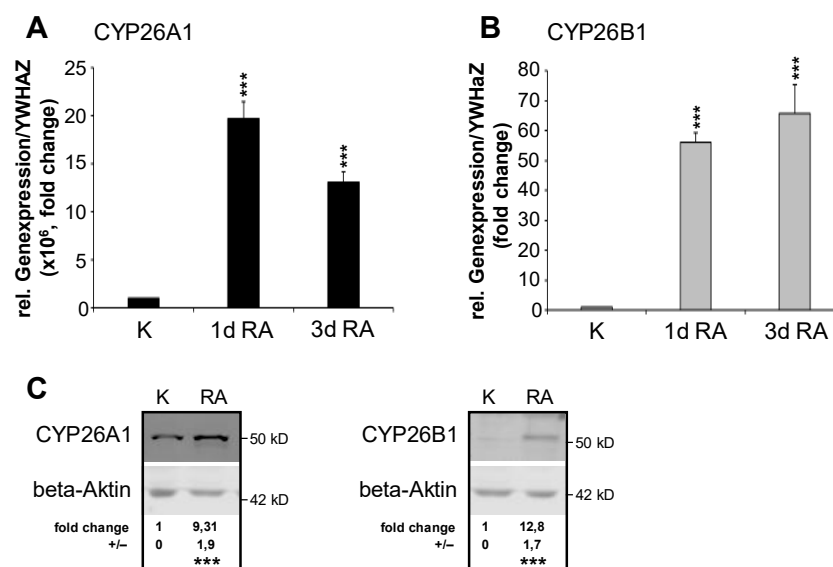
Nach dreitägiger Inkubation (3 d) von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) erfolgte eine Transkriptomanalyse mittels Microarrays in humanem Clariom™ D Assay. Die Auswertung erfolgte mit der Software Transcriptome Analysis Console. Der Expressionsvergleich von CYP26A1 und CYP26B1 in unbehandelten und mit RA stimulierten Kelly- und SH-SY5Y-Zellen wurde als fold change durch die average log2intensity dargestellt.

Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Um die Ergebnisse der Micro-Arrays zu verifizieren, wurden quantitative PCRs und Western Blots durchgeführt (Abbildungen 4.2.2 und 4.2.3). Dazu wurden beide Zellreihen für ein und drei Tage mit 5  $\mu$ M Retinsäure stimuliert, bevor aus den Zellpellets entweder RNA extrahiert oder Proteinlysate hergestellt wurden. Wie in den Micro-Arrays konnte eine Induktion der relativen Expression nach Stimulation mit 5  $\mu$ M

Retinsäure von CYP26A1 in den Kelly-Zellen mit 10,7 nach einem Tag und 13,1 nach drei Tagen und in den SH-SY5Y-Zellen mit 4,9 nach einem Tag und 8,1 nach drei Tagen beobachtet werden (Abbildungen 4.2.2 A und 4.2.3 A). Auch für CYP26B1 konnte eine Expressionszunahme in beiden Zelllinien bestätigt werden (Abbildungen 4.2.2 B und 4.2.3 A), die insbesondere für CYP26B1 in den Kelly-Zellen mit 56 nach einem Tag und 65,7 nach drei Tagen sehr stark war (Abbildung 4.2.2 B), wohingegen sich für SH-SY5Y-Zellen eine Induktion von CYP26B1 auf 6,7 nach einem Tag und 8,5 nach drei Tagen zeigte. Als *housekeeper* wurde YWHAZ verwendet. Auch die Proteinmengen beider Enzyme wurde in beiden Zelllinien signifikant nach dreitägiger Applikation von Retinsäure erhöht (Abbildungen 4.2.2 C und 4.2.3 B). Zur Auftragskontrolle wurde das Zytoskelettprotein beta-Aktin eingesetzt.

### CYP26 in Kelly

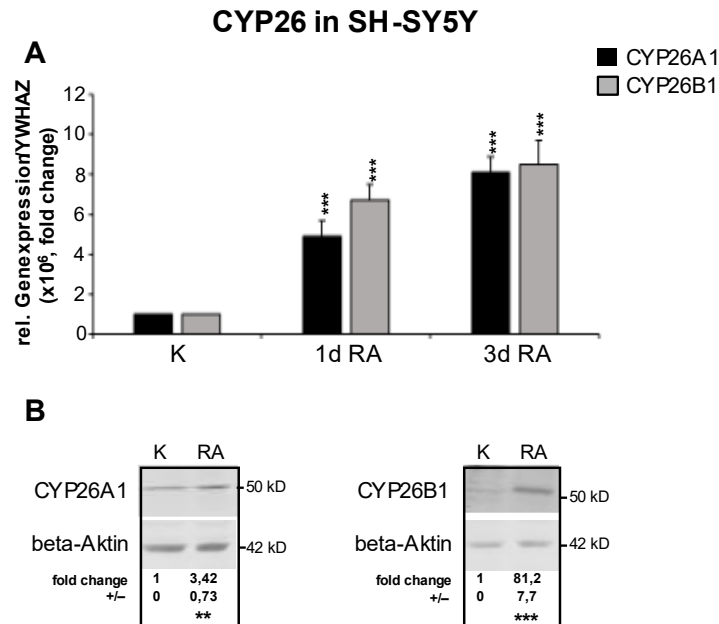


#### Abbildung 4.2.2: Expression und Proteinmengen von CYP26A1 und CYP26B1 in Kelly-Zellen

Nach Inkubation der Kelly-Zellen mit und ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) für einen Tag bzw. drei Tage (1d/ 3d) wurde mit einer quantitativen PCR mittels Taqman-Assay die relative (rel.) Genexpression von CYP26A1 (**A**) und CYP26B1 (**B**) gemessen. Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP26A1 und CYP26B1 als fold change x 10<sup>6</sup> mit dem housekeeper YWHAZ.

**C:** Nach dreitägiger Inkubation der Kelly-Zellen mit und ohne 5  $\mu$ M RA wurde die Proteinmenge von CYP26A1 und CYP26B1 mittels Western Blot dargestellt. Angegeben ist die relative Proteinmenge von CYP26A1 und CYP26B1 als fold change normalisiert auf beta-Aktin.

Signifikanzniveau verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (K): \*\*\* p < 0,001; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.



**Abbildung 4.2.3: Expression und Proteinmengen von CYP26A1 und CYP26B1 in SH-SY5Y-Zellen**

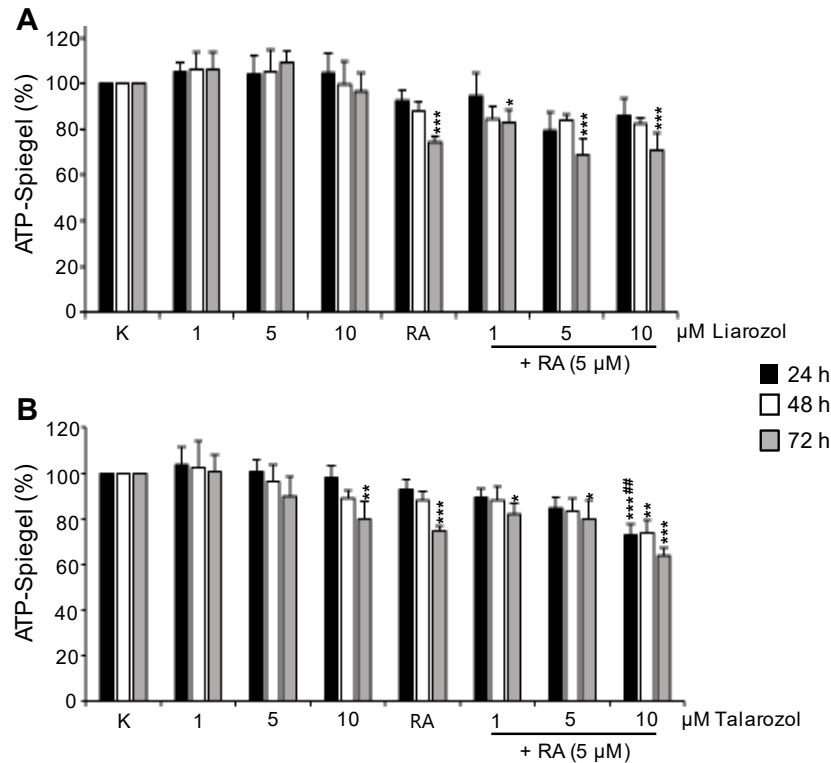
**A:** Nach Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit und ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) für einen Tag bzw. drei Tage (1d/ 3d) wurde mit einer quantitativen PCR mittels Taqman-Assay die relative (rel.) Genexpression von CYP26A1 und CYP26B1 gemessen. Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP26A1 und CYP26B1 als fold change  $\times 10^6$  mit dem housekeeper YWHAZ.

**B:** Nach dreitägiger Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit und ohne 5  $\mu$ M RA wurde die Proteinmenge von CYP26A1 und CYP26B1 mittels Western Blot dargestellt. Angegeben ist die relative Proteinmenge von CYP26A1 und CYP26B1 als fold change normalisiert auf beta-Aktin.

Signifikanzniveau verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (K): \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Es wurde angenommen, dass die Neuroblastomzellen unter Retinsäure-Behandlung die Mengen von CYP26A1 und CYP26B1 erhöhen, um Retinsäure schneller abbauen zu können, um somit eine Differenzierung verhindern und das Zellwachstum aufrechterhalten zu können. Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Zellviabilität unter spezifischen Inhibitoren von CYP26A1 und CYP26B1 sinken würde. Als bekannte spezifische Inhibitoren (Gomaa et al. 2011) wurden zunächst Liarozol (Lia) und Talarozol (Tala) zur Messung der ATP-Spiegel eingesetzt. Mit verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) erfolgte jeweils für Liarozol und Talarozol die Auswertung (nach 24, 48 und 72 Stunden) in Kelly- (Abbildung 4.2.4) und SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.2.5) jeweils mit und ohne Retinsäure.

### Inhibition CYP26 in Kelly



**Abbildung 4.2.4: Inhibition von CYP26A1 und CYP26B1 mit Liarozol und Talarozol in Kelly-Zellen**

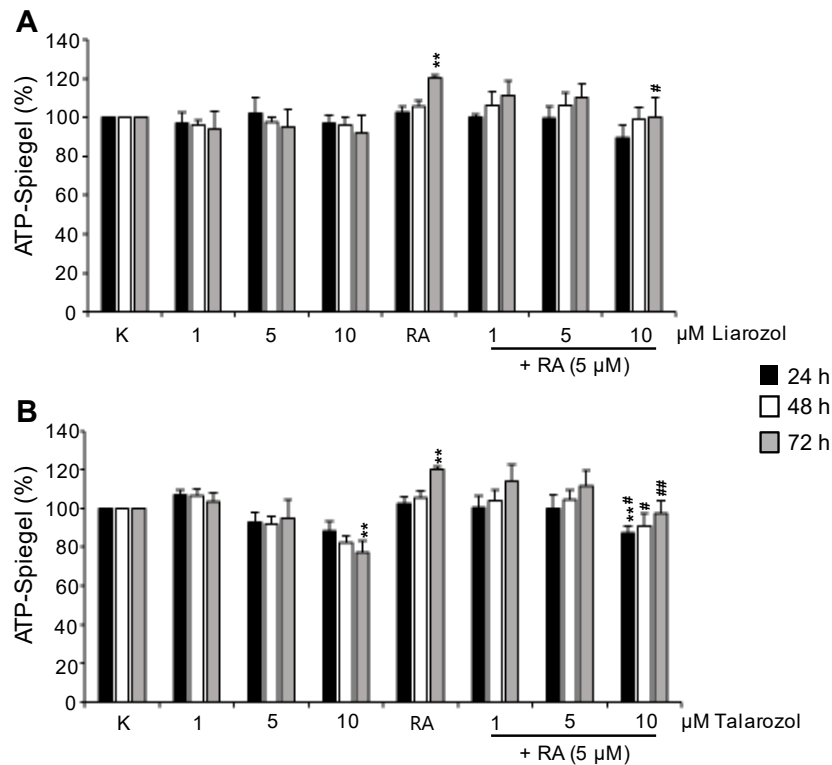
Verglichen wurden die Inhibitionseffekte von 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M Liarozol (**A**, Lia) und Talarozol (**B**, Tala), spezifische CYP26-Inhibitoren, mit und ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) auf den Kelly-Zellen, nach dem diese für 24, 48 und 72 Stunden (h) jeweils inkubiert wurden. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ##  $p < 0,01$ .

Für Liarozol (Abbildung 4.2.4 A) zeigten sich in Kelly-Zellen keine Veränderungen der ATP-Spiegel ohne zusätzliche Gabe von Retinsäure. Eine signifikante Reduktion der ATP-Mengen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen konnte erst nach 72-stündiger Inkubation mit Retinsäure auf 74,6 % sowie zusätzlich mit 1  $\mu$ M (82,8 %), 5  $\mu$ M (69 %) und 10  $\mu$ M Liarozol (71 %) beobachtet werden. Die Applikation von 10  $\mu$ M Talarozol (Abbildung 4.2.4 B) reduzierte die Anzahl der viablen Zellen auch ohne weitere Gabe von Retinsäure nach 72 Stunden auf 79,8 % signifikant. Unter der zusätzlichen Gabe von Retinsäure konnten auch mit 1  $\mu$ M (82,2 %) und 5  $\mu$ M (80 %) eine Reduktion der ATP-Spiegel nach 72 Stunden beobachtet werden, allerdings nicht im Vergleich zu Retinsäure-behandelten Zellen (Abbildung 4.2.4 B). Erst die Konzentration von 10  $\mu$ M Talarozol verringerte die Anzahl der viablen Zellen auch gegenüber der Retinsäure-Kontrolle auf 72,8 % (versus 92,8 %), allerdings nur nach

24 Stunden. Bei Inkubationszeiten von 48 und 72 Stunden war die Reduktion der ATP-Spiegel um 26 % und 36 % nur gegenüber unbehandelten Kontrollen signifikant.

#### Inhibition CYP26 in SH-SY5Y



**Abbildung 4.2.5: Inhibition von CYP26A1 und CYP26B1 mit Liarozol und Talarozol in SH-SY5Y-Zellen**

Verglichen wurden die Inhibitionseffekte von 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M Liarozol (**A**, Lia) und Talarozol (**B**, Tala), spezifische CYP26-Inhibitoren, mit und ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) auf den SH-SY5Y-Zellen, nach dem diese für 24, 48 und 72 Stunden (h) jeweils inkubiert wurden. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen (K): \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ##  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$ .

Ähnlich wie in Kelly-Zellen konnte Liarozol in SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.2.5 A) nicht die Anzahl der viablen Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen reduzieren. Die Gabe von 10  $\mu$ M Liarozol und Retinsäure für 72 Stunden führte zu einer Reduktion der ATP-Spiegel gegenüber Retinsäure-behandelten Zellen (100,4 % versus 120,4 %). Auch Talarozol (Abbildung 4.2.5 B) war erst ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M wirksam. Nach 72-stündiger Inkubation wurde eine Reduktion der ATP-Spiegel gegenüber unstimulierten Kontrollen auf 77,2 % beobachtet. Mit 10  $\mu$ M Talarozol und Retinsäure konnte die Anzahl der viablen Zellen im Vergleich zu den Kontrollen vorübergehend und nur nach 24 Stunden um 22,75 %

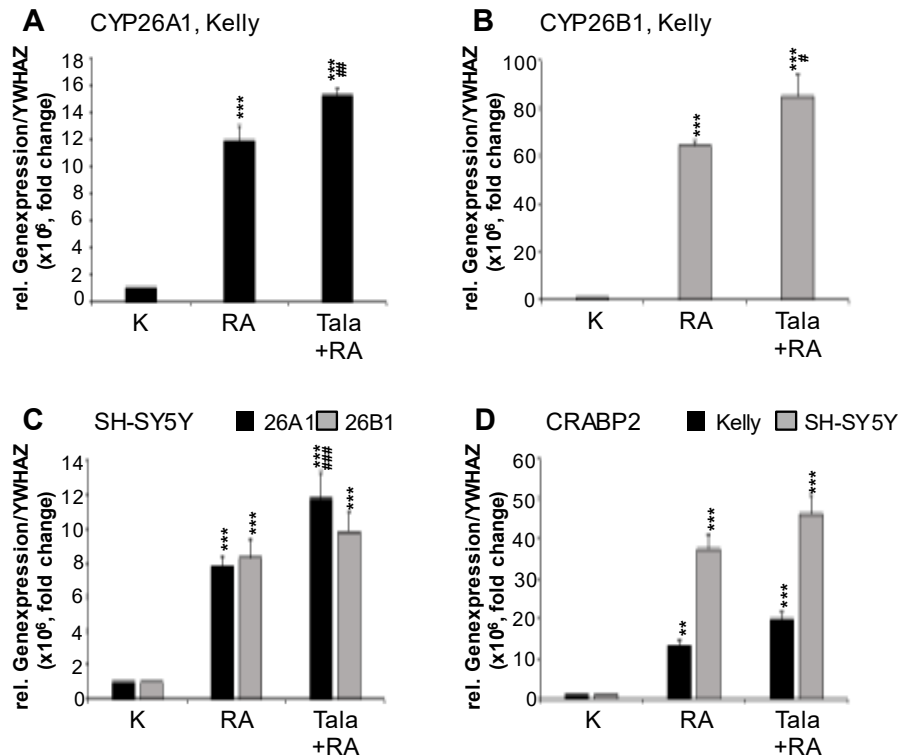


reduziert werden. Gegenüber Retinsäure-behandelten Zellen verringerte die kombinierte Gabe von Retinsäure und 10  $\mu$ M Talarozol zu allen Zeitpunkten signifikant die ATP-Spiegel auf 87,25 %, 90,75 % und 97,4 %. Somit führte die Hemmung von CYP26A1 und CYP26B1 durch Liarozol und Talarozol für beide Zelllinien nur zu einer teilweisen und vorübergehenden Verstärkung der Retinsäure-Wirkung.

Um zu verstehen, warum Liarozol und Talarozol den theoretisch wachstumshemmenden Effekt von Retinsäure nur transient verstärkten, wurde untersucht, ob die Neuroblastomzellen möglicherweise die Gabe der Inhibitoren über eine Veränderung der Mengen von CYP26A1 und CYP26B1 kompensieren konnten. Dazu wurde die Expression beider Enzyme untersucht. Außerdem wurde als Indikator für die zelluläre Retinsäurekonzentration (Liu et al. 2016) die Expression von CRABP2 (*cellular retinoic acid binding protein 2*) analysiert.

Da Talarozol in beiden Zelllinien einen insgesamt stärkeren Effekt als Liarozol zeigte und nur Effekte bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M auftraten, wurden die Versuche mit 10  $\mu$ M Talarozol und dreitägiger Stimulation durchgeführt.

#### Talarozol-Behandlung



**Abbildung 4.2.6: Effekte der Talarozol-Behandlung in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

Verglichen wurden die Inhibitionseffekte von 10  $\mu$ M Talarozol (Tala) auf mit 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) vorbehandelte Kelly- und SH-SY5Y-Zellen. Nach Inkubation der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen ohne

Behandlung sowie mit 10  $\mu$ M Talarozol und 5  $\mu$ M Retinsäure für drei Tage wurde aus den RNA-Pellets eine quantitative PCR mittels Taqman-Assay durchgeführt. Gemessen wurde die relative Genexpression von CYP26A1 (**A**) und CYP26B1 (**B**) in Kelly-Zellen und CYP26A1 und CYP26B1 (**C**) in SH-SY5Y-Zellen. Zusätzlich wurde die relative Genexpression von CRABP2 (**D**) dargestellt. Die relative Genexpression von CYP26A1, CYP26B1 und CRABP2 wurde als fold change  $\times 10^6$  angegeben. Als housekeeper wurde YWHAZ verwendet.

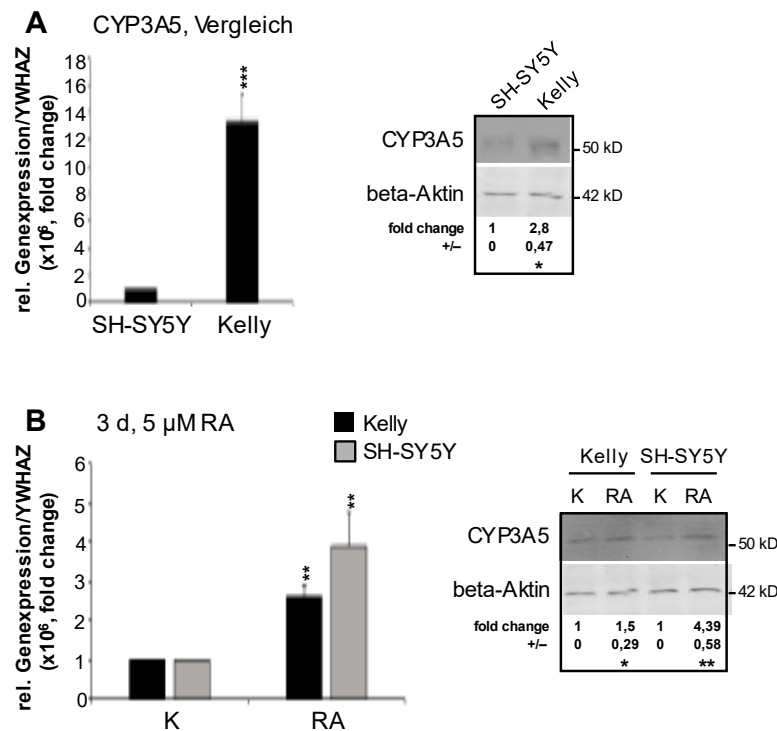
Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

Wie bereits gezeigt, erhöhte die dreitägige Inkubation mit Retinsäure in beiden Zelllinien die Expression von CYP26A1 und CYP26B1 (Abbildungen 4.2.2 und 4.2.3). Wurde zusätzlich Talarozol gegeben, konnte in Kelly-Zellen die Expression von CYP26A1 (15,3 versus 11,9) sowie CYP26B1 (84,7 versus 64,3) weiter und signifikant im Vergleich zu Retinsäure-behandelten Zellen gesteigert werden (Abbildung 4.2.6 A und B). In SH-SY5Y-Zellen wurde lediglich die Genexpression von CYP26A1 (11,8 versus 7,8) stärker durch die Kombination von Retinsäure und Talarozol im Vergleich zu Retinsäure allein erhöht (Abbildung 4.2.6 C). Um abschätzen zu können, ob die Zellen durch diese kompensatorische Regulation von CYP26A1 und CYP26B1 den intrazellulären Retinsäurespiegel konstant halten konnten, wurde die Expression von CRABP2 untersucht. Nach dreitägiger Inkubation mit Retinsäure war das Signal von CRABP2 sowohl in Kelly- als auch in SH-SY5Y-Zellen signifikant erhöht (Kelly: 13,2 versus 1; SH-SY5Y: 37,3 versus 1). Die Expression von CRABP2 veränderte sich nach der Kombination von Talarozol und Retinsäure im Vergleich zu alleiniger Retinsäurebehandlung nicht signifikant (Abbildung 4.2.6 D).

#### 4.4 Der additive Effekt bei der Wirkung von Retinsäure durch CYP3A5

Weiterführend zu CYP26A1 und CYP26B1 zeigte sich in den Microarrays (Abbildung 4.1.4 und 4.1.5) CYP3A5 als oberhalb des definierten Schwellenwerts exprimiert und durch Retinsäure reguliert. Außerdem kann CYP3A5 Retinsäure abbauen (Wang T. 2008) und gilt deshalb als potenzieller Angriffspunkt im Retinsäure-Stoffwechsel der Neuroblastomzellen. Zunächst sollten die Mengen von CYP3A5 auf mRNA- und Proteinebene in beiden Zelllinien untersucht werden. Wie in den MicroArrays wurde CYP3A5 in Kelly-Zellen stärker exprimiert als in SH-SY5Y-Zellen (13,1-fach). Auch in Western Blots bestätigte sich die erhöhte Menge (2,8-fach) (Abbildung 4.2.7 A).

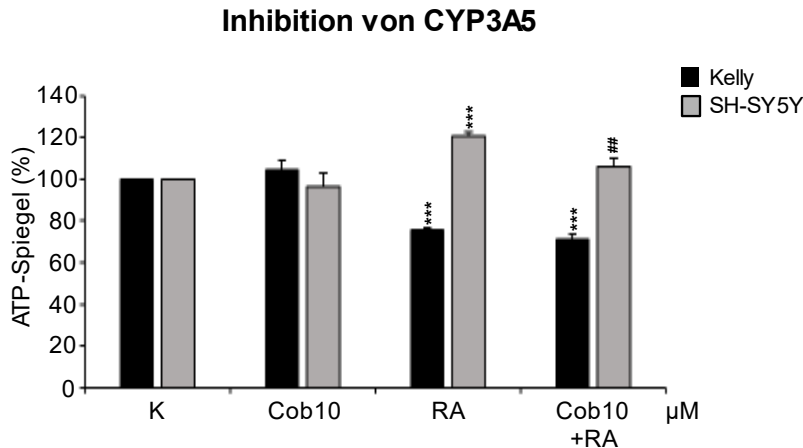
## CYP3A5



**Abbildung 4.2.7: Expression und Proteinmengen von CYP3A5 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

Nach Inkubation der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit und ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) für drei Tage (d) wurde nach RNA-Isolation eine quantitative PCR mittels Taqman-Assay durchgeführt und nach Protein-Extraktion Western Blots. Gemessen wurde die relative Genexpression von CYP3A5 in beiden Zellen als fold change  $\times 10^6$ . Als housekeeper wurde YWHAZ verwendet. Die Proteinmenge von CYP3A5 wurde auf beta-Aktin normalisiert. In **(A)** wurde die CYP3A5-Expression beider naiver Zelllinien verglichen, in **(B)** die CYP3A5-Expression nach Stimulation mit 5  $\mu$ M Retinsäure in beiden Zelllinien. Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen (K): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Auch eine Induktion von CYP3A5 durch 5  $\mu$ M Retinsäure für drei Tage konnte mittels quantitativer PCR und Western Blot gezeigt werden. Hier war die Mengenerhöhung von CYP3A5 in SH-SY5Y-Zellen (3,9-fach bzw. 4,39-fach) ausgeprägter als in Kelly-Zellen (2,6-fach bzw. 1,5-fach) jeweils verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Deshalb stellte sich die Frage, ob eine Blockade von CYP3A5 einen Einfluss auf den Retinsäure-Metabolismus und damit auf die Anzahl der viablen Zellen hatte. Als spezifischer Inhibitor für CYP3A5 ist Cobicistat (Cob) (Hohmann et al. 2021) erprobt und wurde dafür in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt (Abbildung 4.2.8).



**Abbildung 4.2.8: Effekt einer CYP3A5-Inhibition durch Cobicistat**

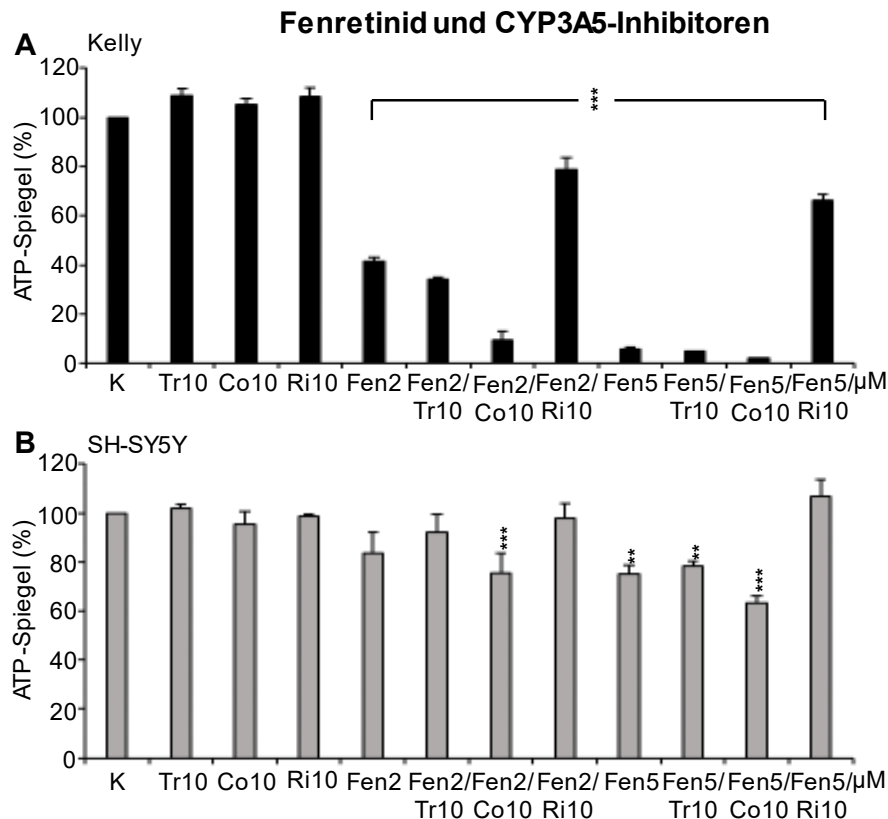
Verglichen wurden die Inhibitionseffekte von 10  $\mu\text{M}$  Cobicistat (Cob) mit und ohne 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA) auf den Kelly- und SH-SY5Y-Zellen, nach dreitägiger Inkubation. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ##  $p < 0,01$ .

Eine alleinige Stimulation mit Cobicistat verursachte keine Veränderungen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 4.2.8). Wurden die Zellen mit Retinsäure und Cobicistat für 72 Stunden behandelt, waren die ATP-Spiegel der Kelly-Zellen signifikant gegenüber unstimulierten Kontrollen auf 71 % reduziert und damit den Zellen vergleichbar, die nur mit Retinsäure inkubiert wurden (75,8 %). In SH-SY5Y-Zellen war nur eine Reduktion der Zellviabilität durch eine zusätzliche Behandlung mit Cobicistat im Vergleich zur alleinigen Gabe von Retinsäure erkennbar (106 % versus 120,8 %), nicht jedoch gegenüber den Kontrollzellen.

Da die Inhibition von CYP3A5 nicht die Viabilität von sonst unbehandelten Zellen reduzierte und nur einen schwachen Effekt in Kombination mit Retinsäure zeigte, sollte untersucht werden, ob die Hemmung von CYP3A5 einen chemosensitivierenden Effekt in Kombination mit einer der Retinsäure ähnlichen Substanz hatte, die über CYP3A5 verstoffwechselt wurde und Zelltod auslösen konnte. Zur Kombination wurde Fenretinid ausgewählt. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Retinoid, das zytotoxisch ist und über CYP3A4/A5 metabolisiert wird (Lopez-Barcons et al. 2017). Dazu wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen entweder nur mit Fenretinid (Fen, Konzentrationen 2  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ) stimuliert oder zusammen mit den CYP3A4/A5-Inhibitoren Troleandomycin (10  $\mu\text{M}$ ) und Cobicistat (10  $\mu\text{M}$ ). Der CYP3A4/CYP3A5-Induktor Rifampicin (10  $\mu\text{M}$ ) wurde verwendet, um zu überprüfen,

ob der zytotoxische Effekt von Fenretinid dadurch reduziert werden konnte. Die ATP-Spiegel wurden nach drei Tagen bestimmt (Abbildung 4.2.9).



**Abbildung 4.2.9: Effekt einer CYP3A5-Induktion und -Inhibition in Kombination mit Fenretinid**

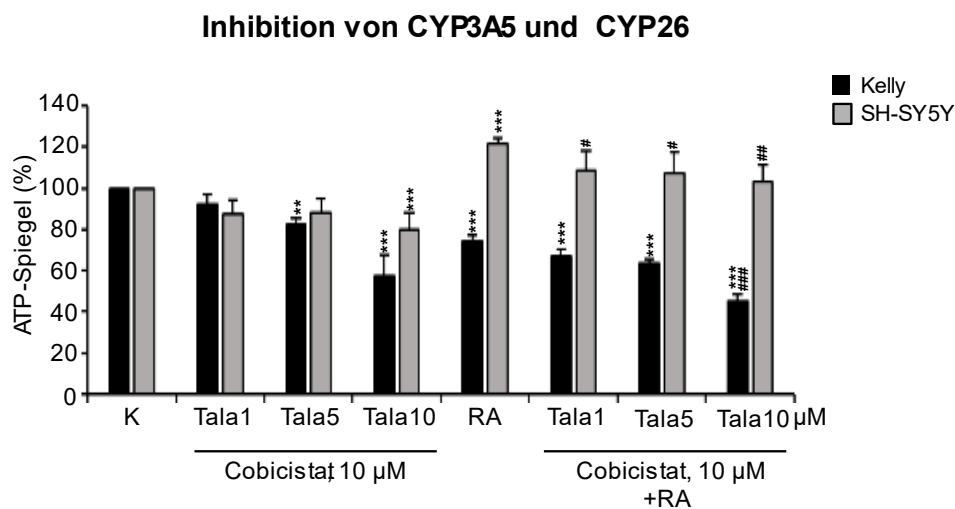
Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) wurden für jeweils drei Tage mit 10  $\mu$ M Troleandomycin (Tr10) oder 10  $\mu$ M Cobicistat (Co10) oder mit 10  $\mu$ M Rifampicin (Ri10) allein inkubiert oder zusätzlich zu 2  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M Fenretinid gegeben. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K) verglichen: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$

In Kelly-Zellen wurde die Anzahl der viablen Zellen durch Fenretinid allein bereits signifikant auf 41 % (2  $\mu$ M) bzw. 6 % (5  $\mu$ M) gegenüber unstimulierten Kontrollen reduziert. Unter der Kombination aus Fenretinid (2  $\mu$ M) und Cobicistat konnte nur noch eine Viabilität von 9,5 % nachgewiesen werden, während die zusätzliche Gabe von Rifampicin die ATP-Spiegel nur auf 78,8 % senkte (Abbildung 4.2.9 A). In SH-SY5Y-Zellen hatte die dreitägige Inkubation mit 2  $\mu$ M Fenretinid keinen Effekt. Erst die Kombination aus Fenretinid und Cobicistat reduzierte die Anzahl der viablen Zellen signifikant auf 75,5 %. Wurde Fenretinid in höherer Konzentration (5  $\mu$ M) verabreicht, konnte die Viabilität signifikant auf 75,3 % gesenkt werden. Die zusätzliche Gabe von Troleandomycin konnte die Wirkung nicht verstärken, während die Kombination mit

Cobicistat die ATP-Spiegeln weiter auf 63,3 % senkte (Abbildung 4.2.9 B). Durch Rifampicin wurde der Effekt von Fenretinid aufgehoben. Damit hatte die Hemmung von CYP3A5 zumindest durch Cobicistat einen chemosensitivierenden Effekt.

Deshalb sollte untersucht werden, ob die kombinierte Hemmung von CYP26A1 bzw. CYP26B1 und CYP3A5 möglicherweise die Viabilität von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen beeinflussen konnte, auch wenn die Einzelhemmungen nicht erfolgreich waren. Dazu wurden beide Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von Talarozol in Kombination mit 10  $\mu$ M Cobicistat behandelt. Die Inkubation erfolgte für drei Tage.



**Abbildung 4.2.10: Kombinierte Inhibition von CYP26-Enzymen und CYP3A5 mit Talarozol und Cobicistat**

Kelly- und SH-SY5Y-Zellen wurden für drei Tage mit 10  $\mu$ M Cobicistat (Co10) und 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Talarozol (Tala1/ 5/ 10) mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

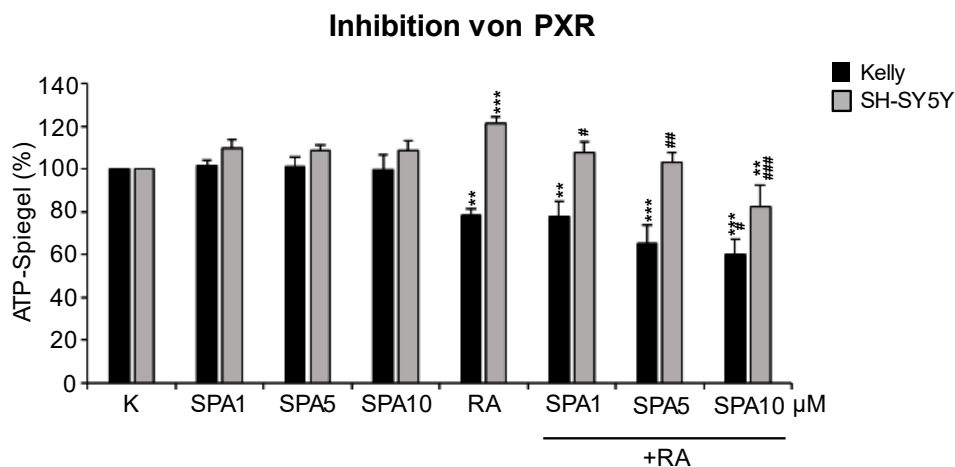
Signifikanzniveau verglichen mit den Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

Für Kelly-Zellen konnte bereits mit 5  $\mu$ M Talarozol und Cobicistat die Anzahl der viablen Zellen auf 83 % gesenkt werden (Abbildung 4.2.10). Die Kombination aus 10  $\mu$ M Talarozol, Cobicistat und Retinsäure reduzierte die ATP-Spiegel sogar signifikant zu Retinsäure-behandelten Zellen (45,2 % versus 74,4 %). Dahingegen war die Anzahl der lebenden SH-SY5Y-Zellen nur unter 10  $\mu$ M Talarozol und Cobicistat signifikant auf 79,9 % vermindert. In Kombination mit Retinsäure konnte die gemeinsame Gabe von Talarozol und Cobicistat lediglich den Retinsäure-vermittelten Anstieg der ATP-Spiegel signifikant senken, nicht jedoch unter das Kontrollniveau (Abbildung 4.2.10).

Damit lässt sich zusammenfassend sagen, dass selbst die kombinierte Hemmung von zwei Retinsäure-metabolisierenden Enzymen die Viabilität der Zellen nur eingeschränkt beeinträchtigte, wenn diese mit Retinsäure behandelt wurden.

#### 4.5 Der additive Effekt bei der Wirkung von Retinsäure durch PXR

In den nächsten Experimenten sollte untersucht werden, ob eine Induktionshemmung von Retinsäure-abbauenden Enzymen dazu beitragen konnte, den Retinsäure-vermittelten Effekt in Neuroblastomzellen zu verstärken. Ein möglicher Regulator war der PXR (*pregnane X receptor*), da das Protein als nukleärer Rezeptor die Transkription von CYP3A4 bzw. CYP3A5 und weniger ausgeprägt von CYP26 steigern sowie über weitere Mechanismen zur Retinsäureresistenz beitragen kann (Ihunnah et al. 2011). Mit Hilfe von unterschiedlichen Konzentrationen des PXR-Inhibitors SPA70 (SPA) (Li et al. 2021) wurde der Einfluss von PXR auf die Viabilität von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen analysiert. Die ATP-Spiegel wurden nach drei Tagen bestimmt (Abbildung 4.2.11).



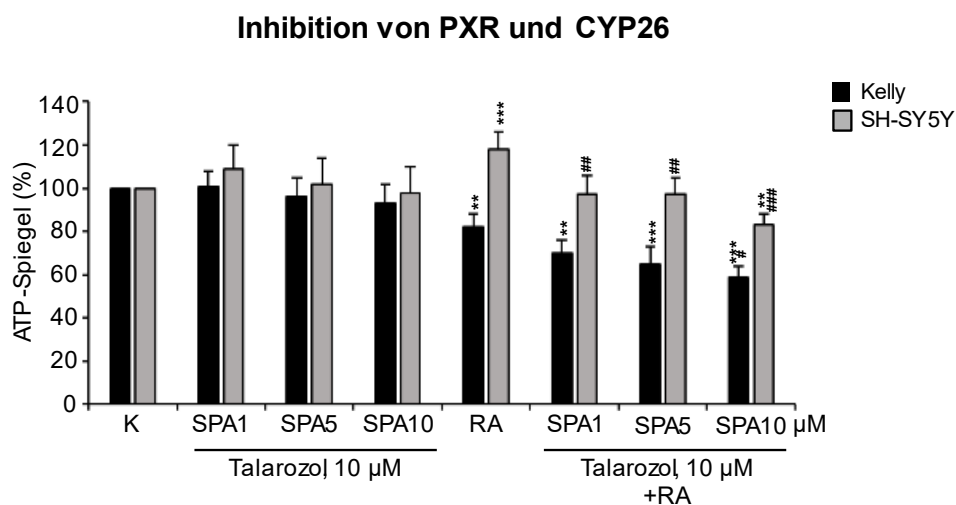
**Abbildung 4.2.11: Inhibition von PXR mit SPA70**

Um den inhibitorischen Effekt von SPA70 auf die Kelly-Zellen und SH-SY5Y-Zellen zu untersuchen, wurden diese jeweils drei Tage entweder mit 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M SPA70 oder zusätzlich mit 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel. Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

Ohne die zusätzliche Gabe von Retinsäure waren keine Veränderungen der ATP-Spiegel durch die Hemmung von PXR zu beobachten. Bei gleichzeitiger Inkubation mit Retinsäure zeigte sich in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig eine reduzierte Zellviabilität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bzw. zu

Retinsäure-behandelten Zellen. Bei Kelly-Zellen konnten die ATP-Spiegel durch die Kombination von Retinsäure und 1  $\mu$ M sowie 5  $\mu$ M SPA70 deutlich auf 78 % bzw. 65,3 % gegenüber der Kontrolle reduziert werden. Mit 10  $\mu$ M SPA70 konnte der ATP-Spiegel auf 60 % und damit signifikant zur Kontrolle und gegenüber den Retinsäure-behandelten Zellen gesenkt werden (Abbildung 4.2.11). In SH-SY5Y-Zellen verminderte die Inkubation mit SPA70 den Anstieg der Zellviabilität durch Retinsäure und führte bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M SPA70 eine gegenüber den Retinsäure-behandelten Zellen signifikante Reduktion der ATP-Spiegel um 13,8 % und 18,2 %, wohingegen eine Stimulation mit 10  $\mu$ M zu einer Abnahme der ATP-Spiegel auf 82,6 % führte, was auch gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen eine signifikante Reduktion war.

Da PXR die Induktion von CYP26A1 bzw. CYP26B1 weniger stark beeinflusst als die von CYP3A4 bzw CYP3A5, sollte untersucht werden, ob die Anzahl der viablen Zellen mit der kombinierten Hemmung von PXR und Talarozol weiter reduziert werden konnte. Talarozol wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt, die ATP-Spiegeln wurden nach drei Tagen bestimmt (Abbildung 4.2.12).



**Abbildung 4.2.12: Kombinierte Hemmung von CYP26-Enzymen und PXR mit Talarozol und SPA70**

Für die kombinierte Hemmung von CYP26A1, CYP26B1 und PXR wurden Kelly-Zellen und SH-SY5Y-Zellen für jeweils drei Tage mit 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M SPA70 und 10  $\mu$ M Talarozol entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

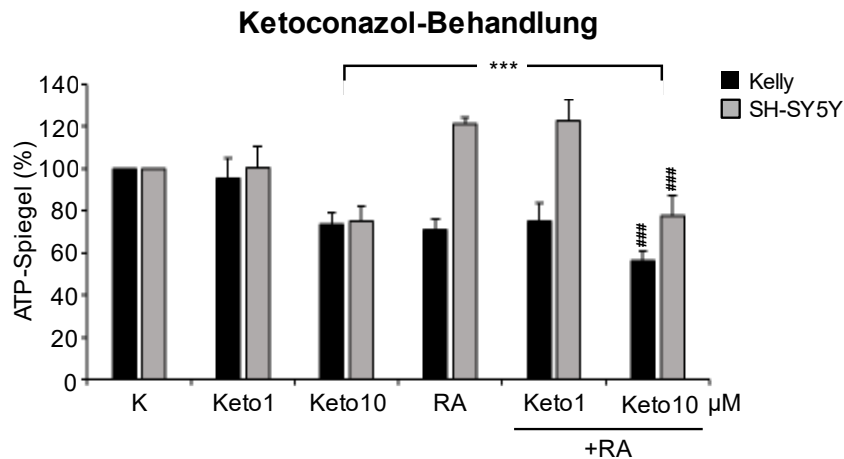


Insgesamt konnte eine Abnahme der Zellviabilität durch die Kombination von SPA70 und Talarozol in Retinsäure-behandelten Zellen beobachtet werden, die konzentrationsabhängig, aber nicht stärker als mit SPA70 allein war. So konnten die ATP-Spiegel in Kelly-Zellen nach dreitägiger Retinsäurebehandlung und Inkubation von 10  $\mu$ M SPA70 und 10  $\mu$ M Talarozol nur auf 59 % gesenkt werden im Vergleich zu 60 % bei Retinsäure und 10  $\mu$ M SPA70. In SH-SY5Y-Zellen waren die Werte unter denselben Bedingungen sehr ähnlich.

Es lässt sich also feststellen, dass eine kombinierte Hemmung von Retinsäure-abbauenden Enzymen, die auch die transkriptionelle Ebene einbezieht, die Zellviabilität beeinflussen kann.

#### 4.6 Die Wirkung von Ketoconazol auf unbehandelte und Retinsäure-behandelte Neuroblastomzellen

Um die Hypothese zu testen, ob eine Inhibition mehrerer Angriffspunkte im Retinsäure-Stoffwechsel sich möglicherweise als effizienter erweisen könnte, wurde demnach eine Substanz benötigt, die auf unterschiedlichen Ebenen in die Retinsäure-vermittelte Zellreaktion eingreift. Der antimykotische Wirkstoff Ketoconazol (Keto) erschien geeignet, da die Substanz CYP26-Enzyme, CYP3A5 und die Induktion von PXR inhibieren kann (Daly 2006; Masuyama et al. 2016). Zur Messung der ATP-Spiegel wurde Ketoconazol in den Konzentrationen 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M verwendet (Abbildung 4.2.13) und die Zellen damit für drei Tage inkubiert.



**Abbildung 4.2.13: Effekte von Ketoconazol in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

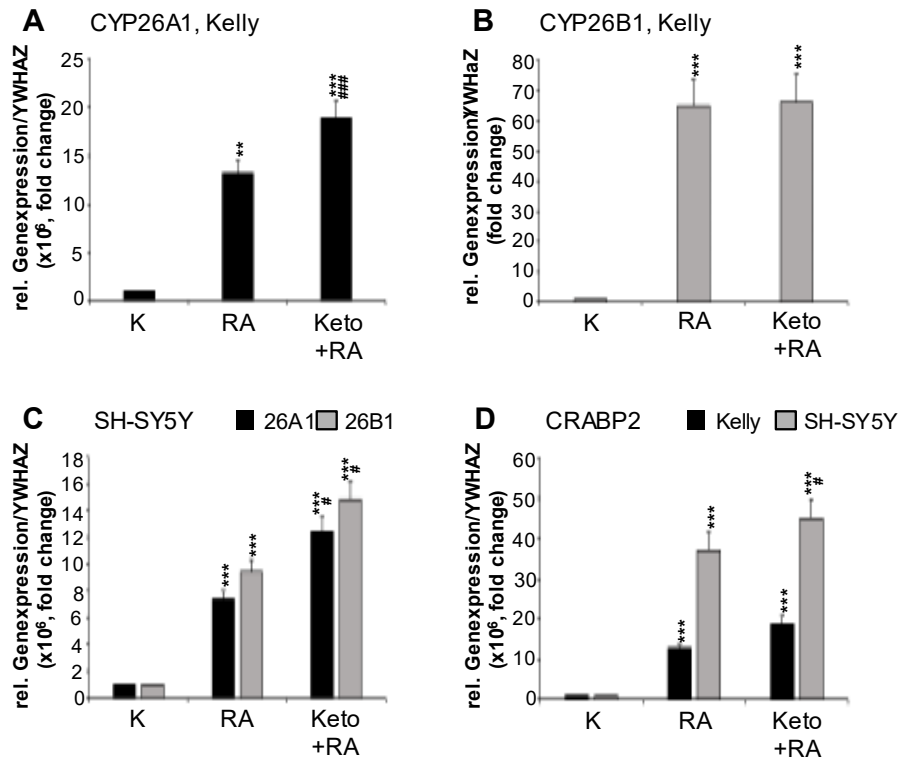
Zur Untersuchung der Effekte und Veränderungen durch Ketoconazol (Keto) wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen jeweils für drei Tage mit 1 µM oder 10 µM Ketoconazol entweder mit oder ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität im Vergleich beider Zelllinien anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ .

Es zeigte sich in beiden Zelllinien eine starke, konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität. Mit Blick auf die bisherigen Ergebnisse war überraschend, dass die ATP-Spiegel sowohl in unbehandelten als auch in Retinsäure-stimulierten Kelly- und SH-SY5Y-Zellen bei 10 µM Ketoconazol abnahmen. In Kelly-Zellen wurden die ATP-Spiegel mit 10 µM Ketoconazol nach dreitägiger Inkubation auf 73,7 % gesenkt, in Kombination mit Retinsäure sogar auf 56,5 %. Auch SH-SY5Y-Zellen zeigten eine signifikante Abnahme der Zellviabilität auf 75,1 % in naiven Zellen und 77,8 % bei zusätzlicher Retinsäuregabe (Abbildung 4.2.13).

Zunächst wurde untersucht, wie Ketoconazol die Regulation von CYP26A1 und CYP26B1 und damit den Abbau von Retinsäure beeinflusste. Dazu wurde die relative Genexpression beider Enzyme überprüft (Abbildung 4.2.14).

## Effekte von Ketoconazol



**Abbildung 4.2.14: Effekte von Ketoconazol auf die Expression von CYP26A1, CYP26B1 und CRABP2**

Verglichen wurden die Effekte von 10  $\mu$ M Ketoconazol (Keto) mit Kontroll- und 5  $\mu$ M Retinsäure-(RA)-vorbehandelten Kelly- und SH-SY5Y-Zellen. Nach dreitägiger Inkubation wurde nach RNA-Isolation eine quantitative PCR mittels Taqman-Assay durchgeführt. Gemessen wurde die relative Genexpression von CYP26A1 (**A**) und CYP26B1 (**B**) in Kelly-Zellen und von CYP26A1 und CYP26B1 (**C**) in SH-SY5Y-Zellen. Zusätzlich wurde die relative Genexpression von CRABP2 (**D**) dargestellt. Die relative Genexpression von CYP26A1, CYP26B1 und CRABP2 wurde als fold change angegeben. Als housekeeper wurde YWHAZ verwendet.

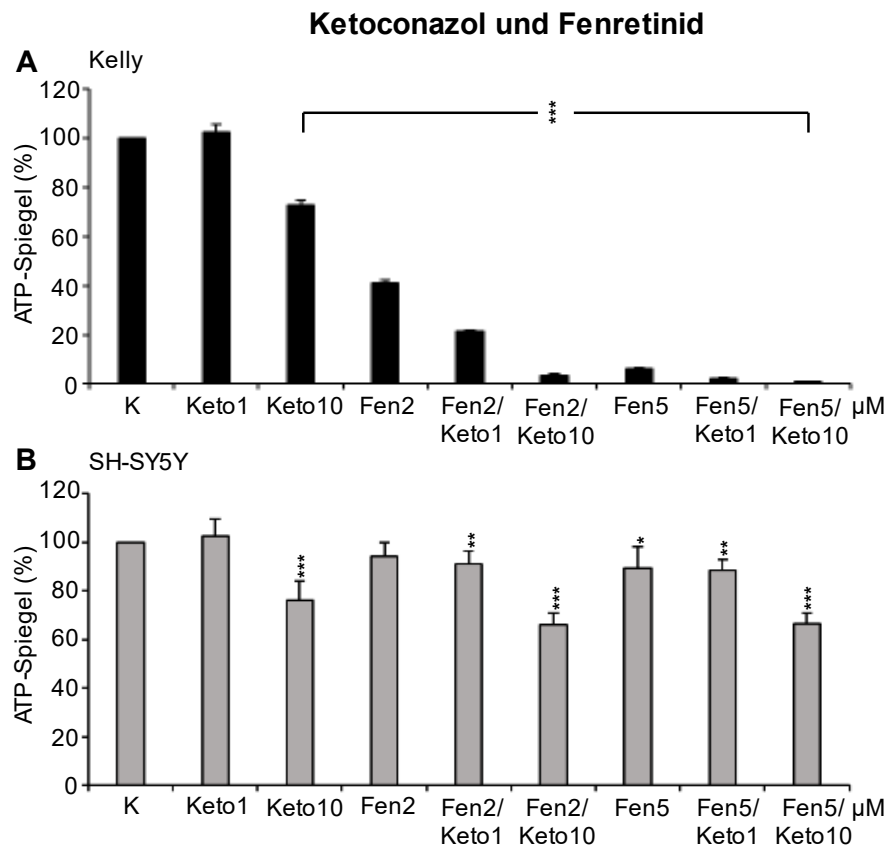
Signifikanzniveau verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

Ähnlich wie bei der Gabe von Talarozol (Abbildung 4.2.6) wurde in Kelly-Zellen die Expression von CYP26A1 durch die Kombination von Retinsäure und Ketoconazol signifikant zu den Kontrollen und den Retinsäure-behandelten Zellen erhöht (18,9 versus 13,2). Die Menge von CYP26B1 wurde nach Inkubation mit Retinsäure und Ketoconazol im Vergleich zu Retinsäure nicht verändert (Abbildung 4.2.14 A und 4.2.14 B). In SH-SY5Y-Zellen wurde die Expression beider Enzyme durch die zusätzliche Gabe von Ketoconazol gegenüber der alleinigen Retinsäurebehandlung erhöht (Abbildung 4.2.14 C), 12,4 versus 7,4 für CYP26A1 und 14,8 versus 9,4 für

CYP26B1. Die indirekte Messung von Retinsäure-Spiegeln über CRABP2 zeigte entsprechend, dass Ketoconazol nur in SH-SY5Y-Zellen die Expression von CRABP2 im Vergleich zu alleiniger Retinsäuregabe steigern konnte (45 versus 37,2).

Demnach waren die Ketoconazol-induzierten Kompensationsmechanismen ähnlich wie nach Talarozol-Behandlung, obwohl die zellulären Effekte stärker waren als bei alleiniger CYP26-Blockade.

Danach sollte untersucht werden, ob Ketoconazol bei der Chemosensitivierung mittels CYP3A4- bzw. CYP3A5-Hemmung einen ähnlichen Effekt verursachte, wie es beim Einsatz von Cobicistat zu beobachten war (vgl. Abbildung 4.2.9). Dazu wurden beide Zelllinien mit Fenretinid (2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M) und Ketoconazol (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) stimuliert und die ATP-Spiegel nach drei Tagen gemessen.



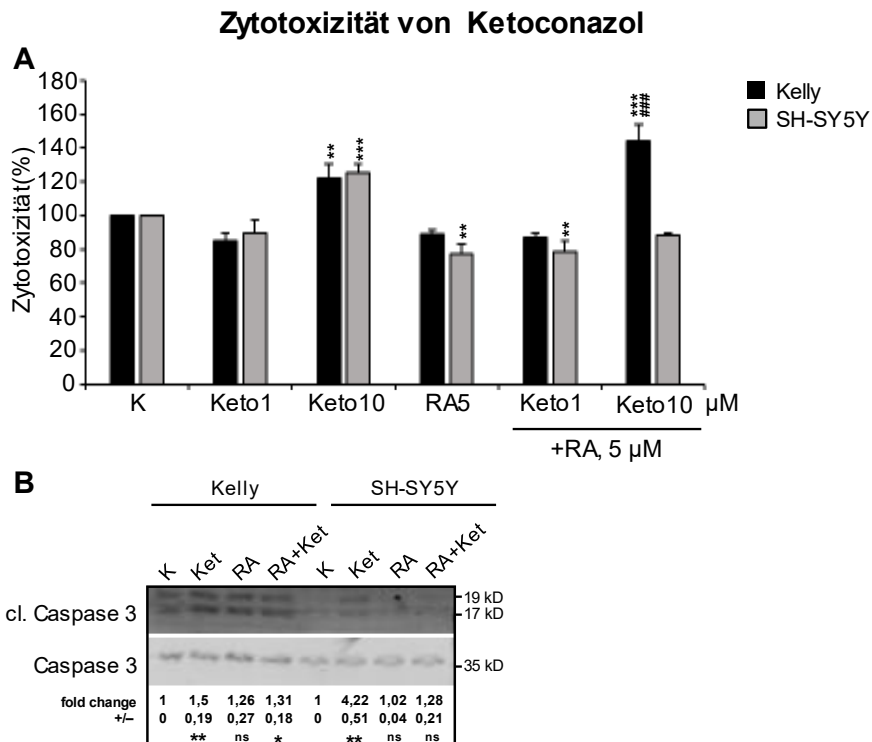
**Abbildung 4.2.15: Kombinierte Gabe von Ketoconazol und Fenretinid**

Kelly-Zellen **(A)** und SH-SY5Y-Zellen **(B)** wurden für jeweils drei Tage allein mit 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M Ketoconazol (Keto) bzw. 2  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M Fenretinid (Fen) inkubiert oder beide Substanzen wurden gemeinsam gegeben. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

In Kelly-Zellen konnte der Effekt von 2  $\mu\text{M}$  Fenretinid sowohl mit 1  $\mu\text{M}$  als auch mit 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol verstärkt werden, indem die ATP-Spiegel auf 21,5 % und 3,5 % im Vergleich zu 41 % gesenkt wurden (Abbildung 4.2.15 A). Insgesamt waren beide Ketoconazol-Konzentrationen damit wirksamer als 10  $\mu\text{M}$  Cobicistat. Auch bei 5  $\mu\text{M}$  Fenretinid nahm die Anzahl der viablen Zellen weiter durch Ketoconazol ab. In SH-SY5Y-Zellen hatte die zusätzliche Gabe von 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol eine stärkere Reduktion der ATP-Spiegel zur Folge als die Verwendung von 1  $\mu\text{M}$  Ketoconazol. Bei 2  $\mu\text{M}$  Fenretinid wurde die Anzahl der viablen Zellen auf 94,2 % gesenkt und kombiniert mit Ketoconazol auf 65,9 % (Abbildung 4.2.15 B). Eine Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  ergab vergleichbare Werte. Damit konnte ein Effekt gemessen werden, der dem von Cobicistat ähnlich war.

Da die bisherigen Experimente zeigten, dass Ketoconazol in einem bestimmten Kontext eine ähnliche Wirkung hatte wie die spezifischen Inhibitoren Talarozol oder Cobicistat, die zellulären Effekte aber stärker waren, sollte untersucht werden, welche zusätzlichen Mechanismen dafür verantwortlich waren. Dazu sollte zunächst analysiert werden, ob Ketoconazol für Kelly- und SH-SY5Y-Zellen zytotoxisch war. Wie in den Versuchen zuvor wurde Ketoconazol in den Dosierungen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  in beiden Zelllinien verwendet, um die Zytotoxizität nach drei Tagen zu bestimmen (Abbildung 4.2.16 A). Ohne den Zusatz von Retinsäure wurde durch 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol in beiden Zelllinien eine erhöhte Zytotoxizität gemessen, die im Vergleich zu den Kontrollen bei 121,8 % (Kelly) bzw. 125,3 % (SH-SY5Y) lag. Mit der zusätzlichen Gabe von Retinsäure waren die Reaktionen zelltypspezifisch. Während in den Kelly-Zellen das Signal bei der kombinierten Gabe von Ketoconazol und Retinsäure auf 143,9 % gegenüber Kontrollen und Retinsäure-behandelten Zellen gesteigert wurde, war die Zytotoxizität bei SH-SY5Y-Zellen allein durch Retinsäure abgeschwächt und konnte durch die Zugabe von Ketoconazol nicht erhöht werden (Abbildung 4.2.16 A).



**Abbildung 4.2.16: Zytotoxizität und Induktion der Apoptose durch Ketoconazol**

**A:** Kelly- und SH-SY5Y-Zellen wurden für jeweils drei Tage mit 1 µM oder 10 µM Ketoconazol (Keto) und mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der toten Zellen.

**B:** Nach dreitägiger Inkubation der Kelly- und SH-SY5Y Zellen mit 10 µM Ketoconazol (Ket) mit oder ohne 5 µM Retinsäure wurden Proteine mit Hilfe von Western Blots gegen aktivierte Caspase (cleaved, cl) 3 und als fold change zur Caspase 3 untersucht.

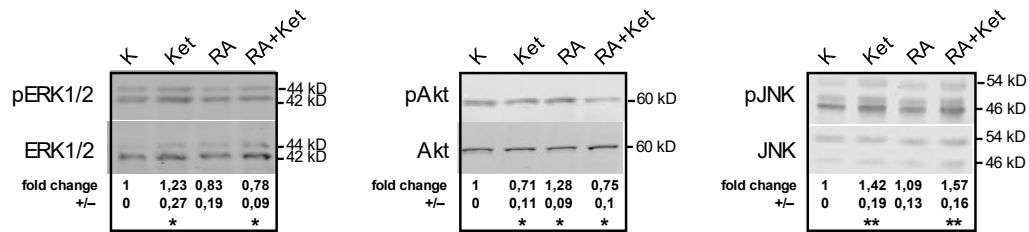
Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ ; ns: nicht signifikant; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Analyse der Caspase-3-Aktivierung im Western Blot, wo Ketoconazol in einer Konzentration von 10 µM verwendet wurde. Bei Kelly-Zellen konnte eine Spaltung der Caspase-3 bei allen Ketoconazol-stimulierten Zellen nachgewiesen werden, bei SH-SY5Y-Zellen nur nach Inkubation mit 10 µM Ketoconazol ohne Retinsäure (Abbildung 4.2.16 B).

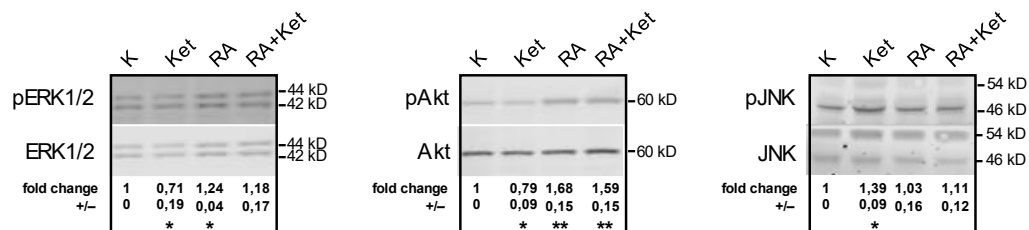
Um die zellulären Effekte besser zu verstehen, sollten wichtige Mediatoren der Signaltransduktion im Western Blot untersucht werden, die charakteristisch für Überleben und Zelltod sind. Hierfür wurden die Aktivitäten (Phosphorylierungen) der Kinasen Akt, ERK1/2 und JNK analysiert.

## Ketoconazol

### A Kelly



### B SH-SY5Y

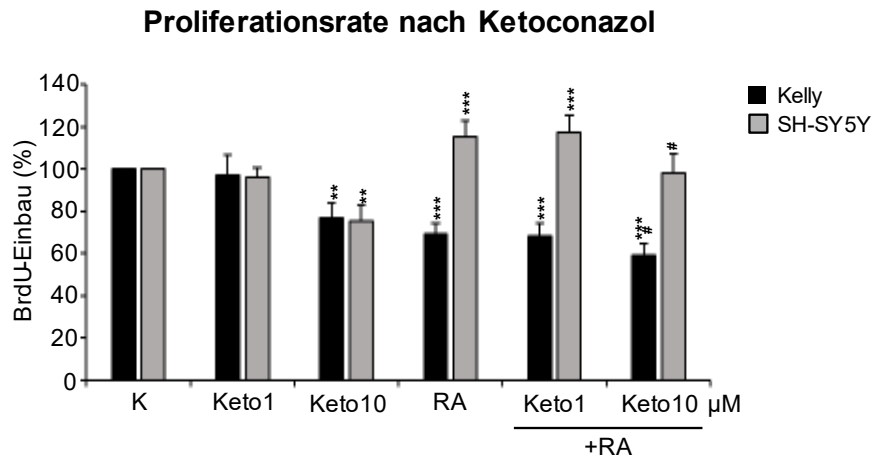


**Abbildung 4.2.17: Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Ketoconazol**

Nach dreitägiger Inkubation von Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) mit 10  $\mu$ M Ketoconazol (Ket) entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) wurden die extrahierten Proteine mit Hilfe von Western Blots auf Phosphorylierungsmuster und Proteinmengen von ERK1/2, Akt und JNK untersucht. Die Phosphorylierung wurde als fold change normalisiert zum nicht-phosphorylierten Protein dargestellt. Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

In Kelly-Zellen (Abbildung 4.2.17 A) wurde nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Ketoconazol eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet, was durch die Gabe von Retinsäure signifikant reduziert werden konnte. Die Aktivierung von Akt wurde sowohl durch Ketoconazol allein als auch bei Ko-Inkubation mit Retinsäure vermindert, was mit einer reduzierten Zellproliferation assoziiert sein konnte. Da allerdings außerdem die Phosphorylierung der Stresskinase JNK durch Ketoconazol erhöht wurde, war die Initiierung von Zelltod wahrscheinlich, wie sich bei der Caspase-3-Aktivierung zeigte (Abbildung 4.2.16 B). In SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.2.17 B) verminderte Ketoconazol (10  $\mu$ M) die Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 und erhöhte die JNK-Aktivität. Die gleichzeitige Gabe von Retinsäure veränderte die Phosphorylierungsmuster jedoch. Bei ERK1/2 und JNK blieb die Aktivität nach Ko-Inkubation auf Kontrollniveau, während die Phosphorylierung von Akt erhöht war.

Damit stellte sich die Frage, ob Ketoconazol darüber hinaus einen proliferationshemmenden Einfluss hatte. Über den Einbau von BrdU in beiden Zelllinien konnte die Proliferation bestimmt werden (Abbildung 4.2.18).



**Abbildung 4.2.18: Proliferationsrate (BrdU-Einbau) nach Inkubation mit Ketoconazol**

Kelly- und SH-SY5Y-Zellen wurden für jeweils drei Tage mit 1 µM oder 10 µM Ketoconazol und mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde die Proliferationsrate (in %) über den BrdU-Einbau.

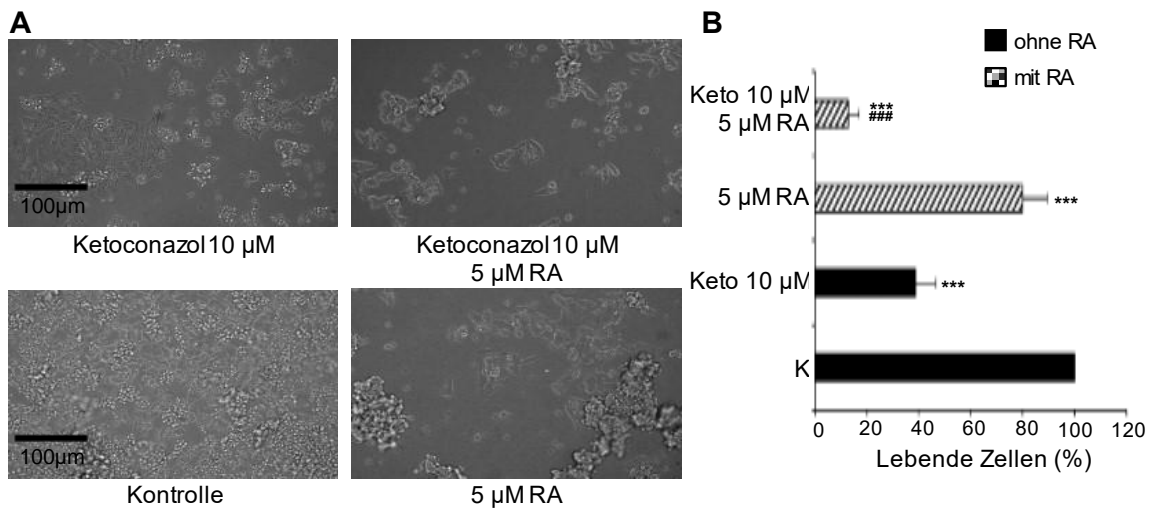
Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: #  $p < 0,05$ .

Ketoconazol reduzierte in der Konzentration von 10 µM die Proliferationsrate in Kelly-Zellen auf 77 %. Die Kombination von Retinsäure und 1 µM Ketoconazol senkte den BrdU-Einbau signifikant auf 68 % und die gemeinsame Gabe mit 10 µM sogar auf 59 %. Auch SH-SY5Y-Zellen zeigten nach Inkubation mit 10 µM Ketoconazol einen um 25 % verminderten Einbau von BrdU im Vergleich zur Kontrolle, während die Ko-Inkubation mit Retinsäure zu einer Proliferationsrate auf Kontrollniveau führte, jedoch gegenüber Retinsäure allein signifikant um 17 % reduziert war.

Um abzuschätzen, wie die Behandlung mit Ketoconazol auch länger als drei Tage die Zellviabilität beeinflusste, wurden Kelly- (Abbildung 4.2.19) und SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.2.20) für zehn Tage mit Ketoconazol und/ oder Retinsäure inkubiert. Danach erfolgte eine mikroskopische Aufnahme und Zählung der Zellen.



### 10 Tage Inkubation mit Ketoconazol, Kelly-Zellen



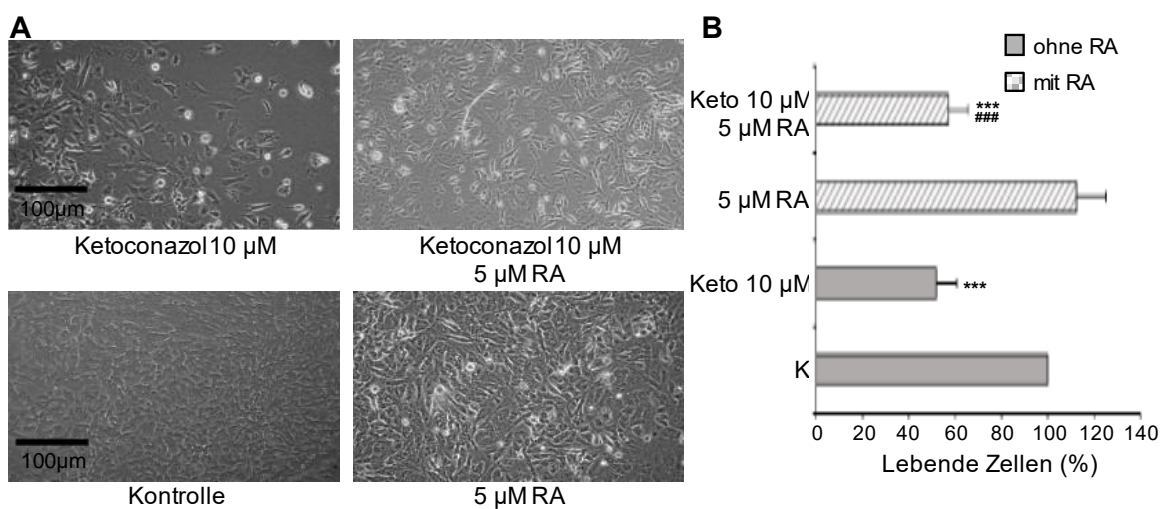
**Abbildung 4.2.19: Langzeitviabilität nach Inkubation mit Ketoconazol in Kelly-Zellen**

**A:** Exemplarische mikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung nach Stimulation mit 10 µM Ketoconazol mit und ohne 5 µM Retinsäure (RA) von Kelly-Zellen nach 10 Tagen.

**B:** Auszählung der lebenden Zellen in den mikroskopischen Bildern relativ zur Kontrolle und zu Retinsäure-behandelten Zellen

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ .

### 10 Tage Inkubation mit Ketoconazol, SH-SY5Y-Zellen



**Abbildung 4.2.20: Langzeitviabilität nach Inkubation mit Ketoconazol in SH-SY5Y-Zellen**

**A:** Exemplarische mikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung nach Stimulation mit 10 µM Ketoconazol mit und ohne 5 µM Retinsäure (RA) von SH-SY5Y-Zellen nach 10 Tagen.

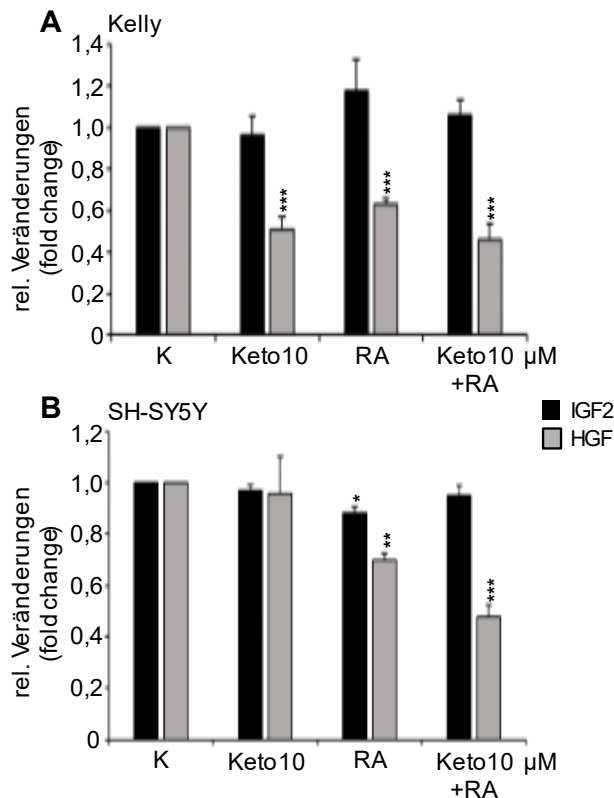
**B:** Auszählung der lebenden Zellen in den mikroskopischen Bildern relativ zur Kontrolle und zu Retinsäure-behandelten Zellen.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ .

Es zeigte sich für beide Zelllinien unter der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol und Retinsäure (5  $\mu\text{M}$ ) eine signifikante Reduktion der lebenden Zellen gegenüber der alleinigen Behandlung mit Retinsäure und gegenüber der Kontrolle. Ebenfalls auf den mikroskopischen Bildern erkennbar war eine starke Verminderung der interzellulären Kontakte unter Ketoconazol, sowohl für die naiven Zellen als auch unter Behandlung mit Retinsäure. Insofern bestätigten die Ergebnisse der 10-tägigen Inkubation die proliferationshemmenden und zelltodfördernden Effekte der Kurzzeitexperimente.

Um die Ursache der bislang beobachteten Resultate zu verstehen, wurde untersucht, ob Ketoconazol einen Einfluss auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren hatte, die in vielen Tumoren das Wachstum stimulieren und den Zelltod inhibieren. Hierfür wurden die Mengen der Wachstumsfaktoren IGF2 (*insuline like growth factor*) und HGF (*hepatocyte growth factor*) im Zellüberstand mittels ELISA gemessen (Abbildung 4.2.21), die beide Überlebensfaktoren von Krebszellen sein können (Czarnecka et al. 2020).

### Wachstumsfaktoren und Ketoconazol



**Abbildung 4.2.21: Freisetzung von IGF2 und HGF nach Inkubation mit Ketoconazol**

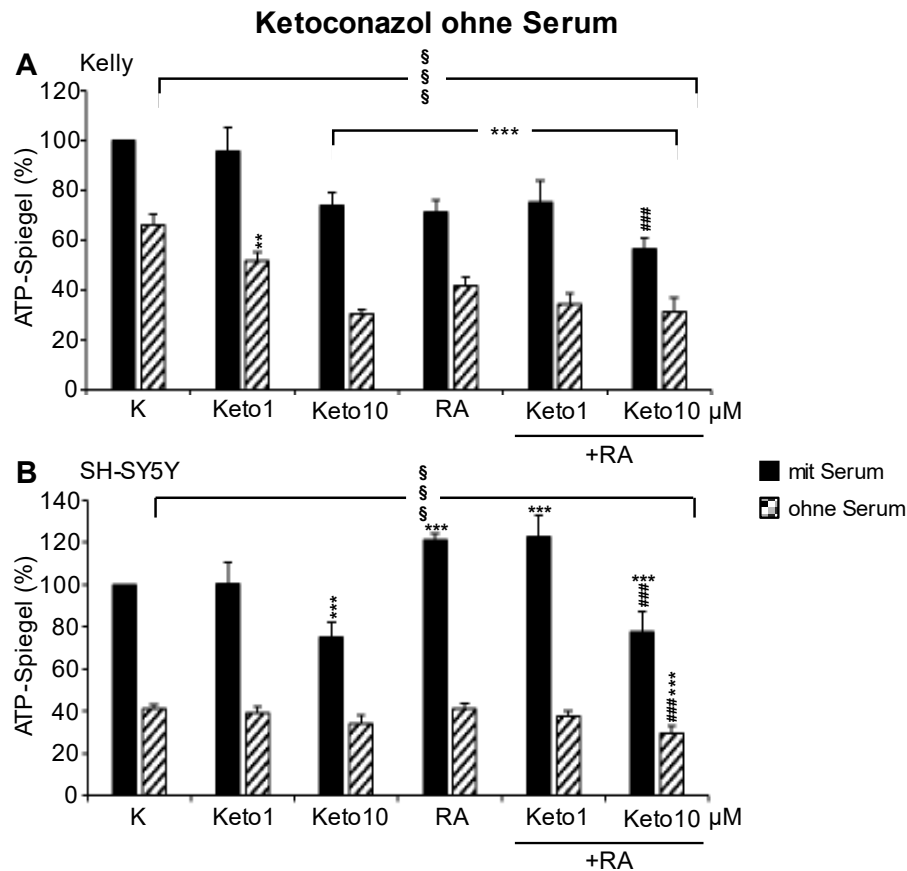
Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) wurden jeweils mit 10  $\mu$ M Ketoconazol (Keto) entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) für drei Tage inkubiert. Daraufhin wurde mittels dem Human IGF-II/IGF2 Quantikine ELISA Kit und Human HGF Quantikine ELISA Kit die freigesetzte Menge an IGF2 und HGF aus den beiden Zelllinien gemessen. Dargestellt sind im Vergleich jeweils die relativen Veränderungen von IGF2 und HGF als fold change zur jeweiligen Kontrolle.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

In Kelly-Zellen wurde nur die Freisetzung von HGF durch die Gabe von Ketoconazol (0,51-fach), Retinsäure (0,63-fach) und deren Kombination (0,46-fach) im Vergleich zur Kontrolle reduziert, während die IGF2-Mengen auf Kontrollniveau blieben (Abbildung 4.2.21 A). Bei SH-SY5Y-Zellen wurden die Spiegel von IGF2 (0,88-fach) und HGF (0,7-fach) durch Inkubation mit Retinsäure vermindert. Ketoconazol konnte nur zusammen mit Retinsäure die Freisetzung von HGF (0,48-fach) reduzieren, nicht jedoch bei alleiniger Behandlung (Abbildung 4.2.21 B).

Da Ketoconazol entweder allein oder in Kombination mit Retinsäure in der Lage war, die Freisetzung von IGF2 und HGF zu beeinflussen, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren im Serum eine Rolle spielte. Dazu wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen in Medium ohne

Serum kultiviert, mit Ketoconazol (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) und/ oder Retinsäure inkubiert und nach drei Tagen die ATP-Spiegel gemessen. (Abbildung 4.2.22).



**Abbildung 4.2.22: Effekte nach Inkubation von Ketoconazol ohne Serum**

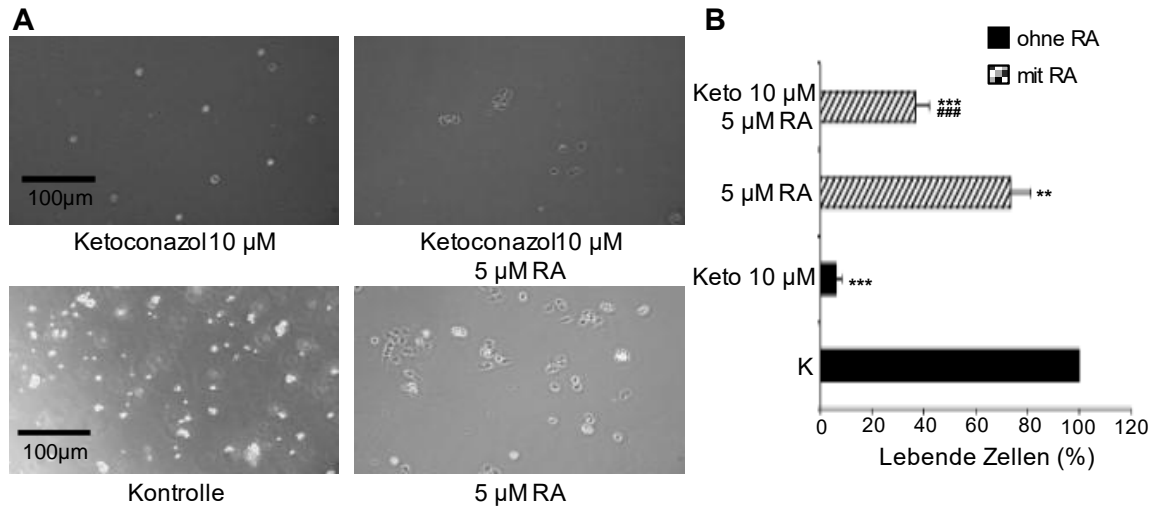
Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) wurden für jeweils drei Tage mit bzw. ohne Serum mit 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M Ketoconazol (Keto) entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$  oder mit Zellen in Serum-haltigem Medium: §§§  $p < 0,001$ .

Insgesamt zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in beiden Zelllinien, wenn diese ohne Serum kultiviert wurden. Wurden serumdeprivierte Kelly-Zellen zusätzlich mit Ketoconazol stimuliert, konnte schon bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine signifikante Abnahme der ATP-Spiegel im Vergleich zu Kontrolle auf 51,7 % (versus 66 %) beobachtet werden. In SH-SY5Y-Zellen reduzierte die Gabe von Ketoconazol in Zellen ohne Serum die Anzahl der viablen Zellen nicht weiter. Nur bei gleichzeitiger Gabe von 10  $\mu$ M Ketoconazol und Retinsäure wurden die ATP-Spiegel auf 29,4 % reduziert und waren damit signifikant gegenüber Kontrollen (41 %) und Retinsäure-behandelten Zellen (41 %) verändert.

Damit stellte sich die Frage, wie sich eine zehntägige Inkubation ohne Serum, aber mit Ketoconazol (10  $\mu$ M) und/ oder Retinsäure auswirkte (Abbildung 4.2.23 und 4.2.24).

#### 10 Tage Inkubation mit Ketoconazol ohne Serum, Kelly-Zellen



**Abbildung 4.2.23: Langzeitviabilität nach Inkubation ohne Serum und mit Ketoconazol in Kelly-Zellen**

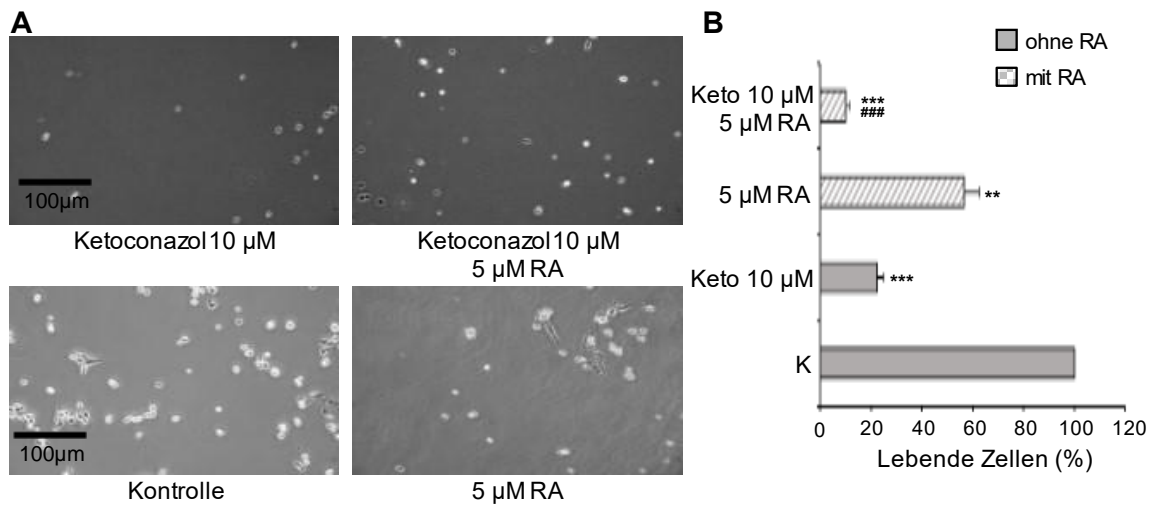
**A:** Exemplarische mikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung nach 10-tägiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Ketoconazol entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) von serumfreien Kelly-Zellen.

**B:** Auszählung der lebenden Zellen in den mikroskopischen Bildern relativ zur Kontrolle.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ .

Verglichen mit der Kontrolle zeigten sich mikroskopisch nach 10-tägiger Inkubation mit Ketoconazol 10  $\mu$ M allein nur noch vereinzelte Kelly-Zellen (Abbildung 4.2.23 A und 4.2.23 B). Unter Retinsäure war die Zellzahl auf 73,4 % reduziert, durch die kombinierte Gabe von Ketoconazol und Retinsäure auf 36,6 %.

### 10 Tage Inkubation mit Ketoconazol ohne Serum, SH-SY5Y-Zellen



**Abbildung 4.2.24: Langzeitviabilität nach Inkubation ohne Serum und mit Ketoconazol in SH-SY5Y-Zellen**

**A:** Exemplarische mikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung nach 10-tägiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Ketoconazol entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) von serumfreien SH-SY5Y-Zellen.

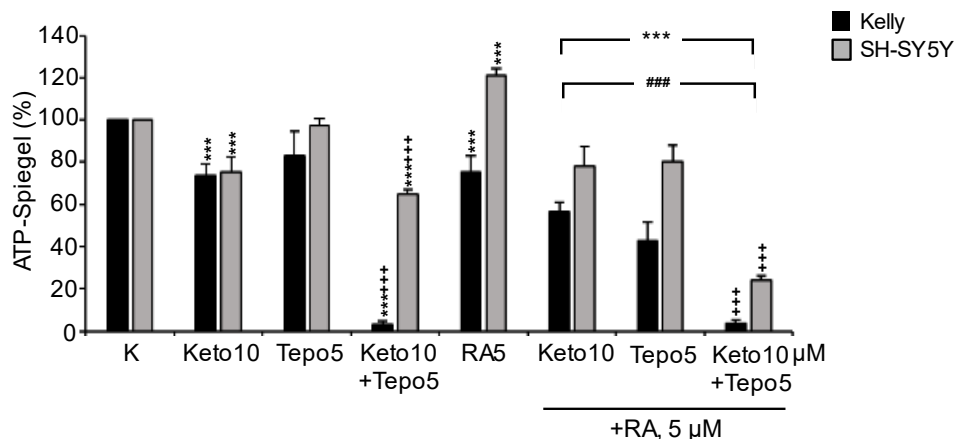
**B:** Auszählung der lebenden Zellen in den mikroskopischen Bildern relativ zur Kontrolle.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ .

Nach 10-tägiger Inkubation ohne Serum sorgten 10  $\mu$ M Ketoconazol für eine starke Reduktion der Zellzahl auf 22,3 % in SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.2.24 A und 4.2.23 B). Besonders die Gabe von Ketoconazol zusätzlich zu Retinsäure führte zu einer massiven Abnahme der lebenden SH-SY5-Zellen auf 10 %.

Da eine komplette Blockade von Wachstumsfaktor-vermittelten Signalen bei der Tumorthherapie nicht möglich ist, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob Ketoconazol die gezielte Inhibition von einzelnen Mediatoren unterstützen konnte. Aufgrund der beobachteten Beeinflussung der HGF-Freisetzung durch Ketoconazol und/ oder Retinsäure (Abbildungen 4.2.21 A und 4.2.21 B), wurde ein spezifischer Hemmstoff des HGF-Signalwegs ausgewählt. Tepotinib (Tepo) ist ein Inhibitor des HGF-Rezeptors c-Met, der intrazellulär die Weiterleitung der Signale blockiert (Markham 2020). Beide Zelllinien wurden mit 10  $\mu$ M Ketoconazol, 5  $\mu$ M Tepotinib, 5  $\mu$ M Retinsäure oder einer Kombination aus zwei oder allen Substanzen inkubiert. Nach drei Tagen wurden die ATP-Spiegel gemessen.

### Ketoconazol und Tepotinib



**Abbildung 4.2.25: Kombinierte Gabe von Ketoconazol und Tepotinib**

Bei der dreitägigen Stimulation von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen wurden folgende Substanzen bzw. Kombinationen eingesetzt: 10  $\mu$ M Ketoconazol (Keto), 5  $\mu$ M Tepotinib (Tepo) oder 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) allein, als Zweifachkombinationen Ketoconazol mit Tepotinib, Ketoconazol mit Retinsäure oder Tepotinib mit Retinsäure und als Dreifachkombination Ketoconazol mit Tepotinib und Retinsäure. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel relativ zur zelltypspezifischen Kontrolle.

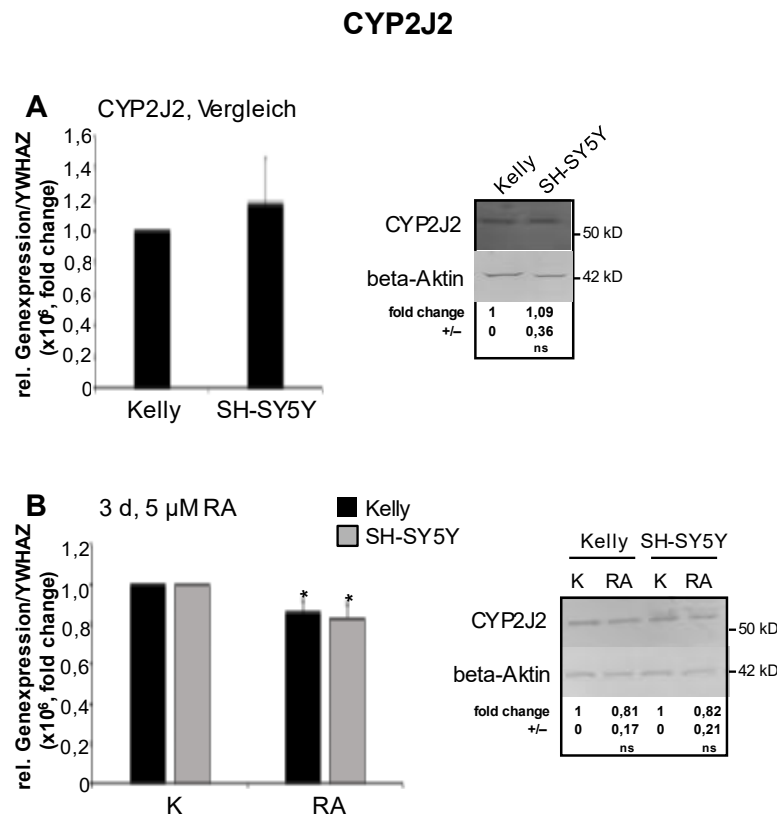
Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$  oder mit Tepotinib-behandelten Zellen: +++  $p < 0,001$ .

Eine alleinige Gabe von Tepotinib zeigte in beiden Zelllinien gegenüber der Kontrolle keine Veränderung. Die Kombination von Ketoconazol und Tepotinib reduzierte die ATP-Spiegel von Kelly-Zellen auf 3,3 % und von SH-SY5Y-Zellen auf 64,7 %. Wurden die Zellen gleichzeitig mit Tepotinib und Retinsäure inkubiert, konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden (Kelly 42,8 %, SH-SY5Y 80 %). Die gleichzeitige Gabe aller Substanzen hatte jedoch einen noch stärkeren Effekt und senkte die Viabilität auf 3,7 % bei Kelly-Zellen und 24 % bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.2.25).

Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass sich das Überleben von Neuroblastomzellen nicht ausschließlich durch die selektive Hemmung von CYP26A1, CYP26B1 oder CYP3A5 reduzieren ließ. Erst die kombinierte Blockade mehrerer Angriffspunkte hatte einen Einfluss auf die Anzahl der lebenden Zellen.

## 4.7 Die Rolle von CYP2J2 in Neuroblastomzellen

Bei der Auswertung der Expressionsdaten verschiedener Cytochrom-P450-Enzyme zeigte sich, dass CYP2J2 nach Gabe von Retinsäure in SH-SY5Y-Zellen reduziert wurde (Abbildung 4.1.5). Da CYP2J2 einen onkogenen Effekt in Tumorzellen haben kann (Zanger und Schwab 2013), sollte in den folgenden Experimenten eine mögliche Bedeutung von CYP2J2 für Neuroblastomzellen untersucht werden.



**Abbildung 4.3.1: Expression und Proteinmengen von CYP2J2 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

Von **(A)** naiven Kelly- und SH-SY5Y-Zellen oder **(B)** nach dreitägiger Inkubation mit 5 μM Retinsäure (RA) wurde nach RNA-Isolation eine quantitative PCR mittels Taqman-Assay durchgeführt, um die Expression von CYP2J2 zu ermitteln. Gemessen wurde die relative Genexpression von CYP2J2 in beiden Zellen fold change x 10<sup>6</sup>. Als housekeeper wurde YWHAZ verwendet. Zusätzlich wurde nach Proteinextraktion die Proteinmenge von CYP2J2 in Western Blots bestimmt, normalisiert auf beta-Aktin. Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \* p < 0,05, ns: nicht signifikant; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Zunächst wurden Expression und Proteinmengen von CYP2J2 in beiden Zelllinien überprüft. Wie in den MicroArrays waren die CYP2J2-Mengen auf mRNA- sowie Proteinebene in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen vergleichbar (Abbildung 4.3.1 A). Nach dreitägiger Inkubation mit 5 μM Retinsäure konnte mittels quantitativer PCR eine

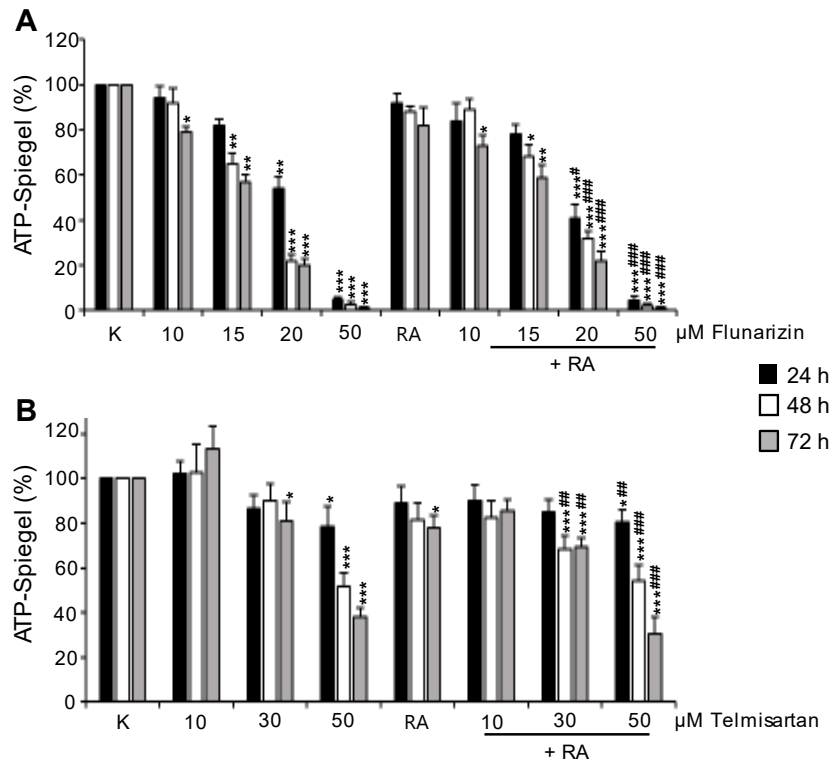


leichte Reduktion von CYP2J2 (Kelly 0,86, SH-SY5Y 0,83) nachgewiesen werden, die im Western Blot allerdings nicht mehr signifikant war (Abbildung 4.3.1 B).

Danach sollte analysiert werden, ob eine Blockade von CYP2J2 einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte. Dazu wurden Inhibitoren verwendet, die CYP2J2 mit hoher Affinität blockierten, aber kein Substrat des Enzyms waren. Diese Kriterien erfüllten Flunarizin (Flu) und Telmisartan (Tel) (Ren et al. 2013). In den Inhibitor-Versuchen wurde für Kelly-Zellen Flunarizin zunächst in Konzentrationen von 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M und 50  $\mu$ M verwendet (Abbildung 4.3.2 A) und Telmisartan in 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M und 50  $\mu$ M (Abbildung 4.3.2 B). SH-SY5Y-Zellen wurden mit Flunarizin-Dosen von 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M (Abbildung 4.3.3 A) stimuliert, während Telmisartan in Konzentrationen von 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M eingesetzt wurde (Abbildung 4.3.3 B). Außerdem wurde in den Versuchen jeweils getestet, inwieweit sich die Viabilität durch die zusätzliche Gabe von 5  $\mu$ M Retinsäure veränderte. Die ATP-Spiegel wurden nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen.

Insgesamt war der Effekt von Flunarizin wesentlich stärker als der von Telmisartan. In Kelly-Zellen wurden durch 10  $\mu$ M Flunarizin die ATP-Spiegel nach drei Tagen auf 79 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Bei gleichzeitiger Gabe von Retinsäure konnte die Anzahl der viablen Zellen auf 73 % gesenkt werden (Abbildung 4.3.2 A). Bei einer Konzentration von 15  $\mu$ M war bereits nach 48 Stunden eine signifikante Reduktion der Viabilität auf 65 % sichtbar, bei 20  $\mu$ M waren die ATP-Spiegel schon nach 24 Stunden um 46 % vermindert. Telmisartan dagegen konnte erst ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M nach dreitägiger Inkubation die Anzahl der lebenden Zellen auf 81 % senken. Mit gleichzeitiger Gabe von Retinsäure war nach 48 Stunden eine Reduktion der Zellviabilität auf 68,1 % erkennbar (Abbildung 4.3.2 B).

### CYP2J2-Inhibition in Kelly



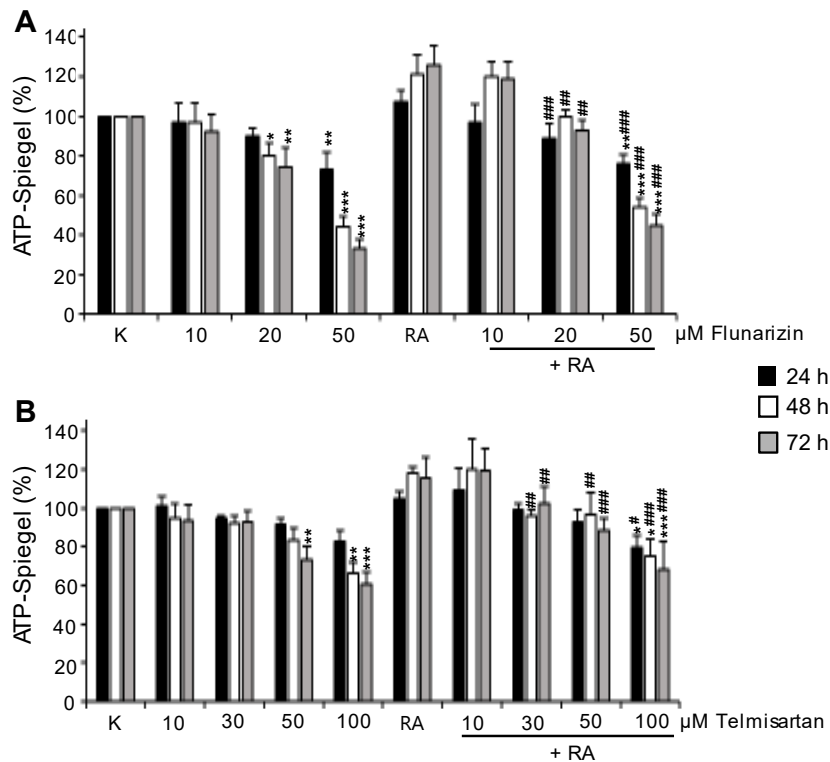
**Abbildung 4.3.2: CYP2J2-Inhibition durch Flunarizin oder Telmisartan in Kelly-Zellen**

**A:** Die Kelly-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 10 µM, 15 µM, 20 µM oder 50 µM Flunarizin und/ oder 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

**B:** Die Kelly-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 10 µM, 30 µM oder 50 µM Telmisartan und/ oder 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

### CYP2J2-Inhibition in SH-SY5Y



**Abbildung 4.3.3: CYP2J2-Inhibition durch Flunarizin oder Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen**

**A:** Die SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 10 µM, 20 µM oder 50 µM Flunarizin und/ oder 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

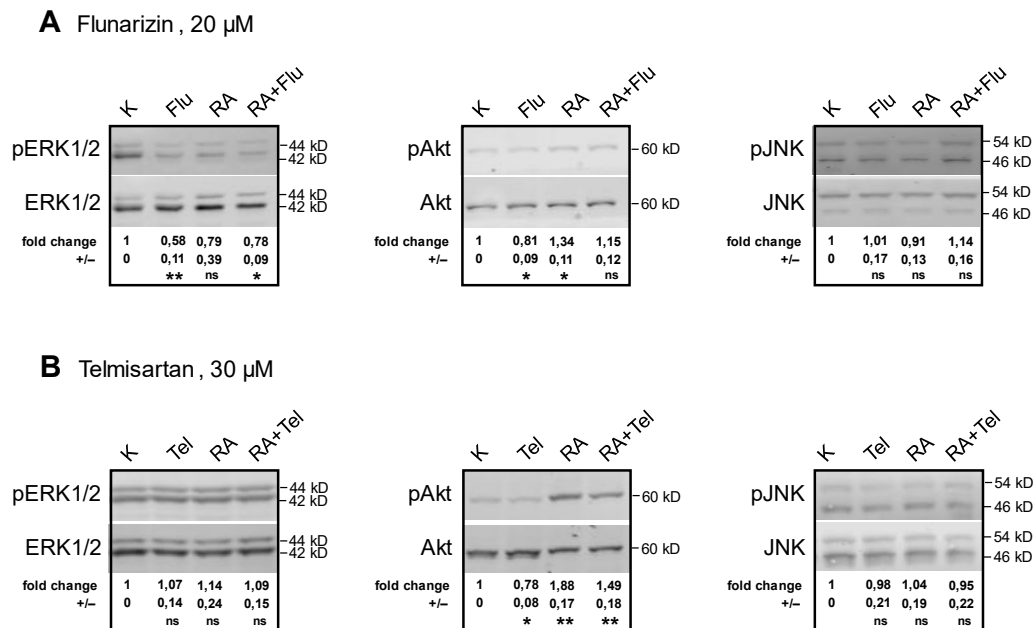
**B:** Die SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 10 µM, 30 µM, 50 µM oder 100 µM Telmisartan und/ oder 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen verglichen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

Ähnlich wie für Kelly-Zellen hatte auch für SH-SY5Y-Zellen Flunarizin den stärkeren Einfluss auf die Viabilität. Bereits 20 µM Flunarizin zeigten gegenüber den unbehandelten Kontrollen eine Reduktion der ATP-Spiegel auf 80 % nach 48 Stunden. Bei gleichzeitiger Stimulation mit Retinsäure konnte die Anzahl der lebenden Zellen nur gegenüber den Retinsäure-behandelten Zellen gesenkt werden, nicht jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Das gelang erst ab einer Konzentration von 50 µM (Abbildung 4.3.3 A). Telmisartan konnte erst nach dreitägiger Inkubation mit 50 µM die ATP-Spiegel signifikant auf 73,2 % reduzieren. Der Effekt war am stärksten mit der Konzentration von 100 µM zu sehen, was auch auf Retinsäure-behandelte SH-SY5Y-Zellen zutraf (Abbildung 4.3.3 B).

Im Weiteren sollten die Inhibitor-Effekte auf die Aktivitäten der Kinasen ERK1/2, Akt und JNK untersucht werden. Hierfür wurden die Phosphorylierungen in Bezug zur Proteinmenge in Betracht gezogen. Die Stimulation erfolgte mit Flunarizin 20  $\mu$ M für Kelly- und 30  $\mu$ M für SH-SY5Y-Zellen. Telmisartan wurde mit 30  $\mu$ M verwendet. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Zellen lysiert, da zu diesem Zeitpunkt noch genug Zellen zur Untersuchung vorhanden waren.

### Effekte Flunarizin und Telmisartan, Kelly-Zellen



**Abbildung 4.3.4: Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Flunarizin oder Telmisartan in Kelly-Zellen**

Die Kelly-Zellen wurden für 48 Stunden mit 20  $\mu$ M Flunarizin (Flu) und mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) **(A)** sowie mit 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel) und mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure **(B)** inkubiert. Nach Proteinextraktion wurde in Western Blots die Phosphorylierungen (als fold change) von ERK1/2, Akt und JNK relativ zur Proteinmenge ermittelt.

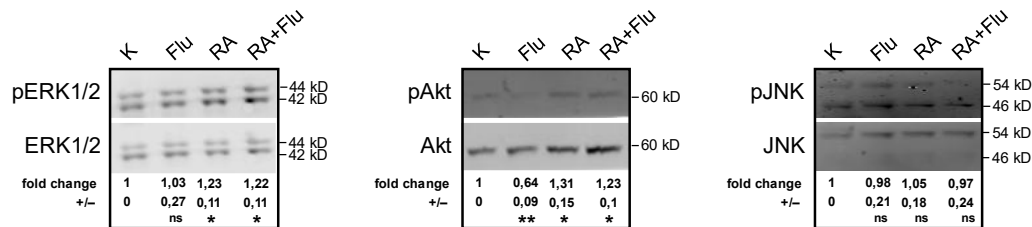
Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , ns: nicht signifikant; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Kelly-Zellen zeigten unter Flunarizin (Abbildung 4.3.4 A) in unbehandelten und Retinsäure-stimulierten Bedingungen eine Reduktion von phosphoryliertem ERK1/2. Die Aktivität von Akt konnte ebenfalls durch die Gabe von Flunarizin gesenkt werden, zusammen mit Retinsäure blieb die Akt-Phosphorylierung aber auf Kontrollniveau. Die Aktivierung von JNK wurde nicht verändert (Abbildung 4.3.4 A). Telmisartan führte zu einer Reduktion der Akt-Phosphorylierung, beeinflusste allerdings sonst weder die

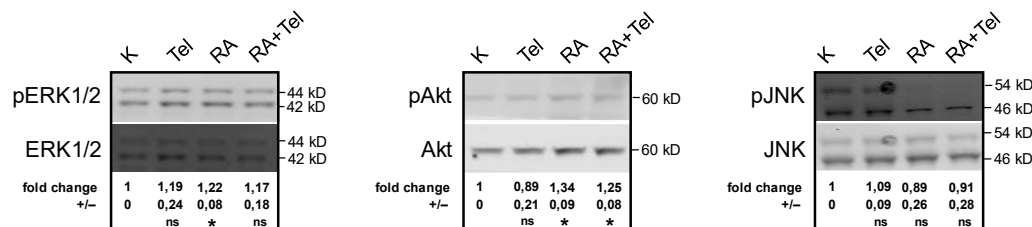
Aktivierungsmuster von ERK1/2 und JNK noch die Retinsäure-induzierte Aktivierung von Akt (Abbildung 4.3.4 B).

### Effekte Flunarizin und Telmisartan, SH-SY5Y-Zellen

#### A Flunarizin, 30 $\mu$ M



#### B Telmisartan, 30 $\mu$ M



**Abbildung 4.3.5: Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Flunarizin oder Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen**

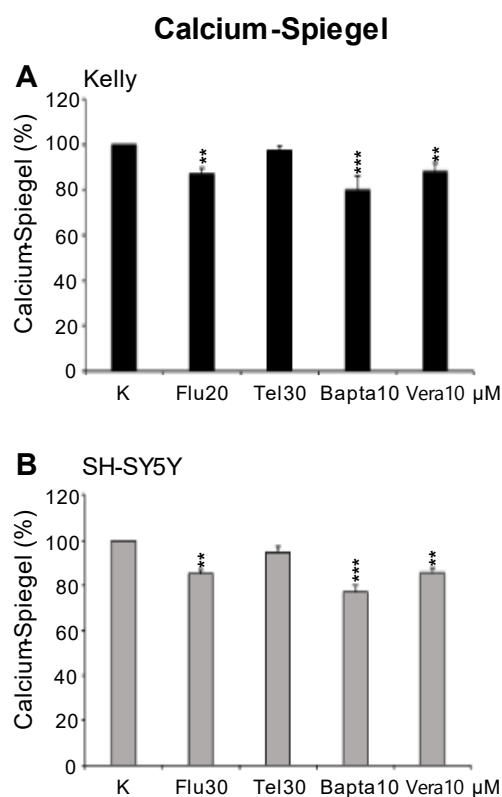
SH-SY5Y-Zellen wurden für 48 Stunden mit 30  $\mu$ M Flunarizin (Flu) und mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) **(A)** sowie mit 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel) und mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure **(B)** inkubiert. Nach Proteinextraktion wurde in Western Blots die Phosphorylierungen (als fold change) von ERK1/2, Akt und JNK relativ zur Proteinmenge ermittelt.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\* p < 0,01, \* p < 0,05, ns: nicht signifikant; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

SH-SY5Y-Zellen zeigten unter Flunarizin (Abbildung 4.3.5 A) keine Veränderung von phosphoryliertem ERK1/2; auch die Retinsäure-induzierte Aktivierung von ERK1/2 wurde durch Flunarizin nicht verhindert. Reduziert wurde durch Flunarizin die Phosphorylierung von Akt, während die Aktivität von JNK auf Kontrollniveau blieb. Telmisartan (Abbildung 4.3.5 B) konnte nur die Retinsäure-vermittelte Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung senken. Die anderen Signale waren im Vergleich zu den Kontrollen oder Retinsäure-behandelten Zellen unverändert.

Um zu verstehen, warum Flunarizin die Zellviabilität stärker reduzierte als Telmisartan, wurden in den folgenden Experimenten zelluläre Effekte von Flunarizin untersucht, die unabhängig von der CYP2J2-Inhibition auftreten konnten.

Für Flunarizin ist bekannt, dass es Calciumkanäle blockiert (Conrad et al. 2010). Zunächst sollte überprüft werden, ob es auch in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen zu einer eingeschränkten Funktion von Calciumkanälen durch Flunarizin kam. Dazu wurden beide Zelllinien auf schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät, um das Hintergrundsignal des fluoreszenzbasierten Calciumassays zu minimieren. Zu einer besseren Beurteilung des Effektes wurden, neben Flunarizin und Telmisartan, weitere Substanzen verwendet, die die intrazellulären Calciumspiegel beeinflussen können. Dazu gehörten BAPTA-AM (BAPTA), ein zellpermeabler Calcium-Chelator (Wu et al. 2018), und Verapamil (Vera), ein Inhibitor der L-Typ-Calciumkanäle (Rattis et al. 2021).



**Abbildung 4.3.6: Calcium-Spiegel in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

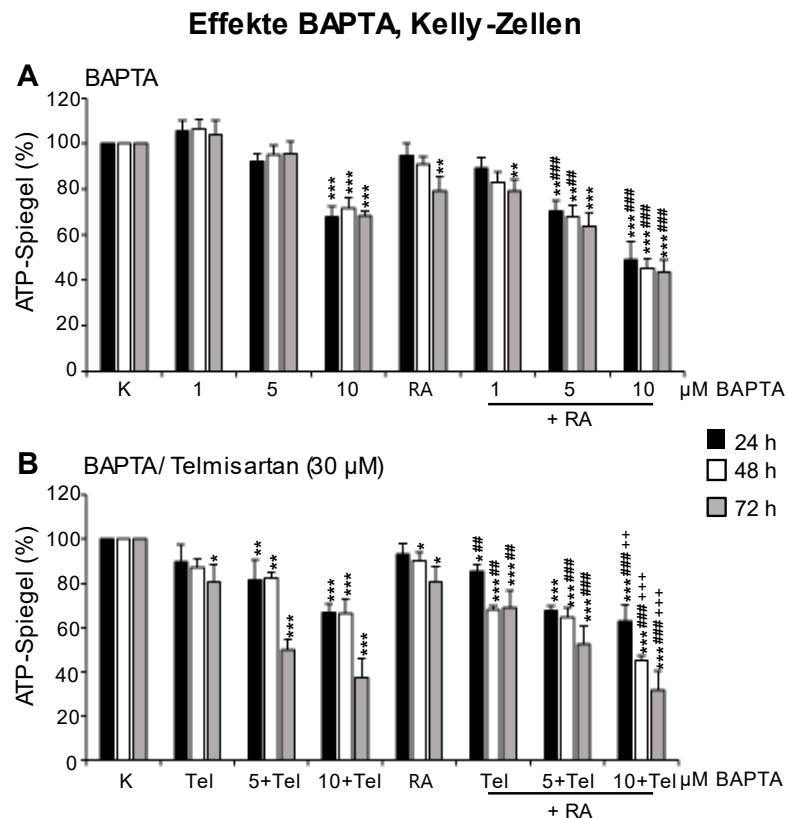
Kelly-Zellen **(A)** wurden für 24 Stunden kultiviert und danach mit 20  $\mu$ M Flunarizin (Flu), 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel), 10  $\mu$ M BAPTA-AM (Bapta) oder 10  $\mu$ M Verapamil (Vera) inkubiert. SH-SY5Y-Zellen **(B)** wurden für 24 Stunden kultiviert und danach mit 30  $\mu$ M Flunarizin, 30  $\mu$ M Telmisartan, 10  $\mu$ M BAPTA-AM oder 10  $\mu$ M Verapamil stimuliert. Daraufhin erfolgte eine Messung des intrazellulären Calcium-Spiegels mittels dem Fluo-4 NW-Assay. Verglichen wurde der Anteil des intrazellulären Calciums (in %) nach unterschiedlicher Stimulation relativ zur Kontrolle.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$

Nach Inkubation mit der Färbelösung, wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Inhibitoren behandelt. Die Calciumspiegel blieben nach Stimulation mit Telmisartan in

beiden Zelllinien auf Kontrollniveau, während Flunarizin zu einer Verminderung der Signale auf 87 % bei den Kelly- und 85 % bei den SH-SY5Y-Zellen führte. Der Calciumchelator BAPTA-AM reduzierte die Fluoreszenz um 20 % bei den Kelly- und 23 % bei den SH-SY5Y-Zellen. Die Inkubation mit Verapamil führte zu ähnlichen Ergebnissen wie Flunarizin: Die Calciumspiegel der Kelly-Zellen wurden auf 88 % gesenkt, die der SH-SY5Y-Zellen auf 86 %.

Um zu überprüfen, ob diese Wirkung für das Überleben von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen relevant war und eine Kombination mit Telmisartan dadurch einen vergleichbaren Effekt wie Flunarizin hatte, wurden die Zellen zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen BAPTA-AM bzw. 30  $\mu$ M Telmisartan allein inkubiert, mit der Zweifachkombination von BAPTA-AM und 5  $\mu$ M Retinsäure bzw. BAPTA-AM und 30  $\mu$ M Telmisartan oder der Dreifachkombination von BAPTA-AM, Retinsäure und Telmisartan. Die ATP-Spiegel wurden nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt.



**Abbildung 4.3.7: Effekt des Calcium-Chelators BAPTA-AM zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen**

**A:** Kelly-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M BAPTA-AM und mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

**B:** Kelly-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 30  $\mu\text{M}$  Telmisartan (Tel) allein oder zusammen mit 5  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM sowie mit bzw. ohne 5  $\mu\text{M}$  Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$  oder mit Telmisartan-behandelten Zellen: +++  $p < 0,001$ , ++  $p < 0,01$ .

Während die ATP-Spiegel der Kelly-Zellen durch eine Inkubation mit BAPTA-AM in den Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  nicht verändert wurden, konnte die Anzahl der lebenden Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM bereits nach 24 Stunden auf 68 % gesenkt werden (Abbildung 4.3.7 A). Wurden Kelly-Zellen gleichzeitig mit BAPTA-AM und Retinsäure behandelt, konnten die ATP-Spiegel auch mit 5  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM auf 70,3 % schon nach 24 Stunden reduziert werden, wobei die Effekte der Kombination von 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM und Retinsäure noch stärker waren.

Außerdem wurde analysiert, ob die gemeinsame Gabe von Telmisartan und BAPTA-AM einen additiven Effekt hatte. Für Kelly-Zellen zeigte sich bereits mit 5  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM und Telmisartan nach 24 Stunden eine Reduktion der Zellviabilität auf 81,7 %. Dieser Effekt konnte konzentrationsabhängig gesteigert werden. Mit Retinsäure, 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM und Telmisartan waren die ATP-Spiegel sogar signifikant niedriger als mit Retinsäure und Telmisartan zusammen (62,8 % versus 85,3 % nach 24 h). Zeitabhängig konnte die Anzahl der lebenden Zellen weiter reduziert werden (Abbildung 4.3.7 B).

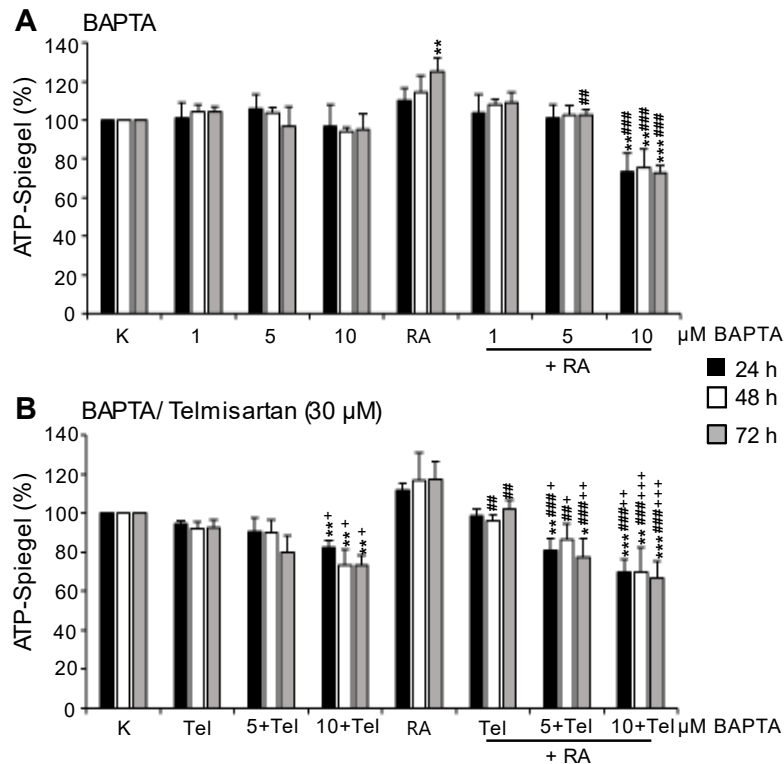
Wurden SH-SY5Y-Zellen nur mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAPTA-AM inkubiert, blieb die Anzahl der lebenden Zellen auf Kontrollniveau (Abbildung 4.3.8 A). Erst die gleichzeitige Kombination von 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM und Retinsäure reduzierte die ATP-Spiegel signifikant gegenüber naiven Kontrollen und Retinsäure-behandelten Zellen auf 73,5 % nach 24 Stunden, was auch durch längere Inkubation nicht weiter gesenkt werden konnte.

Die gleichzeitige Behandlung mit Telmisartan und 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM reduzierte die Viabilität auf 82,6 % nach 24 Stunden und 73,6 % nach 72 Stunden. Die Dreifachkombination aus Telmisartan, Retinsäure und BAPTA-AM konnte die ATP-Spiegel schon nach 24 Stunden signifikant gegenüber Kontrollen und Zellen, die mit Retinsäure und/ oder Telmisartan waren, auf 81 % senken. Wirksamer war die höhere BAPTA-AM-Konzentration (Abbildung 4.3.8 B).



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Wirkung von Telmisartan in beiden Zelllinien steigern ließ, wenn zusätzlich die intrazellulären Calciumspiegel vermindert wurden.

#### Effekte BAPTA, SH-SY5Y-Zellen



**Abbildung 4.3.8: Effekt des Calcium-Chelators BAPTA-AM zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen**

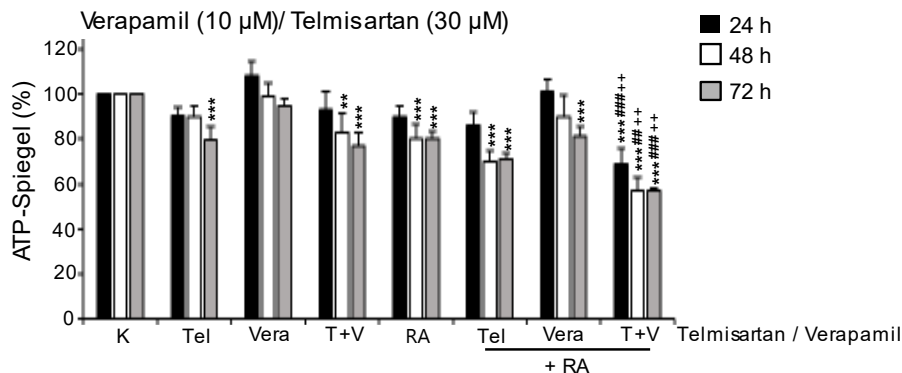
**A:** SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 1 µM, 5 µM oder 10 µM BAPTA-AM und mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

**B:** SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 30 µM Telmisartan (Tel) allein oder zusammen mit 5 µM oder 10 µM BAPTA-AM sowie mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$  oder mit Telmisartan-behandelten Zellen: +++  $p < 0,001$ , ++  $p < 0,01$ , +  $p < 0,05$ .

Da die Reduktion der Calcium-Spiegel nach Behandlung mit BAPTA-AM stärker war als mit Flunarizin und Verapamil, sollte auch untersucht werden, ob die Kombination von Telmisartan und Verapamil ebenfalls eine additive Wirkung hatte.

### Verapamil und Telmisartan, Kelly-Zellen



**Abbildung 4.3.9: Calcium-Kanal-Blockade mit Verapamil zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen**

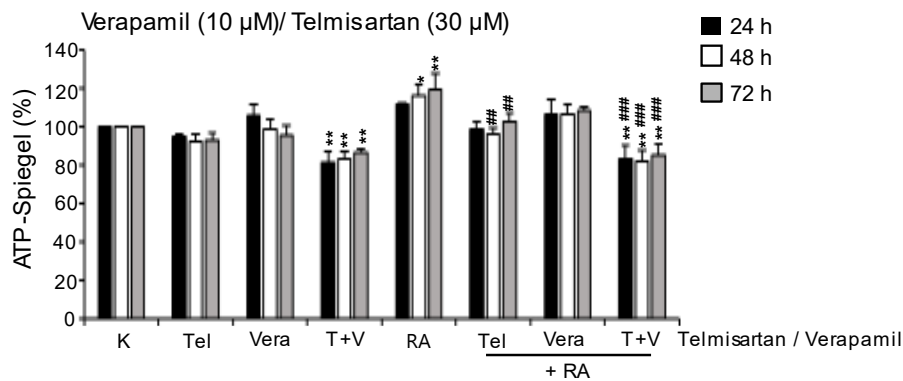
Kelly-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) folgendermaßen stimuliert: allein mit 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel), 10  $\mu$ M Verapamil (Vera) oder 5  $\mu$ M Retinsäure (RA), mit Zweifachkombinationen aus Telmisartan und Verapamil (T+V), Retinsäure und Telmisartan oder Retinsäure und Verapamil sowie mit der Dreifachkombination aus Telmisartan, Verapamil und Retinsäure. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$  oder mit Telmisartan-behandelten Zellen: ++  $p < 0,01$ .

Die Behandlung mit 10  $\mu$ M Verapamil veränderte die ATP-Spiegel von Kelly-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nicht. Die kombinierte Gabe von 30  $\mu$ M Telmisartan und 10  $\mu$ M Verapamil zeigte in naiven Kelly-Zellen ab 48 Stunden eine Reduktion der Zellviabilität auf 83 %. Auch in Retinsäure-vorbehandelten Zellen senkte die Ko-Inkubation mit Verapamil und Telmisartan bereits nach 24 Stunden die ATP-Spiegel auf 68,8 %.

In SH-SY5Y-Zellen konnten die ATP-Spiegel weder mit Verapamil allein noch mit der kombinierten Gabe von Verapamil und Retinsäure verändert werden (Abbildung 4.3.10). Erst die gleichzeitige Behandlung mit Verapamil und Telmisartan reduzierte die Anzahl der lebenden Zellen nach 24 Stunden auf 81,2 %, was bis zum Ende der Inkubationszeit stabil blieb. Die Dreifachkombination aus Verapamil, Retinsäure und Telmisartan verminderte die ATP-Spiegel nach 24 Stunden auf 83 %, was sich auch nach weiteren 48 Stunden nicht änderte. Damit waren die additiven Effekte von Telmisartan und Verapamil in SH-SY5Y-Zellen nicht so ausgeprägt wie in Kelly-Zellen.

### Verapamil und Telmisartan, SH-SY5Y-Zellen



**Abbildung 4.3.10: Calcium-Kanal-Blockade mit Verapamil zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen**

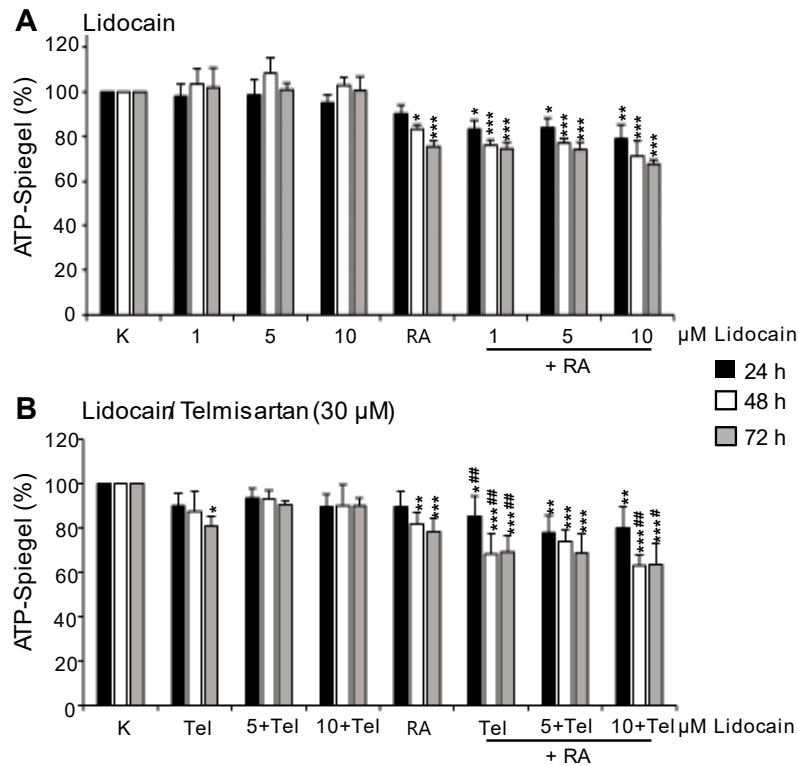
SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) folgendermaßen stimuliert: allein mit 30 µM Telmisartan (Tel), 10 µM Verapamil (Vera) oder 5 µM Retinsäure (RA), mit Zweifachkombinationen aus Telmisartan und Verapamil (T+V), Retinsäure und Telmisartan oder Retinsäure und Verapamil sowie mit der Dreifachkombination aus Telmisartan, Verapamil und Retinsäure. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\* p < 0,01 oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ### p < 0,001, ## p < 0,01

Zusätzlich zu einer Blockade von Calciumkanälen hat Flunarizin auch eine hohe Affinität zu Natriumkanälen (Osborne et al. 2002).

Die nächsten Experimente sollten klären, ob eine Inhibition von Natriumkanälen die Reduktion der Zellviabilität in Kombination mit einer Hemmung von CYP2J2 durch Telmisartan verstärken konnte. Zunächst wurden die Effekte einer alleinigen Natriumkanalblockade untersucht. Als Inhibitor wurde Lidocain (Berk et al. 2018) in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Die Inkubation mit Lidocain veränderte die Anzahl der viablen Kelly-Zellen in keiner der eingesetzten Konzentrationen im Vergleich zu naiven Kontrollen. In Kombination mit Retinsäure konnten die ATP-Spiegel nicht signifikant gegenüber den Retinsäure-vorbehandelten Zellen gesenkt werden (Abbildung 4.3.11 A). Auch zusammen mit Telmisartan war kein additiver Effekt nachweisbar, der über die Senkung der Zellviabilität durch Telmisartan hinausging. Selbst die Dreifachkombination aus Lidocain, Telmisartan und Retinsäure reduzierte die ATP-Spiegel nicht stärker als die Telmisartan und Retinsäure zusammen (Abbildung 4.3.11 B).

### Lidocain und Telmisartan, Kelly-Zellen



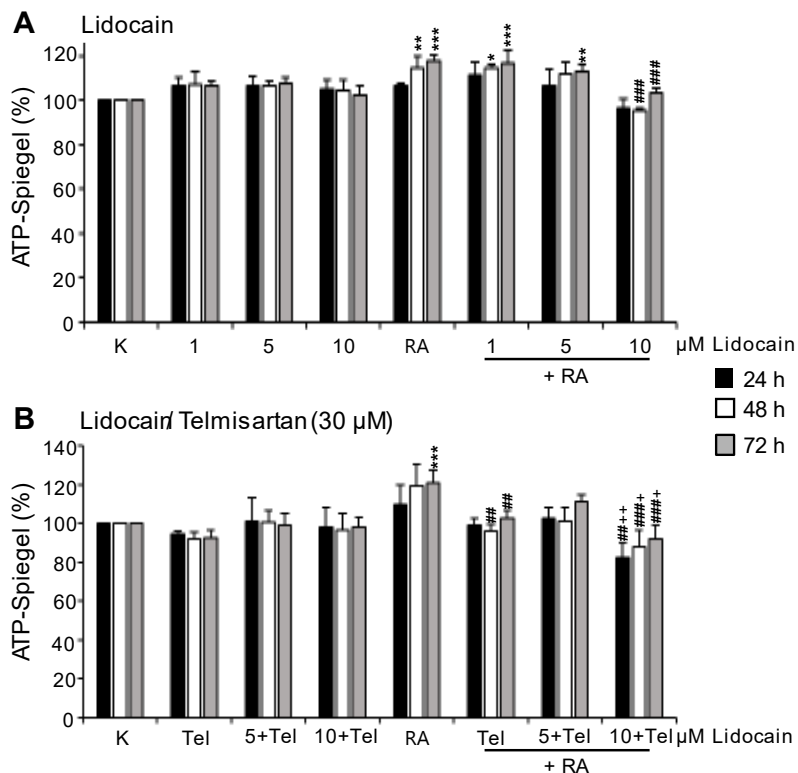
**Abbildung 4.3.11: Natriumkanalblockade mit Lidocain zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen**

**A:** Kelly-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 1 µM, 5 µM oder 10 µM Lidocain mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

**B:** Kelly-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 30 µM Telmisartan (Tel) allein und in Kombination mit 5 µM oder 10 µM Lidocain sowie mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ .

### Lidocain und Telmisartan, SH-SY5Y -Zellen



**Abbildung 4.3.12: Natriumkanalblockade mit Lidocain zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen**

**A:** SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 1 µM, 5 µM oder 10 µM Lidocain mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

**B:** SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 30 µM Telmisartan (Tel) allein und in Kombination mit 5 µM oder 10 µM Lidocain sowie mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$  oder mit Telmisartan-behandelten Zellen: ++  $p < 0,01$ , +  $p < 0,05$ .

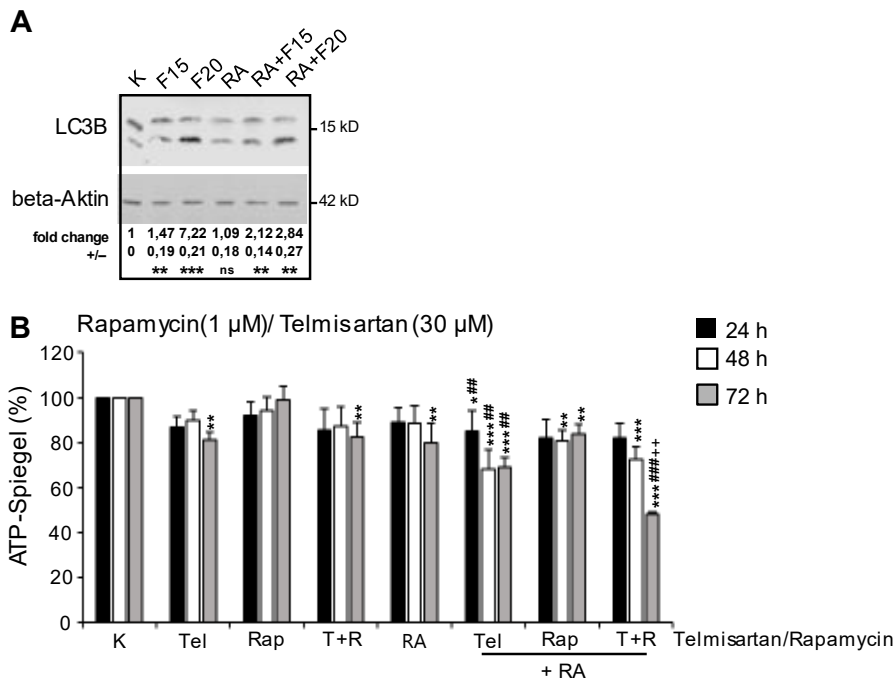
Auch in SH-SY5Y-Zellen konnte die alleinige Behandlung mit Lidocain in keiner Konzentration die ATP-Spiegel verändern, wenn die Werte mit naiven Kontrollen oder Retinsäure-vorbehandelten Zellen verglichen wurden (Abbildung 4.3.12 A). Wurde ein möglicher additiver Effekt von Telmisartan und Lidocain untersucht, blieb auch die Kombination beider Substanzen in naiven Zellen ohne Effekt (Abbildung 4.3.12 B). Allerdings konnte die Inkubation mit 10 µM Lidocain, Telmisartan und Retinsäure die Anzahl lebender Zellen auf 82,4 % nach 24 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen senken. Damit waren die ATP-Spiegel im Vergleich zu

Zellen, die mit Retinsäure und/ oder Telmisartan vorbehandelt waren, signifikant reduziert (Abbildung 4.3.12 B).

Autophagie ist ein weiterer Prozess, der durch Flunarizin beeinflusst werden kann. Beschrieben ist eine Induktion (Zheng et al. 2018). Zunächst sollte anhand des Markerproteins LC3B überprüft werden, ob Flunarizin auch in Neuroblastomzellen autophagische Prozesse initiieren konnte. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Flunarizinkonzentrationen für 72 Stunden inkubiert und danach lysiert. Im Western Blot wurden die Proteinmengen von LC3B bezogen auf beta-Aktin als Auftragskontrolle quantifiziert. Dabei fiel auf, dass in Kelly-Zellen die Mengen von LC3B dosisabhängig nach der Behandlung mit Flunarizin im Vergleich zu naiven Kontrollen oder Retinsäure-behandelten Zellen erhöht waren (Abbildung 4.3.13 A). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Gabe eines Autophagie-Induktors zusätzlich zur Inhibition von CYP2J2 einen additiven Effekt hatte. Als Substanz wurde Rapamycin (Rap/R) (Kim et al. 2015) in der Konzentration 1  $\mu$ M verwendet.

In naiven Kelly-Zellen beeinflusste Rapamycin die ATP-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen nicht. Auch in der Kombination mit Telmisartan konnte die Reduktion der Zellviabilität gegenüber Telmisartan allein nicht gesteigert werden (Abbildung 4.3.13 B). In Retinsäure-vorbehandelten Zellen war Rapamycin schwächer wirksam als Telmisartan. Die Dreifachkombination aus Rapamycin, Retinsäure und Telmisartan senkte allerdings die ATP-Spiegel nach 72 Stunden auf 48,3 %, was signifikant weniger war als nach Inkubation mit Retinsäure und Telmisartan (69 %).

## Autophagie in Kelly



**Abbildung 4.3.13: Autophagie-Induktion mit Rapamycin zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen**

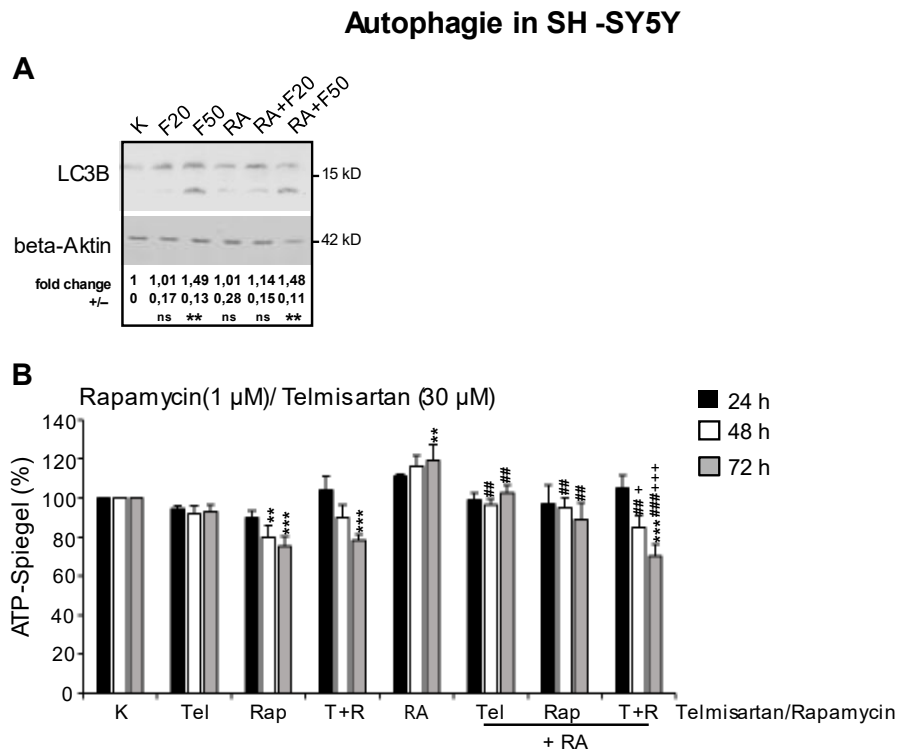
**A:** Kelly-Zellen wurden für drei Tage mit 15 µM oder 20 µM Flunarizin (F) und mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Nach Proteinextraktion wurde die Menge von LC3B mit Hilfe von Western Blots normalisiert auf beta-Aktin dargestellt.

**B:** Kelly-Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden (h) mit 1 µM Rapamycin (Rap), sowie mit 30 µM Telmisartan (Tel) allein bzw. kombiniert (T+R) und mit bzw. ohne 5 µM Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$  oder mit Telmisartan-behandelten Zellen: ++  $p < 0,01$ , +  $p < 0,05$ ; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

In SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.3.14 A) war die Dosisabhängigkeit für eine Autophagie-Induktion durch Flunarizin stärker ausgeprägt. Erst ab einer Konzentration von 50 µM war die LC3B-Menge signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (1,49-fach), was genauso für eine Kombination von Flunarizin und Retinsäure zutraf. Wurden die Zellen mit Rapamycin allein oder mit Kombinationen von Rapamycin, Telmisartan und/ oder Retinsäure inkubiert, zeigte sich, dass die Gabe von 1 µM Rapamycin für 48 Stunden die ATP-Spiegel auf 80 % senkte. Zusammen mit Telmisartan war die Viabilität erst nach einer Behandlung von 72 Stunden signifikant gegenüber den Kontrollen auf 78,2 % reduziert (Abbildung 4.3.14 B). Auch bei der Dreifachkombination aus Rapamycin, Retinsäure und Telmisartan konnte erst nach 72-stündiger Inkubation eine Abnahme der ATP-Spiegel auf 70,2 % detektiert werden.

Damit konnte der Effekt einer CYP2J2-Hemmung in beiden Zelllinien mit einer gleichzeitigen Autophagie-Induktion verbessert werden.



**Abbildung 4.3.14: Autophagie-Induktion mit Rapamycin zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen**

**A:** SH-SY5Y-Zellen wurden für drei Tage mit 20  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M Flunarizin (F) und mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Nach Proteinextraktion wurde die Menge von LC3B mit Hilfe von Western Blots normalisiert auf beta-Aktin dargestellt.

**B:** SH-SY5Y-Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden (h) mit 1  $\mu$ M Rapamycin (Rap), sowie mit 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel) allein bzw. kombiniert (T+R) und mit bzw. ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

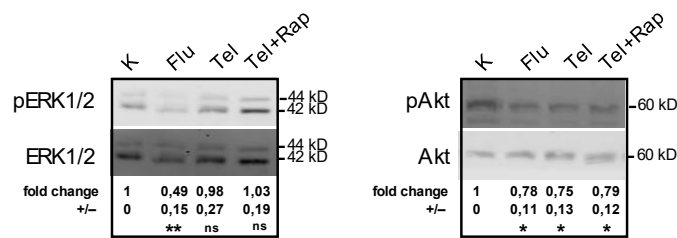
Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$  oder mit Telmisartan-behandelten Zellen: +++  $p < 0,001$ , +  $p < 0,05$ ; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Es sollte außerdem untersucht werden, wie sich die kombinierte Gabe von Telmisartan und Rapamycin auf die Aktivitäten der Kinasen ERK1/2 und Akt auswirkten. In Kelly-Zellen konnte ein ähnliches Phosphorylierungsmuster beider Kinasen wie nach der alleinigen Behandlung mit Telmisartan beobachtet werden (Abbildung 4.3.15 A). Bei SH-SY5Y-Zellen wurde durch die Inkubation von Telmisartan mit Rapamycin die Akt-Aktivierung ähnlich stark reduziert wie nach Gabe von Flunarizin (Abbildung 4.3.15 B), während die Phosphorylierung von ERK1/2 nicht verändert wurde im Vergleich zur Kontrolle.

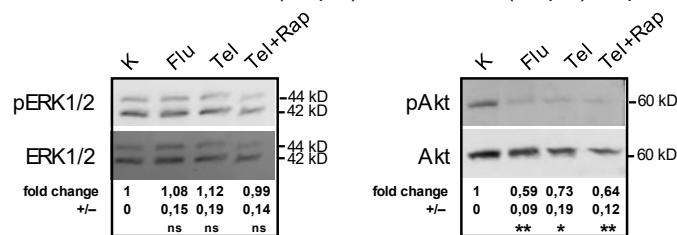


## Effekte in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen

**A** Kelly, Flunarizin (20  $\mu$ M), Telmisartan (30  $\mu$ M), Rapamycin (1  $\mu$ M)



**B** SH-SY5Y, Flunarizin (30  $\mu$ M), Telmisartan (30  $\mu$ M), Rapamycin (1  $\mu$ M)



**Abbildung 4.3.15: Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Flunarizin, Telmisartan und Rapamycin in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

Kelly-Zellen (**A**) wurden für drei Tage mit 20  $\mu$ M Flunarizin (Flu), 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel) allein oder kombiniert mit 1  $\mu$ M Rapamycin (Rap) inkubiert. SH-SY5Y-Zellen (**B**) wurden für drei Tage mit 30  $\mu$ M Flunarizin (Flu), 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel) allein oder kombiniert mit 1  $\mu$ M Rapamycin (Rap) stimuliert. Nach Proteinextraktion wurden in Western Blots die Phosphorylierungen als fold change von ERK1/2 und Akt relativ zur Proteinmenge ermittelt.

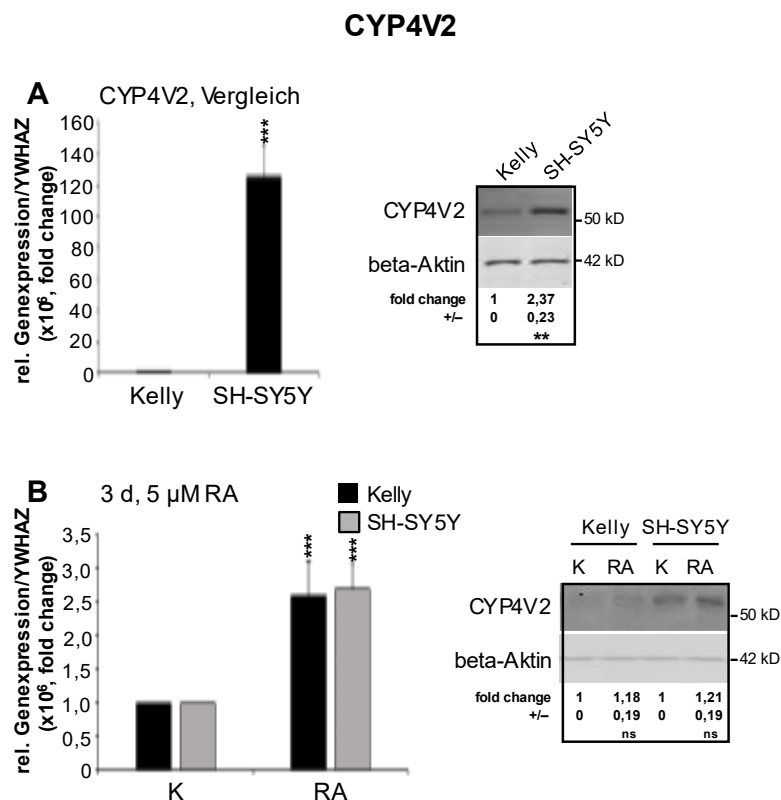
Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

## 4.8 Die Rolle von CYP4V2 in Neuroblastomzellen

In den Microarrays (Abbildungen 4.1.4 und 4.1.5) zeigte sich, dass die Expression von CYP4V2 zwar nicht durch Retinsäure verändert wurde, aber ein signifikant höherer Wert für SH-SY5Y-Zellen erkennbar war als für Kelly-Zellen. Da sich die beiden Zelllinien in ihrem Ansprechen auf die Gabe von Retinsäure unterscheiden, sollte untersucht werden, ob CYP4V2 zur höheren Viabilität der SH-SY5Y-Zellen bei der Inkubation mit Retinsäure beitrug. Die Rolle von CYP4V2 in der Onkologie ist nach wie vor unklar. Bislang ist nur eine Beteiligung an metabolischen Störungen sowie an der seltenen Netzhauterkrankung Bietti-Kristalldystrophie bekannt (Kelly et al. 2011).

Zunächst wurden die Mengen von CYP4V2 auf mRNA- und Proteinebene in beiden Zelllinien analysiert. Wie in den MicroArrays stellte sich mittels quantitativer PCR heraus, dass CYP4V2 in SH-SY5Y stärker exprimiert wurde als in Kelly-Zellen

(125 versus 1). Auch in Western Blots wurden in SH-SY5Y-Zellen höhere Proteinmengen nachgewiesen (Abbildung 4.3.16 A).



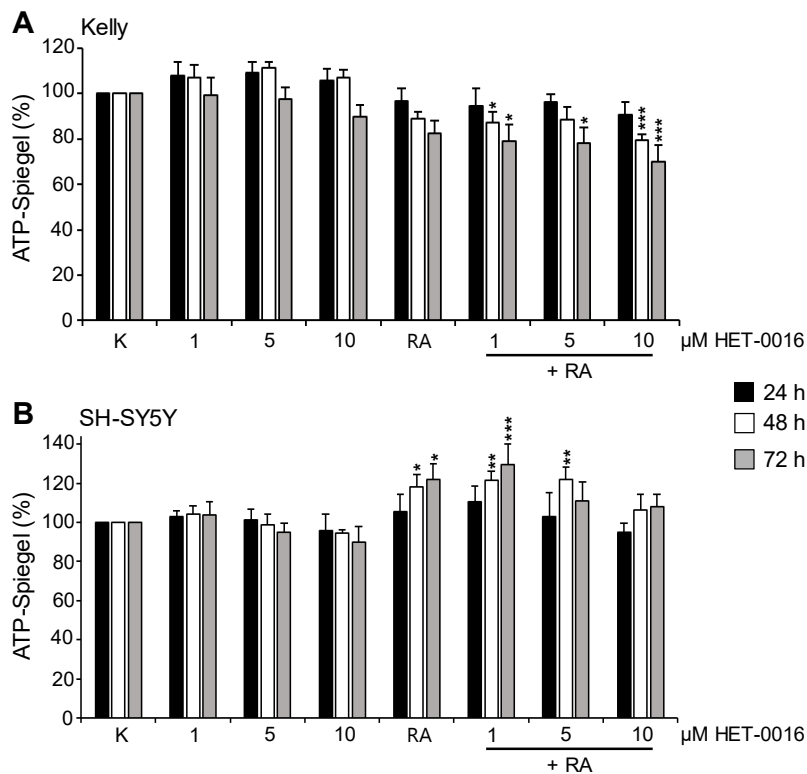
**Abbildung 4.3.16: Expression und Proteinmengen von CYP4V2 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

Von **(A)** naiven Kelly- und SH-SY5Y-Zellen oder **(B)** nach dreitägiger Inkubation mit 5 µM Retinsäure (RA) wurde nach RNA-Isolation eine quantitative PCR mittels Taqman-Assay durchgeführt, um die Expression von CYP4V2 zu ermitteln. Gemessen wurde die relative Genexpression von CYP4V2 in beiden Zellen als fold change x 10<sup>6</sup>. Als housekeeper wurde YWHAZ verwendet. Zusätzlich wurde nach Proteinextraktion die Proteinmenge von CYP4V2 in Western Blots bestimmt, normalisiert auf beta-Aktin. Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01; ns: nicht signifikant; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Auch wenn in den Expressionsarrays allenfalls eine Tendenz erkennbar war, zeigte sich in der quantitativen PCR eine Induktion der CYP4V2-Expression nach der Gabe von Retinsäure (2,6-fach in Kelly-Zellen und 2,7-fach in SH-SY5Y-Zellen). Auf Proteinebene war die Veränderung allerdings nicht mehr signifikant (Abbildung 4.3.16 B).

Um zu untersuchen, ob CYP4V2 einen Einfluss auf die Zellviabilität hatte, wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit dem Inhibitor der Synthese von 20-HETE (Hydroxyeicosatetraensäure) HET-0016 (HET) in unterschiedlichen Konzentrationen über 24, 48 und 72 Stunden inkubiert (Abbildung 4.3.17) (Liu et al. 2021).

### CYP4V2-Inhibition



**Abbildung 4.3.17: CYP4V2-Inhibition durch HET-0016 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

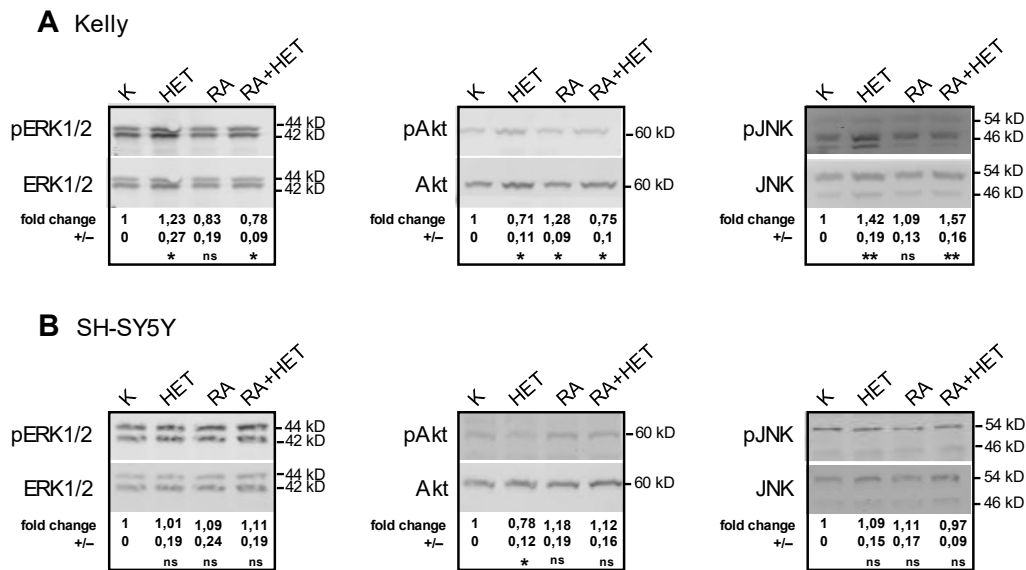
Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M HET-0016 entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

In Kelly-Zellen konnte nur die Kombination aus HET-0016 und Retinsäure die Zellviabilität reduzieren. Insbesondere 10  $\mu$ M HET-0016 zusammen mit Retinsäure senkten die Anzahl der lebenden Zellen auf 79,3 % nach 48 h und 69,8 % nach 72 Stunden, allerdings nicht signifikant stärker als Retinsäure allein. In SH-SY5Y-Zellen konnten die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen die ATP-Spiegel im Vergleich zu naiven Kontrollen oder Retinsäure-behandelten Zellen nicht verändern (Abbildungen 4.3.17 A und B).

Darüber hinaus wurde mittels Western Blot untersucht, welchen Einfluss die CYP4V2-Inhibition auf die Aktivität der Kinasen ERK1/2, Akt und JNK hatte (Abbildung 4.3.18).

### Inkubation mit HET -0016



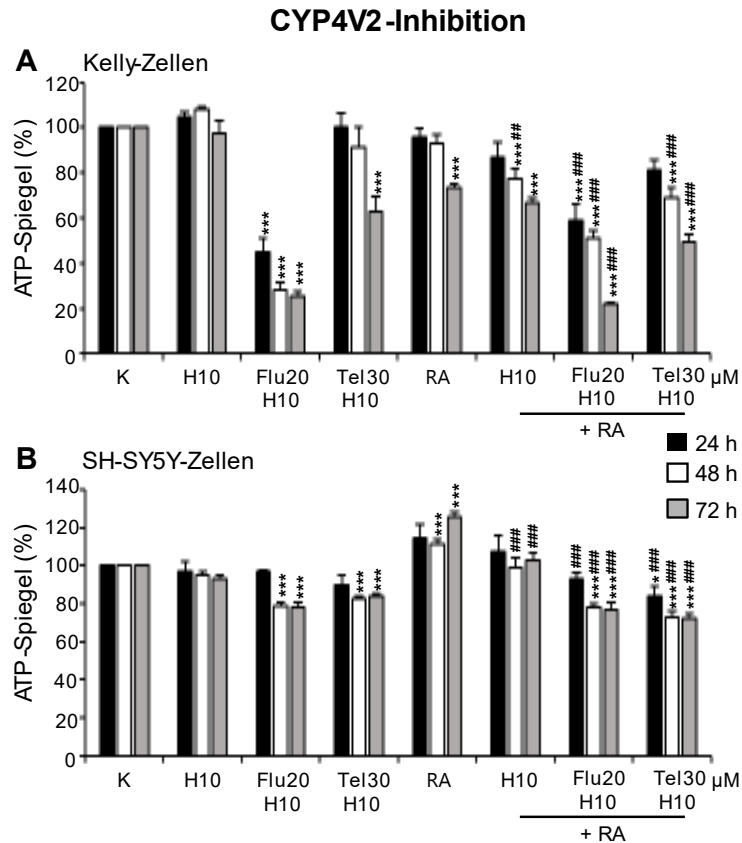
**Abbildung 4.3.18: Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit HET-0016 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) wurden für drei Tage mit 10  $\mu$ M HET-0016 (HET) entweder mit oder ohne 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) inkubiert. Nach Proteinextraktion wurde in Western Blots die Phosphorylierungen als fold change von ERK1/2, Akt und JNK relativ zur Proteinmenge ermittelt.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant; kD: Kilo Dalton; +/-: Standardabweichung.

Dabei zeigte sich, dass die Phosphorylierungsmuster durch HET-0016 verändert wurden. In Kelly-Zellen erhöhte der Inhibitor die Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK, während die Aktivität von Akt reduziert wurde (Abbildung 4.3.18 A). In SH-SY5Y-Zellen wurde nur die Phosphorylierung von Akt reduziert. Die Aktivitäten von ERK1/2 und JNK blieben auf Kontrollniveau (Abbildung 4.3.18 B).

Da sowohl CYP2J2 als auch CYP4V2 an der Verstoffwechslung von Arachidonsäure beteiligt sein und ihre Metabolite bei Tumorerkrankungen eine Rolle spielen können (Panigrahy et al. 2010), sollte zuletzt untersucht werden, ob die gleichzeitige Hemmung beider Enzyme die Zellviabilität stärker beeinflussen konnte als die einzelnen Inhibitoren. Es wurden entsprechend Flunarizin (20  $\mu$ M) oder Telmisartan (30  $\mu$ M) mit 10  $\mu$ M HET-0016 kombiniert.



**Abbildung 4.3.19: Kombinierte Gabe von HET-0016 und Flunarizin oder Telmisartan in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen**

Kelly-Zellen (**A**) und SH-SY5Y-Zellen (**B**) wurden für 24, 48 oder 72 Stunden (h) mit 10  $\mu$ M HET-0016 allein (H10), zusammen mit 20  $\mu$ M Flunarizin (Flu), 30  $\mu$ M Telmisartan (Tel) oder Retinsäure (RA) sowie als Dreifachkombination mit Flunarizin und Retinsäure bzw. Telmisartan und Retinsäure inkubiert. Gemessen wurde der Anteil (in %) der Zellviabilität anhand der ATP-Spiegel.

Signifikanzniveau verglichen mit Kontrollzellen (K): \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  oder mit Retinsäure-behandelten Zellen: ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$

In Kelly-Zellen war die Kombination aus HET-0016 und Flunarizin besonders effektiv (Abbildung 4.3.19 A). Bereits nach 24 Stunden wurden die ATP-Spiegel auf 45 % gesenkt, nach 72 Stunden auf 25 %. Ähnlich stark war die Abnahme mit zusätzlicher Gabe von Retinsäure (58,7 % nach 24 Stunden und 22 % nach 72 Stunden). Die gemeinsame Inkubation von HET-0016 und Telmisartan hatte nach 72 Stunden den stärksten Effekt (62,7 % ohne Retinsäure und 49,7 % mit Retinsäure). In SH-SY5Y-Zellen zeigte die Kombination mit HET-0016 und beiden CYP2J2-Inhibitoren eine vergleichbare Wirkung (Abbildung 4.3.19 B). Ab 48 Stunden reduzierten HET-0016 mit Flunarizin (78,7 %) oder Telmisartan (82,3 %) die ATP-Spiegel signifikant gegenüber den Kontrollzellen. Auch der Zusatz von Retinsäure schützte die Zellen nicht vor einer Abnahme der Viabilität. Ebenfalls nach 48 Stunden verminderte

die Dreifachkombination mit Flunarizin die Anzahl der lebenden Zellen auf 78,3 % und mit Telmisartan auf 72,7 %.

Damit zeigte sich, dass die Inhibition von CYP4V2 allein nicht stark genug war, um das Zellüberleben effektiv einzuschränken, aber eine Kombination mit CYP2J2-Inhibitoren die Zellen sensitivierte.

## 5 Diskussion

### 5.1 Retinsäureresistenz in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen

Retinsäure war seit Ende der 1980er Jahre ein fester Bestandteil in der Postkonsolidierungstherapie des Neuroblastoms bei Hochrisikopatienten (Masetti et al. 2012), da die differenzierungsfördernden und Apoptose-induzierenden Eigenschaften von Retinsäure therapeutisch genutzt wurden (Dobrotkova et al. 2018; Ronca et al. 1999). Aufgrund zunehmender Resistenzen und ein damit einhergehender Wirkungsverlust teils mit Rezidiven, ist die Anwendung weitestgehend zurückgegangen (Armstrong et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Retinsäurewirkung die beiden experimentell etablierten Neuroblastom-Zellmodelle Kelly und SH-SY5Y verwendet, die für ihre proliferationsstarken, chemosensitiven (Kelly) und differenzierungsaffinen (SH-SY5Y) Eigenschaften bekannt sind (Shipley et al. 2016; Curtin et al. 2018). In beiden Zelllinien war nach der Gabe von 5  $\mu$ M Retinsäure keine Zytotoxizität zu beobachten (Abbildung 4.1.2), und für die SH-SY5Y-Zellen zeigte sich eine sogar kurzfristig gesteigerte Proliferation und Zellzahl nach drei Tagen (Abbildung 4.1.1 B und 4.1.2 B). Auch nach zehntägiger Inkubation mit Retinsäure war die Anzahl der Kelly-Zellen reduziert, insgesamt jedoch ein Überleben möglich (Abbildung 4.1.3). Bereits aus anderen Arbeiten war bekannt, dass die Zellzahl der SH-SY5Y-Zellen nicht durch Retinsäure reduziert werden konnte, sondern teilweise sogar gesteigert wurde, sich die Zellen differenzierten und der Apoptose-Induktion entzogen (Cheung et al. 2009; Lombet et al. 2001). Für Kelly-Zellen zeigte sich in anderen Arbeiten eine nur sehr geringe Differenzierungstendenz durch Retinsäure (Girgert und Schweizer 1997). Für eine reduzierte oder fehlende Wirkung von Retinsäure gibt es unterschiedliche Ursachen, die direkt die intrazellulären Retinsäurespiegel betreffen können (Chlapek et al, 2018). Neben der verminderten Aufnahme der Vorstufe Retinol und deren veränderter Metabolisierung kann auch Retinsäure selbst ein Angriffspunkt zellulärer Anpassungen sein. Möglich sind ein gesteigerter Auswärtstransport oder ein erhöhter Retinsäureabbau (Chlapek et al, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde dabei die Rolle von CYPs (Cytochrom-P450-Enzymen) in Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen und ihr Einfluss auf die Retinsäureresistenz untersucht. Retinsäure, besonders die in dieser Arbeit verwendete all-trans-Retinsäure, wird mit großer Affinität von der Gruppe CYP26 (CYP26A1 und CYP26B1) in wasserlösliche

Metabolite (Abbildung 1.4 B) überführt (Armstrong et al. 2005). Diese Enzyme werden regulatorisch durch Retinsäure induziert, was wiederum den Abbau von Retinsäure verstärkt und damit dessen Wirksamkeit reduziert (Topletz et al. 2012). Weiterhin können CYP3A4 und CYP3A5 aus der Gruppe CYP3A Retinsäure abbauen, die indirekt Retinsäure-vermittelt über den nukleären Rezeptor PXR induziert werden (Wang T. 2008) und damit ebenfalls die Bioverfügbarkeit von Retinsäure herabsetzen können. Die erhöhte Tumorexpression von beiden Enzymgruppen ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Oguro et al. 2011; Darwish et al. 2015; Alonso et al. 2017). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst in den Microarrays der Transkriptomanalyse die Expression der CYP26- sowie der CYP3A-Enzyme in naiven und Retinsäure-stimulierten Zellen überprüft. Während CYP26A1 und CYP26B1 in unbehandelten Kelly- und SH-SY5Y-Zellen nur eine geringe Expression zeigten, lag CYP3A5 oberhalb der Schwelle (mindestens fünf; Abbildung 4.1.4).

Nach einer dreitägigen Gabe von Retinsäure war die Induktion von CYP26A1 und CYP26B1 stärker als von CYP3A5 (Abbildung 4.2.1 und 4.2.7). Dass die mRNA-Spiegel von CYP26A1 und CYP26B1 durch all-trans-Retinsäure in Neuroblastomzellen erhöht werden können, ist für SH-SY5Y-Zellen bereits beschrieben (Armstrong et al. 2005).

Auch andere Cytochrom-P450-Enzyme lagen bei der Analyse der Microarrays oberhalb der Expressionsschwelle (Abbildung 4.1.4). Davon konnte jedoch nur CYP2J2 dem Retinsäurestoffwechsel zugeordnet werden (Messina et al. 2010). Interessanterweise zeigte sich eine im Vergleich zu CYP26A1, CYP26B1 und CYP3A5 umgekehrte Regulation durch Retinsäure, die sich in weiteren Versuchen verifizieren ließ (Abbildung 4.3.1). Da für CYP2J2 in hämatologischen Erkrankungen und anderen Tumoren aufgrund seiner Metabolite, den EETs (Epoxyeicosatriensäuren), eine pro-kanzerogene Aktivität bekannterweise zugeschrieben ist und dessen Inhibition zu einer reduzierten Zellzahl der untersuchten malignen Zellen führen kann (Karkhanis et al. 2017), wurde auch die Funktion von CYP2J2 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen untersucht.



## 5.2 Einordnung und Charakterisierung von CYP26A1, CYP26B1 und CYP3A5 als therapeutische Angriffspunkte in Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen

Da in der vorliegenden Arbeit eine starke Induktion der Retinsäure-abbauenden Enzyme CYP26A1 und CYP26B1 nach Retinsäure-Behandlung in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 4.2.1), wurden diese als relevante Mediatoren für eine mögliche Retinsäure-Resistenz in Neuroblastomzellen weiter untersucht. Um ihre Funktion zu charakterisieren und die Effekte von erhöhten Retinsäurespiegeln zu analysieren, wurden Inhibitoren von CYP26A1 und CYP26B1 verwendet. Dass eine Hemmung von CYP26-Enzymen in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen die intrazellulär verfügbare Retinsäure steigern kann, wurde bereits gezeigt (Bilip et al. 2020). Für das hier verwendete Versuchsmodell wurden CYP26-Inhibitoren in Betracht gezogen, die bereits in vivo und klinisch für andere Erkrankungen in ihrer Dosis erprobt wurden, weshalb sich Liarozol (angewandt für Ichthyosis) und Talarozol (angewandt für Psoriasis und Akne) eigneten (Pavez Lorie et al. 2009; Gomaa et al. 2008), wobei Talarozol als wirksamer und spezifischer als Liarozol eingestuft wurde (Gomaa et al. 2012). Für Liarozol konnte in anderen Tumorerkrankungen eine erhöhte Menge an intrazellulärer Retinsäure nachgewiesen werden, führte jedoch aufgrund von Nebenwirkungen zu einem eingeschränkten Gebrauch (Armstrong et al. 2007). Talarozol konnte in vitro die Konzentration von Retinsäure in Keratinozyten steigern (Giltair et al. 2009). In Kelly- und SH-SY5Y-Zellen waren die Effekte beider Substanzen zeit- sowie konzentrationsabhängig, bei Talarozol stärker, bezogen auf die zelluläre Viabilität jedoch insgesamt schwach (Abbildung 4.2.4 und 4.2.5). Erklärt werden konnte die eingeschränkte Wirkung durch einen Inhibitor-vermittelten und beschleunigten Abbau von Retinsäure. Es zeigte sich, dass durch 10  $\mu$ M Talarozol kompensatorisch die im Retinsäure-Metabolismus involvierten Mediatoren CYP26A1 und CYP26B1 sowie CRABP2 induziert wurden, weil mehr Retinsäure verfügbar war (Abbildung 4.2.6). Eine vergleichbare Regulation ist für Talarozol in Epidermiszellen beschrieben (Nelson et al. 2013). Durch Inhibition der CYP26-Enzyme könnte die erhöhte Menge an intrazellulär verfügbarer Retinsäure demnach über einen negativen Feedbackmechanismus den eigenen Abbau verstärken, weshalb der inhibitorische Effekt nur schwach und eher transient war. Aufgrund dieses beobachteten Wirkverlustes der CYP26-Inhibition wäre eine alleinige Hemmung dieser

Enzymgruppe in Kombination mit Retinsäure als therapeutisches Prinzip ungeeignet. Eine Möglichkeit, die selektive CYP26-Inhibition in Neuroblastomzellen therapeutisch auszunutzen, wäre die Kombination mit weiteren Wirkstoffen, die eine kompensatorische Induktion von Retinsäure-metabolisierenden Enzymen reduzieren.

Ein additiver Kandidat dafür wäre CYP3A5, das analog zu den CYP26-Enzymen in der vorliegenden Arbeit durch Retinsäure induziert wurde (Abbildung 4.1.5 und 4.2.7). Eine Induktion von CYP3A durch Retinsäure ist auch in anderen Zelllinien dokumentiert (Howell et al. 1997; Jurima-Romet et al. 1997). Um die Rolle von CYP3A5 zu untersuchen, wurde Cobicistat als spezifischer CYP3A(5)-Inhibitor verwendet, da es in klinischen Patientenstudien die Konzentration von antineoplastischen Medikamenten, die über CYP3A verstoffwechselt werden, steigern konnte (Hohmann et al. 2021). Zwar führte eine Behandlung der Neuroblastomzellen mittels Retinsäure und 10  $\mu$ M Cobicistat zu einer reduzierten Viabilität, diese war jedoch nicht stark ausgeprägt (Abbildung 4.2.8). Möglicherweise kann auch hier eine regulatorische Induktion von CYP3A5 mit einer daraus resultierenden verstärkten Elimination von Retinsäure eine Begründung sein. CYP3A5 wird durch den nukleären Faktor PXR induziert (Tebbens et al. 2018) und dieser wiederum kann durch Retinsäure induziert werden (Wang K. 2008), sodass eine selektive Blockade auf CYP3A5-Ebene nicht ausreichen könnte.

Aus diesem Grund wurde auch überprüft, ob eine Hemmung von PXR einen Effekt auf das Überleben von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen hatte. Bereits in anderen Arbeiten, beispielsweise im Ovarialkarzinom, führte eine Hemmung von PXR durch diverse Zytostatika zu einem Zellzyklusarrest und einer verstärkten Apoptose (Masuyama et al. 2016). Mit Hilfe des experimentellen Inhibitors SPA70 zeigte sich bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M in Kombination mit Retinsäure eine herabgesetzte Viabilität (Abbildung 4.2.11), die allerdings nur geringfügig niedriger lag als bei Cobicistat (Abbildung 4.2.8).

Inwieweit CYP3A5 überhaupt eine Rolle als therapeutischer Angriffspunkt für Neuroblastomzellen spielen konnte, wurde in einem anderen Versuchsansatz überprüft. Dazu wurde nicht Retinsäure mit einem CYP3A5-Inhibitor kombiniert, sondern das synthetische Retinoid Fenretinid, welches nicht nur Differenzierungsprozesse, sondern auch Zelltod initiieren soll (Reynolds et al. 2000; Armstrong et al. 2012). Außerdem wird Fenretinid über CYP3A-Enzyme

verstoffwechselt, sodass es bei Hemmung der CYP3A-Enzyme zu einer Spiegelerhöhung kommt. Diese Chemosensitivierung wäre möglicherweise auch für Fenretinid hilfreich, da der klinisch eingeschränkte Wirkungsbereich problematisch ist (Cooper et al 2021). Die Kombination mit Cobicistat konnte in beiden Zelllinien die Toxizität von Fenretinid steigern, wobei Kelly-Zellen insgesamt empfindlicher auf Fenretinid reagierten als SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 4.2.9). Das Prinzip der Chemosensitivierung mit Fenretinid ist bislang für andere Neuroblastomzellen für den unselektiven CYP-Inhibitor Ketoconazol bekannt (Lopez-Barcons et al. 2017). Bei der Induktion von CYP3A5 durch Rifampicin wurde die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Fenretinid-Behandlung verbessert, sodass CYP3A5 als sensitivierender Mediator gelten konnte. Allerdings blieb die Wirksamkeit gerade bei SH-SY5Y-Zellen eingeschränkt (Abbildung 4.2.9).

Insgesamt lässt sich sagen, dass selektive Einzelhemmungen von CYP26A1 und CYP26B1 sowie CYP3A5 in der vorliegenden Arbeit nicht ausreichten, um die Viabilität in beiden Zelllinien nachhaltig zu senken. Daraus resultierte die Idee einer gleichzeitigen Hemmung beider CYP-Subgruppen, um den Effekt der Induktion dieser durch Retinsäure abzuschwächen. Dass eine kombinierte Hemmung prinzipiell funktionieren kann, wurde in fetalen Leberzellen mittels Talarozol und Fluconazol, einem CYP3A7-Inhibitor, gezeigt, was den Retinsäure-Metabolismus reduzierte (Topletz et al. 2019). Die gleichzeitige Gabe von 10 µM Talarozol, 10 µM Cobicistat und Retinsäure führte allerdings nur in Kelly-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der ATP-Spiegel gegenüber der Kontrolle und den Retinsäure-behandelten Zellen (Abbildung 4.2.10). In SH-SY5Y-Zellen wurde nur die Retinsäure-vermittelte Viabilitätserhöhung reduziert (Abbildung 4.2.10), was zeigte, dass auch hier die Effekte nicht ausreichend waren, um die direkte Hemmung der CYP26-Enzyme und CYP3A5 als therapeutische Möglichkeit weiter zu untersuchen. Wurde Talarozol mit dem PXR-Inhibitor SPA70 und Retinsäure kombiniert, konnten die zellulären ATP-Spiegel bei einer Konzentration von 10 µM der beiden Inhibitoren in einem vergleichbaren Ausmaß gesenkt werden. Dies zeigte sich analog zum Einsatz von Talarozol und Cobicistat, was unterstreicht, dass die isolierte Hemmung von CYP26A1, CYP26B1 und CYP3A5 nicht ausreichend ist, um die Wirksamkeit von Retinsäure therapeutisch zu gewährleisten. Weiterhin wäre, selbst bei zukünftiger klinischer Erprobung aller drei Komponenten (Retinsäure, SPA 70 und Talarozol), eine ausgeprägte Compliance erforderlich, um drei Wirkstoffe einzunehmen. Hier müsste ebenso untersucht werden,

wie stark die Wirkung und Nebenwirkungen aller drei Komponenten von einer gleichzeitigen/zeitnahen Einnahme abhängen würde.

### 5.3 Die pleiotropen Effekte von Ketoconazol in Neuroblastomzellen

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, war eine selektive Hemmung bestimmter Zielstrukturen im CYP-vermittelten Retinsäure-Metabolismus von Neuroblastomzellen unzureichend. Daher wurde eine Substanz gesucht, die diese und möglicherweise weitere Angriffspunkte als *single drug* erreichen konnte. Dafür kam Ketoconazol aufgrund seiner pleiotropen Effekte in Betracht. Ketoconazol kann verschiedene CYPs, wie die CYP26-Gruppe und mit besonderer Affinität die CYP3A-Gruppe sowie PXR inhibieren (Daly 2006; Masuyama et al. 2016) und somit die Dosis von anderen Pharmaka intrazellulär steigern (Fuchs et al. 2013). Bereits in anderen Tumorentitäten wurde Ketoconazol benutzt, um entweder intrazelluläre Zytostatika-Konzentrationen zu steigern (Lou et al. 2019), oder über andere zelluläre Effekte, wie z. B. die Beeinflussung der Cholesterol-/Hormonsynthese, antikanzerogen zu wirken (Tresnanda et al. 2021; Mahler et al. 1993).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für 10 µM Ketoconazol sowohl mit als auch ohne Retinsäure eine signifikante Reduktion der Zellviabilität für Kelly- und SH-SY5Y-Zellen, die stärker als die bisherigen Kombinationen war (Abbildung 4.2.13). Diese Dosis wurde in den weiteren Versuchen genutzt, da für 1 µM Ketoconazol der CYP-inhibitorische Effekt als unzureichend eingestuft wird (McSorley und Daly 2000). In Kelly- und SH-SY5Y-Zellen zeigte sich, ähnlich wie für Talarozol, eine kompensatorische Induktion für CYP26A1, CYP26B1 und CRABP2 nach Kombination mit Retinsäure (Abbildung 4.2.14). Dies ließ vermuten, dass Ketoconazol zwar ähnlich wie Talarozol die CYP26-Enzyme hemmt und dadurch kurzfristig mehr Retinsäure intrazellulär zur Verfügung stellt, aber aufgrund möglicher weiterer Angriffspunkte eine stärkere, anhaltende Wirksamkeit besitzt. Diese Annahme wurde durch Experimente zur Chemosensitivierung mit Fenretinid bestätigt, in denen sich zeigte, dass Ketoconazol die Zellen stärker gegenüber Fenretinid sensitivierte als Cobicistat (Abbildung 4.2.9 und 4.2.15). Ähnliche Resultate waren bereits in anderen Neuroblastomzellen publiziert worden (Lopez-Barcons et al. 2017).

Um zu verstehen, auf welche Effekte die Wirkung von Ketoconazol zurückzuführen war, wurden zunächst basale zelluläre Prozesse untersucht. Dabei zeigte sich, dass Ketoconazol die Proliferationsrate reduzierte (Abbildung 4.2.18) und Zelltod induzierte

(Abbildung 4.2.16) (Lin et al. 2009), was auch das Überleben nach zehntägiger Inkubation beeinträchtigte (Abbildung 4.2.19 und 4.2.20). Hilfreich bei einer längerfristigen Gabe kann die beobachtete Autoinhibition des Ketoconazol-Metabolismus sein, die zu erhöhten Substanzspiegeln und einer verstärkten antikanzerogenen Wirkung im Prostatakarzinom führten (Daneshmend und Warnock 1988). Ketoconazol-vermittelte Apoptose war assoziiert mit verminderter Phosphorylierung der Kinasen Akt und ERK1/2 sowie einer Erhöhung der JNK-Aktivität (Abbildung 4.2.17), was bereits einzeln in anderen experimentellen Situationen dargestellt war (Lin et al. 2009; Karkoulas et al. 2006). Bei erhöhter Aktivierung von Akt und ERK1/2, wie in SH-SY5Y-Zellen nach Retinsäurebehandlung, konnte Ketoconazol keinen Zelltod hervorrufen.

Da Wachstum und Überleben von Neuroblastomzellen von der Verfügbarkeit und zum Teil auch von der endogenen Produktion von Wachstumsfaktoren wie HGF (*hepatocyte growth factor*) abhängen und diese außerdem die Aktivierung von Kinasen wie Akt und ERK1/2 stimulieren (Hecht et al. 2004; Gesualdi et al. 2020), wurde in den folgenden Experimenten analysiert, inwieweit Ketoconazol Wachstumsfaktor-vermittelte Signale beeinträchtigte. Bekannt ist, dass Ketoconazol die Synthese und Freisetzung von Exosomen unterdrücken kann (Greenberg et al. 2021; Datta et al. 2018) und dass extrazelluläre Vesikel Wachstumsfaktoren enthalten können (Qiao et al. 2019). Bei der Analyse, ob Ketoconazol die Freisetzung von IGF2 (*insuline-like growth factor 2*) oder HGF veränderte, zeigte sich, dass in beiden Zelllinien durch Ketoconazol die Menge von HGF im Überstand abnahm, nicht jedoch von IGF2 (Abbildung 4.2.21). Möglicherweise lässt sich dieser Effekt u. a. über eine Regulation von PXR erklären. PXR ist grundsätzlich in der Lage, die Produktion von Wachstumsfaktoren zu induzieren (Kodama et al. 2015; Shizu et al. 2016). Da Ketoconazol PXR inhibiert, könnte eine reduzierte HGF-Freisetzung resultieren.

Um zu untersuchen, ob Wachstumsfaktoren und damit auch HGF für das Überleben unter Ketoconazol-Stimulation wichtig waren, wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen mit Ketoconazol inkubiert. Dabei wurde beobachtet, dass das Überleben nach zehntägiger Ketoconazol-Behandlung von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen unter serumfreien Bedingungen sehr viel stärker reduziert war als im Vollmedium (Abbildung 4.2.23 und 4.2.24). Im klinischen Alltag ist ein kompletter Serumentzug

jedoch als therapeutische Möglichkeit nicht realisierbar, sodass eine selektive Blockade des HGF-Rezeptors c-Met mit Tepotinib getestet wurde. Tepotinib ist in der Tumorthherapie anderer Erkrankungen bereits zugelassen (Markham 2020). Eine Inkubation der beiden Zelllinien mit Retinsäure, Ketoconazol und Tepotinib reduzierte die Zellviabilität signifikant und stärker als die jeweiligen Einzelsubstanzen (Abbildung 4.2.24), da hier die zusätzliche und gleichzeitige Blockade des HGF-Rezeptors bei reduzierter HGF-Verfügbarkeit durch Retinsäure und Ketoconazol besonders effektiv sein könnte.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine Inhibition von CYP26 und CYP3A5 zur Unterstützung einer Retinsäuretherapie nicht ausreichend ist, da die Neuroblastomzellen in der Lage sind, die blockierten CYP-Enzyme kompensatorisch zu induzieren. Ein geeigneter Inhibitor muss deshalb mehrere CYPs sowie weitere intrazelluläre Angriffspunkte haben. Durch die pleiotrope Substanz Ketoconazol konnten neben einer CYP-Inhibition auf verschiedenen zellulären Ebenen eine Wachstumshemmung und Apoptose-Induktion erreicht werden.

Allerdings zeigt Ketoconazol ein hohes Nebenwirkungsprofil, weshalb die klinische Anwendung seit 2013 stark reglementiert ist. Neben dem hohen Interaktionspotential mit anderen Medikamenten, vor allem mit denen, die über CYP3A4 metabolisiert werden, kann es zu allgemeinen abdominalen Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall sowie zu Nebennierenrindeninsuffizienz und erhöhter Hepatotoxizität führen (European Medicines Agency 2014). In Deutschland ist die Anwendung erst ab dem 12. Lebensjahr zugelassen, das durchschnittliche Erkrankungsalter eines Neuroblastoms liegt jedoch bei ein bis vier Jahren (Steliarova-Foucher 2018). Damit kann Ketoconazol in diesem Zusammenhang als experimentelle Substanz gesehen werden, die es erleichtern kann, gezielter nach anderen ähnlich wirkenden, aber besser verträglichen Wirkstoffen zu suchen.

#### 5.4 CYP2J2 als onkologisches Zieltarget in Neuroblastomzellen

CYP2J2 wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, da es in beiden Zelllinien oberhalb der Expressionsschwelle lag (Abbildung 4.1.4) und durch Retinsäure auf Transkriptions- und Proteinebene reduziert wurde (Abbildung 4.3.1), was im Vergleich zu CYP26A1, CYP26B1 und CYP3A5 gegensätzlich stand, da diese durch Retinsäure

induziert wurden. Deshalb wurde CYP2J2 als möglicher Mediator von Überleben mit und ohne Retinsäure in den Neuroblastomzellen analysiert.

Zunächst wurden Expression und Proteinmengen von CYP2J2 nach der dreitägigen Inkubation mit Retinsäure bestimmt. In beiden Zelllinien wurde die Expression signifikant reduziert, die Proteinmenge jedoch nur schwach (Abbildung 4.3.1 B). CYP2J2 kann verschiedene Substrate oxidieren, u. a. all-trans-Retinal zu all-trans-Retinsäure, welches für die embryonale Entwicklung notwendig ist (Messina et al. 2010). Erhöhte Retinsäurespiegel könnten demnach über einen negativen Feedbackmechanismus die Menge von CYP2J2 reduzieren. Dies würde bedeuten, dass eine verminderte CYP2J2-Aktivität zu einer reduzierten Retinsäure-Produktion aus Retinal zur Folge hätte, was wiederum die Wirkung von Retinsäure abschwächen könnte. Insgesamt ist die Regulation der CYP2J2-Expression komplex und durchaus im Rahmen einer Retinsäure-vermittelten Signaltransduktion möglich (Murray 2016), wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht genauer analysiert.

Ob CYP2J2 das Überleben von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen beeinflusste, wurde mit Hilfe von Inhibitorexperimenten untersucht. Grundsätzlich kann CYP2J2 in der Onkologie ein wichtiger Mediator sein. Eine erhöhte CYP2J2-Expression ist in Tumorgeweben bekannt und mit Tumorprogress assoziiert (Guo et al. 2018). Insbesondere durch Metabolite wie EETs (Epoxyeicosatriensäuren) sorgt CYP2J2 für Tumorprogress und Neovaskularisation (Guo et al. 2018; Hu et al. 2018) und könnte demnach auch jenseits Retinsäure-vermittelter Signale das Überleben der Neuroblastomzellen beeinflussen. In hämatologischen Erkrankungen beispielsweise führten reduzierte EET-Level zu verminderter Zellviabilität (El-Serafi et al. 2015). Um dies in der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, wurden Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit den CYP2J2-Inhibitoren Flunarizin und Telmisartan behandelt. Die beiden Substanzen wurden ausgewählt, weil sie CYP2J2 spezifisch inhibieren, aber keine Substrate sind (Ren et al. 2013). Der IC<sub>50</sub>-Wert für die Hemmung von CYP2J2 von Telmisartan ist dabei geringer als der von Flunarizin (Ren et al. 2013).

Flunarizin wird in der Migräneprophylaxe eingesetzt und Telmisartan in der antihypertensiven Therapie. Beide zeigen allerdings auch in unterschiedlichen Tumorzellen eine antikanzerogene Wirksamkeit (Schmeel et al. 2015; Matsui et al. 2019). Flunarizin konnte u. a. in Glioblastomzellen die Zytotoxizität des

zytostatischen Therapeutikums (Chen et al. 2021) verstärken. Telmisartan konnte in malignen Zellen eine Apoptose und einen Proliferationsstop induzieren (Pu et al. 2016).

In den vorliegenden Experimenten wurde die Zellviabilität von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen durch beide Substanzen reduziert (Abbildung 4.3.2 und 4.3.3), jedoch war der Effekt für Flunarizin stärker als für Telmisartan, obwohl Telmisartan CYP2J2 mit höherer Affinität inhibiert. In anderen Versuchsmodellen zeigte Telmisartan einen leichten neuroprotektiven Effekt in SH-SY5Y-Zellen (Şen und Hacıosmanoğlu 2022). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Hemmung von CYP2J2 allein nicht entscheidend für die Viabilität der Zellen war. Deshalb wurden im Folgenden die Aktivierungsmuster von Kinasen untersucht, die generell mit dem Überleben assoziiert waren. In Kelly-Zellen, die besonders empfindlich auf Flunarizin reagierten (Abbildung 4.3.2), wurde durch Flunarizin die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt reduziert (Chen et al. 2021), durch Telmisartan nur die Aktivität von Akt (Zhang et al. 2018) (Abbildung 4.3.4). Bei der Kinase-Aktivierung von SH-SY5Y-Zellen wurde durch Flunarizin die Akt-Phosphorylierung gesenkt (Chen et al. 2021), während Telmisartan keine Veränderung auslöste (Abbildung 4.3.5). Die JNK-Aktivität blieb auf Kontrollniveau. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die beobachteten zellulären Reaktionen nicht durch die bislang untersuchten Signalprozesse erklären ließen.

Es wurden weitere zelluläre Angriffspunkte von Flunarizin im Vergleich zu Telmisartan untersucht, um die unterschiedliche Wirkung der beiden Inhibitoren zu verstehen. Dabei standen drei unterschiedliche Aspekte im Vordergrund: Flunarizin blockiert Calcium-Kanäle sowie Natrium-Kanäle und induziert Autophagie. Jeder einzelne dieser Effekte kann antikanzerogen wirken und in ihrer Summe entsprechend Zelltod verstärken bzw. Viabilität reduzieren (Conrad et al. 2010; Koltai 2015; Zheng et al. 2018). Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren von Calcium- und Natrium-Kanälen sowie einem Autophagie-Induktor, die mit Telmisartan kombiniert wurden, sollte demnach untersucht werden, ob ein Flunarizin-ähnlicher Effekt bzw. eine Wirkverstärkung von Telmisartan erzielt werden konnte.

Bei der Untersuchung der Calcium-Spiegel in beiden Zelllinien wurde sichtbar, dass Telmisartan keine Veränderung hervorrief und Flunarizin ähnlich stark wirkte wie der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil (Abbildung 4.3.6), was für SH-SY5Y-Zellen bereits



bekannt war (Wang R. 1990; An Haack et al. 2011). Bezogen auf die Viabilität zeigten weitere Experimente, dass die Inhibition von Calcium-Kanälen durch Verapamil allein nicht das Überleben reduzierte (Abbildung 4.3.9 und 4.3.10), sondern nur zusammen mit Retinsäure. Außerdem wurde die Anzahl der lebenden Zellen reduziert, wenn Telmisartan und Verapamil gleichzeitig gegeben wurden (Abbildung 4.3.9 und 4.3.10). Die kombinierte Hemmung von CYP2J2 und Calcium-Kanälen hatte demnach einen additiven Effekt. Möglicherweise ist dies unter anderem durch eine verstärkte Calcium-ATP-Fällung begründet (Lange et al. 2019). Bislang war nur bekannt, dass die Calciumkanalinhibition über Amlodipin die Wirksamkeit des Zytostatikums Vincristin in SH-SY5Y-Zellen erhöhte (Taghizadehghalehjoughi et al. 2019).

Die Blockade von Natriumkanälen über Lidocain beeinträchtigte die Viabilität von naiven Zellen nicht. Erst die Kombination mit Retinsäure, Telmisartan oder beiden Substanzen reduzierte die ATP-Spiegel stärker als nach Behandlung mit den jeweiligen Einzelsubstanzen (Abbildung 4.3.11 und 4.3.12). Allerdings waren die Effekte geringer als nach Calciumkanalblockade.

Zuletzt wurde untersucht, ob die Autophagie-induzierenden Effekte von Flunarizin bei der reduzierten Viabilität von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen eine Rolle spielten. Es war bereits bekannt, dass Flunarizin autophagische Prozesse initiieren konnte (Zheng et al. 2018). Außerdem deutete die verminderte Phosphorylierung von Akt nach Flunarizin-Behandlung darauf hin (Abbildung 4.3.4 und 4.3.5), dass vergleichbare Reaktionen auch in den Neuroblastomzellen hervorgerufen wurden. In Western Blots war nach Gabe von Flunarizin eine signifikante Zunahme des Autophagiemarkers LC3B erkennbar (Abbildung 4.3.13 und 4.3.14), was für eine Induktion von Autophagie sprach. Für Telmisartan konnte zwar bereits in T-Zell-Leukämie-Zellen eine Autophagie-Induktion nachgewiesen werden (Kozako et al. 2016), jedoch reduzierte sich die Zellviabilität in den Neuroblastomzellen erst nach Inkubation mit Telmisartan, Retinsäure und dem Autophagieinduktor (Rapamycin) nachhaltig und signifikant (Abbildung 4.3.13 B und 4.3.14 B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die alleinige Hemmung von CYP2J2 nicht ausreichend war, um das Überleben von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen zu reduzieren. An der pleiotropen Substanz Flunarizin ließ sich zeigen, dass zusätzliche Effekte wie eine Calciumkanalblockade und Autophagie-Induktion für eine stärkere Wirkung im

Vergleich zu Telmisartan sorgten. CYP2J2 als therapeutischer Angriffspunkt in der onkologischen Therapie ist somit fraglich. Rein praktisch schwierig könnte die Verträglichkeit beider Substanzen sein mit Nebenwirkungen für Flunarizin wie Benommenheit, Schlaflosigkeit sowie Angstzuständen und für Telmisartan Hypotonie, diverse Entzündungen sowie Depression. Weiterhin besteht für beide Substanzen ein hohes Interaktionspotential mit anderen Medikamenten (ALIUD PHARMA® GmbH 2020; acis Arzneimittel GmbH 2020).

## 5.5 CYP4V2 als mögliche Zielstruktur in der Retinsäure-Resistenz von Neuroblastomzellen

Bei Analyse der Microarrays zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von CYP4V2 in SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu den Kelly-Zellen, was sich in TaqMan-Assays und auf Proteinebene bestätigen ließ (Abbildung 4.1.4 und 4.3.16). Außerdem wurde die Expression durch Retinsäure signifikant induziert, während sich die Proteinmenge nur tendenziell erhöhte (Abbildung 4.3.16). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob CYP4V2 für das Überleben von naiven und Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen eine Rolle spielte. Insgesamt ist wenig über CYP4V2 bekannt. Es handelt sich um eine  $\omega$ -Hydroxylase, die aus Arachidonsäure unterschiedliche Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) herstellen kann (Panigrahy et al. 2010). Mutationen im CYP4V2-Gen sind für ophthalmologische Erkrankungen verantwortlich (Kelly et al. 2011; Nakano et al. 2009). Es wird allerdings auch in einigen Tumoren verstärkt exprimiert (Jarrar und Lee 2019) und kann im Tumorgewebe vom Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose korreliert werden (Murray et al. 2010). Dafür wird den Stoffwechselprodukten von CYP4V2, den HETEs, eine entscheidende Bedeutung in Bezug auf Tumorentstehung zugeschrieben, da sie Apoptose verhindern können und die Angiogenese, Proliferation und Migration von Krebszellen stimulieren (Cancer Metastasis Rev, 2010, 29: 723; Alexanian et al. 2012). Mit 20-HETE, einem sehr wichtigen CYP4V2-Metaboliten, stimulierte Gliomzellen führten zur verstärkten Zellproliferation (Guo et al. 2008).

Eine Behandlung mit HET-0016 zeigte nur für Kelly-Zellen in Kombination mit Retinsäure eine leichte Reduktion der Zellviabilität, für SH-SY5Y war keine HET-0016-induzierte Veränderung zu beobachten (Abbildung 4.3.17), was sich durch eine erhöhte CYP4V2-Expression in SH-SY5Y und damit einer möglichen höheren 20-

HETE-Konzentration erklären lassen könnte. In den zentralen Signalwegen für Zellüberleben waren hauptsächlich bei Kelly-Zellen Regulationen im Phosphorylierungsmuster sichtbar: Die Behandlung mit HET-0016 reduzierte die Akt-Aktivität und erhöhte die JNK-Aktivierung unabhängig von der zusätzlichen Gabe von Retinsäure (Abbildung 4.3.18). Die Phosphorylierung von ERK1/2 blieb jedoch beeinflusst von Retinsäure. HET-0016 in naiven Zellen erhöhte die Aktivität von ERK1/2, während die gleichzeitige Stimulation mit Retinsäure und dem CYP4V2-Inhibitor die Phosphorylierung reduzierte. Diese differentielle Regulation kann dafür verantwortlich sein, dass ohne Retinsäure das Zellüberleben auf Kontrollniveau blieb, bei Ko-Inkubation mit beiden Substanzen die Viabilität jedoch sank (Abbildung 4.3.17). In SH-SY5Y-Zellen war nur ein reduziertes Signal für die Phosphorylierung von Akt in naiven Zellen sichtbar. Die anderen Kinase-Aktivitäten waren vergleichbar mit den Kontrollzellen (Abbildung 4.3.18). Insgesamt scheint das Ansprechen auf HET-0016 zelltypspezifisch zu sein. So führte beispielsweise die Behandlung von Glioblastomzellen mit HET-0016 zu einer reduzierten Zellproliferation (Guo et al. 2006). Dabei ist zu beachten, dass HET-0016 zwar für CYP4V2 als indirekter 20-HETE-Inhibitor erprobt ist (Sharma et al. 2021), aber 20-HETE grundsätzlich auch von anderen CYP-Gruppen, z. B. CYP4A und CYP4F produziert wird (Alexanian und Sorokin 2013), weshalb dieser Inhibitor in Tumoren, die auch CYP4A- und CYP4F-Enzyme produzieren, nicht ausreichen könnte.

Um zu überprüfen, ob Kelly-Zellen generell empfindlicher auf die Hemmung der CYP-vermittelten Arachidonsäure-Verstoffwechslung reagierten als SH-SY5Y-Zellen, wurden Inhibitoren gegen CYP2J2 und CYP4V2 gleichzeitig gegeben. Dadurch wurde die Bildung von Epoxyeicosatriensäuren und Hydroxyeicosatetraensäuren reduziert (Panigrahy et al. 2010). Als CYP2J2-Hemmstoffe wurden Flunarizin und Telmisartan verwendet. In naiven Kelly-Zellen reduzierte die simultane Stimulation mit HET-0016 und Flunarizin die Viabilität stärker als die Kombination mit Telmisartan. In Retinsäure-behandelten Zellen war der Unterschied weniger deutlich (Abbildung 4.3.19 A). SH-SY5Y-Zellen waren insgesamt weniger empfindlich, zeigten jedoch auf beide Substanzkombinationen einen ähnlichen Effekt, was auch durch die zusätzliche Gabe von Retinsäure nicht wesentlich verändert wurde (Abbildung 4.3.19 B). Für HET-0016 konnte in Sauerstoff-/Glukose-depletierten SH-SY5Y-Zellen ein protektiver Effekt gesehen werden (Yang et al. 2020), was u. a. eine Erklärung für eine reduzierte Empfindlichkeit liefern könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zu CYP4V2 grundsätzlich wenig bekannt ist und die Ergebnisse, u. a. aufgrund mangelnder, verfügbarer Inhibitoren nur wenig darüber aussagen, ob CYP4V2 ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt sein könnte oder zumindest durch einen geeigneten Hemmstoff Tumorzellen für eine weitere Behandlung sensibilisieren könnte. Für die Retinsäure-Resistenz in den hier untersuchten Neuroblastomzellen spielt CYP4V2 wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle.

## 6 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist eine heterogene Tumorerkrankung mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen, die von spontaner Regression bis hin zu polytope Metastasierung reicht. Dadurch sind die Krankheitsverläufe schwer vorherzusagen und die therapeutischen Möglichkeiten limitiert (Hara 2012). Innerhalb der bislang verwendeten Therapieoptionen war die Retinsäure-Resistenz eine häufige Ursache für Therapieversagen, weshalb der klinische Gebrauch zunehmend eingeschränkt wurde. Das Prinzip der Zelldifferenzierung und Apoptose-Induktion ist bei Krebszellen mit Stammzeleigenschaften dennoch sinnvoll, sodass die Untersuchung verschiedener Retinsäure-Metabolisierungswege sich eignen könnte, um therapeutisch relevante Angriffspunkte zu finden (Teppola et al. 2016). Insbesondere Enzyme aus der Cytochrom-P450-Familie sind nach Induktion und der dadurch erhöhten Wirkstoffmetabolisierung in vielen Tumorerkrankungen an einer Arzneimittelresistenz beteiligt (Tebbens et al. 2018) und standen deshalb im Fokus der vorliegenden Arbeit zur Retinsäure-Resistenz bei Neuroblastomzellen.

Retinsäure wird vor allem von Proteinen aus der CYP26-Familie und der CYP3A-Subgruppe verstoffwechselt. Dabei wurden in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen nach dreitägiger Behandlung mit Retinsäure die Enzyme CYP26A1, CYP26B1 und CYP3A5 induziert. Diese verstärkte Expression wurde durch den Einsatz selektiver Inhibitoren weiter verstärkt, sodass die Wirkung von Retinsäure nur unwesentlich erhöht werden konnte. Erst die kombinierte Hemmung unterschiedlicher Angriffspunkte im Retinsäurestoffwechsel reduzierte die Viabilität der Neuroblastomzellen, was am besten mit der pleiotropen Substanz Ketoconazol gelang. Bei der Untersuchung weiterer zellulärer Effekte von Ketoconazol fiel auf, dass die Freisetzung des Wachstumsfaktors HGF vermindert wurde. Wurde bei gleichzeitiger Gabe von Ketoconazol der HGF-Rezeptor c-Met durch Tepotinib gehemmt, konnte das Überleben beider Zelllinien signifikant gesenkt werden.

Das Cytochrom-P450-Enzym CYP2J2 ist an der Bildung von Retinsäure beteiligt (Messina et al. 2010) und wurde nach Stimulation mit Retinsäure deshalb vermindert exprimiert. Die selektive Hemmung war wenig effektiv. Hatten die Inhibitoren zusätzliche zelluläre Angriffspunkte, wie beispielsweise die Substanz Flunarizin, konnte das Überleben der hier verwendeten Neuroblastomzellen gesenkt werden.

Dabei zeigte sich, dass insbesondere die Hemmung von CYP2J2 bei gleichzeitiger Induktion von Autophagie eine entscheidende Wirkkomponente von Flunarizin war. Zuletzt wurde untersucht, ob das Cytochrom-P450-Enzym CYP4V2 wichtig für das Überleben von Kelly- und SH-SY5Y-Zellen war. Dabei stellte sich heraus, dass die alleinige Hemmung nur sehr eingeschränkt wirksam war. Erst die kombinierte Gabe von CYP2J2-Inhibitoren und des CYP4V2-Hemmstoffes HET-0016 beeinträchtigte die zelluläre Viabilität, was für eine untergeordnete Funktion von CYP4V2 sprach. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme im Retinsäure-Metabolismus von Neuroblastomzellen eine Rolle spielen und auch an einer therapeutischen Resistenz beteiligt sein können. Dabei zeigte sich allerdings eindrucksvoll, dass die Hemmung nur einer Zielstruktur weitgehend wirkungslos war und erst die gleichzeitige Inhibition unterschiedlicher zellulärer Angriffspunkte das Überleben der Zellen einschränkte, was auch vor dem Hintergrund der Heterogenität von Neuroblastomen sinnvoll erscheint.

## 7 Literaturverzeichnis

Acis Arzneimittel GmbH (2020): Flunarizin acis 5 mg - Packungsbeilage | medikamio.

Aktas S., Altun Z., Erbayraktar Z., Aygun N., Olgun N.: Effect of cytotoxic agents and retinoic acid on Myc-N protein expression in neuroblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*.2010;18(1):86-9

Alexanian A., Miller B., Roman R.J., Sorokin A.: 20-HETE-producing enzymes are up-regulated in human cancers. *Cancer Genomics Proteomics*.2012;9(4):163-9.

Alexanian A., Sorokin A.: Targeting 20-HETE producing enzymes in cancer - rationale, pharmacology, and clinical potential. *Onco Targets Ther*.2013;6:243-55

ALIUD PHARMA® GmbH (2020): Telmisartan AL 80 mg Tabletten - Packungsbeilage | medikamio.

Alnabulsi A., Swan R., Cash B., Alnabulsi A., Murray GI.: The differential expression of omega-3 and omega-6 fatty acid metabolising enzymes in colorectal cancer and its prognostic significance. *Br J Cancer*. 2017;116(12):1612-1620.

Alonso S., Jones R.J., Ghiaur G.: Retinoic acid, CYP26, and drug resistance in the stem cell niche. *Exp Hematol*. 2017;54:17-25

An Haack K., Narayan S.B., Li H., Warnock A., Tan L., Bennett M.J.: Screening for calcium channel modulators in CLN3 siRNA knock down SH-SY5Y neuroblastoma cells reveals a significant decrease of intracellular calcium levels by selected L-type calcium channel blockers. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(2):186-91

Armstrong J.L., Ruiz M., Boddy A.V., Redfern C.P., Pearson A.D., Veal G.J.: Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer*. 2005;92(4):696-704

Armstrong J.L., Taylor G.A., Thomas H.D., Boddy A.V., Redfern C.P., Veal G.J.: Molecular targeting of retinoic acid metabolism in neuroblastoma: the role of the CYP26 inhibitor R116010 in vitro and in vivo. *Br J Cancer*. 2007;96(11):1675-83

Armstrong J.L., Martin S., Illingworth N.A., Jamieson D., Neilson A., Lovat P.E., Redfern C.P., Veal G.J.: The impact of retinoic acid treatment on the sensitivity of neuroblastoma cells to fenretinide. *Oncol Rep*. 2012;27(1):293-8

Astin J.W., Jamieson S.M., Eng T.C., Flores M.V., Misa J.P., Chien A., Crosier K.E., Crosier P.S.: An in vivo antilymphatic screen in zebrafish identifies novel inhibitors of mammalian lymphangiogenesis and lymphatic-mediated metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(10):2450-62

Berry D.C., Noy N.: Is PPARbeta/delta a Retinoid Receptor? *PPAR Res.* 2007;2007:73256

Bilip M., Shah S., Mathiyalakan M., Tagalakakis A.D., Hart S.L., Maeshima R., Eaton S., Orford M., Irving E., Di Florio A., Simons C., Stoker A.W.: Liposomal delivery of hydrophobic RAMBAs provides good bioavailability and significant enhancement of retinoic acid signalling in neuroblastoma tumour cells. *J Drug Target.* 2020;28(6):643-654

Borin T.F., Zuccari D.A., Jardim-Perassi B.V., Ferreira L.C., Iskander A.S., Varma N.R., Shankar A., Guo A.M., Scicli G., Arbab A.S.: HET0016, a selective inhibitor of 20-HETE synthesis, decreases pro-angiogenic factors and inhibits growth of triple negative breast cancer in mice. *PLoS One.* 2014;9(12):e116247

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. Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology.* 2011;261(1):243-57

Bronner M.E., Simões-Costa M.: The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. *Curr Top Dev Biol.* 2016;116:115-34

Bushue N., Wan Y.J.: Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13):1285-98

Cai J.B., Wang J.H., He M., Wang F.L., Xiong J.N., Mao J.Q., Li M.J., Zhu K., Liang J.W.: Unusual presentation of bladder neuroblastoma in a child: A case report. *World J Clin Cases.* 2020;8(1):194-199

Cañón E., Cosgaya J.M., Scsucova S., Aranda A.: Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5583-92



Chen H., Howald W.N., Juchau M.R.: Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from all-trans-retinol: catalysis of all-trans-retinol oxidation by human P-450 cytochromes. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(3):315-22

Chen S.H., Chao C.N., Chen S.Y., Lin H.P., Huang H.Y., Fang C.Y.: Flunarizine, a drug approved for treating migraine and vertigo, exhibits cytotoxicity in GBM cells. *Eur J Pharmacol.* 2021;892:173756

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

Chlapek P., Slavikova V., Mazanek P., Sterba J., Veselska R.: Why Differentiation Therapy Sometimes Fails: Molecular Mechanisms of Resistance to Retinoids. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):132

Conrad D.M., Furlong S.J., Doucette C.D., West K.A., Hoskin D.W.: The Ca(2+) channel blocker flunarizine induces caspase-10-dependent apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Apoptosis.* 2010;15(5):597-607

Cooper J.P., Hwang K., Singh H., Wang D., Reynolds C.P., Curley R.W. Jr., Williams S.C., Maurer B.J., Kang M.H.: Fenretinide metabolism in humans and mice: utilizing pharmacological modulation of its metabolic pathway to increase systemic exposure. *Br J Pharmacol.* 2011;163(6):1263-75

Curtin C., Nolan J.C., Conlon R., Deneweth L., Gallagher C., Tan Y.J., Cavanagh B.L., Asraf A.Z., Harvey H., Miller-Delaney S., Shohet J., Bray I., O'Brien F.J., Stallings R.L., Piskareva O.: A physiologically relevant 3D collagen-based scaffold-neuroblastoma cell system exhibits chemosensitivity similar to orthotopic xenograft models. *Acta Biomater.* 2018;70:84-97

Daly A.K.: Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(1):13-31

Daneshmend T.K., Warnock D.W.: Clinical pharmacokinetics of ketoconazole. *Clin Pharmacokinet.* 1988;14(1):13-34

Darwish M.H., Farah R.A., Farhat G.N., Torbey P.H., Ghandour F.A., Bejjani-Doueihy N.A., Dhaini H.R.: Association of CYP3A4/5 genotypes and expression with the survival of patients with neuroblastoma. *Mol Med Rep.* 2015;11(2):1462-8

Datta A., Kim H., McGee L., Johnson A.E., Talwar S., Marugan J., Southall N., Hu X., Lal M., Mondal D., Ferrer M., Abdel-Mageed A.B.: High-throughput screening identified selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion: A drug repurposing strategy for advanced cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):8161

de Araújo Júnior R.F., Leitão Oliveira A.L., de Melo Silveira R.F., de Oliveira Rocha H.A., de França Cavalcanti P., de Araújo A.A.: Telmisartan induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human renal cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(1):34-44

Dobrotkova V., Chlapek P., Mazanek P., Sterba J., Veselska R.: Traffic lights for retinoids in oncology: molecular markers of retinoid resistance and sensitivity and their use in the management of cancer differentiation therapy. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1059

Dong D., Ruuska S.E., Levinthal D.J., Noy N.: Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem.* 1999;274(34):23695-8

Elfaki I., Mir R., Almutairi F.M., Duhier F.M.A.: Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(8):2057-2070

El-Serafi I., Fares M., Abedi-Valuggerdi M., Afsharian P., Moshfegh A., Terelius Y., Potáková Z., Hassan M.: Cytochrome P450 2J2, a new key enzyme in cyclophosphamide bioactivation and a potential biomarker for hematological malignancies. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(5):405-13

European Medicines Agency (2014): Ketoconazole HRA, INN-ketoconazole.

Fonseca E., Ruivo R., Borges D., Franco J.N., Santos M.M., C Castro L.F.: Of Retinoids and Organotins: The Evolution of the Retinoid X Receptor in Metazoa. *Biomolecules.* 2020;10(4):594

Fritzsche B., Schuchardt J.P., Schmidt A., Nau H., Schweigert F.J., Rühl R.: CYP26A1-specific antagonist influence on embryonic implantation, gene expression and endogenous retinoid concentration in rats. *Reprod Toxicol.* 2010;30(3):446-51

Fuchs I., Hafner-Blumenstiel V., Markert C., Burhenne J., Weiss J., Haefeli W.E., Mikus G.: Effect of the CYP3A inhibitor ketoconazole on the PXR-mediated induction of CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(3):507-13

Fulda S., Lutz W., Schwab M., Debatin K.M.: MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene.* 1999;18(7):1479-86

Georgantzi K., Sköldenberg E.G., Stridsberg M., Kogner P., Jakobson Å., Janson E.T., Christofferson R.H.B.: Chromogranin A and neuron-specific enolase in neuroblastoma: Correlation to stage and prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol.* 2018;35(2):156-165

Gesualdi L., Leonetti E., Cucina A., Scicchitano B.M., Sorrentino S., Tarsitano M.G., Isidori A., Bizzarri M., Filippini A., Riccioli A., Cammarota M., Gigantino V., Ricci G., Catizone A.: The PI3K/AKT Pathway Is Activated by HGF in NT2D1 Non-Seminoma Cells and Has a Role in the Modulation of Their Malignant Behavior. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8669

Giltair S., Herphelin F., Frankart A., Hérin M., Stoppie P., Poumay Y.: The CYP26 inhibitor R115866 potentiates the effects of all-trans retinoic acid on cultured human epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2009;160(3):505-13

Girardi C.S., Rostirolla D.C., Lini F.J.M., Brum P.O., Delgado J., Ribeiro C.T., Teixeira A.A., Peixoto D.O., Heimfarth L., Kunzler A., Moreira J.C.F., Gelain D.P.: Nuclear RXR $\alpha$  and RXR $\beta$  receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(3):317-328

Girgert R., Schweizer P.: Regulation of expression of two different transcripts of the NF-1 gene in neuroblastoma. *J Neurooncol.* 1997;31(1-2):93-7

Gomaa M.S., Armstrong J.L., Bobillon B., Veal G.J., Brancale A., Redfern C.P., Simons C.: Novel azolyl-(phenylmethyl)ary/heteroarylamines: potent CYP26 inhibitors and enhancers of all-trans retinoic acid activity in neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(17):8301-13

Gomaa M.S., Bridgens C.E., Aboraia A.S., Veal G.J., Redfern C.P., Brancale A., Armstrong J.L., Simons C.: Small molecule inhibitors of retinoic acid 4-hydroxylase

(CYP26): synthesis and biological evaluation of imidazole methyl 3-(4-(aryl-2-ylamino)phenyl)propanoates. *J Med Chem.* 2011;54(8):2778-91

Gomaa M.S., Lim A.S., Lau S.C., Watts A.M., Illingworth N.A., Bridgens C.E., Veal G.J., Redfern C.P., Brancale A., Armstrong J.L., Simons C.: Synthesis and CYP26A1 inhibitory activity of novel methyl 3-[4-(arylamino)phenyl]-3-(azole)-2,2-dimethylpropanoates. *Bioorg Med Chem.* 2012;20(20):6080-8

Gordon J., Amini S.: General Overview of Neuronal Cell Culture. *Methods Mol Biol.* 2021;2311:1-8

Grahovac J., Srdić-Rajić T., Francisco Santibañez J., Pavlović M., Čavić M., Radulović S.: Telmisartan induces melanoma cell apoptosis and synergizes with vemurafenib in vitro by altering cell bioenergetics. *Cancer Biol Med.* 2019;16(2):247-263

Green A.C., Kocovski P., Jovic T., Walia M.K., Chandraratna R.A.S., Martin T.J., Baker E.K., Purton L.E.: Retinoic acid receptor signalling directly regulates osteoblast and adipocyte differentiation from mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 2017;350(1):284-297

Greenberg J.W., Kim H., Moustafa A.A., Datta A., Barata P.C., Boulares A.H., Abdel-Mageed A.B., Krane L.S.: Repurposing ketoconazole as an exosome directed adjunct to sunitinib in treating renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2021;11(1):10200

Guo M., Roman R.J., Fenstermacher J.D., Brown S.L., Falck J.R., Arbab A.S., Edwards P.A., Scicli A.G.: 9L gliosarcoma cell proliferation and tumor growth in rats are suppressed by N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenol) formamidine (HET0016), a selective inhibitor of CYP4A. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(1):97-108

Guo A.M., Sheng J., Scicli G.M., Arbab A.S., Lehman N.L., Edwards P.A., Falck J.R., Roman R.J., Scicli A.G.: Expression of CYP4A1 in U251 human glioma cell induces hyperproliferative phenotype in vitro and rapidly growing tumors in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(1):10-9

Guo Z., Johnson V., Barrera J., Porras M., Hinojosa D., Hernández I., McGarrah P., Potter D.A.: Targeting cytochrome P450-dependent cancer cell mitochondria: cancer associated CYPs and where to find them. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(2-3):409-423

Hameed D.A., el-Metwally T.H.: The effectiveness of retinoic acid treatment in bladder cancer: impact on recurrence, survival and TGF $\alpha$  and VEGF as end-point biomarkers. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(1):92-100

Hämmerle B., Yañez Y., Palanca S., Cañete A., Burks D.J., Castel V., Font de Mora J.: Targeting neuroblastoma stem cells with retinoic acid and proteasome inhibitor. *PLoS One.* 2013;8(10):e76761

Handberg-Thorsager M., Gutierrez-Mazariegos J., Arold S.T., Kumar Nadendla E., Bertucci P.Y., Germain P., Tomançak P., Pierzchalski K., Jones J.W., Albalat R., Kane M.A., Bourguet W., Laudet V., Arendt D., Schubert M.: The ancestral retinoic acid receptor was a low-affinity sensor triggering neuronal differentiation. *Sci Adv.* 2018;4(2):eaao1261

Hara J.: Development of treatment strategies for advanced neuroblastoma. *Int J Clin Oncol.* 2012;17(3):196-203

He X., Qin C., Zhao Y., Zou L., Zhao H., Cheng C.: Gene signatures associated with genomic aberrations predict prognosis in neuroblastoma. *Cancer Commun (Lond).* 2020;40(2-3):105-118

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

Hodler J., Kubik-Huch R.A., von Schulthess G.K.: Diseases of the Chest, Breast, Heart and Vessels 2019-2022: Diagnostic and Interventional Imaging. 2019. Springer. Cham (Schweiz)

Hohmann N., Bozorgmehr F., Christopoulos P., Mikus G., Blank A., Burhenne J., Thomas M., Haefeli W.E.: Pharmacoenhancement of Low Crizotinib Plasma Concentrations in Patients with Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small Cell Lung Cancer using the CYP3A Inhibitor Cobicistat. *Clin Transl Sci.* 2021;14(2):487-491

Holownia A., Cederbaum A.I.: Threshold for antiproliferative and proapoptotic activity of ttaxol in HepG2 cells expressing human CYP3A4: effect of P-glycoprotein transporters. *Pharmacology.* 2003;69(3):142-9

- Howell S.R., Shirley M.A., Ulm E.H.: Effects of retinoid treatment of rats on hepatic microsomal metabolism and cytochromes P450. Correlation between retinoic acid receptor/retinoid x receptor selectivity and effects on metabolic enzymes. *Drug Metab Dispos.* 1998;26(3):234-9
- Hu J., Frömel T., Fleming I.: Angiogenesis and vascular stability in eicosanoids and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(2-3):425-438
- Hunsu V.O., Facey C.O.B., Fields J.Z., Boman B.M.: Retinoids as Chemo-Preventive and Molecular-Targeted Anti-Cancer Therapies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7731
- Idres N., Marill J., Flexor M.A., Chabot G.G.: Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *J Biol Chem.* 2002;277(35):31491-8
- Janesick A., Wu S.C., Blumberg B.: Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(8):1559-76
- Jarrar Y.B., Lee S.J.: Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17):4274
- Jarrar Y.B., Shin J.G., Lee S.J.: Identification and functional characterization of CYP4V2 genetic variants exhibiting decreased activity of lauric acid metabolism. *Ann Hum Genet.* 2020;84(5):400-411
- Jurima-Romet M., Neigh S., Casley W.L.: Induction of cytochrome P450 3A by retinoids in rat hepatocyte culture. *Hum Exp Toxicol.* 1997;16(4):198-203
- Steliarova-Foucher E., Fidler M.M., Colombet M., Lacour B., Kaatsch P., Piñeros M., Soerjomataram I., Bray F., Coebergh J.W., Peris-Bonet R., Stiller C.A.: Changing geographical patterns and trends in cancer incidence in children and adolescents in Europe, 1991-2010 (Automated Childhood Cancer Information System): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2018;19(9):1159-1169
- Kaczówka P., Wieczorek A., Czogała M., Książek T., Szewczyk K., Balwierz W.: The role of *N-Myc* gene amplification in neuroblastoma childhood tumour - single-centre experience. *Contemp Oncol (Pozn).* 2018;22(4):223-228

Karkhanis A., Hong Y., Chan E.C.Y.: Inhibition and inactivation of human CYP2J2: Implications in cardiac pathophysiology and opportunities in cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2017;135:12-21

Karkoulas G., Mastrogianni O., Lymperopoulos A., Paris H., Flordellis C.:  $\alpha(2)$ -Adrenergic receptors activate MAPK and Akt through a pathway involving arachidonic acid metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase, matrix metalloproteinase activation and subtype-specific transactivation of EGFR. *Cell Signal.* 2006;18(5):729-39

Kayano D., Wakabayashi H., Nakajima K., Kuroda R., Watanabe S., Inaki A., Toratani A., Akatani N., Yamase T., Kunita Y., Hiromasa T., Takata A., Mori H., Saito S., Araki R., Taki J., Kinuya S.: High-dose  $^{131}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine therapy in patients with high-risk neuroblastoma in Japan. *Ann Nucl Med.* 2020;34(6):397-406

Kelly E.J., Nakano M., Rohatgi P., Yarov-Yarovoy V., Rettie A.E.: Finding homes for orphan cytochrome P450s: CYP4V2 and CYP4F22 in disease states. *Mol Interv.* 2011;11(2):124-32

Kholodenko I.V., Kalinovskiy D.V., Doronin I.I., Deyev S.M., Kholodenko R.V.: Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J Immunol Res.* 2018;2018:7394268

Kim Y.S., Kim E., Park Y.J., Kim Y.: Retinoic acid receptor  $\beta$  enhanced the anti-cancer stem cells effect of  $\beta$ -carotene by down-regulating expression of delta-like 1 homologue in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;480(2):254-260

Kliwer S.A.: The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *J Nutr.* 2003;133(7 Suppl):2444S-2447S

Kodama S., Yamazaki Y., Negishi M.: Pregnane X Receptor Represses HNF4 $\alpha$  Gene to Induce Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein IGFBP1 that Alters Morphology of and Migrates HepG2 Cells. *Mol Pharmacol.* 2015;88(4):746-57

Koltai T.: Voltage-gated sodium channel as a target for metastatic risk reduction with re-purposed drugs. *F1000Res.* 2015;4:297

Kozako T., Soeda S., Yoshimitsu M., Arima N., Kuroki A., Hirata S., Tanaka H., Imakyure O., Tone N., Honda S., Soeda S.: Angiotensin II type 1 receptor blocker

telmisartan induces apoptosis and autophagy in adult T-cell leukemia cells. *FEBS Open Bio*. 2016;6(5):442-60

Kushner B.H.: Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med*. 2004;45(7):1172-88

Lange I., Koster J., Koomoa D.T.: Calcium signaling regulates fundamental processes involved in Neuroblastoma progression. *Cell Calcium*. 2019;82:102052

Lanza C., Galeazzi V., Carboni N., De Berardinis A., De Marino L., Barile A., Giovagnoni A.: Neuroblastoma image-defined risk factors in adrenal neuroblastoma: role of radiologist. *Gland Surg*. 2019;8(Suppl 3):S168-S177

Lee J.W., Son M.H., Cho H.W., Ma Y.E., Yoo K.H., Sung K.W., Koo H.H.: Clinical significance of MYCN amplification in patients with high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(10):e27257

Lin K.L., Huang C.C., Cheng J.S., Tsai J.Y., Lu Y.C., Chang H.T., Jan C.R.: Ketoconazole-induced JNK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(7):1268-76

Liu R.Z., Li S., Garcia E., Glubrecht D.D., Poon H.Y., Easaw J.C., Godbout R.: Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma. *Glia*. 2016;64(6):963-76

Liu H., Qin H., Zhou Y., Yuan Y., Liu Y., Chen Y., Yang Y., Ni H., Xi T., Zheng L.: HET0016 attenuates the stemness of breast cancer cells through targeting CYP4Z1. *Mol Carcinog*. 2021;60(6):413-426

Lombet A., Zujovic V., Kandouz M., Billardon C., Carvajal-Gonzalez S., Gompel A., Rostène W.: Resistance to induced apoptosis in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH in relation to neuronal differentiation. Role of Bcl-2 protein family. *Eur J Biochem*. 2001;268(5):1352-62

Lopez-Barcons L., Maurer B.J., Kang M.H., Reynolds C.P.: P450 inhibitor ketoconazole increased the intratumor drug levels and antitumor activity of fenretinide in human neuroblastoma xenograft models. *Int J Cancer*. 2017;141(2):405-413



Lou D., Cui X., Bao S.S., Sun W., Pan W.H., Chen M.C., Dong Y.Y., Hu G.X., Chen R.J., Wang Z.: Effects of ketoconazole, voriconazole, and itraconazole on the pharmacokinetics of apatinib in rats. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45(4):689-693

Mahler C., Verhelst J., Denis L.: Ketoconazole and liarozole in the treatment of advanced prostatic cancer. *Cancer.* 1993;71(3 Suppl):1068-73

Manikandan P., Nagini S.: Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets.* 2018;19(1):38-54

Markham A.: Tepotinib: First Approval. *Drugs.* 2020;80(8):829-833

Masetti R., Biagi C., Zama D., Vendemini F., Martoni A., Morello W., Gasperini P., Pession A.: Retinoids in pediatric onco-hematology: the model of acute promyelocytic leukemia and neuroblastoma. *Adv Ther.* 2012;29(9):747-62

Masuyama H., Nakamura K., Nobumoto E., Hiramatsu Y.: Inhibition of pregnane X receptor pathway contributes to the cell growth inhibition and apoptosis of anticancer agents in ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* 2016;49(3):1211-20

Matsui T., Chiyo T., Kobara H., Fujihara S., Fujita K., Namima D., Nakahara M., Kobayashi N., Nishiyama N., Yachida T., Morishita A., Iwama H., Masaki T.: Telmisartan Inhibits Cell Proliferation and Tumor Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Inducing S-Phase Arrest In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3197

McSorley L.C., Daly A.K.: Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(4):517-26

Melnik B.C.: Apoptosis May Explain the Pharmacological Mode of Action and Adverse Effects of Isotretinoin, Including Teratogenicity. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(2):173-181

Mensah-Osman E.J., Thomas D.G., Tabb M.M., Larios J.M., Hughes D.P., Giordano T.J., Lizyness M.L., Rae J.M., Blumberg B., Hollenberg P.F., Baker L.H.: Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines. *Cancer.* 2007;109(5):957-65

Messina A., Nencioni S., Gervasi P.G., Gotlinger K.H., Schwartzman M.L., Longo V.: Molecular cloning and enzymatic characterization of sheep CYP2J. *Xenobiotica*. 2010;40(2):109-18

Miyata N., Taniguchi K., Seki T., Ishimoto T., Sato-Watanabe M., Yasuda Y., Doi M., Kametani S., Tomishima Y., Ueki T., Sato M., Kameo K.: HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. *Br J Pharmacol*. 2001;133(3):325-9

Murillo J.R., Goto-Silva L., Sánchez A., Nogueira F.C.S., Domont G.B., Junqueira M.: Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *EuPA Open Proteom*. 2017;16:1-11

Murray G.I., Patimalla S., Stewart K.N., Miller I.D., Heys S.D.: Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer. *Histopathology*. 2010;57(2):202-11

Murray M.: CYP2J2 - regulation, function and polymorphism. *Drug Metab Rev*. 2016;48(3):351-68

Nakano M., Kelly E.J., Rettie A.E.: Expression and characterization of CYP4V2 as a fatty acid omega-hydroxylase. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(11):2119-22

Nakazawa A., Haga C., Ohira M., Okita H., Kamijo T., Nakagawara A.: Correlation between the International Neuroblastoma Pathology Classification and genomic signature in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2015;106(6):766-771

Napoli J.L.: Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. *Pharmacol Ther*. 2017;173:19-33

Nelson C.H., Buttrick B.R., Isoherranen N.: Therapeutic potential of the inhibition of the retinoic acid hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by xenobiotics. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(12):1402-28

Niemas-Teshiba R., Matsuno R., Wang L.L., Tang X.X., Chiu B., Zeki J., Coburn J., Ornell K., Naranjo A., Van Ryn C., London W.B., Hogarty M.D., Gastier-Foster J.M., Look A.T., Park J.R., Maris J.M., Cohn S.L., Seeger R.C., Asgharzadeh S., Ikegaki N., Shimada H.: MYC-family protein overexpression and prominent nucleolar formation represent prognostic indicators and potential therapeutic targets for aggressive high-

MKI neuroblastomas: a report from the children's oncology group. *Oncotarget*. 2017;9(5):6416-6432

Niemeyer C., Eggert A., 2017, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Springer, Berlin

Noll E.M., Eisen C., Stenzinger A., Espinet E., Muckenhuber A., Klein C., Vogel V., Klaus B., Nadler W., Rösli C., Lutz C., Kulke M., Engelhardt J., Zickgraf F.M., Espinosa O., Schlesner M., Jiang X., Kopp-Schneider A., Neuhaus P., Bahra M., Sinn B.V., Eils R., Giese N.A., Hackert T., Strobel O., Werner J., Büchler M.W., Weichert W., Trumpp A., Sprick M.R.: CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Med*. 2016;22(3):278-87

Odate S., Veschi V., Yan S., Lam N., Woessner R., Thiele C.J.: Inhibition of *STAT3* with the Generation 2.5 Antisense Oligonucleotide, AZD9150, Decreases Neuroblastoma Tumorigenicity and Increases Chemosensitivity. *Clin Cancer Res*. 2017;23(7):1771-1784

Oguro A., Sakamoto K., Funae Y., Imaoka S.: Overexpression of CYP3A4, but not of CYP2D6, promotes hypoxic response and cell growth of Hep3B cells. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011;26(4):407-15

Orr K.E., McHugh K.: The new international neuroblastoma response criteria. *Pediatr Radiol*. 2019;49(11):1433-1440

Osanai M., Petkovich M.: Expression of the retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 limits programmed cell death. *Mol Pharmacol*. 2005;67(5):1808-17

Osanai M.: Cellular retinoic acid bioavailability in various pathologies and its therapeutic implication. *Pathol Int*. 2017;67(6):281-291

Oura K., Tadokoro T., Fujihara S., Morishita A., Chiyo T., Samukawa E., Yamana Y., Fujita K., Sakamoto T., Nomura T., Yoneyama H., Kobara H., Mori H., Iwama H., Okano K., Suzuki Y., Masaki T.: Telmisartan inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest. *Oncol Rep*. 2017;38(5):2825-2835

Panigrahy D., Kaipainen A., Greene E.R., Huang S.: Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):723-35

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

Patel K., Doddapaneni R., Chowdhury N., Boakye C.H., Behl G., Singh M.: Tumor stromal disrupting agent enhances the anticancer efficacy of docetaxel loaded PEGylated liposomes in lung cancer. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(11):1377-92

Pavez Loriè E., Chamcheu J.C., Vahlquist A., Törmä H.: Both all-trans retinoic acid and cytochrome P450 (CYP26) inhibitors affect the expression of vitamin A metabolizing enzymes and retinoid biomarkers in organotypic epidermis. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(7):475-85

Pellegrino M., Gianotti L., Cassibba S., Brizio R., Terzi A., Borretta G.: Neuroblastoma in the Elderly and SIADH: Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Med*. 2012;2012:952645

Pezzini F., Bettinetti L., Di Leva F., Bianchi M., Zoratti E., Carrozzo R., Santorelli F.M., Delledonne M., Lalowski M., Simonati A.: Transcriptomic Profiling Discloses Molecular and Cellular Events Related to Neuronal Differentiation in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(4):665-682

Piccardo A., Morana G., Puntoni M., Campora S., Sorrentino S., Zucchetta P., Ugolini M., Conte M., Cistaro A., Ferrarazzo G., Pescetto M., Lattuada M., Bottoni G., Garaventa A., Giovanella L., Lopci E.: Diagnosis, Treatment Response, and Prognosis: The Role of <sup>18</sup>F-DOPA PET/CT in Children Affected by Neuroblastoma in Comparison with <sup>123</sup>I-mIBG Scan: The First Prospective Study. *J Nucl Med*. 2020;61(3):367-374

Pinto N.R., Applebaum M.A., Volchenboum 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.: Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3008-17

Pu Z., Zhu M., Kong F.: Telmisartan prevents proliferation and promotes apoptosis of human ovarian cancer cells through upregulating PPAR $\gamma$  and downregulating MMP-9 expression. *Mol Med Rep*. 2016;13(1):555-9

Purton L.E.: Roles of retinoids and retinoic Acid receptors in the regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *PPAR Res*. 2007;2007:87934

Qiao Z., Zhang Y., Ge M., Liu S., Jiang X., Shang Z., Liu H., Cao C., Xiao H.: Cancer Cell Derived Small Extracellular Vesicles Contribute to Recipient Cell Metastasis Through Promoting HGF/c-Met Pathway. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18(8):1619-1629

Qin H., Yang S., Cai S., Ren Q., Han W., Yang W., Cheng H., Ma X., Wang H.: Clinical characteristics and risk factors of 47 cases with ruptured neuroblastoma in children. *BMC Cancer*. 2020;20(1):243

Ren S., Zeng J., Mei Y., Zhang J.Z., Yan S.F., Fei J., Chen L.: Discovery and characterization of novel, potent, and selective cytochrome P450 2J2 inhibitors. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(1):60-71

Reynolds C.P., Wang Y., Melton L.J., Einhorn P.A., Slamon D.J., Maurer B.J.: Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide. *Med Pediatr Oncol*. 2000;35(6):597-602

Rha S.E., Byun J.Y., Jung S.E., Chun H.J., Lee H.G., Lee J.M.: Neurogenic tumors in the abdomen: tumor types and imaging characteristics. *Radiographics*. 2003;23(1):29-43

Riede U.N., Werner M., 2017, *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 2. Auflage, Springer, Freiburg

Ronca F., Yee K.S., Yu V.C.: Retinoic acid confers resistance to p53-dependent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells by modulating nuclear import of p53. *J Biol Chem*. 1999;274(25):18128-34

Ross A.C., Zolfaghari R.: Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2011;31:65-87

Rossa A., Cacciavillano W., Rose A., Flores P., Chantada G., Zubizarreta P.: Neuroblastoma in patients under 18 months. Single institution experience in Argentina. *Medicina (B Aires)*. 2019;79(4):280-283

Rujkijyanont P., Photia A., Traivaree C., Monsereenusorn C., Anurathapan U., Seksarn P., Sosothikul D., Techavichit P., Sanpakit K., Phuakpet K., Wiangnon S., Chotsampancharoen T., Chainansamit S.O., Kanjanapongkul S., Meekaewkunchorn A., Hongeng S.: Clinical outcomes and prognostic factors to predict treatment response in high risk neuroblastoma patients receiving topotecan and

cyclophosphamide containing induction regimen: a prospective multicenter study. *BMC Cancer*. 2019;19(1):961

Samukawa E., Fujihara S., Oura K., Iwama H., Yamana Y., Tadokoro T., Chiyo T., Kobayashi K., Morishita A., Nakahara M., Kobara H., Mori H., Okano K., Suzuki Y., Himoto T., Masaki T.: Angiotensin receptor blocker telmisartan inhibits cell proliferation and tumor growth of cholangiocarcinoma through cell cycle arrest. *Int J Oncol*. 2017;51(6):1674-1684

Schleiermacher G., Janoueix-Lerosey I., Delattre O.: Recent insights into the biology of neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2014;135(10):2249-61

Schmeel L.C., Schmeel F.C., Kim Y., Blaum-Feder S., Endo T., Schmidt-Wolf I.G.: Flunarizine exhibits in vitro efficacy against lymphoma and multiple myeloma cells. *Anticancer Res*. 2015;35(3):1369-76

Şen S., Haciosmanoğlu E.: Comparing the Neuroprotective Effects of Telmisartan, Perindopril, and Nebivolol Against Lipopolysaccharide-Induced Injury in Neuron-Like Cells. *Cureus*. 2022;14(7):e27429

Šemeláková M., Maliničová L., Macejová M., Pristaš P.: CYP3A gene variability and cancer cells response to the treatment. *Gen Physiol Biophys*. 2021;40(1):49-59

Senda A., Mukai Y., Toda T., Hayakawa T., Yamashita M., Eliasson E., Rane A., Inotsume N.: Effects of Angiotensin II Receptor Blockers on Metabolism of Arachidonic Acid via CYP2C8. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(12):1975-9

Sharma S., Liu S., Durairaj P., Machalz D., Wolber G., Bureik M. A convenient test system for the identification of CYP4V2 inhibitors. *Mol Vis*. 2021;27:601-607

Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J., Joshi V.V., Roald B., Stram D.O., Gerbing R.B., Lukens J.N., Matthay K.K., Castleberry R.P.: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999 Jul;86(2):364-72

Shimshoni J.A., Roberts A.G., Scian M., Topletz A.R., Blankert S.A., Halpert J.R., Nelson W.L., Isoherranen N.: Stereoselective formation and metabolism of 4-hydroxy-retinoic Acid enantiomers by cytochrome p450 enzymes. *J Biol Chem*. 2012;287(50):42223-32

Shipley M.M., Mangold C.A., Szpara M.L.: Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. J Vis Exp. 2016;(108):53193

Shizu R., Abe T., Benoki S., Takahashi M., Kodama S., Miyata M., Matsuzawa A., Yoshinari K.: PXR stimulates growth factor-mediated hepatocyte proliferation by cross-talk with the FOXO transcription factor. Biochem J. 2016 Feb 1;473(3):257-66

(a) Simon T., Hero B., Faldum A., Handgretinger R., Schrappe M., Niethammer D., Berthold F.: Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. J Clin Oncol. 2004 Sep;22(17):3549-57

(b) Simon T., Spitz R., Faldum A., Hero B., Berthold F.: New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status. J Pediatr Hematol Oncol. 2004 Dec;26(12):791-6

Simon T., 2019, AWMF - S1-Leitlinie 025-008 Neuroblastom, Köln

Sonawane P., Cho H.E., Tagde A., Verlekar D., Yu A.L., Reynolds C.P., Kang M.H.: Metabolic characteristics of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) and anti-tumour activity of the 13-cis-retinoic acid metabolite 4-oxo-13-cis-retinoic acid in neuroblastoma. Br J Pharmacol. 2014;171(23):5330-44

Stevison F., Hogarth C., Tripathy S., Kent T., Isoherranen N.: Inhibition of the *all-trans* Retinoic Acid (*atRA*) Hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 Results in Dynamic, Tissue-Specific Changes in Endogenous *atRA* Signaling. Drug Metab Dispos. 2017;45(7):846-854

Suganuma R., Wang L.L., Sano H., Naranjo A., London W.B., Seeger R.C., Hogarty M.D., Gastier-Foster J.M., Look A.T., Park J.R., Maris J.M., Cohn S.L., Amann G., Beiske K., Cullinane C.J., d'Amore E.S., Gambini C., Jarzembowski J.A., Joshi V.V., Navarro S., Peuchmaur M., Shimada H.: Peripheral neuroblastic tumors with genotype-phenotype discordance: a report from the Children's Oncology Group and the International Neuroblastoma Pathology Committee. Pediatr Blood Cancer. 2013;60(3):363-70

Swift C.C., Eklund M.J., Kravaka J.M., Alazraki A.L.: Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma. Radiographics. 2018;38(2):566-580

Taghizadehghalehjoughi A., Sezen S., Hacimuftuoglu A., Güllüce M.: Vincristine combination with Ca<sup>+2</sup> channel blocker increase antitumor effects. *Mol Biol Rep.* 2019;46(2):2523-2528

Tebbens J.D., Azar M., Friedmann E., Lanzendörfer M., Pávek P.: Mathematical Models in the Description of Pregnane X Receptor (PXR)-Regulated Cytochrome P450 Enzyme Induction. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1785

Teppola H., Sarkanen J.R., Jalonen T.O., Linne M.L.: Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem Res.* 2016;41(4):731-47

Teshiba R., Kawano S., Wang L.L., He L., Naranjo A., London W.B., Seeger R.C., Gastier-Foster J.M., Look A.T., Hogarty M.D., Cohn S.L., Maris J.M., Park J.R., Shimada H.: Age-dependent prognostic effect by Mitosis-Karyorrhexis Index in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol.* 2014;17(6):441-9.

Thummel K.E., Brimer C., Yasuda K., Thottassery J., Senn T., Lin Y., Ishizuka H., Kharasch E., Schuetz J., Schuetz E.: Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>. *Mol Pharmacol.* 2001;60(6):1399-406

To K.K., Tomlinson B.: Targeting the ABCG2-overexpressing multidrug resistant (MDR) cancer cells by PPAR $\gamma$  agonists. *Br J Pharmacol.* 2013;170(5):1137-51

Tonini G.P., Capasso M.: Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2020 Mar;39(1):275-285.

Topletz A.R., Thatcher J.E., Zelter A., Lutz J.D., Tay S., Nelson W.L., Isoherranen N.: Comparison of the function and expression of CYP26A1 and CYP26B1, the two retinoic acid hydroxylases. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(1):149-63

Topletz A.R., Zhong G., Isoherranen N.: Scaling in vitro activity of CYP3A7 suggests human fetal livers do not clear retinoic acid entering from maternal circulation. *Sci Rep.* 2019;9(1):4620

Tresnanda R.I., Pramod S.V., Safriadi F.: Ketoconazole for the Treatment of Docetaxel-Naïve Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC): A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021;22(10):3101-3107



Voss S.D.: Functional and anatomical imaging in pediatric oncology: which is best for which tumors. *Pediatr Radiol.* 2019;49(11):1534-1544

Waetzig V., Haeusgen W., Andres C., Frehse S., Reinecke K., Bruckmueller H., Boehm R., Herdegen T., Cascorbi I.: Retinoic acid-induced survival effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Cell Biochem.* 2019;120(4):5974-5986

Wang R., Karpinski E., Wu L.Y., Pang P.K.: Flunarizine selectively blocks transient calcium channel currents in N1E-115 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 ;254(3):1006-11

Wang K., Chen S., Xie W., Wan Y.J.: Retinoids induce cytochrome P450 3A4 through RXR/VDR-mediated pathway. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(11):2204-13

Wang T., Ma X., Krausz K.W., Idle J.R., Gonzalez F.J.: Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(2):674-84

Werk A.N., Cascorbi I.: Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(3):340-8

Yang T., Wang D., Qu Y., Wang Y., Feng Y., Yang Y., Luo Q., Sun X., Yu G., He J., Sun Z., Zhu Y.: N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamidine attenuates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of microRNAs. *J Integr Neurosci.* 2020;19(2):303-311

Yasuda M., Kishimoto S., Amano M., Fukushima S.: Comparison of Pregnane X Receptor Antagonists for Enhancing the Antitumor Effect of Cisplatin. *Anticancer Res.* 2019;39(9):4749-4755

Yi E.S., Son M.H., Hyun J.K., Cho H.W., Ju H.Y., Lee J.W., Yoo K.H., Sung K.W., Koo H.H.: Predictors of survival in patients with high-risk neuroblastoma who failed tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67(2):e28066

Zanger U.M., Schwab M.: Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138(1):103-41

Zhang S., Wang Y.: Telmisartan inhibits NSCLC A549 cell proliferation and migration by regulating the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett.* 2018;15(4):5859-5864

Zheng Z.Y., Li J., Li F., Zhu Y., Cui K., Wong S.T., Chang E.C., Liao Y.H.: Induction of N-Ras degradation by flunarizine-mediated autophagy. *Sci Rep.* 2018;8(1):16932

Zolfaghari R., Mattie F.J., Wei C.H., Chisholm D.R., Whiting A., Ross A.C.: CYP26A1 gene promoter is a useful tool for reporting RAR-mediated retinoid activity. *Anal Biochem.* 2019;577:98-109

## 8 Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnummer	Abbildungstitel	Seitenzahl
Abbildung 1.1	Entwicklung der Neuralleistenzellen; aus Kholodenko et al. (2018)	3
Abbildung 1.2	Histologisches Bild eines Neuroblastom; aus Gürtl-Lackner et al. (2017)	5
Abbildung 1.3	Metabolisierung von Vitamin A (Retinol), frei erstellt nach Handberg-Thorsager et al. (2018)	12
Abbildung 1.4	Chemische Strukturen der Retinsäure, aus Idres et al. (2002)	12
Abbildung 4.1.1	Ausgangssituation als Vergleich zwischen Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	52
Abbildung 4.1.2	Behandlungseffekte durch 5 $\mu$ M Retinsäure (RA)	53
Abbildung 4.1.3	Langzeitviabilität nach Retinsäure-Behandlung	54
Abbildung 4.1.4	Expressionsdaten von ausgewählten Cytochrom-P450-Enzymen (CYPs) im Vergleich beider Zelllinien	55
Abbildung 4.1.5	Expressionsdaten der ausgewählten Cytochrom-P450-Enzyme (CYPs); Vergleich von unbehandelten und Retinsäure-behandelten Zellen	56
Abbildung 4.2.1	Expression von CYP26A1 und CYP26B1 in unbehandelten und Retinsäure-behandelten Kelly- bzw. SH-SY5Y-Zellen	57
Abbildung 4.2.2	Expression und Proteinmengen von CYP26A1 und CYP26B1 in Kelly-Zellen	58
Abbildung 4.2.3	Expression und Proteinmengen von CYP26A1 und CYP26B1 in SH-SY5Y-Zellen	59
Abbildung 4.2.4	Inhibition von CYP26A1 und CYP26B1 mit Liarozol und Talarozol in Kelly-Zellen	60
Abbildung 4.2.5	Inhibition von CYP26A1 und CYP26B1 mit Liarozol und Talarozol in SH-SY5Y-Zellen	61
Abbildung 4.2.6	Effekte der Talarozol-Behandlung in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	62
Abbildung 4.2.7	Expression und Proteinmengen von CYP3A5 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	64
Abbildung 4.2.8	Effekt einer CYP3A5-Inhibition durch Cobicistat	65
Abbildung 4.2.9	Effekt einer CYP3A5-Induktion und -Inhibition in Kombination mit Fenretinid	66

Abbildung 4.2.10	Kombinierte Inhibition von CYP26-Enzymen und CYP3A5 mit Talarozol und Cobicistat	67
Abbildung 4.2.11	Inhibition von PXR mit SPA70	68
Abbildung 4.2.12	Kombinierte Hemmung von CYP26-Enzymen und PXR mit Talarozol und SPA70	69
Abbildung 4.2.13	Effekte von Ketoconazol in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	71
Abbildung 4.2.14	Effekte von Ketoconazol auf die Expression von CYP26A1, CYP26B1 und CRABP2	72
Abbildung 4.2.15	Kombinierte Gabe von Ketoconazol und Fenretinid	73
Abbildung 4.2.16	Zytotoxizität und Induktion der Apoptose durch Ketoconazol	75
Abbildung 4.2.17	Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Ketoconazol	76
Abbildung 4.2.18	Proliferationsrate (BrdU-Einbau) nach Inkubation mit Ketoconazol	77
Abbildung 4.2.19	Langzeitviabilität nach Inkubation mit Ketoconazol in Kelly-Zellen	78
Abbildung 4.2.20	Langzeitviabilität nach Inkubation mit Ketoconazol in SH-SY5Y-Zellen	78
Abbildung 4.2.21	Freisetzung von IGF2 und HGF nach Inkubation mit Ketoconazol	80
Abbildung 4.2.22	Effekte nach Inkubation von Ketoconazol ohne Serum	81
Abbildung 4.2.23	Langzeitviabilität nach Inkubation ohne Serum und mit Ketoconazol in Kelly-Zellen	82
Abbildung 4.2.24	Langzeitviabilität nach Inkubation ohne Serum und mit Ketoconazol in SH-SY5Y-Zellen	83
Abbildung 4.2.25	Kombinierte Gabe von Ketoconazol und Tepotinib	84
Abbildung 4.3.1	Expression und Proteinmengen von CYP2J2 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	85
Abbildung 4.3.2	CYP2J2-Inhibition durch Flunarizin oder Telmisartan in Kelly-Zellen	87
Abbildung 4.3.3	CYP2J2-Inhibition durch Flunarizin oder Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen	88
Abbildung 4.3.4	Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Flunarizin oder Telmisartan in Kelly-Zellen	89
Abbildung 4.3.5	Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Flunarizin oder Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen	90

Abbildung 4.3.6	Calcium-Spiegel in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	91
Abbildung 4.3.7	Effekt des Calcium-Chelators BAPTA-AM zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen	92
Abbildung 4.3.8	Effekt des Calcium-Chelators BAPTA-AM zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen	94
Abbildung 4.3.9	Calcium-Kanal-Blockade mit Verapamil zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen	95
Abbildung 4.3.10	Calcium-Kanal-Blockade mit Verapamil zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen	96
Abbildung 4.3.11	Natriumkanalblockade mit Lidocain zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen	97
Abbildung 4.3.12	Natriumkanalblockade mit Lidocain zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen	98
Abbildung 4.3.13	Autophagie-Induktion mit Rapamycin zusätzlich zu Telmisartan in Kelly-Zellen	100
Abbildung 4.3.14	Autophagie-Induktion mit Rapamycin zusätzlich zu Telmisartan in SH-SY5Y-Zellen	101
Abbildung 4.3.15	Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit Flunarizin, Telmisartan und Rapamycin in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	102
Abbildung 4.3.16	Expression und Proteinmengen von CYP4V2 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	103
Abbildung 4.3.17	CYP4V2-Inhibition durch HET-0016 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	104
Abbildung 4.3.18	Western Blots zur Kinase-Aktivität nach Behandlung mit HET-0016 in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	105
Abbildung 4.3.19	Kombinierte Gabe von HET-0016 und Flunarizin oder Telmisartan in Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	106

## Tabellenverzeichnis

Tabellennummer	Tabellentitel	Seitenzahl
Tabelle 1.1	Differenzierungsgrad des Neuroblastoms; frei erstellt und übersetzt nach Hughes Klassifikation (Shimada et al.)	3
Tabelle 1.2	Prognose des Neuroblastoms; frei erstellt und übersetzt nach Shimada et al. (1999)	5
Tabelle 1.3	Definition der INSS (International Neuroblastoma Staging System) und der INRG (International Neuroblastoma Risk Group) anhand der Tumorstadien beim Neuroblastom nach Brisse et al. (2011); Lanza et al. (2019)	7
Tabelle 1.4	Risikoeinteilung des Neuroblastoms	9
Tabelle 1.5	Substrate der zugehörigen CYP-Gruppen	16
Tabelle 2.1	Verwendete Materialien und Geräte mit den Herstellern	24
Tabelle 2.2	Verwendete Chemikalien mit den Herstellern	26
Tabelle 2.3	Verwendete Kits mit den Herstellern	27
Tabelle 2.4	Verwendete Taq-Man Assays mit den Katalognummern	28
Tabelle 2.5	Verwendete Antikörper für Western Blots	28
Tabelle 2.6	Verwendete Softwares und Webseiten	29
Tabelle 3.1	Zellzahl der Neuroblastomzellen je nach Versuch	30
Tabelle 3.1.1	Zusammensetzung der Nährmedien für Kelly- und SH-SY5Y-Zellen	31
Tabelle 3.1.2	Stimulation der Kelly- und SH-SY5Y-Zellen mit unterschiedlichen Substanzen	32
Tabelle 3.1.3	Substanzen des Cell Proliferation ELISA/ BrdU Assays	34
Tabelle 3.1.4	Reagenzien der ELISA-Assays für HGF und IGF2	35
Tabelle 3.1.5	Reagenzien des Fluo-4 NW Calcium Assay Kits	36
Tabelle 3.2.1	Zusammensetzung des zweifachen DLB-Lysispuffers	38
Tabelle 3.2.2	Zusammensetzung des <i>Chaps Cell Extract Buffers</i>	39
Tabelle 3.2.3	Ergänzende Reagenzien zum <i>Chaps Cell Extract Buffer</i>	39
Tabelle 3.2.4	Zusammensetzung des Sammelgels (insgesamt 6 ml)	41
Tabelle 3.2.5	Zusammensetzung des Trenngels (insgesamt 10 ml)	42
Tabelle 3.2.6	Zusammensetzung des 10X Elektrophoresepuffers	42
Tabelle 3.2.7	Zusammensetzung des fünffachen <i>sample buffers</i>	42
Tabelle 3.2.8	Zusammenstellung der Pufferlösungen für die Western Blots	44
Tabelle 3.2.9	Zusammenstellung der Pufferlösung für Tank Blot-Puffer	45

Tabelle 3.2.10	Zusammenstellung der Inkubationslösungen TBS/ TTBS	45
Tabelle 3.3.1	Chemikalien und Materialien aus dem E.Z.N.A Total RNA Kit I	46
Tabelle 3.3.2	Zusammensetzung des High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	47
Tabelle 3.3.3	Programm im Thermocycler für High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	48
Tabelle 3.3.4	Komponenten der q-RT-PCR mittels TaqMan-Assays	48
Tabelle 3.3.5	Reagenzien des GeneChip™ WT Plus Reagent Kit	49

## 9 Veröffentlichungen

In folgenden Veröffentlichungen erfolgten die Präsentationen von einigen Daten dieser Arbeit:

- Reema Sami Issa, Meike Kaehler, Nina Sophie Pommert, Ingolf Cascorbi and Vicki Waetzig: Enhancing Retinoic Acid-mediated Effects Through Inhibition of CYP26A1, CYP26B1 and HGF Signaling in Neuroblastoma Cells, UKSH Kiel, Institute of Experimental and Clinical Pharmacology, Kiel, Germany, Paper, Anticancer Research 44, 16. August 2024
- Sami Issa, R., Kaehler M., Pommert, S., Cascorbi, I., Waetzig, V.: Dissecting pleiotropic effects of ketoconazole to identify specific targets in neuroblastoma, UKSH Kiel, Institute of Experimental and Clinical Pharmacology, Kiel, Germany, Posterveröffentlichung, 88th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), 07.03.2022 – 10.03.2022
- Nanke Murra, Nina Sophie Pommert, Berit Schmidt, Reema Sami Issa, Meike Kaehler, Henrike Bruckmueller, Vera Tim, Ingolf Cascorbi and Vicki Waetzig: Regulation and function of CCL2 and N-Myc in retinoic acid-treated neuroblastoma cells, UKSH Kiel, Institute of Experimental and Clinical Pharmacology, Kiel, Germany, Papereinreichung, Cancer Genomics & Proteomics, 9. Oktober 2024



## 10 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi bedanken, der mir nicht nur den Arbeitsplatz, sondern auch die finanziellen Mittel zur Verfügung gestellt hat, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau PD Dr. rer. nat. Vicki Wätzig, für ihre großartige Unterstützung und Anleitung während meiner gesamten Promotionszeit. Mit ihrer fachlichen Expertise, ihrem wertvollen Feedback und ihrem Vertrauen hat sie mich nicht nur wissenschaftlich gefördert, sondern mir auch immer wieder Mut gemacht, wenn die Herausforderungen groß waren. Ihre Geduld, ihr Engagement und ihre zuverlässige Erreichbarkeit haben mir enorm geholfen und ich bin sehr dankbar, dass ich von ihr zweifelsfrei so viel lernen durfte.

Ein großes Dankeschön gilt auch dem gesamten Team des Pharmakologischen Institutes. Insbesondere danke ich Irina Naujoks, Annika Mütze, Anna Jürgensen und Britta Wolf, deren fachlicher Austausch, freundliche Unterstützung und herzliche Zusammenarbeit diese Zeit lehrreich und angenehm gestaltet haben.

Ich möchte mich bei meiner Familie und meinen Freunden herzlich bedanken. In den herausforderndsten und stressigsten Momenten wart ihr immer für mich da und habt mir Rückhalt gegeben. Eure unerschütterliche Geduld, euer tiefes Verständnis und die liebevollen Worte haben mir Kraft geschenkt, damit ich diese Doktorarbeit durchführen konnte. Meinen Eltern danke ich besonders dafür, dass sie mir das Medizinstudium und meinen Werdegang als Ärztin ermöglicht haben.

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:

„Die Rolle von Cytochrom-P450-Enzymen für das Überleben und die Differenzierung in Retinsäure-behandelten Neuroblastomzellen“

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende medizinische Doktorarbeit eigenständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche wörtlich oder inhaltlich übernommenen Passagen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere zudem, dass ich diese Arbeit ausschließlich im Rahmen dieses Promotionsverfahrens eingereicht habe und dass keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren diesem Verfahren vorausgegangen sind.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift