Wirkung von Nifurtimox in der Behandlung des Neuroblastoms *in vitro*

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Karin Melanie Cabanillas Stanchi geb. Rohrer
aus Böblingen

Tübingen
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	20.12.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	PD Dr. Ursula Holzer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Stevanovic

Für MECCS.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3

Abbildungsverzeichnis 7

Tabellenverzeichnis 9

Formelverzeichnis 10

Abkürzungsverzeichnis 11

I Einleitung 14

I.1 Hintergrund und Relevanz der Arbeit 14

I.2 Definitionen und Grundlagen 15

I.2.1 Neuroblastom 15

I.2.1.1 Definition 15

I.2.1.2 Epidemiologie 16

I.2.1.3 Ätiologie und Pathogenese 16

I.2.1.4 Genetik, Epigenetik und Molekularbiologie 18

I.2.1.5 Diagnostik und Stadieneinteilung 22

I.2.1.6 Therapie und Prognose 24

I.2.2 Oxidativer Stress 25

I.2.2.1 Definition 25

I.2.2.2 Zellschutzmechanismen gegen oxidativen Stress 26

I.2.2.3 Oxidativer Stress und Krebs – Ursache und Therapiemöglichkeiten 28

I.2.3 Nifurtimox 29

I.2.3.1 Allgemeines 29

I.2.3.2 Wirkmechanismus 30

I.2.3.3 Klinischer Einsatz von Nifurtimox in der Neuroblastom-Therapie 31

I.2.4 Hitzeschockproteine 32

I.2.4.1 Definition 32

I.2.4.2 Allgemeines 32

I.2.4.3 HSP in malignen Erkrankungen 33
I.2.4.4 HSP70-Inhibition durch Pifithrin-μ 34
I.2.4.5 HSP90-Inhibition durch 17-DMAG 35
I.2.5 Glykolyse, Oxidative Phosphorylierung und der Warburg-Stoffwechsel 36
I.2.5.1 Glykolyse 36
I.2.5.2 Oxidative Posphorylierung 37
I.2.5.3 Aerobe Glykolyse oder der Warburg-Effekt 38
I.2.6 Hedgehog-Signalweg 40
I.2.7 Posaconazol 42
I.3 Wissenschaftliche Zielsetzung 42
II Material und Methoden 44
II.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Antikörper, Bedarfsmittel und Geräte 44
II.2 Verwendete Zelllinien 48
II.2.1 Zelllinie SK-N-SH 49
II.2.2 Zelllinie IMR-32 50
II.2.3 Zelllinie LA-N-1 51
II.2.4 Zelllinie LS 52
II.3 Zellkultur 53
II.4 Bestimmung des Zellwachstums von LS 54
II.5 Inkubation mit Test-Reagenzien 54
II.6 MTT-Vitalitäts-Assay 55
II.7 Differenzierung von Apoptose und Nekrose 56
II.8 Untersuchung des Zellzyklus 56
II.9 Reaktive Sauerstoffspezies – DCF-Assay 56
II.10 Glykolyse-Assay 57
II.11 Western Blot 58
II.11.1 Zelllyse Western Blot 58
II.11.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay 59
II.11.3 Gelelektrophorese – SDS-PAGE 59

II.11.4 Semi-dry-Blot 60
II.11.5 Coomassie-Färbung 60
II.11.6 Immundetektion 60
II.12 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCT) 61
II.12.1 Human Cancer Pathway Finder ArrayTM und Human Heat Shock Proteins and Chaperones Array 62
II.13 Statistische Auswertung 68
III Ergebnisse 70
III.1 Verdopplungszeit der Zelllinie LS 70
III.2 Zytotoxizität 70
III.2.1 Behandlung mit Nifurtimox 70
III.2.2 Kombination von Nifurtimox mit Topotecan 74
III.2.3 Behandlung mit Hsp-Inhibitoren 75
III.2.4 Behandlung mit dem SOD1-Inhibitor TETD mit und ohne Nifurtimox 80
III.2.5 Behandlung mit anderen strukturverwandten Verbindungen 82
III.3 Apoptose und Nekrose nach der Behandlung mit Nifurtimox 85
III.4 Zellzyklusarrest nach der Behandlung mit Nifurtimox 87
III.5 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) 89
III.6 mRNA-Expressionsprofil – quantitative Real Time PCR 91
III.7 Protein-Expression – Western Blot 101
III.8 Glucose-Verbrauch, Laktat-Produktion und LDH-Aktivität 105
IV Diskussion 109
IV.1 Nifurtimox 109
IV.1.1 Nifurtimox induziert Zellyzyklus-Arrest und Apoptose 109
IV.1.1 Nifurtimox reduziert die Expression von MYCN 113
IV.1.2 Nifurtimox reduziert den „Warburg-Effekt“ 113
IV.1.3 Kombinationen mit Nifurtimox 120
IV.1.4 Hedgehog-Signalweg 124
IV.1.5 HSP und Cancer Pathway Finder 125

IV.2 Posaconazol 129

V Zusammenfassung 132

VI Literaturverzeichnis 134

VII Veröffentlichungen 164

VII.1 Beiträge in Fachzeitschriften 164

VII.2 Kongressbeiträge 166

Danksagung 167

Lebenslauf 170

Eidesstattliche Versicherung 171

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Nifurtimox 29
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glykolyse. Modifiziert nach (Berg et al., 2015).36
Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von SK-N-SH 50
Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von IMR-32. 51
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme von LA-N-1. 52
Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme von LS. 53
Abbildung 7: Wachstumskurve von Zellen der Linie LS 70
Abbildung 8: Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden. 72
Abbildung 9: Behandlung mit Nifurtimox über 96 Stunden. 73
Abbildung 10: Kombinierte Behandlung mit Topotecan und Nifurtimox über 48 Stunden. ... 75
Abbildung 11: Behandlung mit den Hsp70- und Hsp90-Inhibitoren Pifithrin-μ und 17-DMAG über 24 Stunden. 76
Abbildung 12: Behandlung mit dem Hsp90-Inhibitor 17-DMAG und Nifurtimox über 24 Stunden 78
Abbildung 13: Kombinierte Behandlung mit Nifurtimox und Pifithrin-μ über 96 Stunden. ... 79
Abbildung 14: Behandlung mit dem SOD1-Inhibitor TETD über 24 Stunden. 81
Abbildung 15: Strukturformeln verschiedener Struktur-Analoga. 83
Abbildung 16: Behandlung mit verschiedenen heterozyklischen Verbindungen über 24 Stunden. 84
Abbildung 17: Behandlung mit Posaconazol über 24 Stunden. 84
Abbildung 18: Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden. ... 86
Abbildung 19: Zellzyklusarrest nach der Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden. 88
Abbildung 20: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung mit Nifurtimox und TETD über 24 Stunden. 90
Abbildung 21: mRNA-Expression Hsp70, Hsp90 und MIF nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden. 93
Abbildung 22. mRNA-Expression von Hsp70 und Hsp90 nach Behandlung mit Nifurtimox, TETD, 17-DMAG und Pifithrin-μ über 24 Stunden. 94
Abbildung 23. mRNA-Expression von MYCN nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden. Teile der Ergebnisse gezeigt in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). 95
Abbildung 24. mRNA-Expression ausgewählter Hedgehog-Proteine nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden. 96
Abbildung 25: mRNA-Expression ausgewählter Hedgehog-Proteine nach Behandlung mit Posaconazol über 24 Stunden. 97

Abbildung 26: mRNA Expressions-Profil nach Nifurtimox-Behandlung mit Hilfe des Human Cancer Pathway Finder Array (Qiagen). 98
Abbildung 27: mRNA Expressions-Profil nach Nifurtimox-Behandlung mit Hilfe des Human Heat Shock Proteins & Chaperones Array (Qiagen). 100
Abbildung 28: Western Blot von Hsp70, Hsp90 und MIF nach Nifurtimox-Behandlung. ... 102
Abbildung 29: Western Blot von PDH und phospho-PDH nach Nifurtimox-Behandlung. .. 104
Abbildung 30: Glucose-Verbrauch und Laktat-Bildung nach Behandlung mit Nifurtimox.. 106
Abbildung 31: LDH-Aktivität nach Nifurtimox-Behandlung. 107
Abbildung 32: Vorgeschlagener Mechanismus der Auswirkung von Nifurtimox auf den Zellstoffwechsel. 119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS (modifiziert nach (Sitzmann und Bartmann, 2002)..... 23
Tabelle 2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INPC (modifiziert nach (Maris, 2005a)). 23
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien 44
Tabelle 4: Verwendete Antikörper..... 45
Tabelle 5: Verwendete Primer. 46
Tabelle 6: Verwendete Bedarfsmittel und Geräte..... 46
Tabelle 7: Charakteristika der verwendeten Zelllinien. k.A. – keine Angabe. Modifiziert nach (Tumilowicz et al., 1970)(Seeger et al., 1977)(Rudolph et al., 1991)(Biedler et al., 1973)(Rostomily et al., 1997)(Kato et al., 1989)(Thiele, 1998)..... 49
Tabelle 8: Verwendete Western-Blot-Antikörper. 60
Tabelle 9: Primersequenz der verwendeten qRT-PCR Primer..... 62
Tabelle 10: Übersicht der mittels qRT-PCR analysierten Gene mit Hilfe des Human Cancer Pathway Finder Array (Qiagen). 63
Tabelle 11: Übersicht der mittels qRT-PCR analysierten Gene mit Hilfe des Human Heat Shock Proteins & Chaperones Array (Qiagen). 65
Tabelle 12: Übersicht der Messergebnisse zur Zellvitalität nach 24-stündiger Behandlung mit Pifithrin-μ und 17-DMAG. 77
Tabelle 13: Übersicht der statistisch signifikanten und relevanten Ergebnisse des Human Cancer Pathway Finder PCR Arrays. 99
Tabelle 14: Übersicht der statistisch signifikanten und relevanten Ergebnisse des Human Heat Shock Proteins and Chaperones PCR Arrays. 100
Tabelle 15: Glucose-Verbrauch und Laktat-Bildung nach Behandlung mit Nifurtimox. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA. 106

Formelverzeichnis

Formel 1: Dismutation von Superoxidradikalanion zu Wasserstoffperoxid durch die SOD. .. 26
Formel 2: Entgiftung von Wasserstoffperoxid zu Wasser durch die Catalase. 27
Formel 3: Schematischer Wirkmechanismus von Nifurtimox; modifiziert nach (Boiani et al., 2010, Cerecetto und Gonzalez, 2011). 31

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta G^{0'}$	Änderung der molaren freien Standardenthalpie bei biochemischen Standardbedingungen und pH 7
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALDH	Acetaldehyd-Dehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
CGNP	cerebellar granule neuron precursor
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRD	Cystein-reiche Domäne
CYP51A1	Cytochrom P450 Monooxygenase 51A1
DCA	Dichloracetat
DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
dH_2O	demineralisiertes Wasser, durchschnittlicher Widerstand ca. 3 MW·cm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
E_0'	Reduktionspotential bei Standardbedingungen und pH7
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescent-activated cell sorting, durchflusszytometrisches Verfahren
FCS	fetal calf Serum, fetales Kälberserum
GLI1	Gen: Glioma-associated oncogene homologue 1
Gli1	Protein: Glioma-associated oncogene homologue 1
GLI2	Gen: Glioma-associated oncogene homologue 2
Gli2	Protein: Glioma-associated oncogene homologue 2
GLI3	Gen: Glioma-associated oncogene homologue 3
Gli3	Protein: Glioma-associated oncogene homologue 3
GLUT1	Glucose-Transporter 1
HDL	high-density lipoproteins
HIF-1α	hypoxia-inducible factor 1 α
HK2	Hexokinase 2
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSP	Hitzeschockprotein(e)
HSP10	Hitzeschockproteine der 10 kDa Familie
HSP27	Hitzeschockproteine der 27 kDa Familie

HSP40	Hitzeschockproteine der 40 kDa Familie
HSP70	Hitzeschockproteine der 70 kDa Familie
HSP90	Hitzeschockproteine der 90 kDa Familie
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
kDa	Kilo-Dalton
kJ	Kilo-Joule
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	low-density lipoproteins
log P_{OW}	dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
mA	Milli-Ampère
Max	Myc-associated factor X
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
mg	Mikrogramm
mg	Milligram
mIBG	Meta-iodobenzylguanidin
MIF	makrophage inhibitory factor
mL	Mikroliter
mL	Milliliter
mol	Stoffmenge; 1 mol = $6{,}022 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolylblau
MYCN	Gen: v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
nm	Nanometer
N-Myc	Protein: v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
NSE	neuronspezifische Enolase
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, p-Wert
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco
PBST	PBS mit 0,1% Tween® 20
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDK	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
PGK1	Phosphoglycerat-Kinase1

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phospho-Inositid-3-Kinase
PKB	Protein-Kinase B
PTCH1	Gen: Patched 1
Ptch1	Protein: Patched 1
PTCH2	Gen: Patched 2
Ptch2	Protein: Patched 2
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel-electrophoresis, Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Shh	Protein: Sonic Hedgehog
SHH	Gen: Sonic Hedgehog
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Smo	Protein: Smoothened
SMO	Gen: Smoothened
SOD	Superoxiddismutase
SUFU	Gen: Suppressor of fused homologue
Sufu	Protein: Suppressor of fused homologue
T/E	Trypsin-Lösung mit EDTA, Trypsin/EDTA
TETD	Tetraethylthiuramdisulfid
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low-density lipoproteins

I Einleitung

I.1 Hintergrund und Relevanz der Arbeit

Die Arbeitsgruppe um Giselle Saulnier Sholler von der Universität Vermont veröffentlichte 2006 einen Fallbericht über eine 5-jährige Patientin mit einem abdominalen Neuroblastom mit MYCN-Amplifikation (MYCN: Kurzform für *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)*), sowie bereits Metastasen in Lymphknoten, Knochen und Knochenmark. Trotz intensiver chemotherapeutischer und chirurgischer Intervention zeigte sich ein progressiver Verlauf, sodass entschieden wurde, lediglich palliativ chemotherapeutisch weiter zu behandeln. Zu diesem Zeitpunkt wurde festgestellt, dass sich die Patientin über eine Bluttransfusion mit dem in den USA höchst selten vorkommenden Parasiten *Trypanosoma cruzi* infiziert hatte. Die Patientin wurde daraufhin mit dem Anti-Protozoikum Nifurtimox behandelt. Überraschenderweise zeigten sich bald darauf eine Remission des Tumors sowie ein negativer Befund im Knochenmark. Nach etwa einem Jahr Kombinationstherapie mit Nifurtimox, Topotecan und Cyclophosphamid konnten in der Patientin keine Neuroblastom-Zellen mehr nachgewiesen werden. Das kurze Zeit später auftretende Rezidiv konnte durch Wiederaufnahme der Kombinationstherapie erneut erfolgreich behandelt werden (Saulnier Sholler et al., 2006). Dieses eindrucksvolle Resultat des kombinierten Einsatzes von Nifurtimox und Hochdosis-Chemotherapie zur Behandlung eines therapieresistenten und histologisch sowie molekulargenetisch sehr ungünstigen Tumors, führte dazu, dass zunächst weitere Untersuchungen mit Nifurtimox an verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien *in vitro* durchgeführt wurden. Hierbei zeigte sich erstmals, dass Nifurtimox nicht nur zur Behandlung von Trypanosomen geeignet ist, sondern ebenfalls zytotoxische

Eigenschaften gegenüber Neuroblastom-Zellen aufweist. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Nifurtimox oxidativen Stress in Form von reaktiven Sauerstoffradikalen erzeugt und vermutlich dadurch den apoptotischen Untergang von Neuroblastom-Zellen induziert (Singh et al., 2011a). In einer Phase-I-Studie an Kindern mit therapierefraktärem Neuroblastom bzw. Rezidiv zur Dosisfindung von Nifurtimox in Kombination mit Topotecan und Cyclophosphamid konnte bislang eine maximal tolerierbare Dosis von Nifurtimox von 30 mg/kg Körpergewicht und Tag per os bestimmt werden (Saulnier Sholler et al., 2011). Aktuell wird eine Phase II Studie zur Effektivität der Behandlung von Kindern mit therapierefraktärem Neuroblastom mit Nifurtimox und Cyclophosphamid sowie Topotecan durchgeführt (Saulnier Sholler, 2008b).

Die Prognose bei Erkrankung mit einem Neuroblastom gestaltet sich in Relation zu den meisten Tumorentitäten sehr heterogen. So sind zwar sogar Spontanremissionen möglich, jedoch verbleibt die Prognose bei Erkrankung mit einem Hochrisiko-Neuroblastom mit entsprechend ungünstigen histologischen oder molekulargenetischen Eigenschaften ausgesprochen schlecht. Hier liegt die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate weiterhin bei lediglich 30% (Fuchs, 2012). Die Etablierung neuer Therapie-Strategien oder Wirkstoffe für die Kombinations-Chemotherapie ist daher von großer Bedeutung.

I.2 Definitionen und Grundlagen

I.2.1 Neuroblastom

I.2.1.1 Definition

Das Neuroblastom ist ein solider, maligner neuroektodermaler Tumor des

embryonalen, autonomen Nervensystems des Menschen und tritt vornehmlich im Kindesalter auf (Sitzmann und Bartmann, 2002).

I.2.1.2 Epidemiologie

Das Neuroblastom ist der häufigste solide, extrakranielle Tumor im Kindesalter (Maris, 2010, Fuchs, 2012). Die Inzidenzrate wird mit 8,7 bis 10,9 Erkrankungen je einer Million Kinder unter 15 Jahren und Jahr angegeben, wobei keines der Geschlechter bevorzugt betroffen ist (Spix et al., 2006, Sitzmann und Bartmann, 2002). Medianes Diagnosealter ist dabei 1,2 Jahre wobei 90% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 6 Jahre sind (Niessen und Bachert, 2001, Kaatsch und Spix, 2013). Es sind sowohl fulminante Verläufe mit exzessivem Tumorwachstum und Metastasierung aber auch spontane Remissionen mit vollständiger Ausdifferenzierung möglich. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 95% bei niedrig-malignen und 30% bei Hochrisiko-Neuroblastomen (Brodeur, 2003, Park et al., 2013, Philip et al., 1997).

I.2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Das Neuroblastom entsteht aus pluripotenten Zellen (Neuroblasten) der Neuralleiste. Neuroblasten sind naszente Nervenzellen, die sich über die Embryonalentwicklung zu sympathischen, postsynaptischen Neuronen des autonomen Nervensystems entwickeln. Die Signale zur Migration in dorsaler/ventraler oder kaudaler/kranialer Richtung ist dabei über den Hedgehog-Signalweg gesteuert (vgl. Kapitel I.2.6 Hedgehog-Signalweg). Beim Auftreten maligner Mutationen über die embryonale Entwicklung verlieren die naszenten Zellen die Fähigkeit zu Nervenzellen oder adrenalen medullären Zellen auszureifen. Die unkontrollierte Vermehrung dieser neuroektodermalen Zellen führt dann zur Bildung eines Neuroblastoms, das überall da

lokalisiert sein kann, wo sympathisches Nervengewebe vorliegt. In etwa der Hälfte der Fälle tritt der Tumor im Bereich der Nebennieren auf, wobei alle Lokalisationen im Bereich des sympathischen Nervengewebes möglich sind. Das Neuroblastom zeichnet sich durch die Heterogenität des Krankheitsverlaufes aus. Spontanremissionen oder Spontanregressionen des Tumors sind möglich und in dieser Häufigkeit einzigartig im Bereich der Tumorerkrankungen. Im Gegenzug dazu zeichnet sich das Neuroblastom vor allem durch frühzeitige Metastasierung mit Infiltrationen in vor allem Knochenmark (in etwa 80% der Fälle), Knochen, Lymphknoten, Leber, Haut und Orbita und somit auch fulminanten und therapierefraktären Verläufen aus . Die Amplifikation, also die Überexpression, des Proto-Onkogens MYCN, die etwa in 20% der diagnostizierten Fälle auftritt, ist maßgeblich wegweisend für die Prognose, Therapie und Stadieneinteilung des Neuroblastom. Durch seine tragende Rolle bei der Tumorprogression werden alle MYCN-amplifizierten Neuroblastome automatisch als Stadium IV klassifiziert (Muntau, 2009, Niessen und Bachert, 2001). Die Deletion von 1p36,2-3 und unb11q wird ebenfalls als ungünstiger prognostischer Faktor beurteilt, wobei die DNA-Hyperploidie (DNA: Desoxyribonukleinsäure) sowie die Expression von CD44, trkA und Hras als günstig beurteilt werden (Attiyeh et al., 2005, Niessen und Bachert, 2001). Exogene Ursachen für die Entstehung eines Neuroblastoms werden aktuell nicht angenommen. Über familiäre Häufungen wurde bereits Ende der 1980er Jahre berichtet, dennoch konnten lange Zeit keine eindeutigen prädisponierenden genetischen Faktoren benannt werden (Clausen et al., 1989). Im Zuge der Hochdurchsatzanalysen (Next-Generation-Sequencing) wurden seit Anfang der 2010er Jahre verschiedene genetische und epigenetische Muster in Neuroblastomen beschrieben, wodurch neue und vor allem spezifischere Therapie-Strategien formuliert

werden konnten (Clausen et al., 1989, Oldridge et al., 2015, Gomez et al., 2015, Hertwig et al., 2015, Louis und Shohet, 2015).

I.2.1.4 Genetik, Epigenetik und Molekularbiologie

Malignes Tumorgewebe entsteht grundsätzlich durch eine Transformation von gesundem Ursprungsgewebe. Das neu gebildete Gewebe (Neoplasie) weist dabei veränderte Eigenschaften gegenüber dem gesunden Gewebe auf. Dazu zählen der Verlust der ursprünglichen gewebsspezifischen Funktion, ein Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum- und Zelltod hin zu Wachstum, Gefäßneubildung (Angiogenese), grenzüberschreitendes Wachstum in umliegendes Gewebe, sowie Metastasierung. Diese veränderten Eigenschaften bedürfen stets einer Veränderung der genetischen und epigenetischen Strukturen und einem daraus resultierenden veränderten molekularbiologischen Zustand der Zelle (Wagener und Müller, 2009). Zur molekularen Phänotypisierung der Neuroblastome werden z.B. die Expressionslevel von CD44, trkA, HRAS und MYCN bestimmt.

Chromosomensatz

Zellen des menschlichen Körpers besitzen einen diploiden Chromosomensatz. Knapp über die Hälfte der untersuchten Neuroblastome weisen einen veränderten, zum Teil auch in sich inhomogenen Chromosomensatz auf. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien weisen entsprechend unterschiedlicher Ploidien auf (vgl. Kap. II.2 Verwendete Zelllinien). Hyperdiploide und fast-triploide Chromosomensätze sind häufig mit einer guten Prognose und geringen strukturellen Veränderungen der Chromosomen (Chromosomenaberrationen) assoziiert, wohingegen di- und tetraploide Chromosomensätze eher mit einer schlechteren Prognose verbunden sind (Domingo-Fernandez et al., 2013).

MYCN-Amplifikation

Mitte der 1980er Jahre wurde die klinische und prognostische Rolle des Gens MYCN und seines exprimierten Proteins N-Myc erstmals beschrieben (Brodeur et al., 1985, Brodeur et al., 1984).

MYCN ist ein sogenanntes Proto-Onkogen. Das heißt, prinzipiell liegt MYCN als natürliches Gen in der Zelle vor und unterstützt durch sein korrespondierendes Protein N-Myc die natürlichen zellulären Wachstums- und Proliferationsprozesse. Erst durch genetische Veränderungen und Amplifikationen von MYCN kommt es zu einer übermäßigen Expression des Proteins N-Myc und in der Folge zu einer krankhaft gesteigerten Rate dieser Wachstums-Prozesse. N-Myc wird in diesem Fall also zum Onkogen.

N-Myc gehört zur Familie der Myc-Proteine und ist damit in der Lage, heterodimere Komplexe mit dem DNA-bindenden Protein Max (Myc-associated Factor X) zu bilden. Diese aktiven Komplexe fungieren als Transkriptionsfaktoren einer Vielzahl von Proteinen, die essentiell bei der Steuerung der Tumor-Proliferation und -Angiogenese, sowie apoptotischer Prozesse und des Zellzyklus beteiligt sind (Brodeur et al., 1985). Eine gezielte Steuerung von MYCN bzw. N-Myc stellt somit ein attraktives Therapieziel für Behandlungsstrategien des Neuroblastoms dar.

Unklar ist bislang, wie die genetische Konstellation der MYCN-Gene mit der Expression auf mRNA-Ebene (mRNA: messenger ribonucleic acid; Boten-Ribonukleinsäure) und der Translation zum Onkoprotein N-Myc korreliert ist. So ist es möglich, dass hyperploide Zelllinien bereits mehr als 10 Chromosomen 2 aufweisen, auf denen sich das MYCN-Gen mit keiner oder niedriger Amplifikation findet, wohingegen euploide Zelllinien möglicherweise eine hohe Amplifikation des

MYCN-Gens mit mindestens 5 Kopien auf einem Chromosom aufweisen. Diese MYCN-Kopien können als Gen-Locus integriert in das Chromosom 2 (homogenous staining region), aber auch als neugebildete extrachromosomale Struktur (double minutes) im Kern vorliegen. Interessanterweise scheint eine Amplifikation von MYCN – auf welche Art und Weise auch immer – nicht zwingend eine Korrelation zur Expression auf mRNA-Ebene zu haben. Es wird sowohl von Neuroblastomen mit niedriger MYCN-Amplifikation aber hoher N-Myc-mRNA-Expression, als auch von Neuroblastomen mit hoher MYCN-Amplifikation, aber relativ niedriger N-Myc-mRNA-Expression berichtet. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass eine genomische Amplifikation von LIN28B zu einer erhöhten Protein-Expression von N-Myc führt (Stafman und Beierle, 2016). Die Veröffentlichungen in der Fachliteratur zur Regulation und Rolle von MYCN und N-Myc in Bezug auf Tumorprogression und Malignität sind widersprüchlich, wobei auch die methodische Herangehensweise und Qualitätskontrolle in der praktischen Analytik oftmals im Fokus der Kritik stehen. Es besteht weiterhin großer Aufklärungsbedarf auch in Bezug auf die Signaltransduktionswege von N-Myc und dessen Rolle als mögliches Angriffsziel in der Tumortherapie (Maris, 2005b, Brodeur et al., 1985).

Sonstige Veränderungen

Eine Amplifikation des Gens MYCN tritt in Neuroblastomen häufig in Kombination mit einer Deletion des kurzen Arms des Chromosoms 1 auf (del1p). Es wird vermutet, dass 1p für ein oder mehrere Tumorsuppressorgene codiert. Die Deletion von 1p gilt somit als ungünstiger prognostischer Faktor und tritt in etwa 30% der diagnostizierten Neuroblastome auf. Gleichermaßen wird die Codierung von Tumorsuppressorgenen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 vermutet. Eine 3p-Deletion gilt ebenso als ungünstiger prognostischer Faktor und tritt in etwa 20% der diagnostizierten Fälle auf

(Domingo-Fernandez et al., 2013).

Eine inverse Korrelation zur MYCN-Amplifikation wird für die Deletion von 11q beobachtet. So gibt es nahezu keine beobachteten Fälle von einer Kombination aus 11q-Deletion und MYCN-Amplifikation. Hingegen ist die 11q-Deletion fast immer verbunden mit dem metastasierten Stadium 4 und einer sehr schlechten Prognose (Domingo-Fernandez et al., 2013).

Neben den genannten Deletionen, ist die Insertion von 17q in etwa der Hälfte aller Neuroblastome zu finden, meist mit einer kombinierten MYCN-Amplifikation sowie einer 1p-Deletion. Der 17q-Zugewinn gilt als ungünstiger prognostischer Faktor (Domingo-Fernandez et al., 2013).

Anfang der 1990er Jahre wurden kleine etwa 20 bp (Basenpaare) große RNA-Moleküle zunächst in *C. elegans* entdeckt und später deren Rolle innerhalb des Tumor-Stoffwechsels untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Profile dieser Micro-RNA (miRNA) eine Klassifizierung verschiedener Neuroblastom-Typen und deren Risiko-Stratifizierung zulassen. Die miRNA-Moleküle sind in der Lage mit der transkribierten mRNA sequenzspezifisch zu interagieren und regulieren dadurch die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene zugunsten des Tumor-Stoffwechsels. Es konnte gezeigt werden, dass MYCN wiederum an der Regulation der miRNA beteiligt ist (Domingo-Fernandez et al., 2013).

Epigenetische Veränderungen im Sinne einer Hyper-Methylierung der DNA können zu einem sogenannten Gen-Silencing, also zur Verhinderung der Transkription verschiedener Gene führen. Dies ist insbesondere bei der Expression von Tumorsuppressorgenen oder Apoptose-Genen (z.B. Caspase-8) von Relevanz. Die

Klassifizierung verschiedener Neuroblastom-Typen kann mittlerweile durch spezifische Methylierungsmuster erfolgen (Domingo-Fernandez et al., 2013).

I.2.1.5 Diagnostik und Stadieneinteilung

Die Labordiagnostik schließt zunächst die spezifischen Katecholaminmetaboliten Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und Dopamin in Urin und Serum, sowie die neuronspezifische Enolase (NSE) ein, wobei die Abwesenheit dieser Laborparameter noch keine Neuroblastomerkrankung auszuschließen vermag. Weiterhin können die Laktatdehydrogenase sowie Ferritin im Blut unspezifisch erhöht sein. Bei über 80% der metastasierten Neuroblastome sind Metastasen im Knochenmark zu finden. Daher erfolgt bei entsprechender Indikationsstellung eine morphologische Untersuchung des Knochenmarks mit immunhistochemischer Färbung und Charakterisierung mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR). Biopsate des Tumormaterials werden histopathologisch untersucht und nach dem Grading-System nach Hughes et al. (Hughes et al., 1974) stratifiziert. Dabei erfolgen auch die molekulargenetischen Charakterisierungen von MYCN und Veränderungen am Chromosom 1p. Zur Lokalisation und Größenbestimmung von Primärtumor und Metastasen kommen bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Magnetresonanztomographie (ggf. mit Kontrastmittel) und Computertomographie zum Einsatz. Zur Darstellung von Fernmetastasen wird die ^{123}mIBG (Meta-iodobenzylguanidin)-Szintigraphie durchgeführt wobei ^{123}mIBG spezifisch in Tumorzellen mit Katecholaminrezeptoren aufgenommen wird (Hero und Berthold, 2011).

Die Stadieneinteilung erfolgt seit 1988 gemäß den Vorgaben des International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Brodeur et al., 1993, Kaneko et al., 1998, Castleberry et al., 1994) in 5 Stadien mit Unterteilung (Tab. 1).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS (modifiziert nach (Sitzmann und Bartmann, 2002)

Stadium	Befund
I	Tumor lokalisiert, makroskopisch komplett entfernt
IIa	Tumor lokalisiert, inkomplett entfernt, kein Lymphknotenbefall
IIb	Tumor lokalisiert, inkomplett entfernt, ipsilateraler Lymphknotenbefall
III	Tumor überschreitet Mittellinie, nicht resektabel, kontralateraler Lymphknotenbefall
IV	Tumor metastasiert in andere Organe und entfernte Lymphknoten
IV-S	Tumor lokalisiert, Patient <1 Jahr, Metastasen in Leber, Haut oder Knochenmark, keine Skelettmetastasen

Alternativ wird unter zusätzlicher Berücksichtigung des MYCN-Status die Risikostratifizierung nach der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) nach Shimada (Shimada et al., 1999, Shimada et al., 2001) durchgeführt (Tab. 2).

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INPC (modifiziert nach (Maris, 2005a)).

INSS Stadium	Alter	MYCN-Status	Risiko-Gruppe
1	0-21 Jahre	jeder	niedrig
2A/2B	<365 Tage	jeder	niedrig
	≥365 Tage – 21 Jahre	nicht amplifiziert	niedrig
	≥365 Tage – 21 Jahre	amplifiziert	niedrig
	≥365 Tage – 21 Jahre	amplifiziert	hoch
3	<365 Tage	nicht amplifiziert	intermediär
	<365 Tage	amplifiziert	hoch
	≥365 Tage – 21 Jahre	nicht amplifiziert	intermediär
	≥365 Tage – 21 Jahre	nicht amplifiziert	hoch
	≥365 Tage – 21 Jahre	jeder	hoch
4	<365 Tage	nicht amplifiziert	intermediär
	<365 Tage	amplifiziert	hoch
	≥365 Tage – 21 Jahre	jeder	hoch
4S	<365 Tage	nicht amplifiziert	niedrig
	<365 Tage	nicht amplifiziert	intermediär
	<365 Tage	nicht amplifiziert	intermediär
	<365 Tage	amplifiziert	hoch

I.2.1.6 Therapie und Prognose

Die Therapie erfolgt stadienabhängig und risikoadaptiert. Hochrisiko-Neuroblastome werden in der Regel im Rahmen einer neoadjuvanten Chemotherapie zunächst biopsiert und anschließend in einer Kombinations-Chemotherapie behandelt um ggf. die Tumor-Exzision zu erleichtern oder ein Down-Staging (also das Erreichen eines niedrigeren Stadiums) zu erzielen. Alternativ wird eine Hochdosis-Chemotherapie durchgeführt mit zusätzlichem Stammzell-Rescue. Hierbei werden dem Patienten vor der chemotherapeutischen Behandlung Stammzellen entnommen und nach der Chemotherapie wieder reinfundiert (autologe Stammzelltransplantation). In der Regel wird eine komplette chirurgische Tumor-Resektion angestrebt. Weiterhin gehören je nach Indikationsstellung Radiotherapie, mIBG-Therapie oder die monoklonale Antikörper-Therapie zu den möglichen Therapie-Strategien. Niedrigrisikopatienten (z.B. Stadium 4S) können dagegen beobachtet oder bei klinischer Indikation mit Chemotherapie behandelt werden. Chemotherapeutisch kommen alkylierende Substanzen (Cyclophosphamid, Dacarbazin, Ifosfamid, Melphalan), Anthrazykline (Adriamycin) oder die Kombinationstherapie mit Etoposid, Melphalan, Topotecan, Carbo- und Cisplatin sowie Vincristin oder Vindesin zum Einsatz (Fuchs, 2012).

Im Rahmen der multizentrischen NB2004-Studie wurden zwischen 2004 und 2010 über 640 Patienten mit Neuroblastom-Erkrankungen verschiedener Stadien eingeschleust. Ziel der Phase III und IV Studie ist die Bewertung der Herangehensweisen von abwartender Haltung, Kombinations-Chemotherapie, Radiotherapie oder autologer Stammzelltransplantation, abhängig von der Indikationsstellung und Risiko-Stratifizierung. Bislang sind keine Ergebnisse der Studie veröffentlicht (Stand: September 2017) (Frank, 2004).

I.2.2 Oxidativer Stress

I.2.2.1 Definition

Zur Selbstregulation des zellulären Stoffwechselgleichgewichtes (Homöostase), ist es für die Zelle essentiell, reduktive (Elektronenaufnahme) sowie oxidative (Elektronenabgabe) Prozesse im Gleichgewicht zu halten. Hierbei spricht man vom Redox-Gleichgewicht. Kommt es durch physikalische (z.B. UV-Licht) oder chemische (z.B. Pro-Oxidantien) Noxen oder durch gravierende Änderungen metabolischer Prozesse (z.B. in malignem Gewebe) zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes mit Überwiegen der oxidativen Prozesse, so spricht man von oxidativem Stress. In diesem Zustand werden von Oxidantien mehr Elektronen abgegeben, als durch die Zellinhaltsstoffe ohne relevante Schädigungen kompensiert werden können. In der Regel geschieht dies über sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS), also Sauerstoffspezies, die Träger freier radikalischer Elektronen sind. Wichtigste Vertreter der ROS stellen das Superoxidradikalanion ($\bullet O_2^-$), das Hydroxylradikal ($\bullet OH$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) dar. Diese können auf alle Zellinhaltsstoffe, wie Lipide, Proteine oder DNA aber auch auf wichtige Zellorganellen übertragen werden und damit deren Funktion einschränken, verändern oder zerstören. Bei der Lipidoxidation entstehen charakteristischerweise Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal. Die oxidative Schädigung der DNA zeigt sich in Bildung von 8-Hydroxydesoxy-Guanosin. Funktionsverluste und Fehlfaltungen von Proteinen und Enzymen nach oxidativer Schädigung werden durch die Thiol-Oxidation, Carbonylierung und Seitenketten-Oxidation verursacht (Pisoschi und Pop, 2015). Oxidativer Stress gilt daher auch als mögliche Ursache für die Entstehung von Krebs (Pisoschi und Pop, 2015, Milkovic et al., 2014, Schieber und Chandel, 2014).

I.2.2.2 Zellschutzmechanismen gegen oxidativen Stress

Um Schäden durch ROS zu verhindern oder ggf. zu reparieren stehen der Zelle verschiedene Zellschutzmechanismen zur Verfügung, die zusammenfassend als Stressantwort bezeichnet werden. Die direkte Entgiftung von ROS kann über Scavenger-Moleküle, wie Vitamin E oder Anti-Oxidantien wie Vitamin C stattfinden. Dabei werden die freien radikalischen Elektronen stabil auf diese Moleküle übertragen und die radikalische Reaktion endet ggf. auf dieser Stufe. Weiterhin behilft sich die Zelle über die verstärkte Expression von Entgiftungsenzymen, wie der Superoxid-Dismutase (SOD) oder der Catalase, die den Abbau der ROS katalysieren. Dies wird als primärer antioxidativer Schutz bezeichnet. Mit der Induktion der Expression von Reparatur-Enzymen, die die geschädigten Zellinhaltsstoffe reparieren (z.B. die Hitzeschockproteine; vgl. Kap. I.2.4 Hitzeschockproteine) steht der Zelle der sekundäre antioxidative Schutz zur Verfügung (Pisoschi und Pop, 2015).

Superoxid-Dismutase

Die Superoxid-Dismutase ist ein ubiquitär vorliegendes Enzym, das spezifisch die Entgiftung (hier: Dismutation) des Superoxid-Radikalanions $\bullet O_2^-$ an ihrem aktiven Zentrum mit Cu/Zn zu Wasserstoffperoxid H_2O_2 katalysiert:

$$Cu^{2+} + \bullet O_2^- \rightarrow Cu^+ + O_2$$

$$Cu^+ + \bullet O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow Cu^{2+} + H_2O_2$$

Formel 1: Dismutation von Superoxidradikalanion zu Wasserstoffperoxid durch die SOD.

Die Entgiftung des Wasserstoffperoxids erfolgt in einer direkt nachgeschalteten Reaktion, katalysiert durch die Catalase:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Formel 2: Entgiftung von Wasserstoffperoxid zu Wasser durch die Catalase.

Von der SOD sind bislang drei Isoformen bekannt. Die SOD1 (auch: Cu/Zn-SOD) liegt im Zytoplasma vor und enthält die Elemente Kupfer und Zink im aktiven Zentrum. Die SOD2 (Mn-SOD) ist in den Mitochondrien lokalisiert und enthält Eisen und Mangan im aktiven Zentrum. Die SOD3 (EC-SOD) ist extrazellulär und enthält ebenfalls Kupfer und Zink im aktiven Zentrum, besitzt jedoch zusätzlich ein Signal-Peptid, das die extrazelluläre Ausschüttung verursacht (Zelko et al., 2002).

Tetraethylthiuramdisulfid (TETD, auch Disulfiram; IUPAC: Bis(diethylthiocarbamoyl)-disulfid; CAS: 97-77-78; MW 296,54 g/mol), bzw. dessen reduktives Spaltprodukt N,N-Diethyldithiocarbamat, komplexiert spezifisch das aktive Zentrum der SOD1. Wird die SOD1 gehemmt, kommt es zur intrazellulären Anhäufung von ROS.

Neben der inhibitorischen Wirkung auf die SOD1, ist auch die Hemmung der Acetaldehyd-Dehydrogenase (ALDH) durch TETD bekannt. Auf Grund dieser Eigenschaft wurde TETD (Handelsname Antabus®) lange Zeit zur Sucht-Therapie von Alkoholikern verwendet. Nach Alkoholkonsum wird der aufgenommene Ethanol im menschlichen Körper zu Acetaldehyd abgebaut. Nach Hemmung der SOD1 durch TETD kumuliert der angefallene Acetaldehyd im Körper des Patienten und verursacht unter Anderem Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen. Dadurch versprach man sich die Entwicklung einer Aversion des Patienten gegenüber Alkohol. Aufgrund der möglicherweise fatalen Folgen des übermäßigen Alkoholkonsums während der Einnahme von TETD wird Antabus® zwar nicht mehr angewendet, ist aber klinisch

gut untersucht (Jorgensen et al., 2011, Jones, 1949, Hald et al., 1949).

In den 1970er Jahren konnte erstmals eine zytotoxische und wachstumshemmende Wirkung von TETD auf maligne Zellen nachgewiesen werden. Nachfolgende *in vivo*-Versuche und klinische Studien konnten diese Wirkung ebenfalls nachweisen. Zwar hatte TETD nie durchschlagenden Erfolg als Chemotherapeutikum in der onkologischen Therapie, wurde aber immer wieder diskutiert und reevaluiert für verschiedene Tumor-Entitäten (Cvek, 2011, Cvek und Dvorak, 2008, Kast und Halatsch, 2012, Kona et al., 2011, Sauna et al., 2005, Triscott et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde TETD zur spezifischen Hemmung der SOD1 in Neuroblastom-Zellen verwendet.

I.2.2.3 Oxidativer Stress und Krebs – Ursache und Therapiemöglichkeiten

Ein gewisses Maß an reaktiven Sauerstoffspezies ist wichtig für die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase und des Redox-Gleichgewichtes der Zelle (Kardeh et al., 2014). Anhaltender oxidativer Stress hingegen und die dadurch möglicherweise irreversible Schädigung oder Mutation der Erbinformation der Zelle wird als potentielle Ursache für die Entstehung von Krebs betrachtet. Umgekehrt wird jedoch auch durch die gesteigerte metabolische Aktivität maligner Zellen eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet, sodass Tumor-Zellen grundsätzlich ein höheres Basal-Level intrazellulärer ROS besitzen, als gesundes Gewebe. Die Ursache-Wirkungs-Beziehung dieser beiden Prozesse wird kontrovers diskutiert. So werden beispielsweise Antioxidantien, verabreicht als Nahrungs-Supplemente, eine prophylaktische Wirkung vor der Krebsentstehung oder eine unterstützende Wirkung bei der onkologischen Therapie zugeschrieben (Rafieian-Kopaie und Nasri, 2015, Valko et al., 2006). In sieben klinischen Studien, 16

Kohorten-, sowie 36 Fall-kontrollierten Studien konnte jedoch bislang kein derartiger Nutzen nachgewiesen werden (Patterson et al., 1997). Die Induktion von ROS in Tumor-Zellen durch sehr hohe Dosen an Antioxidantien wurde z.B. für Vitamin C, Resveratrol oder Carnosol nachgewiesen, wobei zytotoxische Effekte auf verschiedene Tumor-Entitäten beobachtet wurden (Tong et al., 2015, Putchala et al., 2013). Hingegen werden ROS im Rahmen der photodynamischen Therapie therapeutisch nutzbar gemacht. Über die Aktivierung eines Photosensitizers (z.B. Protoporphyrin IX) wird eine radikalische (Typ II) Reaktion erzeugt und durch den dabei spezifisch in malignem Gewebe entstehenden oxidativen Stress die Apoptose induziert (Ortel und Calzavara-Pinton, 2010).

I.2.3 Nifurtimox

I.2.3.1 Allgemeines

Nifurtimox (IUPAC: (*RS*)-*N*-(3-methyl-1,1-dioxo-1,4-thiazinan-4-yl)-1-(5-nitro-2-furyl)meth-animin; CAS: 23256-30-6; MW 287,3 g/mol; Handelsname: Lampit®) gehört zur Gruppe der Nitrofurane, besitzt einen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient log P_{OW} von 0,1 und ist damit extrem lipophil, also nicht in Wasser löslich.

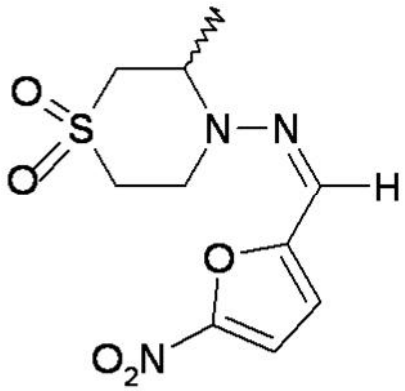
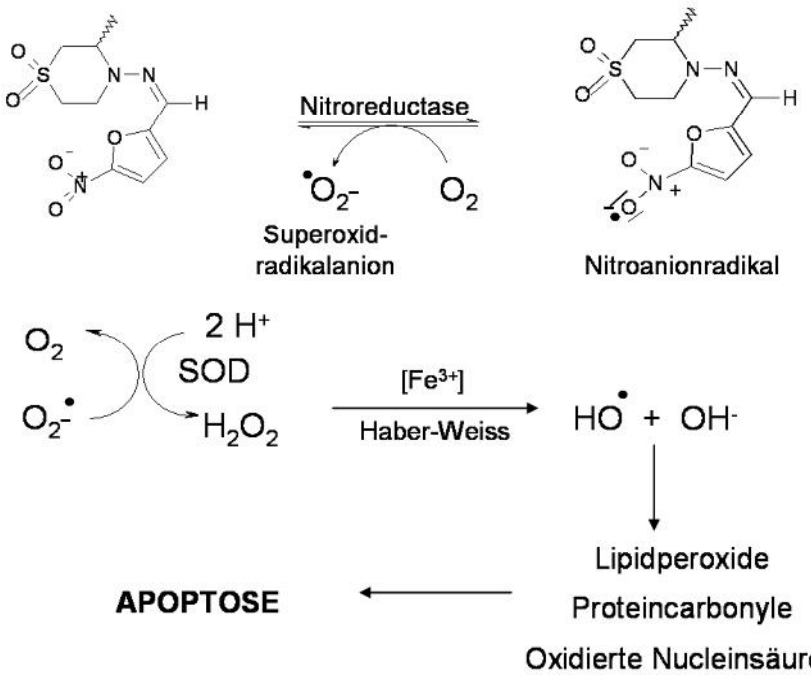


Abbildung 1: Strukturformel von Nifurtimox

Bereits 1972 wurden die toxischen Effekte von Nifurtimox auf den Parasiten *Trypanosoma cruzi in vitro* beschrieben (Gonnert und Bock, 1972). Im Jahre 1979 folgten dann erste Versuche an mit *Trypanosoma cruzi* infizierten Mäusen, wobei beobachtet wurde, dass die Parasitenlast durch Nifurtimox signifikant reduziert werden konnte (Villalta et al., 1979). Nifurtimox wurde unter dem Namen Lampit® von der Firma Bayer als erstes Medikament gegen die Chagas-Krankheit auf den Markt gebracht (Jannin und Villa, 2007).

I.2.3.2 Wirkmechanismus

Der genaue Wirkmechanismus von Nifurtimox ist nicht vollständig aufgeklärt, es wird jedoch angenommen, dass nach dessen intrazellulärer Aufnahme in den Parasiten die Nitrogruppe durch die Typ I-Nitroreduktase zum Arylradikal reduziert wird (Cerecetto und Gonzalez, 2011). Bei der Rückreaktion, also der Oxidation des Arylradikals, wird aus intrazellulärem Triplettsauerstoff hochreaktives Superoxidradikalanion gebildet, welches durch die Superoxid-Dismutase weiter zu Wasserstoffperoxid reduziert wird (Boiani et al., 2010). Formel 3 zeigt den angenommenen Wirkmechanismus von Nifurtimox in einer schematischen Darstellung.



Formel 3: Schematischer Wirkmechanismus von Nifurtimox; modifiziert nach (Boiani et al., 2010, Cerecetto und Gonzalez, 2011).

Wie bereits beschrieben (vgl. Kap. I.2.2 Oxidativer Stress) sind sowohl Superoxidradikalanion, als auch Wasserstoffperoxid in der Lage, lebenswichtige Zellbestandteile nachhaltig zu schädigen und den apoptotischen, respektive nekrotischen Zelltod zu induzieren. Die Induktion von oxidativem Stress durch Nifurtimox könnte einen neuen Ansatz zur Behandlung von Neuroblastomen darstellen. Die Bildung von ROS in Neuroblastom-Zellen durch Nifurtimox wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits nachgewiesen (Saulnier Sholler et al., 2009, Singh et al., 2011a, Singh et al., 2011b).

I.2.3.3 Klinischer Einsatz von Nifurtimox in der Neuroblastom-Therapie

In einer Phase-I-Studie an Kindern konnte gezeigt werden, dass eine Dosis von 30 mg/kg KG/d Nifurtimox gut toleriert wird und ein erfolgreiches Ansprechen des

Tumors sowohl auf Nifurtimox alleine, als auch auf die Kombination von Nifurtimox mit Chemotherapeutika stattfindet (Saulnier Sholler et al., 2011). Eine weiterführende Phase-II-Studie wird derzeit von derselben Arbeitsgruppe durchgeführt. Ziel der Studie ist es, durch die kombinierte Gabe von Nifurtimox und Cyclophosphamid sowie Topotecan die Behandlung refraktärer Neuroblastome bzw. Medulloblastome effektiv zu verbessern. Erste Ergebnisse werden Ende 2017 erwartet (Saulnier Sholler, 2008a).

I.2.4 Hitzeschockproteine

I.2.4.1 Definition

Hitzeschockproteine (HSP) sind über die Evolution hoch konservierte Proteine, die bei einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen essentiell beteiligt sind. Sie werden ihrer Größe nach bzw. ihres etwaigen Molekulargewichtes in kilo-Dalton (kDa) nach in die Familien HSP90 (90 kDa), HSP70 (70 kDa), HSP60 (60 kDa), HSP40 (40 kDa), HSP27 (27 kDa) und HSP10 (10 kDa) eingeteilt.

I.2.4.2 Allgemeines

Ein Großteil der HSP werden konstitutiv exprimiert und liegen daher in konstanter Menge in der Zelle vor. Sie unterstützen essentielle Prozesse innerhalb des Zellstoffwechsels in ihrer Funktion als sogenanntes Chaperon. Chaperone sind Proteine, die die korrekte Faltung und Synthese anderer Proteine vermitteln und damit deren Funktion erst ermöglichen. Daneben sind HSP beteiligt an Prozessen der Protein-Degradation und Rückfaltung nach Schädigung, der Protein-Sekretion und des -Transports, sowie der Regulation von Transkriptionsfaktoren und diverser Kinasen. Weiterhin übernehmen HSP Aufgaben zur Unterstützung von immunologischen Funktionen der angeborenen und der erworbenen Immunität und fungieren als Signal-

Vermittler z.B. durch Ausschüttung intrazellulärer HSP in Folge von nekrotischem Zelltod nach Infektion oder Inflammation, oder aus malignem Gewebe (Srivastava, 2002, Basu et al., 2000, Javid et al., 2007). Die ausgeschütteten HSP sind in der Lage die Zytokin-Sekretion und die Expression von kostimulatorischen Molekülen zu induzieren und die Antigen-Präsentation auf Antigen-präsentierenden Zellen zu verstärken (Asea et al., 2000, Vabulas et al., 2002, Rohrer et al., 2014). Daneben tragen insbesondere Vertreter der Familie der HSP mit einer Größe von 70 und 90 kDa (HSP70 und HSP90 Familie) zur adaptiven Immunantwort bei (Javid et al., 2007, Srivastava, 2002).

I.2.4.3 HSP in malignen Erkrankungen

In malignem Gewebe werden HSP eine besondere Rolle beigemessen. So ist bekannt, dass insbesondere HSP70 und HSP90 in entarteten Zellen verstärkt exprimiert werden. Dies wird unter anderem auf die erhöhte Stoffwechselrate zurückgeführt. Dadurch kommt es vermehrt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die die Zellinhaltsstoffe in einer radikalischen Reaktion schädigen. Als Reaktion darauf werden HSP70 und HSP90 verstärkt exprimiert, um die Reparatur oder den Abbau irreversibel geschädigter Proteine zu unterstützen, oder zur Stabilisierung einer Vielzahl von Enzymen, die bei den Prozessen der Proliferation, des Zellzyklusses, der Angiogenese oder der Apoptose beteiligt sind. Die HSP ermöglichen also die Aufrechterhaltung der zellulären Prozesse unter den pathophysiologischen Bedingungen des Tumor-Stoffwechsels (Hatziagapiou et al., 2011, Tutar, 2011, da Silva und Ramos, 2012, Lianos et al., 2015). Die Überexpression von HSP gehen einher mit einer schlechteren Prognose und höherer Therapie-Resistenz von malignen Erkrankungen. So haben die Expressions-Level der HSP sowohl Bedeutung als prognostischer Marker, aber auch als mögliches therapeutisches Ziel in der

Behandlung von Tumor-Erkrankungen erlangt (Khalil et al., 2011). Sowohl Hsp70- als auch Hsp90-Inhibitoren werden in der Fachliteratur als attraktive Therapie-Ziele in der Behandlung von soliden Tumoren und Leukämien diskutiert (Goloudina et al., 2012, Klikova et al., 2016, Kumar et al., 2016, Reikvam et al., 2014). Es wurde beobachtet, dass Hsp70 während der spezifischen Inhibition von Hsp90 einige gehemmte Prozesse kompensieren. Daher wird empfohlen, Hsp70 und Hsp90 simultan zu inhibieren (Gong et al., 2014). Hsp90-Inhibitoren wurden und werden derzeit in klinischen Studien untersucht (Patel et al., 2011, Gomez-Monterrey et al., 2012, Kummar et al., 2010, Saif et al., 2013, Do et al., 2015, Lancet et al., 2010, Yong et al., 2016). Hsp70-Inhibitoren werden derzeit noch nicht klinisch eingesetzt, sind jedoch in Tumor-Modellen *in vitro* und *in vivo* vielfach untersucht (Patury et al., 2009, Powers et al., 2010, Murphy, 2013, Budina-Kolomets et al., 2014)

I.2.4.4 Hsp70-Inhibition durch Pifithrin-μ

Pifithrin-μ (2-Phenylethynesulfonamid; CAS 64984-31-2; MW 181,21 g/mol) ist ein Sulfonamid, das spezifisch die Bindung der Hsp70-Co-Chaperone (z.B. Hsp40, Bag-1) an den Carboxyl-Terminus der Substratbindestelle von Hsp70 behindert, also die Chaperon-Funktion einschränkt. Es wurde beschrieben, dass Pifithrin-μ die Zellvitalität von Tumor-Zellen reduziert und sowohl Autophagie- als auch lysosomale Prozesse beeinflusst (Leu et al., 2009). Bei dem Vergleich von Pifithrin-μ mit anderen Hsp70-Inhibitoren (VER-155008 und MKT-077) im Hinblick auf die Zytotoxizität, Autophagie und Beeinflussung von Hsp90-Client-Proteinen, zeigte Pifithrin-μ im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren keine Bindung in oder nahe der ATP-Bindestelle, sondern an der Substratbinde-Domäne, wodurch eine ungewollte unspezifische Inhibition z.B. von Hsp90 unwahrscheinlicher wird (Budina-Kolomets et al., 2014). Aus diesem Grund wurde für die Hsp70-Inhibitions-Versuche dieser

Arbeit Pifithrin-μ verwendet.

I.2.4.5 HSP90-Inhibition durch 17-DMAG

17-DMAG (17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin; CAS: 467214-20-6; MW 616,76 g/mol) ist ein wasserlösliches und damit gut bioverfügbares Geldanamycin-Analogon, das an die ATP-Bindedomäne von HSP90 bindet. In *in vivo* und *in vitro* Studien zeigte 17-DMAG anti-angiogene Eigenschaften und eine Induktion der HSP70-Expression (Kaur et al., 2004). In einem *in vitro* Neuroblastom-Modell konnte gezeigt werden, dass 17-DMAG das Zellwachstum signifikant hemmt, einen Zellzyklusarrest verursacht und die Apoptose induziert. Insbesondere zeigten Zellen mit MYCN-Amplifikation parallel zu einer ALK (anaplastic lymphoma kinase)-Mutation eine höhere Sensitivität gegenüber der 17-DMAG-Behandlung (Yi et al., 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die 17-DMAG-Behandlung von Neuroblastom-Zellen zu einer Destabilisierung und verminderten Expression von MYCN sowie einer induzierten Expression des Tumor-Suppressors p53 führt (Regan et al., 2011). Präklinische Untersuchungen im Rahmen des Pediatric Preclinical Testing Program an Xenograft-Modellen zeigte die größte anti-tumorale Aktivität bei Rhabdomyosarkomen (Smith et al., 2008). Klinische Studien der Phase I zur Anwendung von 17-DMAG in Patienten mit malignen Erkrankungen wurden durchgeführt (Aregbe et al., 2012, Jhaveri et al., 2012, Kummar et al., 2010, Lancet et al., 2010, Pacey et al., 2011, Ramanathan et al., 2010, Shadad und Ramanathan, 2006). Auf Grund der guten klinischen Studienlage zu 17-DMAG zum Zeitpunkt der Projektplanung wurde für die HSP90-Inhibitions-Versuche 17-DMAG verwendet.

I.2.5 Glykolyse, Oxidative Phosphorylierung und der Warburg-Stoffwechsel

I.2.5.1 Glykolyse

Die Glykolyse beschreibt die Reaktion, in der Glucose in mehreren Reaktionsschritten zu Pyruvat unter Bildung von ATP und NADH umgewandelt wird (Abb. 2).

	Enzym	Metabolit	Verbrauch/Gewinn
Stufe 1		Glucose	
	Hexokinase	↓	ATP → ADP
		Glucose-6-Phosphat	
	Glucose-6-Phosphat-Isomerase	↓	
		Fructose-6-Phosphat	
	Phosphofructokinase	↓	ATP → ADP
		Fructose-1,6-Bisphosphat	
	Aldolase	↓	
		Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat	
Stufe 2 (2 Durchläufe je Molekül Glucose)	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	↓	P, NAD^+ → NADH
		1,3-Bisphosphoglycerat	
	Phosphoglycerat-Kinase	↓	ADP → ATP
		3-Phosphoglycerat	
	Phosphoglycerat-Mutase	↓	
		2-Phosphoglycerat	
	Enolase	↓	
		Phosphoenolpyruvat	
	Pyruvatkinase	↓	ADP → ATP
		Pyruvat	
		Netto:	**+2 ATP +2 NADH**

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glykolyse. Modifiziert nach (Berg et al., 2015).

Die Glykolyse findet im Mitochondrienplasma statt. Das gewonnene Pyruvat wird in die Mitochondrienmatrix transportiert und unter aeroben Bedingungen im Rahmen der oxidativen Decarboxylierung vollständig zu CO_2 abgebaut. Dabei werden NADH und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) gebildet, welches direkt in den Citrat-Zyklus eingeht.

Liegt ein Mangel oder die Abwesenheit von Sauerstoff vor (anaerobe Bedingungen) wird Pyruvat zu Laktat umgewandelt. Dieser Prozess wird als Milchsäuregärung bezeichnet. Durch die fehlende Möglichkeit zur oxidativen Decarboxylierung, kann auch folglich kein Citrat-Zyklus stattfinden, sodass durch den Abbau des Glucose-Moleküls ein Netto-Energie-Gewinn von lediglich 2 ATP aus einem Molekül Glucose vorliegt (Berg et al., 2015).

I.2.5.2 Oxidative Posphorylierung

Nach der oxidativen Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetyl-CoA werden im Citrat-Zyklus die Reduktionsäquivalente NADH und $FADH_2$ generiert. Diese übertragen in einer Elektronentransportkette, der oxidativen Phosphorylierung, Elektronen auf Sauerstoff unter Bildung von Wasser. Die einzelnen Redoxreaktionen verlaufen über 4 Transmembranprotein-Komplexe (Komplex I, II, III und IV) der Mitochondrienmembran, wobei zum einen Elektronen eines höheren Energieniveaus sukzessive auf eine niedrigeres Energieniveau herabgesetzt werden und gleichzeitig über die Mitochondrienmembran Protonen aus der mitochondrialen Matrix in das Zytoplasma transportiert. Dieser dabei entstehende Protonengradient erzeugt ein elektrochemisches Membranpotential, das auch als protonenmotorische Kraft genannt wird. Durch Rückfluss der Protonen entlang des Gradienten wird ATP aus ADP in einem endergonen Prozess regeneriert. Diese Reaktion wird durch die

membranständige ATP-Synthase (auch: Komplex V) katalysiert. Die vollständige Oxidation der Glucose (über Glykolyse, Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-Co-A, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung) resultiert in einem Netto-Gewinn von 30-36 ATP und wird direkt nach dem Energiebedarf der Zelle reguliert (Berg et al., 2015).

I.2.5.3 Aerobe Glykolyse oder der Warburg-Effekt

Mitte der 1920er Jahre beobachtete Otto Warburg, dass sich Tumorzellen durch eine erhöhte Glucose-Aufnahme-Rate auszeichnen und dabei große Mengen an Laktat produzieren. Entgegen des natürlichen Prozesses der oxidativen Decarboxylierung, also des vollständigen Abbaus von Pyruvat zu CO_2, beobachtete Warburg dies selbst unter ausreichender Sauerstoffzufuhr (Warburg et al., 1927). Im Verlauf weiterer Untersuchungen konnte er zeigen, dass unter Sauerstoffausschluss weiterhin eine metabolische Aktivität von Tumorzellen unter Laktatbildung besteht, und schlussfolgerte einen Sauerstoff-unabhängigen Tumor-Stoffwechsel (Warburg, 1956). Seine Beobachtungen dieser „aeroben Glykolyse“ konnten im Verlauf der letzten Jahrzehnte nahezu für alle Tumor-Entitäten beobachtet werden und wurden später auch als „Warburg-Effekt“ oder „Warburg-Stoffwechsel“ bezeichnet. Die aerobe Glykolyse zählt daher mittlerweile zu den Schlüsselmerkmalen von Tumorerkrankungen (keine oder geringe organspezifische Funktion, Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, Umgehen der Apoptose, unbegrenztes Wachstum, Verlust der Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden oder Apoptose-induzierenden Signalen, Angiogenese, Invasion benachbarter Gewebe, Fähigkeit zur Metastasierung) (Hanahan und Weinberg, 2000). Wie in Kap. I.2.5.1 Glykolyse beschrieben, erzielt die aerobe Glykolyse der Tumor-Zellen einen Netto-Energie-Gewinn von lediglich 2 ATP. Im Rahmen der aeroben Atmung mit anschließender

oxidativen Phosphorylierung werden insgesamt 30 - 36 ATP gewonnen. Dies erscheint zunächst paradox, charakterisieren sich die Tumor-Zellen doch durch einen hohen Stoff- und Energie-Umsatz (Berg et al., 2015). Großangelegte Studien an menschlichen Tumoren konnten zeigen, dass in 70% der Tumor-Entitäten eine signifikante Überexpression der an der Glykolyse beteiligten Gene stattfindet (Tran et al., 2016). Dabei scheinen weitere Mechanismen diesen metabolischen Prozess von Tumor-Zellen zu unterstützen, unter anderem genetische Modifikationen, die zu einer erhöhten Aufnahme von Glucose in die Zellen (Glucose-Transporter GLUT1), sowie einer Überexpressionen der Glykolyse-Enzyme führen (Tran et al., 2016). Zusätzlich kommt es über die Aktivierung des Protein-Kinase-B/Akt-Signalweges zur Aktivierung der Hexokinase (phosphoryliert die Glucose), sowie einer Aktivierung der *de novo*-Fettsäuresynthese. Zusammen mit der Phospho-Inositid-3-Kinase (PI3K; PKB/PI3K-Signalweg) erfolgt die Aktivierung des mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR ist eine zentrale Schnittstelle bei der Aktivierung von Signalwegen, die an der Angiogenese, Proliferation, Zellwachstum und des Energiestoffwechsels beteiligt sind. Weiterhin ist mTOR ein upstream-Regulator des hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α), welcher wiederum Heterodimere bildet, die als Transkriptionsfaktor einer Vielzahl von Genen fungiert, die an der Glykolyse beteiligt sind (Tran et al., 2016).

Neben diesen Prozessen, die dem Tumor einen erhöhten Glucose-Umsatz, sowie eine signifikant gesteigerte Biomasse-Produktion ermöglichen, führt der Warburg-Stoffwechsel zu einer großen anfallenden Menge an Laktat. Dieses wird über den Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) protonenabhängig über die Zellmembran aus der Zelle hinaustransportiert. Dies hat mehrere Effekte zur Folge, die die Ausbreitung und das Überleben des Tumors maßgeblich unterstützen. Zum einen wird durch Laktat

der vascular endothelial growth factor (VEGF) aktiviert und dadurch die Angiogenese induziert. Das umliegende gesunde Gewebe wird durch die Übersäuerung des Milieus durch Laktat zerstört, was z.B. eine Invasion des Tumors über Gewebsgrenzen hinweg erleichtert und damit die Metastasierung ermöglicht. Weiterhin hemmt Laktat das Immunsystem, das somit nicht mehr oder weniger als Regulativ gegenüber den entarteten Zellen wirken kann. Ob die genannten Vorzüge des Warburg-Stoffwechsels nun Ursache oder Auswirkung der Tumorigenese darstellen, wird kontrovers diskutiert (Tran et al., 2016). Eine Reprogrammierung des Glucose-Stoffwechsels von der aeroben Glykolyse hin zur oxidativen Phosphorylierung wurde und wird auch im Hinblick auf die klinische Anwendung vielfach untersucht und diskutiert (Chen et al., 2015, Li und Zhang, 2016, Ngo et al., 2015, Olson et al., 2016, Sheng und Tang, 2016, Vatrinet et al., 2015, Yu et al., 2016, Tran et al., 2016).

I.2.6 Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg wurde erstmals 1980 in *Drosophila melanogaster* von der Arbeitsgruppe um Christiane Nüsslein-Vollhard beschrieben (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Seine Rolle als wichtiges Morphogen bei der Embryonalentwicklung wurde bis heute intensiv untersucht und einige seiner komplexen Mechanismen näher aufgeklärt. Grundlegend geht man für den kanonischen Signalweg davon aus, dass ein Hedgehog-Ligand, wie z.B. Sonic Hedgehog (Shh) an das Transmembran-Protein Patched (Ptch) bindet. Dieses inhibiert im aktiven Zustand das Protein Smoothened (Smo). Smo wiederum ist für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren glioma-associated oncogene Familie (Gli) verantwortlich. Sobald ein Hedgehog-Ligand gebunden ist, wird Ptch inaktiviert und somit die Einwanderung von Smo aus der Zellmembran in das primäre Zilium erlaubt. Diese Aktivierung von Smo führt über die Aktivierung von Gli zur Expression von

Proteinen, die essentiell für das Zellwachstum sind. In Medulloblastomen, Basalzellkarzinomen, Rhabdomyosarkomen sowie Neuroblastomen findet sich häufig eine Ligand-unabhängige Aktivierung dieses Signalweges (Brechbiel et al., 2014). Insbesondere scheint die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges essentiell für das Wachstum und die Proliferation von Neuroblastomen zu sein (Xu et al., 2012). Eine klinische Phase I/Phase II-Studie an pädiatrischen Patienten mit u.a. Medulloblastom und Neuroblastom und Behandlung mit dem Hedgehog-Inhibitor Sonidegib wurde im Oktober 2014 abgeschlossen. Studienergebnisse liegen aktuell noch nicht vor (Novartis Pharmaceuticals, 2010).

Smo ist ein so genanntes 7-Pass-Transmembranprotein und besitzt eine N-terminale Cystein-reiche Domäne (CRD) und ein C-terminales intrazelluläres Ende. Man geht davon aus, dass Smo und Ptch keine direkte Interaktion aufweisen, sondern dass kleine, intrazelluläre Moleküle für die Signalübertragung verantwortlich sind. Am intrazellulären C-terminalen Ende konnte eine Bindestelle für das Pflanzen-Sterin Cyclopamin identifiziert werden. Durch die Bindung von Cyclopamin soll Smo gehemmt werden. Im Kontrast dazu konnte wiederholt gezeigt werden, dass Oxysterine (wie z.B. Cholesterin) an die extrazelluläre CRD von Smo binden und den Hedgehog-Signalweg aktivieren (McCabe und Leahy, 2015). Eine Hemmung des Hedgehog-Signalweges durch Cholesterin-Depletion bzw. Sterin-Depletion durch Cyclodextrin-Behandlung konnte bereits an einem Mausmodell mit defekter Cholesterin-Biosynthese (Smith-Lemli-Opitz-Syndrom) gezeigt werden (Cooper et al., 2003). Die Erkenntnisse durch die Untersuchungen am Hedgehog-Signalweg zeigen, dass Sterine, die z.B. durch die Cholesterin-Biosynthese synthetisiert werden, eine wichtige Rolle bei der Signalübermittlung zu spielen scheinen.

I.2.7 Posaconazol

Posaconazol (IUPAC: 4-[4-[4-[4-[[(3R,5R)-5-(2,4-difluorophenyl)-5-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-oxolan-3-yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]phenyl]-2-[(2S,3S)-2-hydroxypentan-3-yl]-1,2,4-triazol-3-on; CAS: 171228-49-2; MW 700,8 g/mol; Handelsname: Noxafil) ist ein Azol, das zur antimykotischen Prophylaxe bei Patienten mit eingeschränkter Immunabwehr (zum Beispiel nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation; HSCT) aber auch therapeutisch gegen ein breites Spektrum an humanpathogenen Pilzen eingesetzt wird. Posaconazol inhibiert die Ergosterin-Synthese des Pilzes der dadurch keine intakte Zellwand mehr bilden kann (Merck Sharp & Dohme, 2003). Posaconazol wird neben Benznidazol und Nifurtimox auch in der Behandlung der Chagas-Krankheit verwendet (Buckner und Navabi, 2010).

I.3 Wissenschaftliche Zielsetzung

Das Neuroblastom ist der häufigste solide Tumor im Kindesalter mit hoher Rezidiv- und Mortalitätsrate. Das Antiprotozoikum Nifurtimox zeigte in Studien eine zytotoxische Wirkung gegenüber Neuroblastom-Zellen, die vermutlich über Induktion von oxidativem Stress erreicht wird.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die Wirkungsweise von Nifurtimox auf vier verschiedene Neuroblastom-Zellen *in vitro* zu untersuchen, und darauf aufbauend sinnhafte Kombinationsmöglichkeiten mit Agenzien zu finden, die synergistische Effekte zur Zytotoxizität erzielen.

Das Proto-Onkogen MYCN trägt signifikant zur Malignität von Neuroblastomen bei und gilt daher als wichtigster prognostischer Parameter bei der Risiko-Stratifizierung von Neuroblastom-Erkrankungen. Eine potentielle Auswirkung der Nifurtimox-Behandlung auf die Expression von MYCN sollte daher untersucht werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Nifurtimox zur Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale führt. Die SOD1 entgiftet intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Hsp70 und Hsp90 sind unter anderem für die korrekte Faltung und Rückfaltung, sowie für die Degradation von intrazellulären Proteinen zuständig und können damit geschädigte Proteine reparieren oder, im Falle irreversibler Schäden, abbauen. Damit sind sie essentiell beim Schutz der Zelle vor Stressfaktoren wie z. B. Hitze oder oxidativem Stress. Eine gezielte Inhibition von SOD1, Hsp70 und Hsp90 könnte die zytotoxischen Auswirkungen von Nifurtimox auf Neuroblastom-Zellen verstärken und damit ein synergistischer Effekt erzielt werden. Darum sollte die Effektivität der Hemmung von SOD1, Hsp70 und Hsp90 in Kombination mit der Nifurtimox-Behandlung näher untersucht und bewertet werden.

Hinsichtlich eines potentiellen klinischen Einsatzes von Nifurtimox, sollte geprüft werden, ob Nifurtimox Neuroblastom-Zellen im *in vitro*-Modell für die Behandlung mit Topotecan sensibilisieren kann.

Für die Behandlung der Chagas-Krankheit werden unter anderem Struktur-Analoga von Nifurtimox eingesetzt oder aktuell klinisch geprüft (z.B. Benznidazol, Posaconazol). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, soll deren mögliches zytotoxisches Potential gegenüber Neuroblastom-Zellen identifiziert werden.

II Material und Methoden

II.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Antikörper, Bedarfsmittel und Geräte

Zur Durchführung der Experimente wurden die nachfolgend tabellarisch gelisteten Chemikalien und Reagenzien (Tab. 3), Antikörper (Tab. 4), Primer (Tab. 5), sowie Bedarfsmittel und Geräte (Tabelle 6) verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Name	**Sonstige Informationen**	**Hersteller, Ort**
17-DMAG	CAS: 467214-20-6	Invivogen, San Diego, CA, USA
2-Propanol		Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
4-20% Precise Tris-HEPES Protein Gel	10 well, 12 well und 15 well	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Albumin Fraktion V	Biotinfrei	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit		PromoCell GmbH, Heidelberg
Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit		PromoCell GmbH, Heidelberg
BCA Protein Assay Kit		Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
BupH™ Tris-Glycine Buffer Packs		Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
BupH™ Tris-HEPES SDS Running Buffer		Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Cell based Glycolysis Assay Kit		Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Cellular Reactive Oxygen Species Detection Kit		Abcam, Cambridge, UK
Complete Mini EDTA-free		Roche, Basel, Schweiz
DCF-DA Cellular ROS Detection Assay Kit		Abcam, Cambridge, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	>99,5%	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	1x oder 10x-Konzentrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eisessig	100% Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)		Biochrom AG, Berlin
Glucose Colorimetric Assay Kit		BioVIsion Inc., Milpitas, CA, USA
Imperial Protein Stain		Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Invitrolon™ PVDF Filter Paper Sandwich 0,45 mm		LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	200 mM, low endotoxin	Biochrom AG, Berlin

Methanol	AnalaR Normapur	VWR International, Radnor, PA, USA
Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit		BioVIsion Inc., Milpitas, CA, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥ 99%	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natronlauge	1N	Merck KGaA, Darmstadt
Nifurtimox	CAS: 23256-30-6	BayerHealthcare, Leverkusen
Nuclear-ID® Green Cell Cycle Kit for flow cytometry		Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA
NuPage LDS Sample Buffer 4x		LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder		Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Pefabloc SC		Roche, Basel, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/mL//10.000 mg/mL	Biochrom AG, Berlin
Pifithrin-μ	CAS: 64984-31-2	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution		Merck KGaA, Darmstadt
RIPA Buffer		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNeasy Mini Kit		Qiagen Inc., Venlo, Niederlande
Roti®-Block 10x	10x-Konzentrat	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
RPMI-1640®	mit Phenolrot 5 mg/L, mit 2,0 g/L $NaHCO_3$	Biochrom AG, Berlin
Tetraethylthiuramdisulfid TETD	CAS: 97-77-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thiazolylblau	≥ 98%	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
TMB Substrate Kit		Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Trypanblau Lösung	0,40%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA	0,05%/0,025% (w/V) in PBS w/o Mg/Ca	Biochrom AG, Berlin
Tween® 20		Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Venor® GeM One Step Kit	Mykoplasmen-Detektion	Minverva Biolabs, Berlin
Wb-Probenpuffer	NuPAGE® LDS Sample Buffer	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Name	**Host**	**Hersteller, Ort**
anti-GAPDH IgG1	aus Maus; Klon 1D4	Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA
anti-Hsp70/Hsp72 IgG1	aus Maus; Klon C92F3A-5	Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA
anti-Hsp90 IgG1	aus Maus; Klon 2D11B9	Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA
Anti-human MIF	aus Kaninchen; Klon D01P	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
anti-Human N-Myc	aus Kaninchen	Thermo Fisher Scienctific, Rockford, IL, USA

anti-Kaninchen IRDye 680RD IgG	aus Ziege	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
anti-Maus IRDye 800CW IgG	aus Ziege	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
anti-PDH	aus Maus	Abcam, Cambridge, UK
anti-phospho S293 PDH	aus Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 5: Verwendete Primer.

Gen	**Primersequenz forward (5' → 3')**	**Primersequenz reverse (5' → 3')**
DHH	CCGGCTTCGACTGGGTCTACTAC	GACCGCCAGTGAGTTATCAGCTTT
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT
GLI1	CCAACTCCACAGGCATACAGGAT	CACAGATTCAGGCTCACGCTTC
GLI2	AAGTCACTCAAGGATTCCTGCTCA	GTTTTCCAGGATGGAGCCACTT
HIF-1α	ATGAAGTGTACCCTAACTAGCCG	GCTTGAGTTTCAACCCAGACATA
HSP70 A1A	TCAAGGGCAAGATCAGCGAG	TGATGGGGTTACACACCTGC
IHH	AGGCCGGCTTTGACTGGGTGTATT	GCGGCCGAGTGCTCGGACTT
MIF	AGCAGCTGGCGCAGGCCAC	CTCGCTGGAGCCGCCGAAGG
mTOR	CGCTGTCATCCCTTTATCG	ATGCTCAAACACCTCCACC
MYCN	ACCCTGAGCGATTCAGATGAT	GTGGTGACAGCCTTGGTGTT
PTCH1	CCCCTGTACGAAGTGGACACTCTC	AAGGAAGATCACCACTACCTTGGCT
PTCH2	GATGGGGCCATCTCCACATT	CGCCGCAAAGAAGTACCTTACA
SHH	CCGGCTTCGACTGGGTGTACTA	CGCCACCGAGTTCTCTGCTTT
SMO	GCTACTTCCTCATCCGAGGAGTCA	GGCGCAGCATGGTCTCGTT
SUFU	GCTGCTGACAGAGGACCCACA	GTGCAGACACCAACGATCTGGA
Survivin	AGCCAGACTTGGCCCAGTGTTTC	GCACTTTCTCCGCAGTTTCCTCA
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA

Tabelle 6: Verwendete Bedarfsmittel und Geräte

Name	**Sonstige Informationen**	**Hersteller**
6-KV-Platten	Multiwell^{TM} 6-well, PS, steril	BD, Franklin Lanes, NJ, USA
96-KV-Platten	Flat Bottom, PS	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Autoklav	Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Blotkammer	Trans-Blot® SD	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Brutschrank	HERAcell; 5% CO_2, ges. Luftfeuchte, 37°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Dounce Tissue Grinder		Sigma-Aldrich, St. Lious, MO, USA
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD, Franklin Lanes, NJ, USA

Elektrophorese-Apparatur	Mini-PROTEAN® II Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
FACSCalibur		BD, Franklin Lanes, NJ, USA
GraphPad Prism for Windows, Version 5.03		GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Imaging System	Li-Cor Odyssey Fc	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Kanüle	Microlance™ 3, 19G 1,5'', 1,1x40 mm	BD, Franklin Lanes, NJ, USA
Kolbenhubpipetten	diverse Größen, variabel	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Kolbenhubpipetten	diverse Größen, variabel	Abimed GmbH, Langenfeld
Kolbenhubpipetten	diverse Größen, variabel	Eppendorf AG, Hamburg
Kompaktwaage	EMB-1200-1	Kern&Sohn GmbH, Balingen
Lichtmikroskop	IX50	Olympus AG, Shinjuku, Tokio, Japan
Messpipette	COSTAR®, PS; 5, 10 und 25 mL	Corning, Inc., Corning, NY, USA
Mikroreaktionsgefäß	Safe-lock-Gefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg
m-Slide 8well	ibiTreat	Ibidi, Verona, WI, USA
Odyssey FC Dual-Mode Imaging System		Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
Pasteur-Pipetten	230 mm	WU Mainz, Mainz
PCR-Cycler	Gene Amp PCR System 9700	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
pH-Meter	pH 538	WTW GmbH, Weilheim
Photometer	Milenia Kinetic Analyzer	Diagnostic Products Corporation, CA, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy Accu-Jet	Abimed GmbH, Langenfeld
Power-Supply	Power-Pac 200	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
PVDF-Membran, niedrigfluoreszent	Immobilon®-FL	Merck KGaA, Darmstadt
Reaktionsgefäß	CELLSTAR®, Tube S, PP; 25 und 50 mL	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Rollenmischgerät	RM5	Assistent, Unterweissbach
Sample-Bag for Micro-Beta™		Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Schüttler	IKA® MS3 basic	IKA-Werke-GmbH & Co. KG, Staufen
Schüttler	TITRAMAX 1000	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach
Schwenker	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach
Spektrophotometer NanoDrop 2000c		Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Spritze	1 Injekt®-F, 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilbank	Heraeus HS12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Versigelungsfolie für Mikrotestplatten, Acetat		Sarstedt AG und Co., Nürnbrecht
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA-Werke-GmbH & Co. KG, Staufen

Zelkultur-Flasche 175 cm^2	CELLSTAR®, PS	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Zelkultur-Flasche 75 cm^2	PS	Corning, Inc., Corning, NY, USA
Zellschaber		Corning, Inc., Corning, NY, USA
Zellzählkammer	Neubauer Improved	Assistent, Unterweissbach
Zentrifuge	Rotina 420R	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Zentrifuge	Mikro 22R	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Zentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich AG, Bäch, Schweiz

II.2 Verwendete Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden Zellen aus vier verschiedene Neuroblastom-Zelllinien verwendet. Drei davon sind kommerziell erhältlich (IMR-32, LA-N-1, SK-N-SH) und eine entstammt der Kultivierung aus einem Patienten des Institutes, in dem die Arbeit angefertigt wurde (LS). Diese ist nicht kommerziell erhältlich, aber in der Literatur vielfach beschrieben (Baader et al., 1994, Baader et al., 1992, Bruchelt et al., 1990, Corvi et al., 1995, Kuci et al., 2002, Rudolph et al., 1991, Schilbach et al., 1990). Tab. 7 fasst einige der publizierten Eigenschaften der Zelllinien zusammen.

Tabelle 7: Charakteristika der verwendeten Zelllinien. k.A. – keine Angabe. Modifiziert nach (Tumilowicz et al., 1970)(Seeger et al., 1977)(Rudolph et al., 1991)(Biedler et al., 1973)(Rostomily et al., 1997)(Kato et al., 1989)(Thiele, 1998).

	IMR-32	**LA-N-1**	**SK-N-SH**	**LS**
Tumor Charakteristikum				
Jahr der Etablierung	1967	1977	1970	1989
Geschlecht des Spenders	männlich	männlich	Weiblich	weiblich
Alter des Spenders	13 Monate	2 Jahre	4 Jahre	16 Monate
INSS-Stadium	k.A.	IV	k.A.	III
Tumor-Lokalisation	Abdomen	Primarius unbekannt; isoliert aus Knochenmarksmetastase	Primär-Lokalisation im Gehirn; isoliert aus Knochenmarksmetastase	Abdomen
Durchschnittliche Verdopplungszeit *in vitro* [Stunden ± Standardabweichung]	26±5	32±9	36±8	21±0,2
Neurotransmitter-Charakteristik (West et al., 1977)	adrenerg	adrenerg	inaktiv	k.A.
Chromosomale Charakteristika				
Modalwert der Chromosomen-Anzahl	48	87	47	48
Spannweite der Chromosomen-Anzahl	41-51	47-87	45-48	
1p-Alterationen	1p Deletion	1p Deletion	-	k.A.
MYCN-Amplifikation	++	+	-	+
Literatur-Stellen	(Tumilowicz et al., 1970, Seeger et al., 1977, Rostomily et al., 1997, Kato et al., 1989, Thiele, 1998)	(Seeger et al., 1977, Thiele, 1998)	(Seeger et al., 1977, Biedler et al., 1973, Thiele, 1998)	(Rudolph et al., 1991)

II.2.1 Zelllinie SK-N-SH

Die adhärente Zelllinie SK-N-SH wurde 1970 aus dem Knochenmark einer 4-jährigen Neuroblastom-Patientin etabliert und besteht aus zwei morphologisch unterschiedlichen Zelltypen. Zum einen sind kleine und kompakte Zellen zu finden, die fokale Aggregate ausbilden. Zum anderen weist die Linie Zellen auf, die eher groß und epitheloiden Charakters sind (Abb. 3).

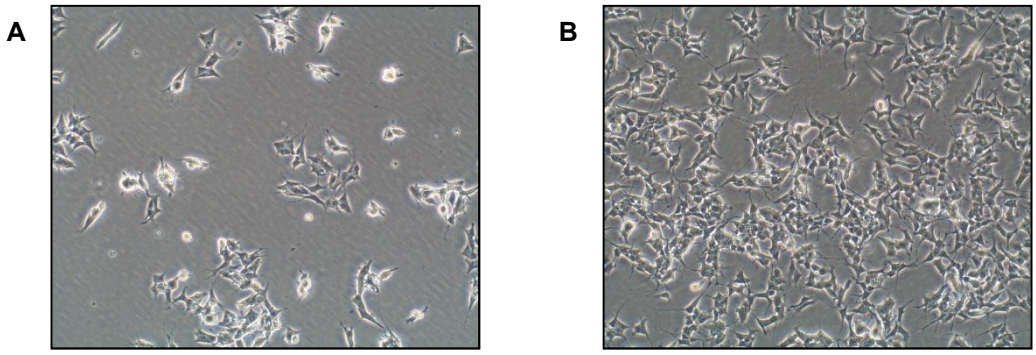


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von SK-N-SH
Die Abbildung zeigt die Zellen der Linie SK-N-SH mit etwa 10% Konfluenz (**A**) und etwa 90% Konfluenz (**B**). Vergrößerung: 200-fach.

SK-N-SH besitzt eine Verdopplungszeit von 36 ± 8h (Seeger et al., 1977). Mit dem Fehlen der Tyrosin-Hydroxylase gilt die Zelllinie grundsätzlich als nicht adrenerg, jedoch wird eine hohe Aktivität von Dopamin-β-Hydroxylase gemessen, was als adrenerger Marker gilt. Weiterhin präsentieren sich die Zellen als elektrophysiologisch aktiv (West et al., 1977). Die Karyotypenanalyse zeigt einen Chromosomensatz von 47 Chromosomen (Biedler et al., 1973). SK-N-SH exprimiert weder das Protoonkogen N-Myc (Bruchelt et al., 1990) noch das Gangliosid GD2 (Chen et al., 2000). Die Zelllinie ist kommerziell erhältlich.

II.2.2 Zelllinie IMR-32

Die adhärente Zelllinie IMR-32 wurde 1967 aus dem Abdomen eines 13 Monate alten Jungen entnommen und etabliert. Ebenso wie bei der Zelllinie SK-N-SH zeigen sich zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen mit kleinen, kompakten Zellaggregaten sowie relativ großen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen (Abb. 4).

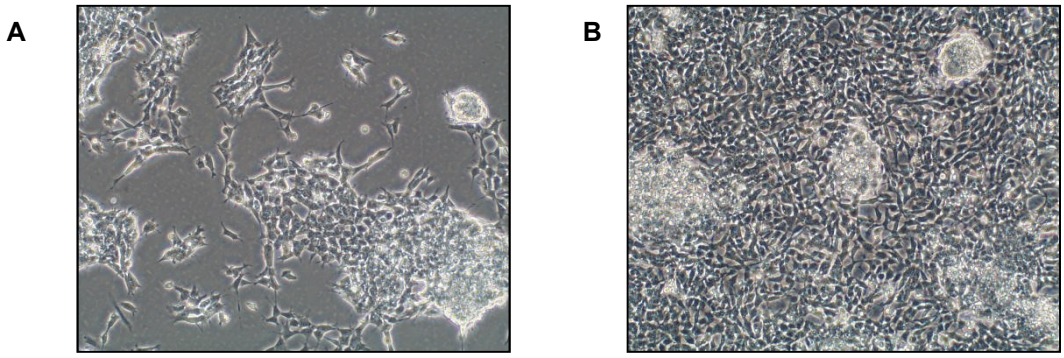


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von IMR-32.
Die Abbildung zeigt Zellen der Linie IMR-32 mit etwa 20% Konfluenz (**A**) und etwa 95% Konfluenz (**B**).
Vergrößerung: 200-fach.

Die Verdopplungszeit von IMR-32 beträgt 26 ± 5h (Seeger et al., 1977). Die Karyotypenanalyse zeigt hauptsächlich Zellen mit 49 Chromosomen, jedoch sind ebenfalls Zellen mit 41 bis hin zu Zellen mit 51 Chromosomen vorhanden. Von einer zytogenetischen Instabilität wird für IMR-32 ausgegangen (Tumilowicz et al., 1970). IMR-32 weist hohe Gehalte der Tyrosin-Hydroxylase auf und gehört zu den adrenergen, Katecholamin-produzierenden Neuroblastom-Zelllinien, wobei die Bildung von Norepinephrin und Dopamin nur schwach ausgeprägt ist (Gupta et al., 1985, West et al., 1977). Zellen dieser Linie gelten als elektrophysiologisch aktiv (West et al., 1977) und exprimieren das Protoonkogen N-Myc (Rudolph et al., 1991) sowie das Gangliosid GD2 (Ohta et al., 1993). Die Zelllinie ist kommerziell erhältlich.

II.2.3 Zelllinie LA-N-1

Die Zelllinie LA-N-1 wurde 1977 aus dem Knochenmark eines 2-jährigen Jungen mit Hochrisiko-Neuroblastom (Stadium IV) gewonnen. LA-N-1 wächst tropfenförmig und meist in semi-adhärenten Aggregaten (Abb. 5).

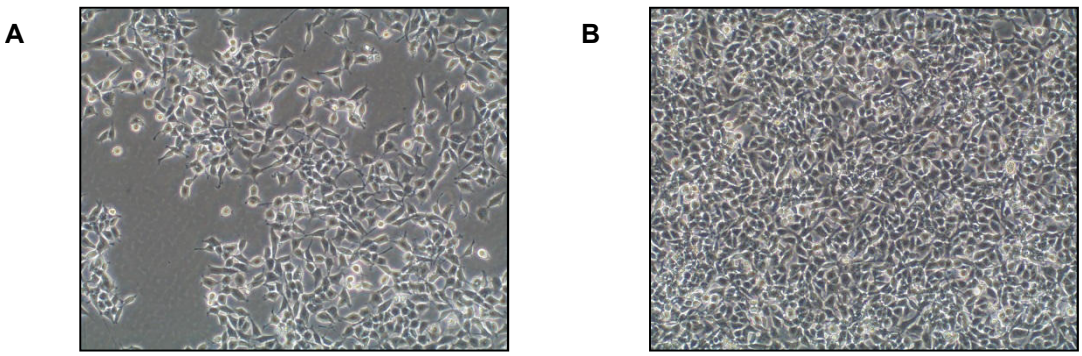


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme von LA-N-1.
Die Abbildung zeigt Zellen der Linie LA-N-1 mit etwa 40% Konfluenz (A) und etwa 95% Konfluenz (B).
Vergrößerung: 200-fach.

Die Verdopplungszeit von LA-N-1 beträgt 32±9h (Seeger et al., 1977). In der Karyotypenanalyse sind hauptsächlich Zellen mit 87 Chromosomen zu finden, wobei 4% der Zellen 47 Chromosomen aufweisen. LA-N-1 gehört zu den adrenergen, Katecholamin-produzierenden Neuroblastom-Zelllinien und gilt als elektrophysiologisch aktiv (West et al., 1977). Zellen dieser Linie exprimieren das Protoonkogen N-Myc (Rudolph et al., 1991) sowie das Gangliosid GD2 (Chen et al., 2000). Die Zelllinie ist kommerziell erhältlich.

II.2.4 Zelllinie LS

Die hauseigene Zelllinie LS wurde 1990 aus einer 16 Monate alten Patientin mit einem abdominalen Neuroblastom im Stadium III entnommen und etabliert. LS wächst gleichförmig und sehr regelmäßig (Abb. 6).

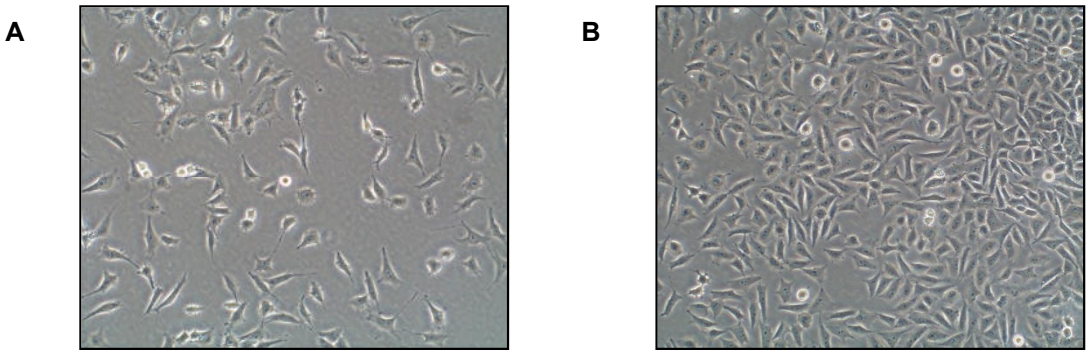


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme von LS.
Die Abbildung zeigt Zellen der Zelllinie LA-N-1 mit etwa 20% Konfluenz (**A**) und etwa 95% Konfluenz (**B**). Vergrößerung: 200-fach.

LS exprimiert das Gangliosid GD2 und enthält das 30-fache des Protoonkogen N-myc im Vergleich zur Zelllinie IMR-32 (Rudolph et al., 1991). Die Zelllinie ist nicht kommerziell erhältlich, aber in der Literatur vielfach beschrieben (Baader et al., 1994, Baader et al., 1992, Bruchelt et al., 1990, Corvi et al., 1995, Kuci et al., 2002, Rudolph et al., 1991, Schilbach et al., 1990).

II.3 Zellkultur

Medium: RPMI-1640® (Biochrom AG, Berlin) mit 10% FCS (v/v) (Biochrom), 1% L-Glutamin (v/v) (Biochrom), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) (Biochrom), 1% Na-Pyruvat (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Alle Arbeiten an Zellen, die dauerhaft kultiviert wurden, wurden aseptisch unter einer Sterilbank (Heraeus HS12, Heraeus Holding GmbH, Hanau) durchgeführt.

Die verwendeten Zelllinien wurden für die Dauerkultivierung in 75cm^2 Polystyrol-Zellkulturflaschen (Corning, Inc., Corning, NY, USA) mit Medium bei 5% CO_2, gesättigter Luftfeuchte und 37°C jeweils bis zur Konfluenz im Brutschrank

(HERAcell, Heraeus) inkubiert. Zur Passagierung wurden die Zellen zweifach mit PBS (Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung, Sigma-Aldrich) gewaschen und mit T/E (Biochrom) (LS, SK-N-SH) bzw. mit PBS (IMR-32, LA-N-1) von der Zellkultur-Flasche gelöst. Die Zellen wurden in gewünschter Verdünnung neu ausgesät. In der Regel erfolgte eine Passage pro Woche. Für Versuchsansätze wurden die Zellen analog in 6-KV-Platten (BD, Franklin Lanes, NJ, USA) ausgesät und bis zur 95%-igen Konfluenz inkubiert.

Die Zellen wurden bis maximal (Gesamt-)Passage 80 für die Versuche verwendet. Zur Überprüfung auf Mykoplasmen-Kontamination wurden die als Stock eingefrorenen Aliquote mit Hilfe des Venor® GeM One Step Kits (Minerva Biolabs, Berlin) direkt vor der Kryokonservierung nach Herstellerangaben auf Mykoplasmen getestet.

II.4 Bestimmung des Zellwachstums von LS

Bislang wurde das Wachstumsverhalten von LS nicht näher beschrieben. Daher wurde die Verdopplungszeit der Zelllinie bestimmt. Hierzu wurden initial 50.000 Zellen je 9,6 cm^2 Wachstumsfläche einer 6-KV-Platte wie zuvor beschrieben ausgesät und bei den beschriebenen Bedingungen kultiviert (vgl. Kap. II.3 Zellkultur). Nach unterschiedlichen Wachstumsperioden wurden die Zellen mit T/E von der Wachstumsfläche gelöst und mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt (IX 50, Olympus AG, Shinjuku, Japan).

II.5 Inkubation mit Test-Reagenzien

Für die Versuchsansätze wurden Zellen der vier Linien mit unterschiedlichen Dosierungen an Nifurtimox (BayerHealthcare, Leverkusen), Posaconazol (Merck KGaA, Darmstadt), TETD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Pifithrin-μ (Sigma-Aldrich), 17-DMAG (Invivogen, San Diego, CA, USA) oder Topotecan (Sigma-

Aldrich), über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Hierzu wurden Stammlösungen in DMSO (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) (Nifurtimox, Posaconazol, TETD, Pifithrin-μ, Topotecan) oder bidemineralisiertem Wasser (ddH_2O) (17-DMAG) hergestellt und bis zur Verwendung im Experiment bei -20°C aufbewahrt. Verdünnungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt. Stamm- und Versuchslösungen wurden in lichtdichten Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg) aufbewahrt. Zur Durchführung der Versuche wurde das überstehende Medium der Zellen gewechselt, mit je 0,5 % (v/v) Reagenz im Wachstums-Medium angesetzt und unterschiedlich lange inkubiert. Zusätzlich wurde für jede Versuchsgruppe eine Lösemittel-Kontrolle mit reinem DMSO bzw. eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

II.6 MTT-Vitalitäts-Assay

MTT-Lysepuffer: 5% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) (Carl Roth) und 0,6% Eisessig (v/v) (Carl Roth) in DMSO

MTT-Reagenz: 5 mg Thiazolylblau (Carl Roth) je 1 mL ddH_2O

Zur Messung der Vitalität von Zellen der vier Linien nach unterschiedlichen Behandlungen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Hierzu wurde das überstehende Medium der Zellen entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Jeweils 100 μL MTT-Reagenz wurden pro 2000 μL Medium zugegeben und die Zellen unter den üblichen Bedingungen eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen mit 700 μL MTT-Lysepuffer pro 9,6 cm^2 Wachstumsfläche lysiert. Das Lysat wurde zu je 50 μL in Triplikaten auf eine 96-KV-Platte (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich) aufgetragen und photometrisch bei 570

nm/630 nm Referenz mit Hilfe des Milenia Kinetic Analyzer (DPC, CA, USA) vermessen. Die relative Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch Abgleich mit analog mitgeführten Lösemittel- sowie unbehandelten Kontrollproben.

II.7 Differenzierung von Apoptose und Nekrose

Zur Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen nach Nifurtimox-Behandlung wurden Zellansätze mit 50% Konfluenz wie beschrieben mit Nifurtimox behandelt (vgl. Kap. II.5 Inkubation mit Testreagenzien). Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V (Färbung apoptotischer Zellen) und mit Ethidium-Homodimer III (Färbung nekrotischer Zellen) mit Hilfe des Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit (Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg) nach Hersteller-Angaben gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch (FACSCalibur, BD Franklin Lanes, NJ, USA) vermessen.

II.8 Untersuchung des Zellzyklus

Um einen Einfluss der Nifurtimox-Behandlung auf den Zellzyklus der Neuroblastom-Zellen zu identifizieren, wurden Zellansätze mit 50% Konfluenz wie beschrieben mit Nifurtimox behandelt (vgl. Kap. II.5 Inkubation mit Testreagenzien). Diese wurden anschließend mit Hilfe des Nuclear-ID® Green Cell Cycle Kit for flow cytometry (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) nach Hersteller-Angaben gefärbt und durchflusszytometrisch (FACSCalibur) vermessen.

II.9 Reaktive Sauerstoffspezies – DCF-Assay

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Nifurtimox die Bildung von ROS in Neuroblastom-Zellen induziert. Um diese Erkenntnisse auch für die hier verwendeten Zelllinien zu bestätigen, wurde ein DCF-Assay durchgeführt. Zusätzlich wurde der

Einfluss der Hemmung der SOD1 mittels TETD mit und ohne Kombination mit Nifurtimox auf den intrazellulären ROS-Gehalt untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben mit Nifurtimox und/oder TETD behandelt (vgl. Kap. II.5 Inkubation mit Testreagenzien). Die Zellen wurden mit 2′,7′-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCF-DA) gefärbt. Intrazellulär erfolgt durch Reaktion mit ROS die Abspaltung des Diacetat zu dem fluoreszenten Farbstoff DCF. Dieser kann durchflusszytometrisch detektiert werden. Die Durchführung des DCF-Assays erfolgte mit Hilfe des Cellular Reactive Oxygen Species Detection Kit (Abcam, Cambridge, UK) nach Angaben des Herstellers.

II.10 Glykolyse-Assay

Die aerobe Glykolyse gilt als einer der klassischen Charakteristika für maligne Stoffwechselprozesse. Um einen Einfluss von Nifurtimox auf die aerobe Glykolyse zu identifizieren, wurden der Glukose-Verbrauch sowie die Laktat-Produktion der Zellen unter Nifurtimox-Behandlung untersucht. Hierzu wurden die Zellen auf 75 cm^2 Wachstumsfläche ausgesät und für 4 Stunden mit 50 µg/mL Nifurtimox wie beschrieben behandelt (vgl. Kap. II.5 Inkubation mit Testreagenzien). Die Produktion von L-Laktat und der Verbrauch von Glucose aus dem Wachstumsmedium wurde mit Hilfe des Cell based Glycolysis Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) und des Glucose Colorimetric Assay Kit (BioVision) nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Als Blindwert wurde frisches Wachstumsmedium vermessen. Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch tote Zellen zu relativieren, wurden die Zellen bei Probenentnahme gezählt. Die Messergebnisse der Glucose- und Laktat-Bestimmungen wurden anschließend auf die Zellzahlen normalisiert.

Die Zellen derselben Ansätze wurden für die Bestimmung der LDH-Aktivität

verwendet. Hierzu wurden die Zellen lysiert und die Aktivität mit Hilfe des Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

II.11 Western Blot

WB-Lysepuffer: 1 Tablette Proteinase-Inhibitor Complete Mini (Roche, Basel, Schweiz) je 10 mL RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich)

Elektrophoresepuffer: BupH^{TM} Tris-HEPES SDS Running-Buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben in ddH_2O gelöst.

Blotpuffer: BupH^{TM} Tris-Glycine Buffer Packs (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben in ddH_2O mit 20% Methanol (v/v) (VWR International, Radnor PA, USA) gelöst.

Waschpuffer: PBS mit 0,1 % Tween® 20 (Carl Roth) (PBST)

Blocklösung: Roti®-Block 10x (Carl Roth) nach Herstellerangaben mit PBST verdünnt.

Antikörper-Lösung: Je nach Antikörper verschiedene Verdünnungen in Blocklösung (1:1000 bis 1:20000) nach Hersteller-Empfehlung.

II.11.1 Zelllyse Western Blot

Um das Expressionsverhalten verschiedener intrazellulärer Proteine nach unterschiedlicher Behandlung zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechend vorbehandelten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem WB-Lysepuffer versetzt. Nach 2-minütiger Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen durch Auf- und Abziehen in

einem 19-G-Kanüle (BD) mit Hilfe einer Spritze (Injekt®-F, 1 mL, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) resuspendiert und lysiert. Nach weiteren zehn Minuten Inkubationszeit auf Eis wurden die unerwünschten Bestandteile der Zelle bei etwa 15.000 g für 15 Minuten abzentrifugiert (Zentrifuge Mikro 22R, Hettich AG, Bäch, Schweiz). Der Überstand wurde anschließend weiter analysiert oder bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Zur Trennung der zytosolischen und der mitochondrialen Fraktion wurde die Lyse mit Hilfe des Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit (BioVIsion Inc., Milpitas, CA, USA) und des Dounce Tissue Grinders (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.11.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zelllysate erfolgte mittels BCA-Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Der Proteingehalt der Lysate wurde nach der Aufreinigung auf 4 mg/mL eingestellt.

II.11.3 Gelelektrophorese – SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine der Lysat-Überstände erfolgte mit Hilfe einer Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierzu wurden 15 µg Gesamt-Protein der Zelllysat-Überstände mit 4x-LDS-Puffer (NuPAGE® LDS Sample Buffer, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) für 5 Minuten im Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg) bei 95°C denaturiert. Das Reaktionsgemisch sowie ein Proteinstandard (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) wurden nach Abkühlen auf Eis auf ein 4-20% Polyacrylamid-Gel (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Elektrophorese-Apparatur (Mini-PROTEAN® II Cell, Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bei konstanten 120 V.

II.11.4 Semi-dry-Blot

Nach der erfolgten SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels Semi-dry-Blot in einer Blotkammer (Trans-Blot® SD, Bio-Rad Laboratories) bei konstanten 60 mA je 63,75 cm^2 Membran auf eine niedrigfluoreszente Polyvinyliden-Fluorid-Membran (Immobilon®-FL, Merck, KGaA, Darmstadt) übertragen.

II.11.5 Coomassie-Färbung

Zur Überprüfung des Proteingehaltes im Gel wurde nach erfolgtem Semi-dry-Blot eine Coomassie-Färbung mit Imperial Stain (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.11.6 Immundetektion

Die geblottete Membran wurde zunächst in Blocklösung für mindestens drei Stunden geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit Primär-Antikörper in 5 mL Blocklösung inkubiert. Nach erfolgter Primär-Antikörper-Inkubation wurde die Membran mindestens drei Mal in PBST gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit Sekundär-Antikörper in 5 mL Blocklösung für mindestens drei Stunden inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper wurde entsprechend der Hersteller-Angaben durchgeführt (in der Regel zwischen 1:1000 und 1:20.000). In Tab. 8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Western-Blot-Antikörper.

Name	**Host**	**Hersteller**
anti-GAPDH IgG1	aus Maus; Klon 1D4	Enzo Life Sciences
anti-HO1 PE-Konj. IgG2b	aus Maus; Klon HO-1-2	Enzo Life Sciences
anti-Hsp70/Hsp72 IgG1	aus Maus; Klon C92F3A-5	Enzo Life Sciences
anti-Hsp90 IgG1	aus Maus; Klon 2D11B9	Enzo Life Sciences

Anti-human MIF	aus Kaninchen; Klon D01P	Biozol Diagnostica
anti-Human N-Myc	aus Kaninchen	Thermo Fisher Scienctific
anti-Kaninchen IRDye 680RD IgG	aus Ziege	Li-Cor Biosciences
anti-Maus IRDye 800CW IgG	aus Ziege	Li-Cor Biosciences
anti-PDH	aus Maus	Abcam
anti-phospho S293 PDH	aus Kaninchen	Abcam

Anschließend erfolgte die Detektion sowie die quantitative Auswertung mit Hilfe des Imaging System Li-Cor Odyssey^{TM} Fc Dual Imaging System und der Software Image Studio^{TM} Software Version 3.1 for windows (Li-Cor Inc.) nach Herstellerangaben. Die Quantifizierung der Expression der jeweiligen Proteine erfolgte in Abgleich mit einer internen Ladekontrolle (GAPDH) und in Relation zu unbehandelten bzw. Lösemittel-Kontrollproben.

II.12 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCT)

Die Isolation der RNA und der DNA-Verdau der inkubierten Versuchsansätze erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen Inc., Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben. Die Vermessung des RNA-Gehaltes und Beurteilung der Reinheit der Isolate erfolgte spektrophotometrisch (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher).

Zur Herstellung der cDNA wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) oder das RT^2 First Strand Kit (Qiagen; für die anschließende Verwendung in den RT^2 Proflier PCR Arrays) nach Hersteller-Angaben verwendet. Für den Umschrieb wurden mindestens 100 bis maximal 500 ng cDNA je Ansatz verwendet.

Für die qRT-PCR wurde der Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen) oder der RT^2 SYBR Green Master Mix (Qiagen; für die anschließende Verwendung in den RT^2 Proflier PCR Arrays) und der BioRad CFX96 Touch^{TM} qPCR Cycler, sowie die in

Tab. 9 aufgeführten Primer verwendet

Tabelle 9: Primersequenz der verwendeten qRT-PCR Primer.

Gen	Primersequenz forward (5' → 3')	Primersequenz reverse (5' → 3')
HSP70 A1A	TCAAGGGCAAGATCAGCGAG	TGATGGGGTTACACACCTGC
MIF	AGCAGCTGGCGCAGGCCAC	CTCGCTGGAGCCGCCGAAGG
MYCN	ACCCTGAGCGATTCAGATGAT	GTGGTGACAGCCTTGGTGTT
IHH	AGGCCGGCTTTGACTGGGTGTATT	GCGGCCGAGTGCTCGGACTT
SHH	CCGGCTTCGACTGGGTGTACTA	CGCCACCGAGTTCTCTGCTTT
DHH	CCGGCTTCGACTGGGTCTACTAC	GACCGCCAGTGAGTTATCAGCTTT
PTCH1	CCCCTGTACGAAGTGGACACTCTC	AAGGAAGATCACCACTACCTTGGCT
PTCH2	GATGGGGCCATCTCCACATT	CGCCGCAAAGAAGTACCTTACA
SMO	GCTACTTCCTCATCCGAGGAGTCA	GGCGCAGCATGGTCTCGTT
SUFU	GCTGCTGACAGAGGACCCACA	GTGCAGACACCAACGATCTGGA
GLI1	CCAACTCCACAGGCATACAGGAT	CACAGATTCAGGCTCACGCTTC
GLI2	AAGTCACTCAAGGATTCCTGCTCA	GTTTTCCAGGATGGAGCCACTT
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT
HIF-1α	ATGAAGTGTACCCTAACTAGCCG	GCTTGAGTTTCAACCCAGACATA
Survivin	AGCCAGACTTGGCCCAGTGTTTC	GCACTTTCTCCGCAGTTTCCTCA
mTOR	CGCTGTCATCCCTTTATCG	ATGCTCAAACACCTCCACC

Die Bedingungen der qRT-PCR beinhalteten 2 min bei 95°C Vorheizen, 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden gefolgt von 60°C für 1 Minute. Zur Bestimmung der relative Gen-Expression wurden die erhaltenen C_q-Werte der Zielgene gegen die Werte der GAPDH normalisiert und nach der $2^{-\Delta\Delta C}{}_T$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001, Schmittgen und Livak, 2008).

II.12.1 Human Cancer Pathway Finder ArrayTM und Human Heat Shock Proteins and Chaperones Array

Die Analyse der Genexpression von je 84 Genen über die RT^2 Profiler PCR Arrays Human Cancer Pathway Finder Array^{TM} sowie Human Heat Shock Proteins and Chaperones Array (Qiagen) erfolgte nach 96-stündiger Behandlung der Zelllinie LS mit 5 µg/mL Nifurtimox, 5 µM Pifithrin-µ oder 0,001 % DMSO als Kontrolle im überstehenden Medium. Die Aufreinigung der Zellen, die cDNA-Synthese, sowie die

Durchführung und Messbedingungen der qRT-PCR erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Tab. 10 und Tab. 11 zeigen eine Übersicht der analysierten Gene.

Tabelle 10: Übersicht der mittels qRT-PCR analysierten Gene mit Hilfe des Human Cancer Pathway Finder Array (Qiagen).

Abkürzung	Beschreibung	Gen Name/alternative Bezeichnungen
ACLY	ATP citrate lyase	ACL/ATPCL/CLATP
ACSL4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	ACS4/FACL4/LACS4/MRX63/MRX68
ADM	Adrenomedullin	AM/PAMP
ANGPT1	Angiopoietin 1	AGP1/AGPT/ANG1
ANGPT2	Angiopoietin 2	AGPT2/ANG2
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	APAF-1/CED4
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	HIF-1-beta/HIF-1beta/HIF1-beta/HIF1B/HIF1BETA/TANGO/bHLHe2
ATP5A1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	ATP5A/ATP5AL2/ATPM/COXPD22/HEL-S-123m/MC5DN4/MOM2/OMR/ORM/hATP1
AURKA	Aurora kinase A	AIK/ARK1/AURA/AURORA2/BTAK/PPP1R47/STK15/STK6/STK7
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BAM/BIM/BOD
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	AIP1/API2/CIAP2/HAIP1/HIAP1/MALT2/MIHC/RNF49/c-IAP2
BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene	FLVI2/BMI1/PCGF4/RNF51/flvi-2/bmi-1
CA9	Carbonic anhydrase IX	CAIX/MN
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP-2/ICH1/NEDD-2/NEDD2/PPP1R57
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP-7/CMH-1/ICE-LAP3/LICE2/MCH3
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	APAF-3/APAF3/ICE-LAP6/MCH6/PPP1R56
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2/HC11/HSMCR30/MCAF/MCP-1/MCP1/SCYA2/SMC-CF
CCND2	Cyclin D2	KIAK0002/MPPH3
CCND3	Cyclin D3	-
CDC20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	CDC20A/bA276H19.3/p55CDC
CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	CD325/CDHN/CDw325/NCAD
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CASH/CASP8AP1/CLARP/Casper/FLAME/FLAME-1/FLAME1/FLIP/I-FLICE/MRIT/c-FLIP/c-FLIPL/c-FLIPR/c-FLIPS
COX5A	Cytochrome c oxidase subunit Va	COX/COX-VA/VA
CPT2	Carnitine palmitoyltransferase 2	CPT1/CPTASE/IIAE4
DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	DDBB/UV-DDB2
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	CEBPZ/CHOP/CHOP-10/CHOP10/GADD153
DKC1	Dyskeratosis congenita 1, dyskerin	CBF5/DKC/DKCX/NAP57/NOLA4/XAP101

DSP	Desmoplakin	DCWHKTA/DP/DPI/DPII
E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding	E2F-4
EPO	Erythropoietin	EP/MVCD2
ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	BTF2/GTF2H/RAD25/TFIIH/TTD2/XPB
ERCC5	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	COFS3/ERCC5-201/ERCM2/UVDR/XPG/XPGC
ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	ETS2IT1
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	ALPS1B/APT1LG1/APTL/CD178/CD95-L/CD95L/FASL/TNFSF6
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	BFGF/FGF-2/FGFB/HBGF-2
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT/FLT-1/VEGFR-1/VEGFR1
FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)	FKHL14/LD/MFH-1/MFH1
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD1
GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	CR6/DDIT2/GADD45gamma/GRP17
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	GDH2/GPDM/mGPDH
GSC	Goosecoid homeobox	SAMS
HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1D/HO-1/HSP32/bK286B10
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	BP-53/IBP3
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5	IBP5
IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7	AGM/FSTL2/IBP-7/IGFBP-7/IGFBP-7v/IGFBPRP1/MAC25/PSF/RAMSVPS/TAF
KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	CD309/FLK1/VEGFR/VEGFR2
KRT14	Keratin 14	CK14/EBS3/EBS4/K14/NFJ
LDHA	Lactate dehydrogenase A	GSD11/HEL-S-133P/LDHM/PIG19
LIG4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent	LIG4S
LPL	Lipoprotein lipase	HDLCQ11/LIPD
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	CFC3/MAPKK1/MEK1/MKK1/PRKMK1
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAPKK3/MEK3/MKK3/PRKMK3/SAPKK-2/SAPKK2
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	CSBP/CSBP1/CSBP2/CSPB1/EXIP/Mxi2/PRKM14/PRKM15/RK/SAPK2A/p38/p38ALPHA
MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2	BM28/CCNL1/CDCL1/D3S3194/MITOTIN/cdc19
MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	KIA/MIB-/MIB-1/PPP1R105
NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	ARC/FCM/MYP/NOP/NOP30
OCLN	Occludin	BLCPMG/PPP1R115
PFKL	Phosphofructokinase, liver	ATP-PFK/PFK-B/PFK-L
PGF	Placental growth factor	D12S1900/PGFL/PLGF/PlGF-2/SHGC-10760
PINX1	PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1	LPTL/LPTS
POLB	Polymerase (DNA directed), beta	-

PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	GADD34
SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	HsT1201/PAI/PAI-2/PAI2/PLANH2
SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	EPC-1/OI12/OI6/PEDF/PIG35
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	FBL1/FBXL1/FLB1/p45
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	CSE/DYT17/DYT18/DYT9/EIG12/GLUT/GLUT-1/GLUT1/GLUT1DS/HTLVR/PED
SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)	SLUGH2/SNA/SNAH/SNAIL/SNAIL1/dJ710H13.1
SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)	SLUG/SLUGH1/SNAIL2/WS2D
SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)	SMUC/SNAIL3/ZNF293/Zfp293
SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble	ALS/ALS1/HEL-S-44/IPOA/SOD/hSod1/homodimer
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10	DOM/PCWH/WS2E/WS4/WS4C
STMN1	Stathmin 1	C1orf215/LAP18/Lag/OP18/PP17/PP19/PR22/SMN
TBX2	T-box 2	-
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial	CD202B/TIE-2/TIE2/VMCM/VMCM1
TEP1	Telomerase-associated protein 1	TLP1/TP1/TROVE1/VAULT2/p240
TERF1	Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	PIN2/TRBF1/TRF/TRF1/hTRF1-AS/t-TRF1
TERF2IP	Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein	DRIP5/RAP1
TINF2	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2	DKCA3/TIN2
TNKS	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	ARTD5/PARP-5a/PARP5A/PARPL/TIN1/TINF1/TNKS1/pART5
TNKS2	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2	ARTD6/PARP-5b/PARP-5c/PARP5B/PARP5C/TANK2/TNKL/pART6
UQCRFS1	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	RIP1/RIS1/RISP/UQCR5
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Flt4-L/LMPH1D/VRP
WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)	WEE1A/WEE1hu
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	API3/BIRC4/IAP-3/ILP1/MIHA/XLP2/hIAP-3/hIAP3
ACTB	Actin, beta	BRWS1/PS1TP5BP1
B2M	Beta-2-microglobulin	-
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD/HEL-S-162eP
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT/HPRT
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	L10E/LP0/P0/PRLP0/RPP0

Tabelle 11: Übersicht der mittels qRT-PCR analysierten Gene mit Hilfe des Human Heat Shock Proteins & Chaperones Array (Qiagen).

Abkürzung	**Beschreibung**	**Gen Name/alternative Bezeichnungen**

ADCK3	AarF domain containing kinase 3	ARCA2/CABC1/COQ10D4/COQ8/SCAR9
ATF6	Activating transcription factor 6	ATF6A
BAG1	BCL2-associated athanogene	BAG-1/HAP/RAP46
BAG2	BCL2-associated athanogene 2	BAG-2/dJ417I1.2
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	BAG-3/BIS/CAIR-1/MFM6
BAG4	BCL2-associated athanogene 4	BAG-4/SODD
BAG5	BCL2-associated athanogene 5	BAG-5
CCS	Copper chaperone for superoxide dismutase	-
CCT2	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	99D8.1/CCT-beta/CCTB/HEL-S-100n/PRO1633/TCP-1-beta
CCT3	Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	CCT-gamma/CCTG/PIG48/TCP-1-gamma/TRIC5
CCT4	Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	CCT-DELTA/Cctd/SRB
CCT5	Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	CCT-epsilon/CCTE/HEL-S-69/PNAS-102/TCP-1-epsilon
CCT6A	Chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	CCT-zeta/CCT-zeta-1/CCT6/Cctz/HTR3/MoDP-2/TCP-1-zeta/TCP20/TCPZ/TTCP20
CCT6B	Chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)	CCT-zeta-2/CCTZ-2/Cctz2/TCP-1-zeta-2/TSA303
CCT7	Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	CCTETA/CCTH/NIP7-1/TCP1ETA
CRYAA	Crystallin, alpha A	CRYA1/CTRCT9/HSPB4
CRYAB	Crystallin, alpha B	CMD1II/CRYA2/CTPP2/CTRCT16/HEL-S-101/HSPB5/MFM2
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	DJ-2/DjA1/HDJ2/HSDJ/HSJ-2/HSJ2/HSPF4/NEDD7/hDJ-2
DNAJA2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	CPR3/DJ3/DJA2/DNAJ/DNJ3/HIRIP4/PRO3015/RDJ2
DNAJA3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3	HCA57/TID1/hTID-1
DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	MST104/MSTP104/PRO1472
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	HSPF1/Hdj1/Hsp40/RSPH16B/Sis1
DNAJB11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	ABBP-2/ABBP2/DJ9/Dj-9/EDJ/ERdj3/ERj3/ERj3p/PRO1080/UNQ537
DNAJB12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12	DJ10
DNAJB13	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 13	RSPH16A/TSARG5/TSARG6
DNAJB14	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 14	EGNR9427/PRO34683
DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	CMT2T/DSMA5/HSJ-1/HSJ1/HSPF3
DNAJB5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5	Hsc40
DNAJB6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	DJ4/DnaJ/HHDJ1/HSJ-2/HSJ2/LGMD1D/LGMD1E/MRJ/MSJ-1
DNAJB7	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 7	DJ5/HSC3
DNAJB8	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8	CT156/DJ6
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	ERdj4/MDG-1/MDG1/MST049/MSTP049
DNAJC1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	DNAJL1/ERdj1/HTJ1/MTJ1
DNAJC10	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	ERdj5/JPDI/MTHr/PDIA19
DNAJC11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11	dJ126A5.1

DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	JDP1
DNAJC13	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	PARK21/RME8
DNAJC14	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14	DNAJ/DRIP78/HDJ3/LIP6
DNAJC15	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	DNAJD1/HSD18/MCJ
DNAJC16	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16	-
DNAJC17	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 17	-
DNAJC18	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 18	-
DNAJC21	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 21	DNAJA5/GS3/JJJ1
DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	ACPHD/ERdj6/HP58/P58/P58IPK/PRKRI
DNAJC4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	DANJC4/HSPF2/MCG18
DNAJC5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5	CLN4/CLN4B/CSP/DNAJC5A/NCL/mir-941-2/mir-941-3/mir-941-4/mir-941-5
DNAJC5B	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5 beta	CSP-beta
DNAJC5G	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5 gamma	CSP-gamma
DNAJC6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	DJC6/PARK19
DNAJC7	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	DJ11/DJC7/TPR2/TTC2
DNAJC8	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8	HSPC331/SPF31
DNAJC9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	HDJC9/JDD1/SB73
HSF1	Heat shock transcription factor 1	HSTF1
HSF2	Heat shock transcription factor 2	HSF 2/HSTF 2
HSF4	Heat shock transcription factor 4	CTM/CTRCT5
HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	EL52/HSP86/HSP89A/HSP90A/HSP90N/HSPC1/HSPCA/HSPCAL1/HSPCAL4/HSPN/Hsp89/Hsp90/LAP-2/LAP2
HSP90AB1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	D6S182/HSP84/HSP90B/HSPC2/HSPCB
HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	ECGP/GP96/GRP94/HEL-S-125m/HEL35/TRA1
HSPA14	Heat shock 70kDa protein 14	HSP70-4/HSP70L1
HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	HEL-S-103/HSP70-1/HSP70-1A/HSP70.1/HSP70I/HSP72/HSPA1
HSPA1B	Heat shock 70kDa protein 1B	HSP70-1B/HSP70-2/HSP70.2
HSPA1L	Heat shock 70kDa protein 1-like	HSP70-1L/HSP70-HOM/HSP70T/hum70t
HSPA2	Heat shock 70kDa protein 2	HSP70-2/HSP70-3
HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4	APG-2/HEL-S-5a/HS24/P52/HSPH2/RY/hsp70/hsp70RY
HSPA4L	Heat shock 70kDa protein 4-like	APG-1/HSPH3/Osp94
HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	BIP/GRP78/HEL-S-89n/MIF2
HSPA6	Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	-
HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8	HEL-33/HEL-S-72p/HSC54/HSC70/HSC71/HSP71/HSP73/HSPA10/LAP-1/LAP1/NIP71
HSPA9	Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	CRP40/CSA/GRP-75/GRP75/HEL-S-124m/HSPA9B/MOT/MOT2/MTHSP75/PBP74

HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1	CMT2F/HEL-S-102/HMN2B/HS.76067/HSP27/HSP28/Hsp25/SRP27
HSPB2	Heat shock 27kDa protein 2	HSP27/Hs.78846/LOH11CR1K/MKBP
HSPB3	Heat shock 27kDa protein 3	DHMN2C/HMN2C/HSPL27
HSPB6	Heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	HEL55/Hsp20/PPP1R91
HSPB7	Heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	cvHSP
HSPB8	Heat shock 22kDa protein 8	CMT2L/DHMN2/E2IG1/H11/HMN2/HMN2A/HSP22
HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	CPN60/GROEL/HLD4/HSP-60/HSP60/HSP65/HuCHA60/SPG13
HSPE1	Heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	CPN10/EPF/GROES/HSP10
HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	HSP105/HSP105A/HSP105B/NY-CO-25
PFDN1	Prefoldin subunit 1	PDF/PFD1
PFDN2	Prefoldin subunit 2	PFD2
SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	AsTP3/CBP1/CBP2/HSP47/OI10/PIG14/PPROM/RA-A47/SERPINH2/gp46
SIL1	SIL1 homolog, endoplasmic reticulum chaperone (S. cerevisiae)	BAP/MSS/ULG5
TCP1	T-complex 1	CCT-alpha/CCT1/CCTa/D6S230E/TCP-1-alpha
TOR1A	Torsin family 1, member A (torsin A)	DQ2/DYT1
ACTB	Actin, beta	BRWS1/PS1TP5BP1
B2M	Beta-2-microglobulin	-
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD/HEL-S-162eP
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT/HPRT
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	L10E/LP0/P0/PRLP0/RPP0

II.13 Statistische Auswertung

Für jeden Versuch wurden mindestens drei unabhängige Experimente an unterschiedlichen Tagen in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Für die Identifikation signifikanter Unterschiede zwischen mehr als zwei Versuchsgruppen wurden ANOVA analysis of variance und anschließendem Post-Test nach Kruskall-Wallis oder Bonferroni (je nach Stichprobenumfang) bzw. two-way ANOVA mit anschließender Korrektur nach Dunnett durchgeführt. Bei Vergleich von zwei Vergleichsgruppen wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant anerkannt (Symbole *: $p<0,05$; **:

p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001).

Die Bestimmung der mittleren Verdopplungszeit der Zelllinie LS wurde mit Hilfe der mittleren Zellzahlen zu definierten Zeitpunkten bei gleicher Zellaussaat aus fünf unabhängigen Versuchen eine Exponentialfunktion nach einer polynomen best fit-Methode erstellt und die mittlere Verdopplungszeit berechnet.

Statistische Auswertungen und die Abbildungen wurde mit der Software GraphPad Prism für Windows, Version 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt.

III Ergebnisse

III.1 Verdopplungszeit der Zelllinie LS

Die Neuroblastom-Zelllinie LS ist nicht kommerziell erhältlich. Daher wurde zur näheren Charakterisierung deren Wachstumsverhaltens die mittlere Verdopplungszeit bestimmt. Abb. 7 zeigt repräsentativ eine von 5 unabhängig durchgeführten Messungen des Wachstums von LS.

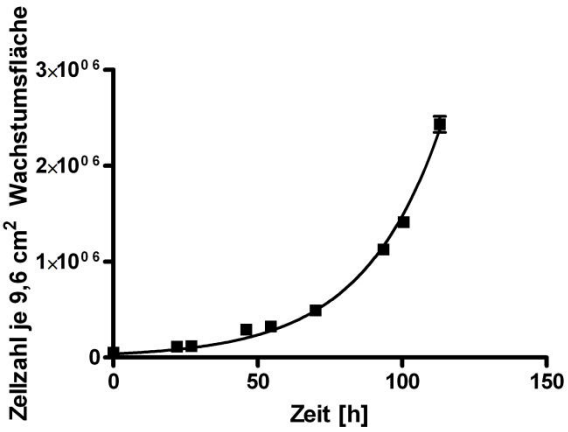


Abbildung 7: Wachstumskurve von Zellen der Linie LS

Die mittlere Verdopplungszeit von LS wurde zu 21,6±0,22 h bestimmt. Die Zelllinie LS weist damit ein wesentlich schnelleres Zellwachstum auf, als die der anderen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (IMR-32: 26±5 h; LA-N-1: 32±9 h; SK-N-SH: 36±8 h; vgl. Kap. II.2 verwendete Zelllinien)

III.2 Zytotoxizität

III.2.1 Behandlung mit Nifurtimox

Zur Evaluation der Zytotoxizität von Nifurtimox auf die Zellen der vier verwendeten Linien, wurden Zeit- und Dosis-Eskalationen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen 24 bis maximal 96 Stunden, sowie unterschiedlichen Nifurtimox-Dosierungen von 0,1 bis 100 µg/mL Nifurtimox im überstehenden Medium

durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Inkubations-Zeiten und –Dosen mit Nifurtimox, mit der die nachfolgenden Versuche durchgeführt wurden, wurden so gewählt, dass Zellvitalitäten zwischen 50 und 75 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lösemittelkontrolle) erzielt wurden. Abb. 8A zeigt die relative Vitalität der behandelten Zellen in % im Vergleich zur Lösemittelkontrolle aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien nach 24-stündiger Nifurtimox-Behandlung mit 10 und 50 µg/mL Nifurtimox. Die Vitalität wurde mit Hilfe des MTT-Testes gemessen.

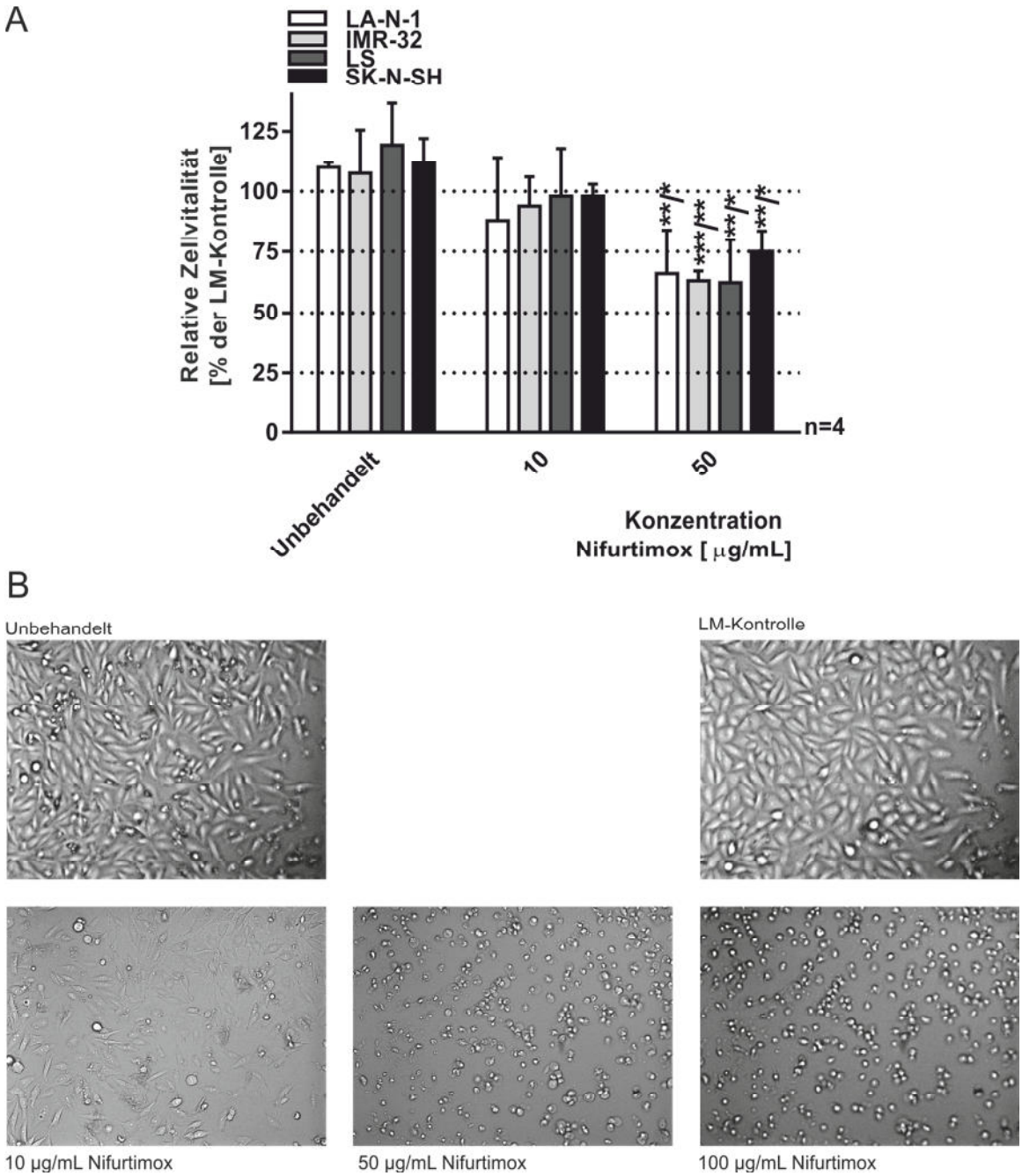


Abbildung 8: Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden.

A. Die Grafik zeigt die relative Zellvitalität von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (reines DMSO). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=4. B. Die Abbildung zeigt beispielhaft lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen der Linie LS nach der Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen über 24 Stunden. Vergrößerung: 400-fach. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

In Abb. 8B ist repräsentativ für alle Zelllinien die lichtmikroskopische Aufnahme von Zellen der Linie LS des Versuchsansatzes der in A gezeigten Vitalitäts-Messung zu sehen. In dem mit 100 µg/mL Nifurtimox inkubierten Ansatz waren keine adhärenten Zellen vorhanden, sodass eine Messung mit Hilfe des MTT-Testes obsolet war. Neben der verringerten Zelldichte – vermutlich durch Ablösung der Zellen von der Wachstums-Oberfläche – imponiert die morphologische Veränderung zu kugel-förmigen Zellen und die Auflösung des Zellverbandes.

Bei der Behandlung der Chagas-Krankheit mit Nifurtimox werden Serum-Spiegel zwischen 5 und 10 µg/mL Nifurtimox erreicht. Bei diesen Konzentrationen werden ebenfalls signifikante Vitalitäts-Reduktionen um 25% erreicht. Abb. 9 zeigt beispielhaft an der MYCN-amplifizierten Zelllinie LS und an der MYCN-single-copy Zelllinie SK-N-SH die Zellvitalität nach 96-stündiger Behandlung mit Nifurtimox.

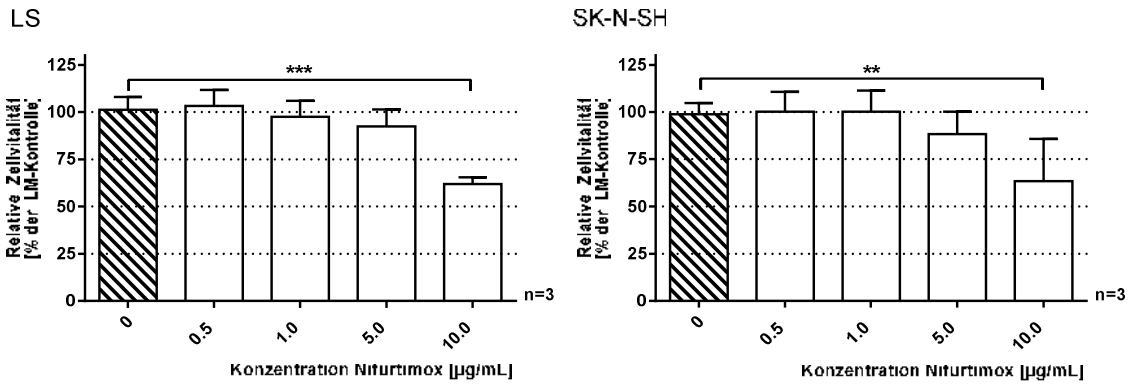


Abbildung 9: Behandlung mit Nifurtimox über 96 Stunden.
Die Grafik zeigt die relative Zellvitalität von Zellen der Linien LS und SK-N-SH nach 96-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (reines DMSO). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei niedrigeren Nifurtimox-Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Vitalität an den Neuroblastom-Zellen resultiert.

III.2.2 Kombination von Nifurtimox mit Topotecan

Topoisomerase-Inhibitoren wie z.B. Topotecan werden standardmäßig in der Neuroblastom-Therapie als Kombinations-Therapeutikum eingesetzt (Frank, 2004, Fuchs, 2012). Sie verhindern die Reparatur der durch die Chemotherapie entstandenen Tumor-DNA-Schäden (Basili und Moro, 2009). Ein additiver oder synergistischer Effekt von Nifurtimox und Topotecan könnte dabei auch eine Dosisreduktion beider Medikamente ermöglichen. Therapeutische Serum-Zielkonzentrationen von Topotecan bei der Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen liegen zwischen 80 und 120 ng·mL-1·h (≡ 0.2 – 0.3 µM; Molmasse: 421.45 g/mol) (Panetta et al., 2008). Eine Dosiseskalation über 48 Stunden wurde für alle Neuroblastom-Zelllinien durchgeführt mit vergleichbaren Resultaten (beispielhaft für Zelllinie LS gezeigt in Abb. 10A). Die am unteren Rand des Zielbereiches angesiedelte Topoptecan-Konzentration von 0.2 µM (84.3 ng/mL) Topotecan zeigte eine signifikante mittlere Reduktion der Zellvitalität auf 27±4 % im Vergleich zur Lösemittelkontrolle ($p < 0.0001$).

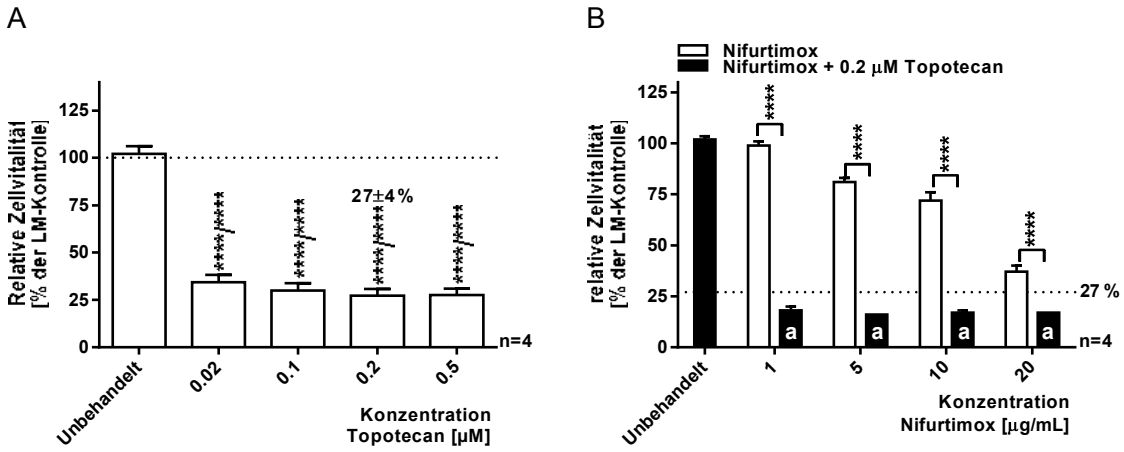


Abbildung 10: Kombinierte Behandlung mit Topotecan und Nifurtimox über 48 Stunden.
Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linie LS nach 48-stündiger Behandlung mit Topotecan (**A**) oder Nifurtimox mit und ohne Kombination mit Topotecan (**B**) in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (reines DMSO). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$ und a: signifikanter Unterschied zur Behandlung mit Topotecan 0.2 µM über 48h. Stichprobenumfang n=4. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

Die Kombination von Nifurtimox in Konzentrationen zwischen 1 und 20 µg/mL und 0.2 µM Topotecan (Abb. 10B) erzielte eine signifikant höhere Reduktion der Zellvitalität (auf ca. 18% bei 10 µg/mL Nifurtimox und 0.2 µM Topotecan) als der entsprechende Wirkstoff alleine ($p < 0.0001$). Dieser Effekt konnte bereits bei sehr niedrigen Nifurtimox-Konzentrationen von 1 µg/mL Nifurtimox erreicht werden.

III.2.3 Behandlung mit Hsp-Inhibitoren

In der Literatur ist die Bildung von ROS in Neuroblastom-Zellen nach Nifurtimox-Behandlung bereits beschrieben (Saulnier Sholler et al., 2009). Die dadurch möglicherweise entstandenen Schädigungen der intrazellulären Proteine kann durch Rückfaltung mit Hilfe der Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 kompensiert werden. Zudem sind Hsp70 und Hsp90 an der Vermittlung essentieller Signaltransduktionswege der Tumor-Zelle beteiligt. Abb. 11 zeigt die Zellvitalität der

in dieser Arbeit verwendeten Zellen nach Behandlung mit dem Hsp70-Inhibitor Pifithrin-μ (Abb. 11A), dem Hsp90-Inhibitor 17-DMAG (Abb. 11B) und der Kombination aus beiden (Abb. 11C).

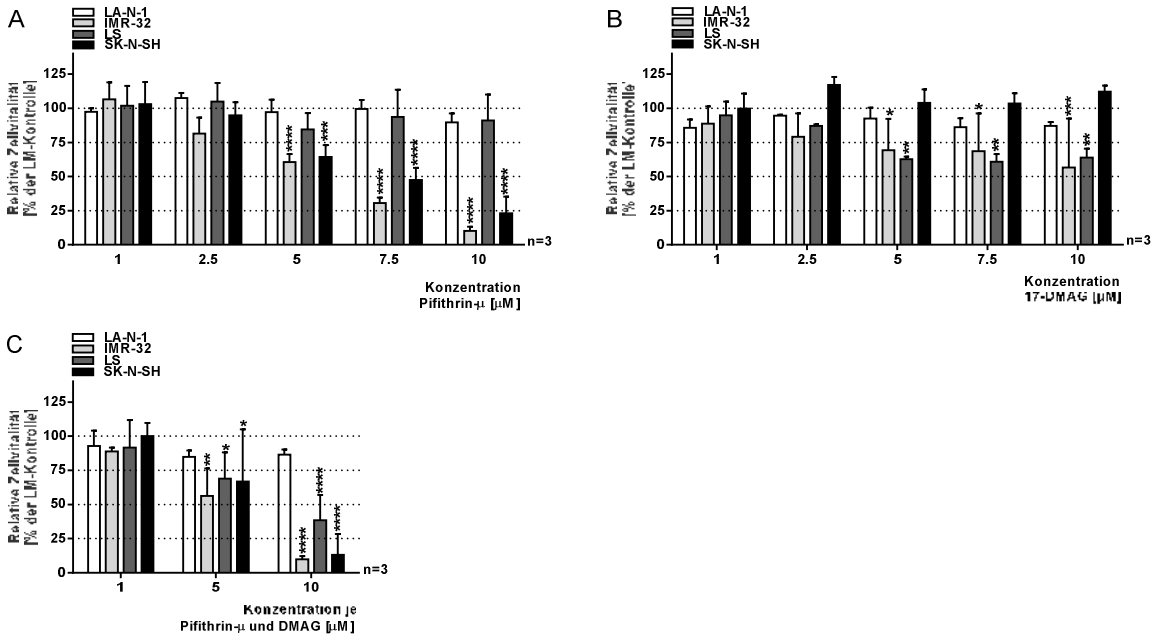


Abbildung 11: Behandlung mit den Hsp70- und Hsp90-Inhibitoren Pifithrin-μ und 17-DMAG über 24 Stunden.

Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit dem Hsp70-Inhibitor Pifithrin-μ (A), dem Hsp90-Inhibitor 17-DMAG (B) oder der Kombination aus beiden (C) in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (Wasser). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3.

Die Ergebnisse der Behandlung mit Pifithrin-μ zeichnen sich sehr heterogen für die vier verschiedenen Zelllinien. So ist nach 24-stündiger Behandlung eine signifikante Reduktion der Zellvitalität gegenüber der Lösemittel-Kontrolle bereits bei einer Pifithrin-μ-Dosis von 5 μM für die Zellen der Linien IMR-32 und SK-N-SH um etwa 30% zu beobachten. Hingegen zeigen sich für die Zellen der Linien LS und LA-N-1 selbst bei einer Pifithrin-μ-Dosis von 10 μM noch keine signifikanten Effekte. Ähnlich unterschiedlich fallen die Ergebnisse für die Behandlung mit 17-DMAG aus.

Hier kann bei einer Konzentration von 5 µM 17-DMAG eine signifikante Reduktion der Vitalität von Zellen der Linien IMR-32 und LS nach 24 Stunden erreicht werden. Für die Zellen der Linien LA-N-1 und SK-N-SH kann bei der höchsten eingesetzten Dosierung von 10 µM kein signifikanter Effekt auf die Zellvitalität erreicht werden. Die Kombination von 17-DMAG und Pifithrin-µ zeigte interessanterweise nur für die Zelllinie LS einen additiven Effekt bei der Kombination beider HSP-Inhibitoren (Tab. 12).

Tabelle 12: Übersicht der Messergebnisse zur Zellvitalität nach 24-stündiger Behandlung mit Pifithrin-µ und 17-DMAG.

Zelllinie	Zellvitalität bei 10 µM **Pifithrin-µ** [% der LM-Kontrolle ± SD]	Zellvitalität bei 10 µM **17-DMAG** [% der LM-Kontrolle ± SD]	Zellvitalität bei 10 µM **Pifithrin-µ** + 10 µM **17-DMAG** [% der LM-Kontrolle ± SD]
LA-N-1	90 ± 6,5	87 ± 2,8	87 ± 3,7
IMR-32	10 ± 3,2	57 ± 35,8	10 ± 2,4
LS	91 ± 18,9	64 ± 6,5	**38 ± 15,3**
SK-N-SH	23 ± 12,0	112 ± 4,6	13 ± 18,4

Für die Zellen der Linien IMR-32 und SK-N-SH war der Effekt der HSP70-Inhibition dominierend wohingegen bei den Zellen der Linie LA-N-1 keine signifikanten Vitalitäts-Verluste weder durch Hsp70- noch Hsp90-Inhibition erreicht werden konnten. Eine zusätzliche Inkubation mit 20 µg/mL Nifurtimox zeigten ebenfalls keinen additiven Effekt der HSP-Inhibitoren bei 24-stündiger Behandlung von Zellen der Linie LA-N-1 (Abb. 12).

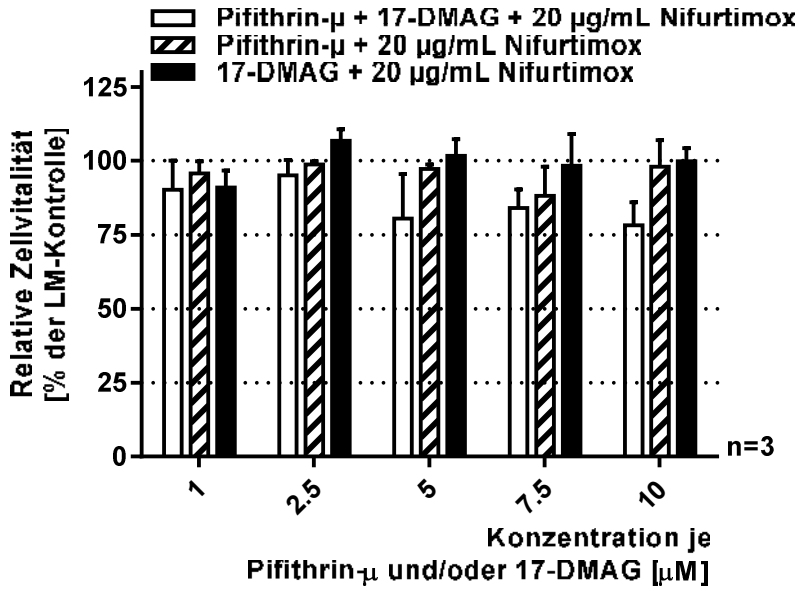


Abbildung 12: Behandlung mit dem Hsp90-Inhibitor 17-DMAG und Nifurtimox über 24 Stunden
Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linie LA-N-1 nach 24-stündiger Behandlung mit dem Hsp70-Inhibitor Pifithrin-μ, dem Hsp90-Inhibitor 17-DMAG oder der Kombination aus beiden jeweils mit 20 μg/ml Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (DMSO/Wasser). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, Stichprobenumfang n=3.

Da die dominanteren zytotoxischen Effekte über die Hsp70-Inhibition vermittelt waren, wurden weitere Kombinationen von Pifithrin-μ und Nifurtimox an den Zelllinien durchgeführt. Abb. 13 zeigt die Kombinationen der beiden Wirkstoffe beispielhaft an den Zelllinien LS (MYCN-amplifiziert) und SK-N-SH (MYCN-single-copy).

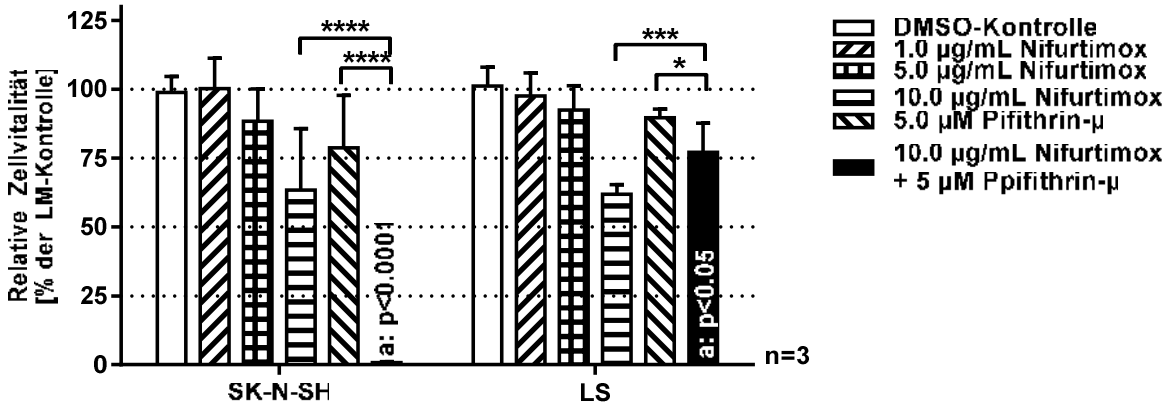


Abbildung 13: Kombinierte Behandlung mit Nifurtimox und Pifithrin-µ über 96 Stunden.
Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linien LS und SK-N-SH nach 96-stündiger Behandlung mit dem Hsp70-Inhibitor Pifithrin-µ oder Nifurtimox oder der Kombination aus beiden in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Lösemittelkontrolle (Kennzeichnung a) oder alle Gruppen untereinander wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes nach Kruskall-Wallis identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3.

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Zelllinie SK-N-SH ein signifikanter additiver Effekt der Kombination aus Nifurtimox und dem HSP70-Inhibitor Pifithrin-µ erreicht werden kann. So erzielten die Behandlungen mit Nifurtimox und Pifithrin-µ Vitalitätsverluste von etwa 30 bzw. 25 %. Durch die Kombination beider Wirkstoffe waren lediglich 1% lebende Zellen nachweisbar. Für die Zelllinie LS konnte kein additiver Effekt der beiden Wirkstoffe nachgewiesen werden. Nach 96-stündiger Behandlung mit Nifurtimox und Pifithrin-µ konnten Vitalitätsverluste von etwa 30 bzw. 10% gezeigt werden. Die Kombination aus beiden Wirkstoffen zeigte zwar eine signifikante Reduktion der Vitalität gegenüber der Lösemittelkontrolle und der Behandlung mit Pifithrin-µ alleine, jedoch war der Effekt gegenüber Nifurtimox alleine nicht überlegen.

III.2.4 Behandlung mit dem SOD1-Inhibitor TETD mit und ohne Nifurtimox

Die SOD1 ist in der Lage, das Superoxidradikalanion $\bullet O_2^-$ zu entgiften und zählt daher zu den endogenen Zellschutzmechanismen vor oxidativem Stress. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Nifurtimox die Bildung intrazellulärer ROS verursacht. Durch die Behandlung mit TETD wird die SOD1 spezifisch gehemmt und der Zelle wird dieser endogene Zellschutzmechanismus entzogen. Abb. 14 zeigt die Vitalität von Zellen der vier Neuroblastom-Zelllinien nach der Behandlung mit TETD alleine (Abb. 14A) oder in Kombination mit Nifurtimox (Abb. 14B) über 24 Stunden. Für die Zellen der Linien IMR-32 und LS konnten bereits bei einer Dosis von 1 µM TETD signifikante Verluste der Zellvitalität nach 24 Stunden erzielt werden. Die Zelllinien LA-N-1 und SK-N-SH zeigten hingegen selbst bei der höchsten eingesetzten Dosis von 7,5 µM TETD kein Ansprechen auf die Behandlung. Die Kombination beider Wirkstoffe (10 µM Nifurtimox und 5 µM TETD) konnte in allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Reduktion der Zellvitalität nach bereits 24 Stunden erreichen (Abb. 14B). Ein signifikanter additiver Effekt der kombinierten Behandlung gegenüber der Behandlung mit beiden Wirkstoffen alleine konnte für die Zellen der Linien LA-N-1 und LS beobachtet werden. Für die Zelllinie IMR-32 konnte kein signifikanter Unterschied der Behandlung mit TETD alleine oder in Kombination mit Nifurtimox erkannt werden.

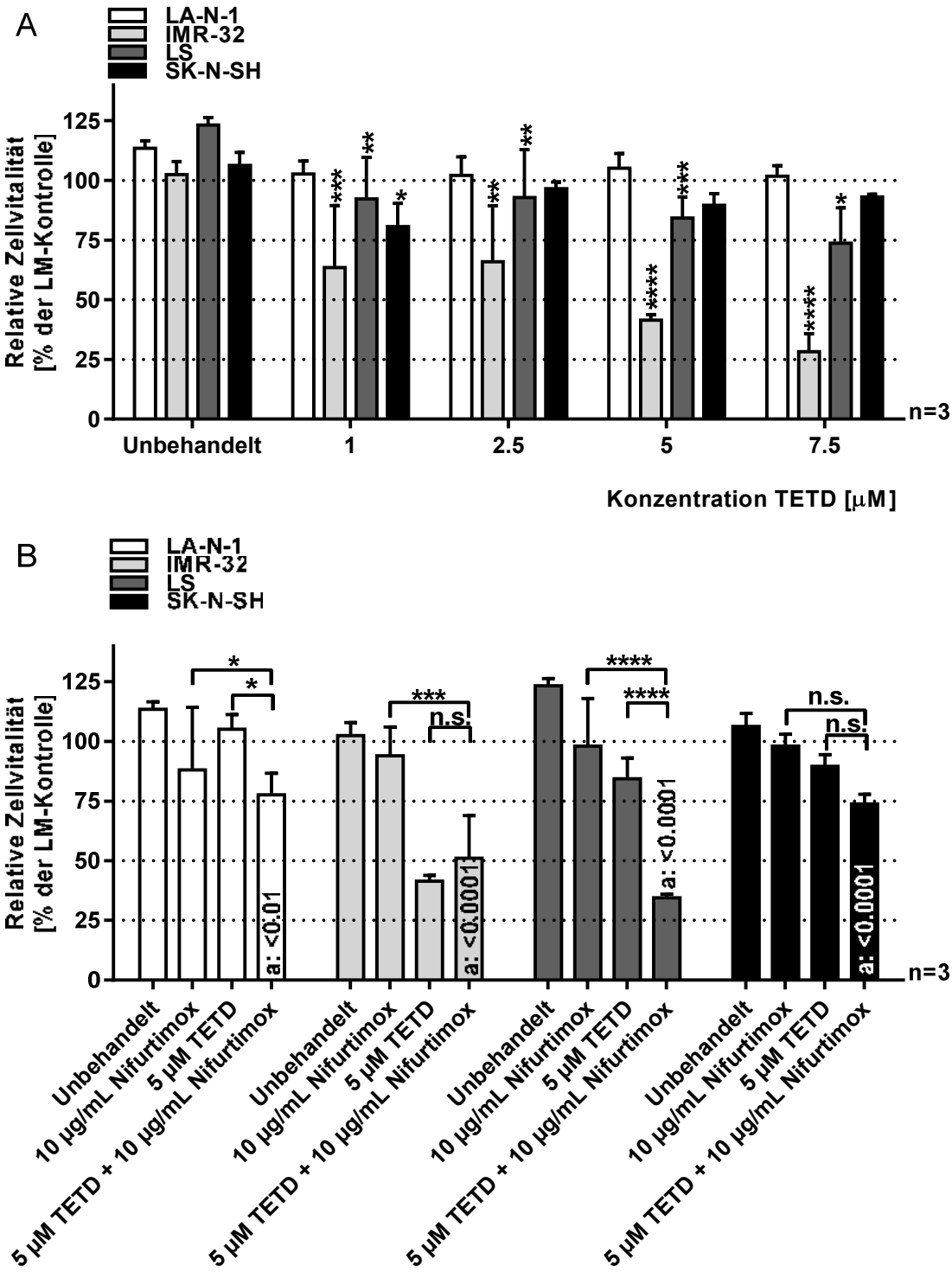


Abbildung 14: Behandlung mit dem SOD1-Inhibitor TETD über 24 Stunden.

A. Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit dem SOD1-Inhibitor TETD in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (DMSO). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **:

p<0.01, ***: p<0.001 und ****: p<0.0001. Stichprobenumfang n=3. B. Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox mit und ohne Kombination mit dem SOD1-Inhibitor TETD in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (DMSO). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's multiple comparisons Test identifiziert, mit a: Unterschied ggü. Lösemittelkontrolle, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 und ****: p<0.0001. Stichprobenumfang n=3.

Für die Zelllinie SK-N-SH wurden zwar reduzierte Zellvitalitäten durch die Kombination beider Wirkstoffe gemessen, jedoch waren die Unterschiede zur Behandlung mit Nifurtimox bzw. TETD alleine statistisch nicht signifikant.

III.2.5 Behandlung mit anderen strukturverwandten Verbindungen

Für die Behandlung der Chagas-Krankheit werden üblicherweise die beiden strukturverwandten Medikamente Nifurtimox und Benznidazol verwendet. Kürzlich konnte ein anti-trypanosomaler Effekt von Posaconazol gezeigt werden. Um mögliche zytotoxische Auswirkungen auf Neuroblastom-Zellen zu identifizieren wurden diese Wirkstoffe und deren Struktur-Analoga hinsichtlich der Zellvitalität näher untersucht. Abb. 15 zeigt die Strukturformeln der Verbindungen Nifurtimox, Benznidazol, Nitrofurazon, Posaconazol, Itraconazol und Fluconazol.

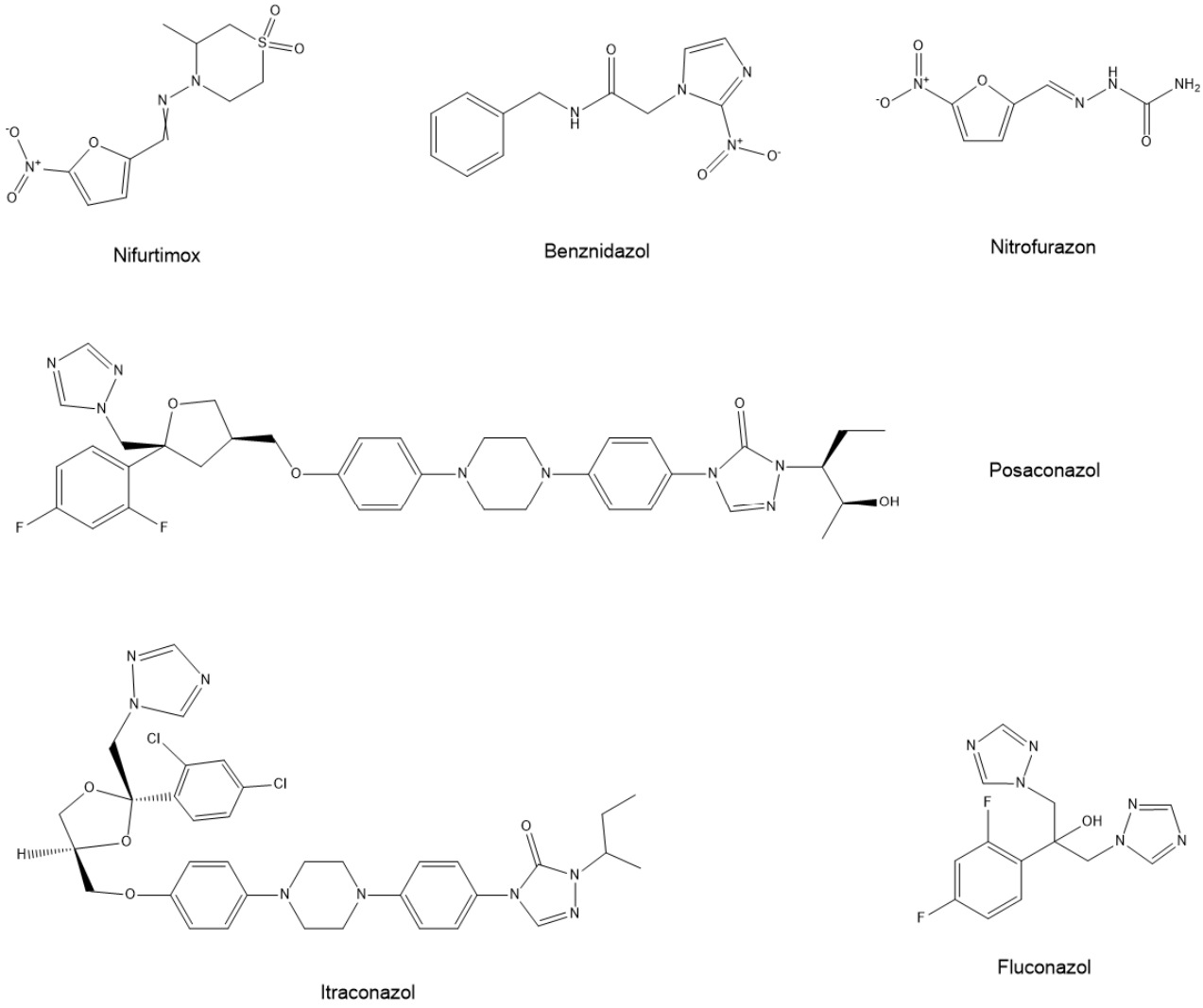


Abbildung 15: Strukturformeln verschiedener Struktur-Analoga.

Die genannten Verbindungen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen über 24 Stunden in Zellvitalitäts-Experimenten repräsentativ mit der Zelllinie LS untersucht. Es zeigte sich, dass außer Benznidazol alle Wirkstoffe bei einer Dosierung von 100 µM signifikante Reduktionen der Vitalität zur Folge hatten (Abb. 16). Bei einer anwendungsorientierten Dosis von 10 µM konnten für Nitrofurazon, Posaconazol und Itraconazol signifikante Vitalitäts-Verluste erzielt werden. Insbesondere Posaconazol schien in diesen Versuchen dominierend.

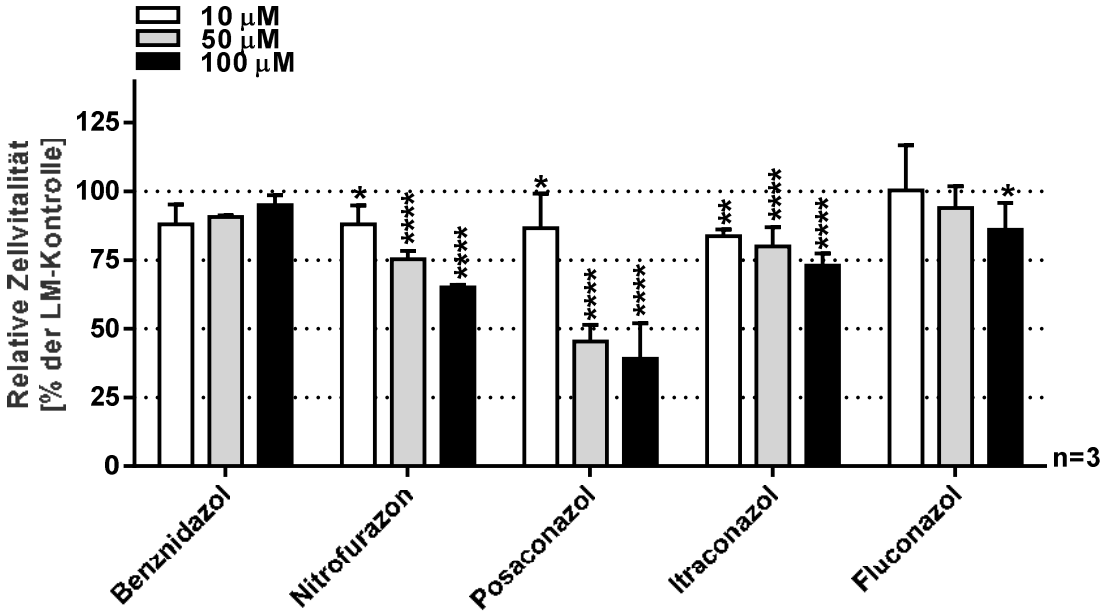


Abbildung 16: Behandlung mit verschiedenen heterozyklischen Verbindungen über 24 Stunden.
Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linie LS nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen nitroheterozyklischen Verbindungen in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (DMSO). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3.

Weitere Untersuchungen mit einer größeren Stichprobe konnten die Ergebnisse für die MYCN-amplifizierte Zelllinie LS bestätigen und auch für die MYCN-single-copy Zelllinie SK-N-SH verifizieren (Abb. 17)

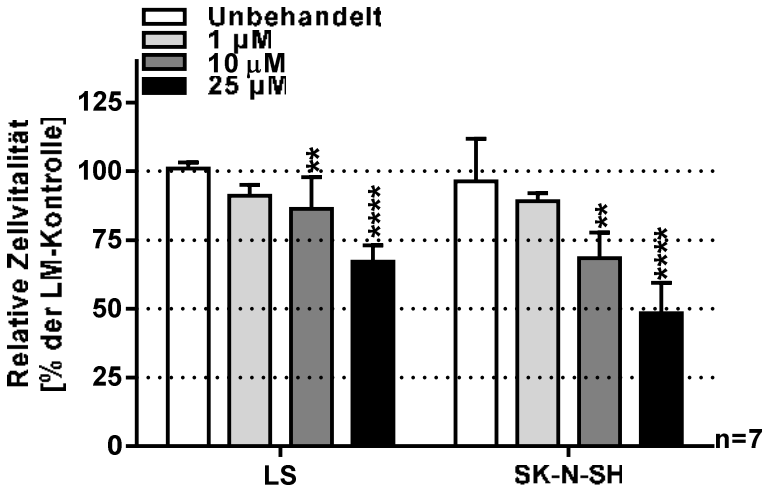


Abbildung 17: Behandlung mit Posaconazol über 24 Stunden.

Die Grafik zeigt die relative Vitalität von Zellen der Linien LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Posaconazol in den angegebenen Konzentrationen in % der Lösemittelkontrolle (DMSO). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3.

Da die näheren Untersuchungen zur Wirkungsweise von Posaconazol auf Neuroblastom-Zellen nicht primär Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, wurden mit Posaconazol zunächst Vorversuche zur Beantragung von Folgeprojekten durchgeführt.

III.3 Apoptose und Nekrose nach der Behandlung mit Nifurtimox

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Zelltod nach der Nifurtimox-Behandlung über apoptotische oder nekrotische Prozesse vermittelt wird, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen mit PI-PerCP (Färbung nekrotischer Zellen) und Annexin-V-FITC (Färbung apoptotischer Zellen) durchgeführt. Die Untersuchungen zeigen, dass der Anteil an apoptotischen Zellen nach 24-stündiger Nifurtimox-Behandlung zunimmt (Abb. 18; statistisch signifikant für Zelllinien LA-N-1, IMR-32, LS).

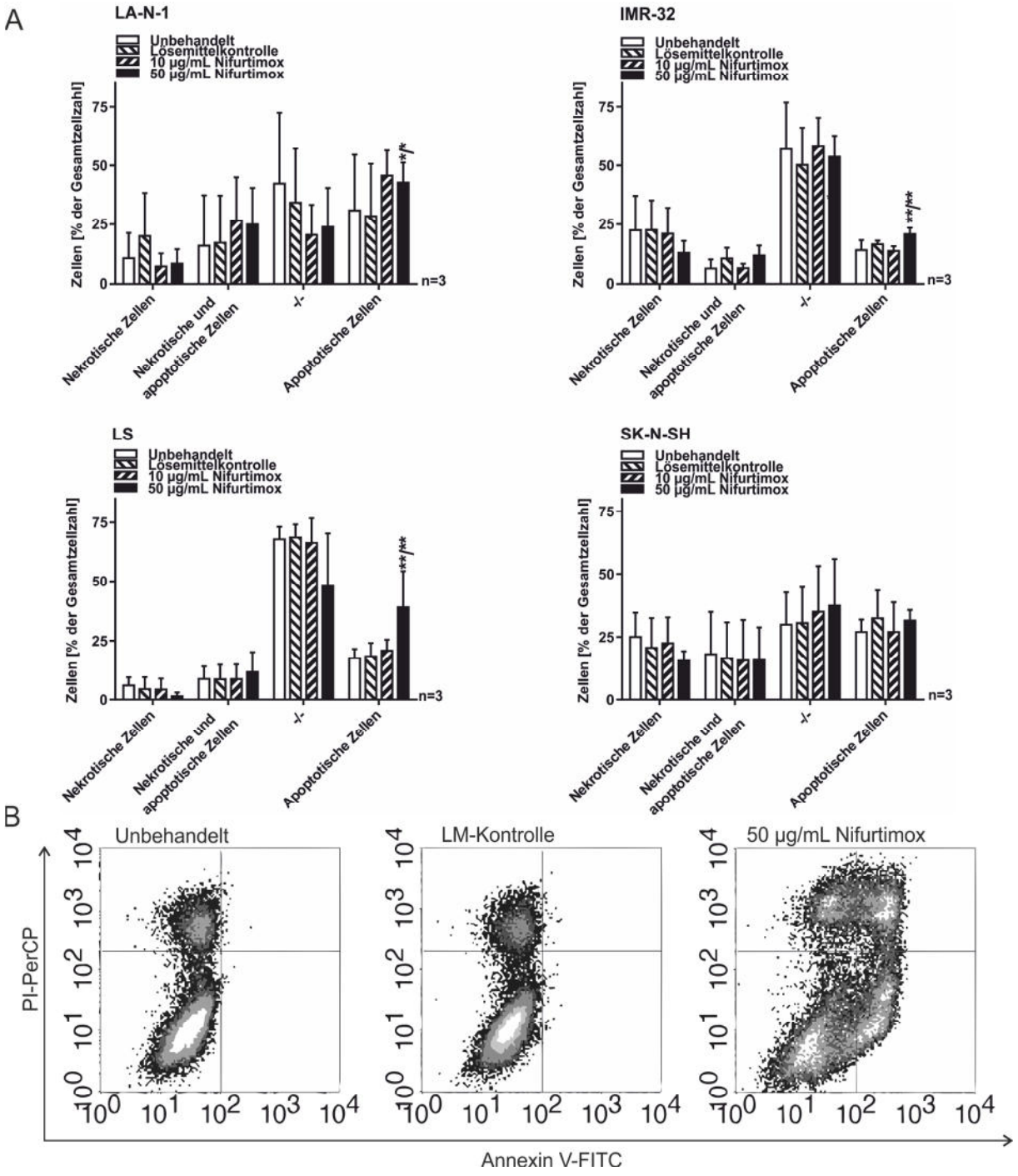


Abbildung 18: Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden.

A. Die Grafik zeigt den jeweiligen Anteil an nekrotischen, apoptotischen, nekrotischen und apoptotischen sowie gesunden (-/-) Zellen der Neuroblastom-Zelllinien LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen in % der gesamten gemessenen Zellen. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$.

Stichprobenumfang n=3. **B.** Die Grafik zeigt am Beispiel der Zelllinie LS die durchflusszytometrischen Messergebnisse nach Färbung der Zellen mit PI PerCP (Detektion der nekrotischen Zellen) und Annexin V FITC (Detektion der apoptotischen Zellen) für die unterschiedlichen Behandlungen mit Nifurtimox und den entsprechenden Kontrollen. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

Abb. 18B zeigt exemplarisch die durchflusszytometrischen Messergebnisse am Beispiel der Zelllinie LS.

III.4 Zellzyklusarrest nach der Behandlung mit Nifurtimox

Eine Hauptursache für die Tumor-Progression und das Tumor-Überleben ist der Schutz vor dem Zellzyklus-Arrest. Dieser wird in malignen Zellen durch das Versagen verschiedener Kontroll-Mechanismen verursacht, die die Regulation des Zellzyklus über seine unterschiedlichen Phasen (G_1: postmitotische und präsynthetische Phase, S: Synthese-Phase, G_2: postsynthetische und prämitotische Phase, M: Mitose-Phase, G_0: ruhende Zellen). Eine Wiederaufnahme dieser Kontroll-Mechanismen, die durch Therapeutika induziert wird, ist daher ein wünschenswerter Effekt in der onkologischen Therapie. Um einen derartigen Effekt von Neuroblastom-Zellen zu identifizieren, wurde die Zellzyklusprogression für alle vier Zelllinien nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox untersucht (Abb. 19).

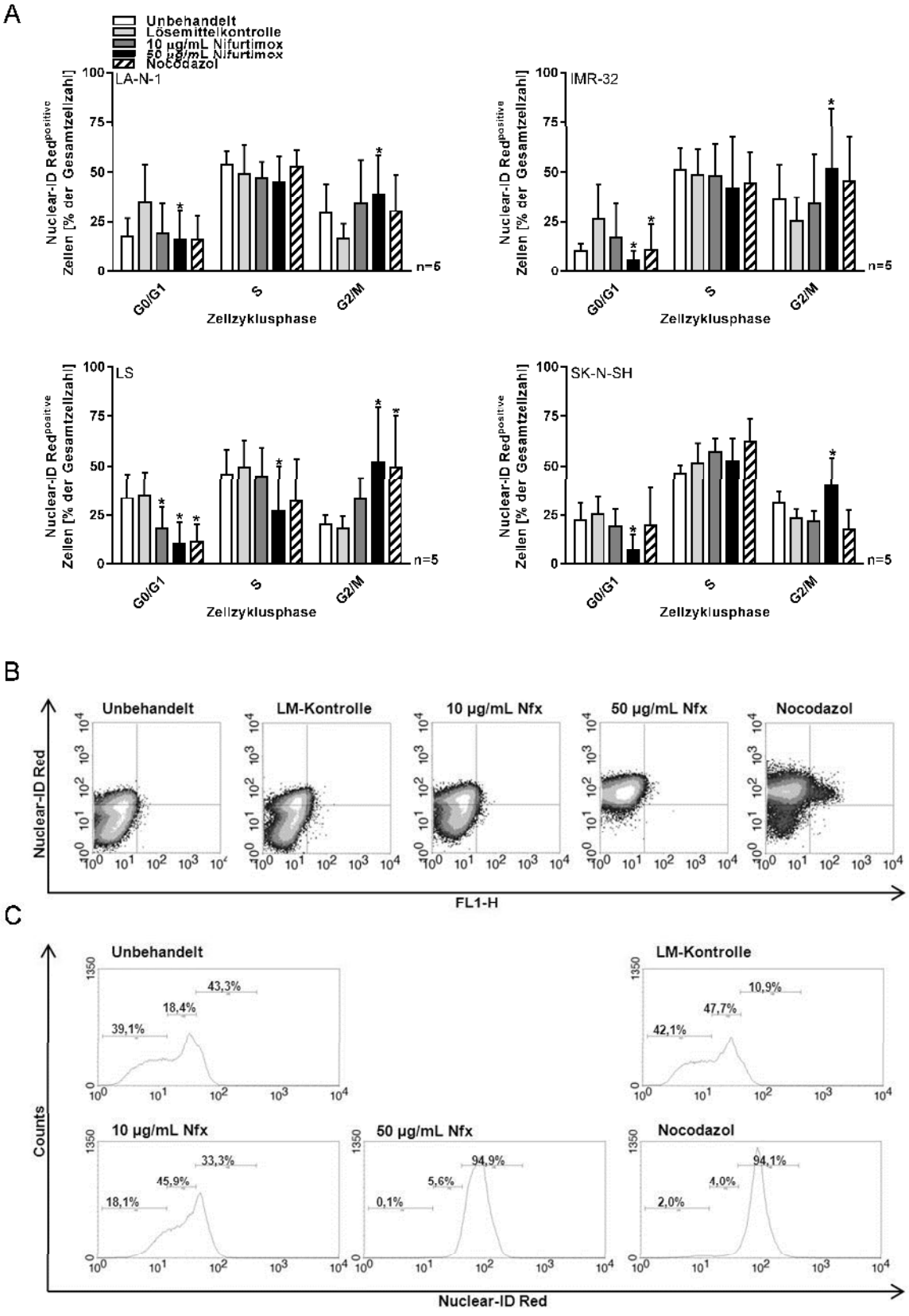


Abbildung 19: Zellzyklusarrest nach der Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden.

A. Die Grafik zeigt den jeweiligen Anteil an Zellen der Phasen G_0/G_1, S oder G_2/M der Neuroblastom-Zelllinien LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen

Konzentrationen oder mit Nocodazol als Positivkontrolle in % der gesamten gemessenen Zellen. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3. **B.** Die Grafik zeigt am Beispiel der Zelllinie LS die durchflusszytometrischen Messergebnisse nach Färbung der Zellen mit Nuclear-ID Red zur Detektion der einzelnen Zellzyklusphasen als Dotplot. **C**. Die Grafik zeigt am Beispiel der Zelllinie LS die durchflusszytometrischen Messergebnisse nach Färbung der Zellen mit Nuclear-ID Red zur Detektion der einzelnen Zellzyklusphasen als Histogramm. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

Der Anteil an Zellen in der G_0/G_1-Phasen war für alle Linien signifikant niedriger und der Anteil an Zellen in der G_2/M-Phasen signifikant erhöht nach einer Behandlung mit 50 µg/mL Nifurtimox ($p<0.05$) im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Die Positiv-Kontrolle wurde durch Behandlung mit Nocodazol mitgeführt.

III.5 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Es wird angenommen, dass der Wirkmechanismus von Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi* über die Bildung radikalischer Verbindungen über Aktivierung durch die Nitroreduktase bestimmt wird (Singh et al., 2011a, Boiani et al., 2010). Weiterhin konnte bereits ein Anstieg von ROS in Neuroblastom-Zellen *in vitro* nach Nifurtimox-Behandlung nachgewiesen werden (Saulnier Sholler et al., 2009). Um die gezeigten Ergebnisse auch für die hier verwendeten Zelllinien zu bestätigen, wurde ein durchflusszytometrischer DCF-Assay nach Nifurtimox-Behandlung durchgeführt. Hier zeigte sich, dass eine 24-stündige Behandlung mit 50 µg/mL Nifurtimox zu einem signifikanten Anstieg intrazellulärer ROS führt ($p<0.0001$) (Abb. 20). Mit 10 µg/mL Nifurtimox über 24 Stunden konnten signifikante Effekte gegenüber der unbehandelten Kontrolle bzw. der unbehandelten und der DMSO-Kontrolle in den Zellen der Linien LA-N-1 und SK-N-SH erzielt werden.

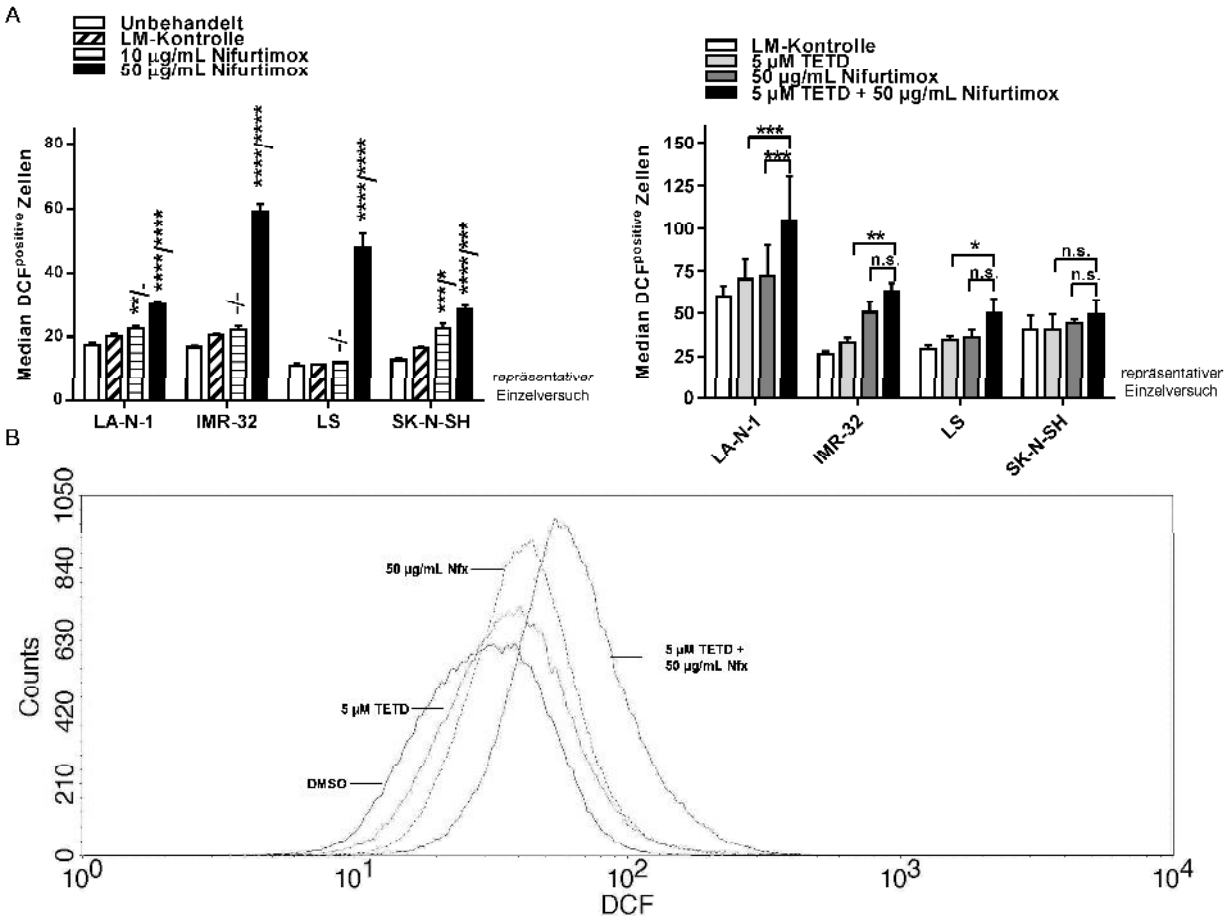


Abbildung 20: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung mit Nifurtimox und TETD über 24 Stunden.

A. Die Grafik zeigt die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen. Der intrazelluläre Gehalt an ROS ist proportional zur intrazellulären Bildung des Fluoreszenzfarbstoffes 2,7-Dichlorfluorescein (DCF). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3. **B.** Die Grafik zeigt die Bildung intrazellulärer ROS der nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox und TETD in den angegebenen Konzentrationen. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3. **C**. Die Grafik zeigt am Beispiel der Zelllinie LS die durchflusszytometrischen Messergebnisse nach Färbung der Zellen mit H_2DCF-DA zur Detektion der gebildeten ROS als Histogramm. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

TETD ist ein spezifischer Inhibitor der SOD1, welche wiederum für den Abbau von $\bullet O_2^-$ zuständig ist. Um zu überprüfen, ob durch die kombinierte Behandlung von TETD und Nifurtimox eine verstärkte Bildung intrazellulärer ROS zu erwarten ist, wurden Zellen aller vier Zelllinien mit 5 µM TETD und 50 µg/mL Nifurtimox über 24 Stunden behandelt (Abb. 20B). Hier zeigte sich insbesondere ein signifikanter Anstieg intrazellulärer ROS bei der Kombinationsbehandlung von LA-N-1 im Vergleich zur Behandlung mit beiden Wirkstoffen einzeln. Ebenso zeigten sich signifikante Anstiege in den Zellen der Linien IMR-32 und LS im Vergleich zur Behandlung mit Nifurtimox alleine (Abb. 20B und Abb. 20C). Bei der Interpretation der Ergebnisse gilt zu beachten, dass für Abb. 20A und 20B je ein repräsentativer Einzelversuch dargestellt wurde. Die Bildung von ROS sowie Umsetzung von DCF sind hochsensible und recht variable Systeme, abhängig von Zell-Passage, Wachstumsdichte, Inkubationsdauer und Durchführung der Färbung sowie Messung der Zellen, sodass insbesondere auch während der durchflusszytometrischen Messung große Spannweiten der Messergebnisse (z.T. Faktor 10) möglich sind. Um Werte-Streuungen bedingt alleine durch die Messdauer abzubilden, wurden die technischen Replikate einer Stichprobe innerhalb einer Gruppe (eine Zelllinie, unbehandelte Probe, DMSO-Kontrolle, behandelte Proben) in zufälliger Reihenfolge vermessen.

III.6 mRNA-Expressionsprofil – quantitative Real Time PCR

Die zytotoxischen Eigenschaften von Nifurtimox auf Neuroblastom-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit sowie in der Fachliteratur bereits hinreichend beschrieben. Die Auswirkungen auf den Tumor-Stoffwechsel hingegen, sind bislang nahezu unbekannt.

Die Hitzeschockproteine der Hsp70 und Hsp90-Familien sind nicht nur ein wichtiger

Aspekt der endogenen Zellschutzmechanismen durch ihre Funktion als Protein-Reparatur-System, sondern unterstützen und stabilisieren essentielle Signalwege innerhalb des Tumor-Stoffwechsels (Neckers, 2007, Murphy, 2013). In qRT-PCR-Analysen wurde daher eine Reaktion innerhalb der mRNA-Expression von Hsp70 und Hsp90 auf die Inkubation mit 10 und 50 µg/mL Nifurtimox über 24 Stunden untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von Hsp70 für Zellen aller Zelllinien bei einer Behandlung mit 50 µg/mL anstieg (signifikant für IMR-32, SK-N-SH und LS; Abb. 21). Für die Expression von Hsp90 konnte ein Anstieg für Zellen der Linie LS bei einer Inkubation mit 50 µg/mL Nifurtimox und für Zellen der Linie SK-N-SH bei einer Inkubation mit 10 µg/mL Nifurtimox beobachtet werden (Abb. 21).

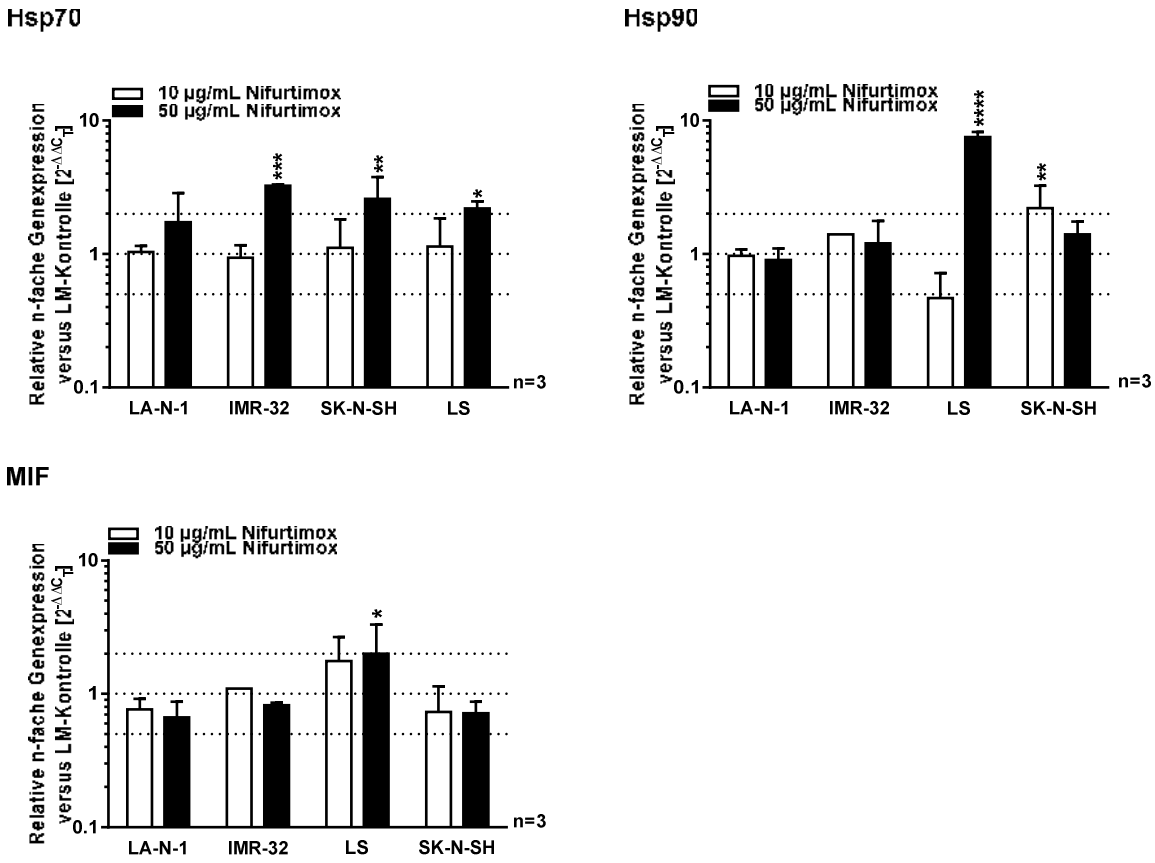


Abbildung 21: mRNA-Expression Hsp70, Hsp90 und MIF nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden.

Die Grafik zeigt die mRNA-Expression von Hsp70, HspP90 und MIF in Referenz zur DMSO-Kontrolle und normiert auf die GAPDH-mRNA-Expression von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen bestimmt mit Hilfe der quantitativen real time PCR und berechnet nach der ΔΔCT-Methode (Livak und Schmittgen, 2001, Schmittgen und Livak, 2008). Die gepunkteten Linien zeigen die Expressionsniveaus 0,5, 1- und 2-fach der DMSO-Kontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3.

HSP90 ist ein wichtiger Stabilisator des makrophage migration inhibitory factor (MIF), der wiederum essentiell ist für das Tumor-Überleben und mit einer schlechten Prognose korreliert (Murphy, 2013). In den Ergebnissen der qRT-PCR zeigte sich, dass die mRNA-Expression von MIF lediglich in Zellen der Linie LS signifikant erhöht ist nach Nifurtimox-Behandlung (Abb. 22). Diese Ergebnisse gehen einher mit

den Messdaten für Hsp90.

Zusätzlich wurden die Expressions-Niveaus von Hsp70 und Hsp90 nach Inkubation mit dem SOD1-Inhibitor TETD allein, nach Inkubation mit TETD und Nifurtimox sowie nach Inkubation mit den HSP70- und HSP90-Inhibitoren Pifitrhin-μ und 17-DMAG beispielhaft für die Zelllinie LS durchgeführt.

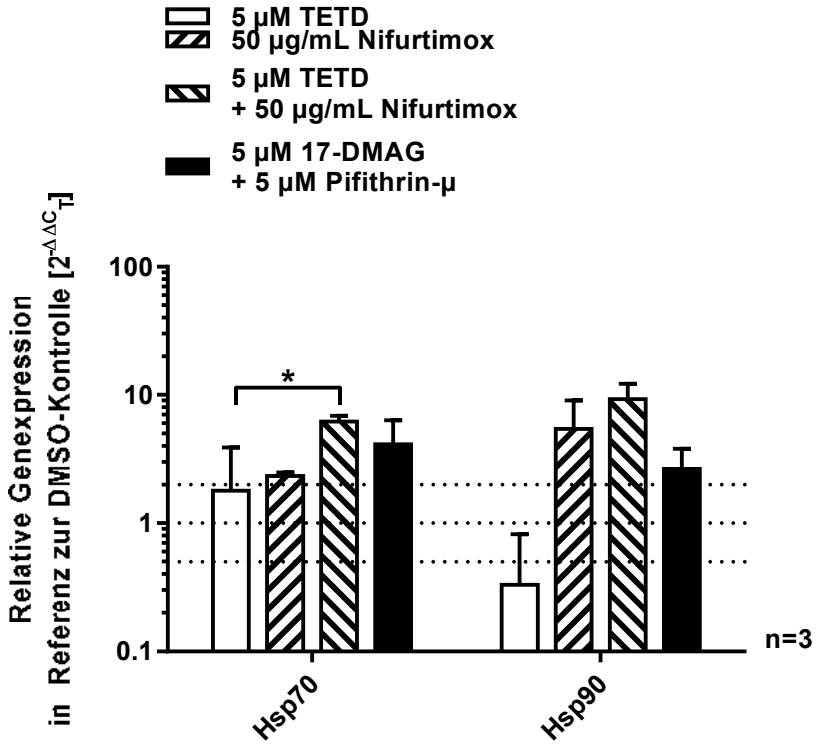


Abbildung 22. mRNA-Expression von Hsp70 und Hsp90 nach Behandlung mit Nifurtimox, TETD, 17-DMAG und Pifithrin-μ über 24 Stunden.

Die Grafik zeigt die mRNA-Expression von HSP70 und HSP90 in Referenz zur DMSO-Kontrolle und normiert auf die GAPDH-mRNA-Expression von Zellen der Linie LS nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen bestimmt mit Hilfe der qRT- PCR und berechnet nach der $\Delta\Delta C_T$-Methode (Livak und Schmittgen, 2001, Schmittgen und Livak, 2008). Die gepunkteten Linien zeigen die Expressionsniveaus 0,5, 1- und 2-fach der DMSO-Kontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=3.

Die Ergebnisse für Hsp70 zeigen, dass im Vergleich zur Inkubation mit TETD bzw. Nifurtimox alleine, eine Steigerung der mRNA Expression von Hsp70 durch die kombinierte Inkubation mit Nifurtimox und TETD erzielt werden kann (Abb. 21). Die Inkubation mit den HSP-Inhibitoren Pifithrin-μ sowie 17-DMAG führte tendenziell zu einer gesteigerten Expression der Hsp70- und Hsp90-mRNA gegenüber der DMSO-Kontrolle, jedoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu anderen Testgruppen erkannt werden.

Als entscheidender prognostischer Faktor bei der Risiko-Stratifizierung von Neuroblastom-Erkrankungen gilt weiterhin das Proto-Onkogen MYCN (Fuchs, 2012). Die 24-stündige Behandlung mit 50 μg/mL Nifurtimox führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Expression von MYCN (Abb. 23).

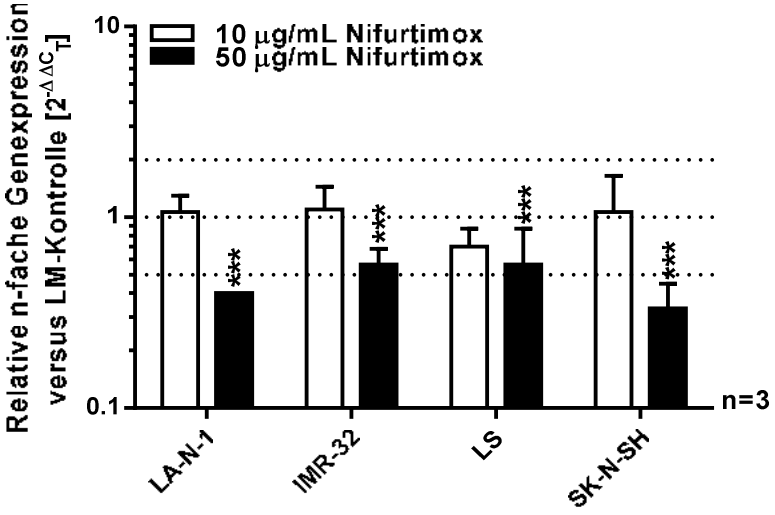


Abbildung 23. mRNA-Expression von MYCN nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden. Teile der Ergebnisse gezeigt in (Cabanillas Stanchi et al., 2015).

Die Grafik zeigt die mRNA-Expression von MYCN in Referenz zur DMSO-Kontrolle und normiert auf die GAPDH-mRNA-Expression von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen bestimmt mit Hilfe der qRT- PCR und berechnet nach der $\Delta\Delta C_T$-Methode (Livak und Schmittgen, 2001, Schmittgen und Livak, 2008). Die gepunkteten Linien zeigen die Expressionsniveaus 0,5, 1- und 2-fach der DMSO-Kontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem

Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 und ****: p<0.0001. Stichprobenumfang n=3. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

Die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges scheint essentiell für das Wachstum und die Proliferation von Neuroblastomen zu sein (Xu et al., 2012). Die Expression von MYCN ist unter anderem über den Hedgehog-Transkriptionsfaktor Gli1 gesteuert. Die Untersuchung der Expression der am Hedgehog-Signalweg beteiligter Proteine zeigte eine signifikante Reduktion der Expression des Transkriptionsfaktors GLI1 (Abb. 24) nach 96-stündiger Behandlung mit 1 und 5 µg/mL Nifurtimox.

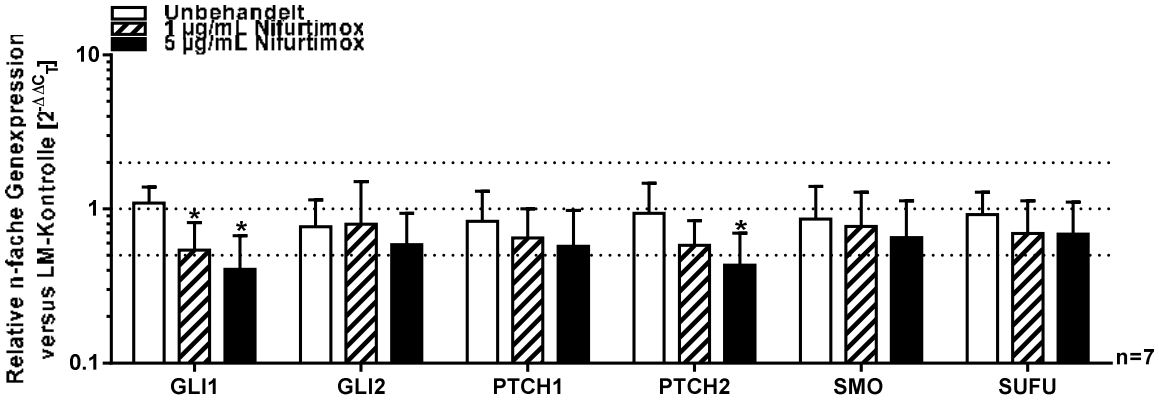


Abbildung 24. mRNA-Expression ausgewählter Hedgehog-Proteine nach Behandlung mit Nifurtimox über 24 Stunden.

Die Grafik zeigt die mRNA-Expression in Referenz zur DMSO-Kontrolle und normiert auf die GAPDH-mRNA-Expression von Zellen der Linie LS nach 96-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen bestimmt mit Hilfe der qRT-PCR und berechnet nach der $\Delta\Delta C_T$-Methode (Livak und Schmittgen, 2001, Schmittgen und Livak, 2008). Die gepunkteten Linien zeigen die Expressionsniveaus 0,5, 1- und 2-fach der DMSO-Kontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 und ****: p<0.0001. Stichprobenumfang *n*=7.

Ebenso zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression des Signalvermittlers PTCH2.

Bei der Behandlung mit Posaconazol über 24 Stunden zeigten sich signifikante Reduktionen der Expression der Transkriptionsfaktoren GLI1 und GLI2 sowie des initialen Signal-Vermittlers PTCH1 bei einer Konzentration von 100 µM Posaconazol (Abb. 25). Dieser Konzentrationsbereich von Posaconazol entspricht jedoch nicht den Serum-Konzentrationen, die bei klinischer Anwendung erreicht werden.

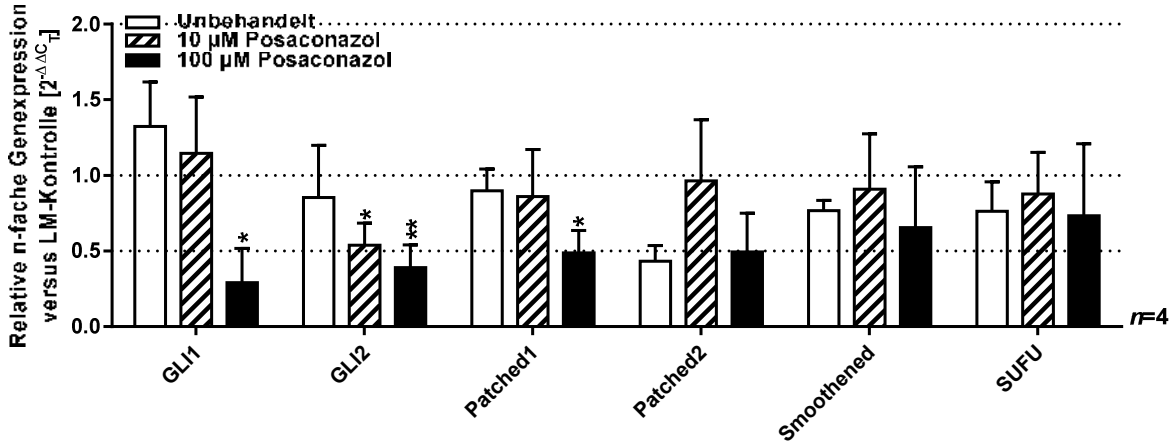


Abbildung 25: mRNA-Expression ausgewählter Hedgehog-Proteine nach Behandlung mit Posaconazol über 24 Stunden.

Die Grafik zeigt die mRNA-Expression in Referenz zur DMSO-Kontrolle und normiert auf die GAPDH-mRNA-Expression von Zellen der Linie LS nach 96-stündiger Behandlung mit Posaconazol in den angegebenen Konzentrationen bestimmt mit Hilfe der qRT-PCR und berechnet nach der $\Delta\Delta C_T$-Methode (Livak und Schmittgen, 2001, Schmittgen und Livak, 2008). Die gepunkteten Linien zeigen die Expressionsniveaus 0,5, 1- und 2-fach der DMSO-Kontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang n=4.

Bei klinisch realistischeren Konzentrationsbereichen von 10 µM zeigte sich für den Transkriptionsfaktor GLI2 eine signifikant verminderte Expression nach 24-stündiger Posaconazol-Behandlung. Weiterführende Untersuchungen mit einer größeren Stichprobe sowie längeren Inkubationszeiten sind notwendig, um eine differenzierte Aussage über die Auswirkung von Posaconazol auf Neuroblastom-Zellen zu treffen.

Die PCR-Arrays Human Cancer Pathway Finder^{TM} und Human Heat Shock Proteins and Chaperones waren zum Zeitpunkt der Projektplanung noch nicht kommerziell verfügbar und wurden daher erst gegen Ende des Promotionsprojektes durchgeführt. Die 96-stündige Inkubation mit 5 µg/mL Nifurtimox zeigte nach der Messung mit Hilfe des Human Cancer Pathway Finder PCR Arrays eine signifikant reduzierte Expression der Gene, SERPINF1, IGFBP5, LDHA, ANGPT1 und SERPINB2 sowie eine signifikant erhöhte Expression der Gene MKI67 und DDIT3 (Abb. 26)

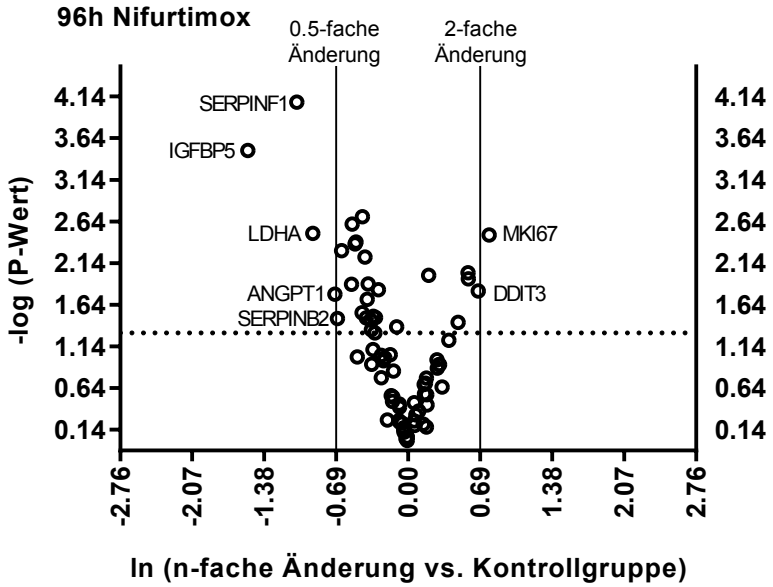


Abbildung 26: mRNA Expressions-Profil nach Nifurtimox-Behandlung mit Hilfe des Human Cancer Pathway Finder Array (Qiagen).
Die Auftragung der Messwerte erfolgt als ln der n-fachen Änderung relativ zur Kontrollgruppe (x-Achse) gegen den negativen dekadischen log der jeweiligen p-Werte. Änderungen < 0,5-fach und > 2,0-fach des Kontrollniveaus wurden als relevant erachtet (durchgezogene Linien im Diagramm); p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet (gestrichelte Linie im Diagramm). Stichprobenumfang $n = 3$.

In Tab. 13 sind jeweils die n-fache Änderung sowie die p-Werte der unter- bzw. überexprimierten Gene angegeben.

Tabelle 13: Übersicht der statistisch signifikanten und relevanten Ergebnisse des Human Cancer Pathway Finder PCR Arrays.

Gen	n-fache Regulation	*p*-Wert
Überexprimiert		
MKI67	2,173	0,003326
PPP1R15A	7,4778	0,000002
Unterexprimiert		
ANGPT1	-2,0192	0,017161
IGFBP5	-4,6526	0,000323
LDHA	-2,4957	0,003187
SERPINF1	-2,9133	0,000085
SNAI3	-2,8283	0,000023

Die Untersuchung der Expression verschiedener Hitzeschockproteine und Chaperone mit Hilfe des Human Heat Shock Proteins and Chaperones Arrays nach 96-stündiger Behandlung mit Nifurtimox zeigte eine signifikant reduzierte Expression der Gene HSF4, HSPA8, DNAJC5G, DNAJC11, BAG1 sowie CCT6B, sowie eine signifikant erhöhte Expression der Gene DNAJB2, HSPA1A, HSPA5, HSP90A1A und DNAJB9 (Abb. 27).

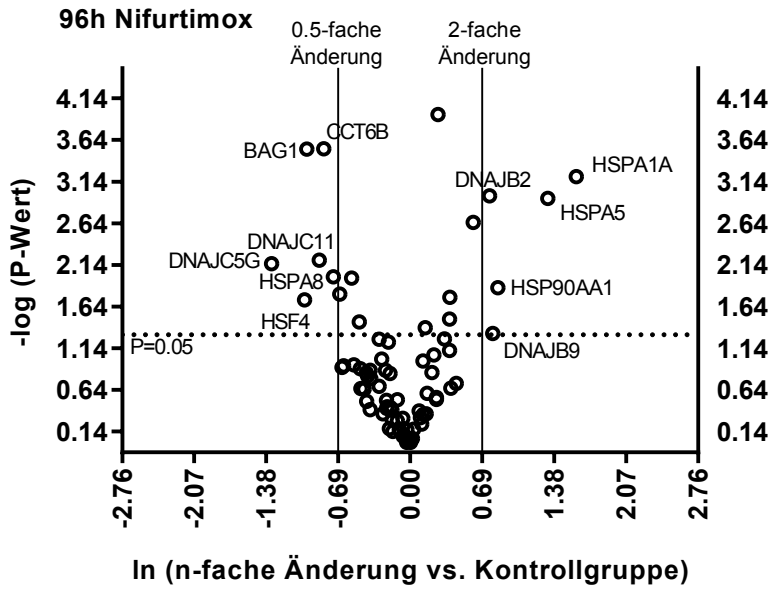


Abbildung 27: mRNA Expressions-Profil nach Nifurtimox-Behandlung mit Hilfe des Human Heat Shock Proteins & Chaperones Array (Qiagen).
Die Auftragung der Messwerte erfolgt als ln der n-fachen Änderung relativ zur Kontrollgruppe (x-Achse) gegen den negativen dekadischen log der jeweiligen p-Werte. Änderungen < 0,5-fach und > 2,0-fach des Kontrollniveaus wurden als relevant erachtet (durchgezogene Linien im Diagramm); p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet (gestrichelte Linie im Diagramm). Stichprobenumfang $n = 3$.

In Tab. 14 sind jeweils die n-fache Änderung sowie die p-Werte der unter- bzw. überexprimierten Gene angegeben.

Tabelle 14: Übersicht der statistisch signifikanten und relevanten Ergebnisse des Human Heat Shock Proteins and Chaperones PCR Arrays.

Gen	n-fache Regulation	p-Wert
Überexprimiert		
DNAJB2	2,1395	0,001074
DNAJB9	2,2092	0,048278
HSP90AA1	2,3212	0,013582
HSPA1A	4,9231	0,000629
HSPA5	3,7442	0,001155
Unterexprimiert		
BAG1	-2,6957	0,000294
CCT6B	-2,2885	0,000293
DNAJC11	-2,3885	0,006368
DNAJC5G	-3,7793	0,007023
HSF4	-2,7491	0,019089
HSPA8	-2,0913	0,010072

Eine detaillierte Erläuterung der Ergebnisse erfolgt im Kap. IV Diskussion.

III.7 Protein-Expression – Western Blot

Die Expression der mRNA wurde nach Nifurtimox-Behandlung für verschiedene Gene bereits gezeigt. Durch Western Blot-Analysen sollte hier die tatsächliche Protein-Konzentration nach Nifurtimox-Behandlung untersucht werden. So zeigte sich, dass der intrazelluläre Gehalt an Hsp70 nach 24-stündiger Behandlung mit 50 µg/mL Nifurtimox signifikant erhöht war für Zellen der Linien IMR-32 und SK-N-SH. Für Zellen der Linien LA-N-1 und LS konnte ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung gegenüber der Lösemittelkontrolle festgestellt werden, jedoch waren diese statistisch nicht signifikant (Abb. 28). Die Untersuchungen der Protein-Level von Hsp90 zeigten lediglich für die Zelllinie LS eine signifikante Erhöhung auf das etwa 7-fache des Hsp90-Levels der DMSO-Kontrolle bei einer Inkubation mit 50 µg/mL Nifurtimox über 24 Stunden. Die Ergebnisse der Inkubationen der anderen Zelllinien waren entweder nicht statistisch signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle oder nicht relevant (< 0,5-fache oder > 2,0-fache Werte im Vergleich zur Kontrolle).

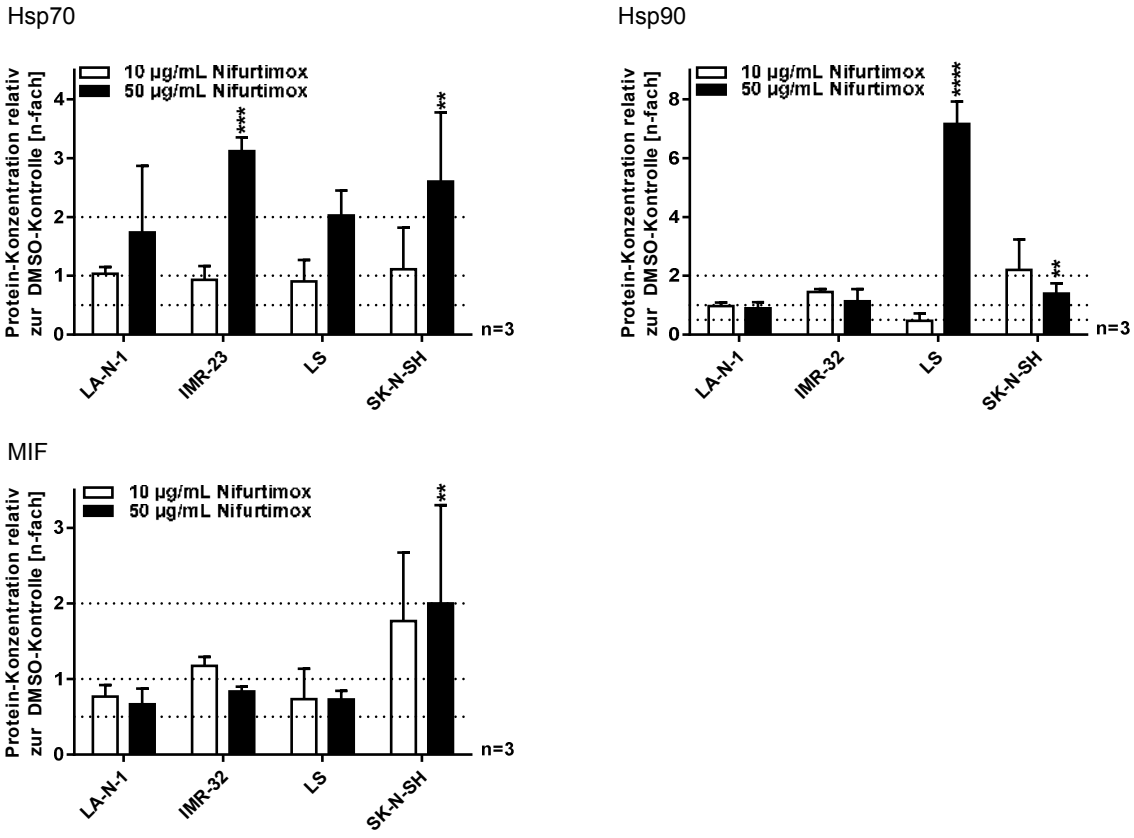


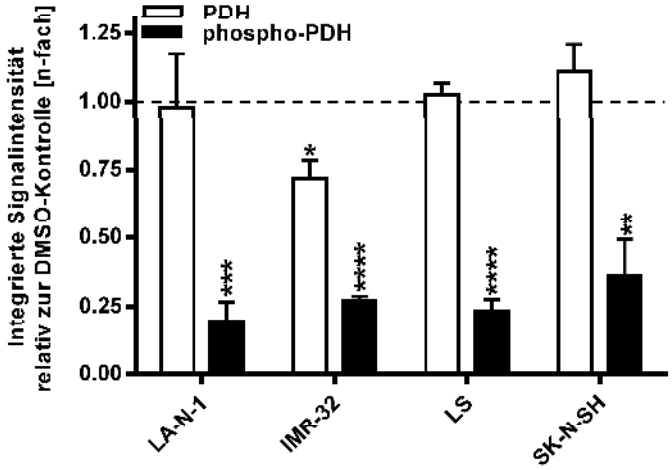
Abbildung 28: Western Blot von Hsp70, Hsp90 und MIF nach Nifurtimox-Behandlung.
Die Grafik zeigt die Protein-Expression von Hsp70, Hsp90 und MIF in Referenz zur DMSO-Kontrolle und normiert auf die GAPDH-Expression von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen. Die gepunkteten Linien zeigen die Expressionsniveaus 0,5, 1- und 2-fach der DMSO-Kontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang $n=3$.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Protein-Levels von MIF zeigten nur für die Inkubation von Zellen der Linie SK-N-SH mit 50 µg/mL Nifurtimox einen statistisch signifikanten Anstieg auf das etwa zweifache des Kontroll-Niveaus.

Der Aktivierungszustand der PDH ist essentiell für die Konversion von Pyruvat. In seiner aktiven unphosphorylierten Form wird Pyruvat durch die PDH zu Acetyl-CoA

verarbeitet, welches anschließend in den Citrat-Zyklus eingeht. In seiner inaktiven phosphorylierten Form findet dieser Prozess nicht statt, sodass die Bildung von Laktat aus Pyruvat indirekt unterstützt wird. Dieser Prozess ist vorherrschend in malignen Zellen und wird auch als „Warburg-Effekt“ bezeichnet (vgl. Kap. I.2.5.3 Aerobe Glykolyse oder der Warburg-Effekt) (Chen et al., 2014). Eine „Re-Aktivierung“ der PDH durch Nifurtimox wäre daher ein wünschenswerter therapeutischer Effekt, da dadurch diese Art des Tumor-Stoffwechsels verhindert würde. Der Gehalt an mitotischer phospho-PDH sowie der unphosphorylierten PDH nach Behandlung mit Nifurtimox wurde mit Hilfe des quantitativen Western Blot bestimmt. Hier zeigte sich für alle Zelllinien eine statistisch signifikante und relevante Reduktion der Protein-Konzentrationen der phospho-PDH nach 4-stündiger Behandlung mit Nifurtimox (Abb. 29).

A



B

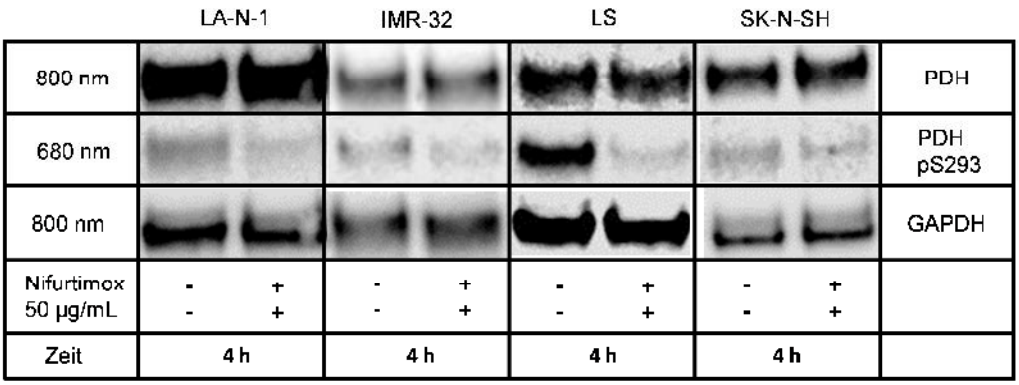


Abbildung 29: Western Blot von PDH und phospho-PDH nach Nifurtimox-Behandlung.

A. Die Grafik zeigt die Protein-Expression von PDH und phospho-PDH in Referenz zur DMSO-Kontrolle und normiert auf die GAPDH-Expression von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 24-stündiger Behandlung mit Nifurtimox in den angegebenen Konzentrationen. Die gepunkteten Linien zeigen die Expressionsniveaus 0,5, 1- und 2-fach der DMSO-Kontrolle. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte + Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Stichprobenumfang $n=3$. B. Die Grafik zeigt beispielhaft einen zusammengefügten Blot mit den jeweiligen Detektionsbalken der untersuchten Proteine bei 680 nm und 800 nm. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

Die Protein-Gehalte der unphosphorylierten PDH waren für die Zelllinien LA-N-1, LS und SK-N-SH entsprechend den Gehalten der DMSO-Kontrolle. Für Zellen der Zelllinie IMR-32 reduzierte sich der Gehalt der unphosphorylierten PDH auf etwa das

0,7-fache des Kontroll-Niveaus.

III.8 Glucose-Verbrauch, Laktat-Produktion und LDH-Aktivität

Der Verbrauch von Glucose und die Produktion von Laktat sind aufschlussreiche Parameter um den Stoffwechsel-Zustand von Tumor-Zellen zu bewerten. Um zu untersuchen, ob Nifurtimox einen Einfluss auf die aerobe Glykolyse von Zellen der verwendeten Zelllinien hat, wurden die Glucose- und Laktat-Konzentrationen nach 4-stündiger Nifurtimox-Behandlung bestimmt. Abb. 30A zeigt den Glucose-Verbrauch aus dem überstehenden Wachstumsmedium der Neuroblastom-Zellen normiert auf die eingesetzte Zellzahl. Für alle untersuchten Zelllinien zeigte sich ein signifikant niedrigerer Glucose-Verbrauch nach Nifurtimox-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Laktat-Produktion war nach Nifurtimox-Behandlung signifikant erhöht für die Zelllinien LA-N-1, IMR-32 und LS, jedoch nicht für die Zelllinie SK-N-SH (Abb. 30B).

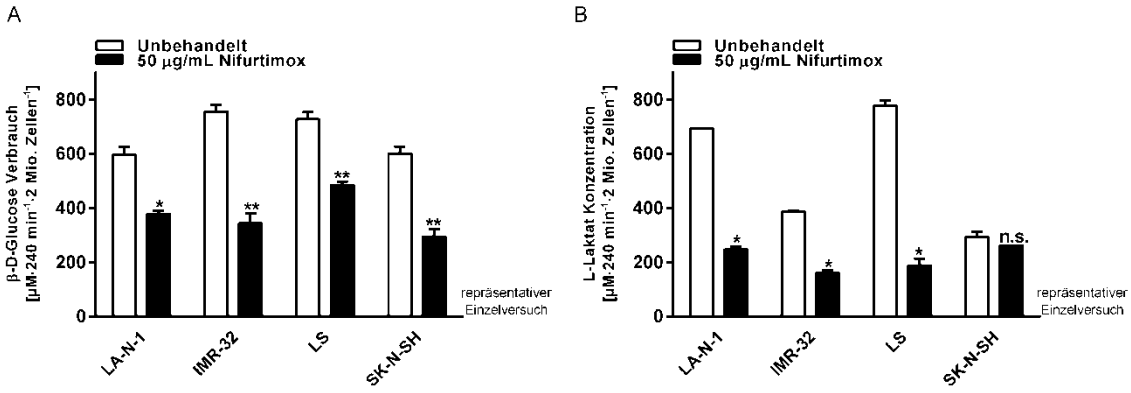


Abbildung 30: Glucose-Verbrauch und Laktat-Bildung nach Behandlung mit Nifurtimox.
Die Abbildung zeigt den Verbrauch von β-D-(+)-Glucose (**A**) oder die Bildung von L-Laktat (**B**) je 4 Stunden aus dem überstehenden Wachstumsmedium nach Inkubation mit Nifurtimox oder Wachstumsmedium alleine, normalisiert auf die eingesetzte Zellzahl. Je drei unabhängige Versuche wurden je in Duplikaten durchgeführt. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Einzelversuch. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

Um zu prüfen, ob der beobachtete niedrigere Glucose-Verbrauch eine direkte Korrelation zur Laktat-Produktion aufweist, wurden für alle Zelllinien Verhältnisse aus verbrauchter Glucose zu produziertem Laktat berechnet (Tab. 15). Das Verhältnis Glucose:Laktat stieg nach Nifurtimox-Behandlung an, sodass davon ausgegangen werden kann, dass weniger Laktat aus derselben Menge Glucose gebildet wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Tabelle 15: Glucose-Verbrauch und Laktat-Bildung nach Behandlung mit Nifurtimox. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

	Unbehandelt			**50 µg/mL Nifurtimox**			**Veränderung Ratio**
	Verbrauchte Glucose [*]	Produziertes Laktat [*]	Ratio Glucose:Laktat	Verbrauchte Glucose [*]	Produziertes Laktat [*]	Ratio Glucose:Laktat	
LA-N-1	596	694	**1:1.16 or 0.86**	378	247	**1:0.65 or 1.53**	↑
IMR-32	756	386	**1:0.51 or 1.96**	343	161	**1:0.47 or 2.13**	↑
LS	728	776	**1:1.07 or 0.94**	485	188	**1:0.39 or 2.56**	↑
SK-N-SH	601	293	**1:0.49 or 2.06**	294	262	**1:0.89 or 1.13**	↓

*µM·240 min^{-1}·2 Mio. $Zellen^{-1}$

Diese Beobachtungen wurden allerdings nur für die MYCN-amplifizierten Zelllinien LA-N-1, IMR-32 und LS gemacht. Im Gegensatz dazu sank das Verhältnis bei der MYCN-single copy SK-N-SH nach der Nifurtimox-Behandlung.

Die beobachtete reduzierte Bildung von Laktat nach der Nifurtimox-Behandlung kann unterschiedlich verursacht worden sein. Um zu unterscheiden, ob es sich hierbei um eine direkte Inhibition der Aktivität der LDH oder um eine Änderung des Pyruvat-Metabolismus z.B. durch die Aktivierung der PDH (wie die Ergebnisse des Western Blots der PDH zeigen; vgl. Kap. III.7 Protein-Expression – Western Blot) handelt, wurde die Enzym-Aktivität nach vierstündiger Nifurtimox-Behandlung untersucht.

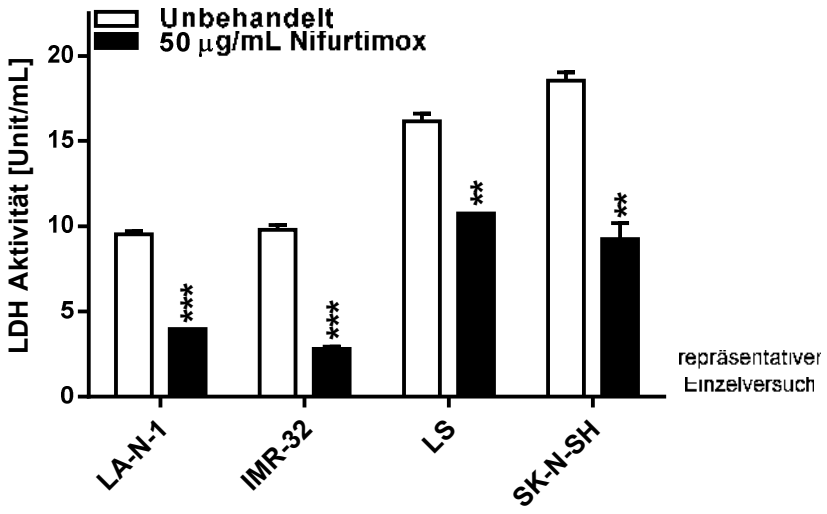


Abbildung 31: LDH-Aktivität nach Nifurtimox-Behandlung.
Die Grafik zeigt die LDH-Enzymaktivität von Zellen der Linien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH nach 4-stündiger Behandlung mit 50 µg/mL oder unbehandelt. Je drei unabhängige Versuche wurden je in Triplikaten durchgeführt. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Einzelversuch. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Probe/Lösemittelkontrolle wurden mit Hilfe eines ANOVA-Testes und nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparisons Test identifiziert, mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ und ****: $p<0.0001$. Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Enzym-Aktivität der LDH in Zellen aller Zelllinien signifikant reduziert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 31). Die Ergebnisse zur Enzymaktivität von LDH, zu Glucose-Verbrauch und Laktat-Produktion sowie zum Western Blot von PDH/phospho-PDH wurden jeweils aus denselben Versuchsansätzen generiert.

IV Diskussion

Durch die hier gewonnen Daten konnten Teile des Wirkmechanismus von Nifurtimox auf Neuroblastom-Zellen charakterisiert werden. Weiterhin konnte erstmals eine zytotoxische Wirkung von Posaconazol auf Neuroblastom-Zellen gezeigt werden.

IV.1 Nifurtimox

IV.1.1 Nifurtimox induziert Zellyzyklus-Arrest und Apoptose

Die zytotoxischen Effekte von Nifurtimox auf Neuroblastom-Zellen und dessen mögliche anti-tumorale Eigenschaften wurden bereits in der Literatur beschrieben (Saulnier Sholler et al., 2011, Saulnier Sholler et al., 2009, Saulnier Sholler et al., 2006). Der genaue Wirkmechanismus dieser Beobachtungen wurde jedoch bislang nur unzureichend erörtert – sowohl in Neuroblastom-Zellen, als auch in seiner eigentlichen Verwendung gegen Trypanosomen. Die bisher allgemein anerkannte Wirkungsweise in Trypanosomen ist die Bildung eines Nitro-Anion-Radikals über die Reduktion der Nitro-Gruppe. In der Folge werden durch das Radikal reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die mit den Zellinhaltsstoffen unter Bildung von Protein-Carbonylen, Fettsäure-Hydroperoxiden und oxidierter DNA reagieren (Maya et al., 2007, Maya et al., 1997). Entgegen dieser Hypothese wurden in der Fachliteratur Zweifel geäußert, ob nicht die Bildung von ROS, sondern vielmehr die Hemmung verschiedener Dehydrogenasen und die Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials den eigentlichen zytotoxischen Effekt von Nifurtimox begründeten (Boiani et al., 2010). Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren nur wenige Veröffentlichungen zur Wirkungsweise von Nifurtimox in Neuroblastomen (Koto et al., 2011, McNeil et al., 2013, Saulnier Sholler et al., 2011, Saulnier Sholler et al., 2009, Saulnier Sholler et al., 2006, Singh et al., 2011a, Singh et al., 2011b).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Übereinstimmung von bereits publizierten Arbeiten, Nifurtimox auch in den hier verwendeten Zelllinien zytotoxisch wirkt und den apoptotischen Zelltod vermittelt (Saulnier Sholler et al., 2009).

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit an elf verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien, konnten IC_{50}-Werte (mittlere inhibitorische Konzentration) nach 72-stündiger Behandlung zwischen 20 und etwa 150 µM Nifurtimox im überstehenden Medium bestimmt werden. In Bezug auf die Zellvitalität entsprechen diese Erkenntnisse denen der vorliegenden Arbeit, mit einem stärkeren Ansprechen der Zelllinie IMR-32 auf die Behandlung mit Nifurtimox im Vergleich zur Zelllinie SK-N-SH (IC_{50} IMR-32: 30 µM; IC_{50} SK-N-SH: 82 µM). Weiterhin konnte anhand der intrazellulären Konzentrationen der gespaltenen poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP1) gezeigt werden, dass die Nifurtimox-Behandlung zwischen 25 µM und 200 µM über 72 Stunden zu einer apoptotischen Vermittlung des Zelltodes führt (Du et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass durch die Nifurtimox-Behandlung der Anteil an Zellen, die sich in der Phase G_2/M befinden, signifikant steigt. Folglich bedeutet dies, dass der G_2/M-Checkpoint nach der Nifurtimox-Behandlung nicht überwunden wird. Bedingungen für die Überwindung des Checkpoints sind z.B. die vollständige Replikation des Genoms und eine ausreichende Zellgröße. Weiterhin ist für den G_2/M-Übergang die Aktivierung des Cyclin B/CDK1-Komplexes notwendig (Porter und Donoghue, 2003). Durch Schädigungen der DNA, wie z.B. hier durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Nifurtimox, kann der G_2/M-Übergang blockiert werden (Hseu et al., 2012, Wagener und Müller, 2009). Untersuchungen von O_2/O_3 (molekularer Sauerstoff und Ozon) als Therapie-Modell an der Neuroblastom-

Zelllinie SK-N-SH konnten zeigen, dass es durch die Behandlung mit diesen aktiven Sauerstoff-Formen zu einer reduzierten Bildung und Aktivität sowie zu einer veränderten Lokalisation des Cyclin B/CDK1-Komplexes kommt, unter Verbleib der Zellen in der G_2-Phase (Cannizzaro et al., 2007). Untersuchungen an CGNP-Zellen (cerebellar granule neuron precursor) der Maus konnte gezeigt werden, dass der aktive Cyclin B/CDK1-Komplex für die Phosphorylierung des GSK-3β-Motivs von N-Myc zuständig ist. Dadurch kann keine IGF-(insulin like growth factor)-abhängige Stabilisierung von N-Myc mehr stattfinden und es kommt zur Degradierung von N-Myc. Dieser Prozess ist notwendig für den Austritt aus dem Zellzyklus und die anschließende Ausdifferenzierung der CGNP-Zellen (Sjostrom et al., 2005). Eine Kombination aus G_2/M-Zellzyklus-Arrest und verminderter Expression von MYCN-mRNA konnte bei der Behandlung von Neuroblastom-Zellen mit Rutin gezeigt werden (Chen et al., 2013). Eine Nifurtimox-vermittelte Regulation der CDK1-Aktivität oder -Funktion wäre denkbar, jedoch müsste dies in weiterführenden Untersuchungen näher erörtert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Nifurtimox die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies induziert, allerdings erst in höheren Dosierungen und nach viel längeren Inkubationszeiten, als erwartet wurde. Der erste messbare signifikante Anstieg an intrazellulären ROS wurde erst nach etwa acht Stunden beobachtet (Zelllinie LS; Daten nicht gezeigt), was nicht für die direkte Bildung radikalischer Spaltprodukte von Nifurtimox spricht. Diese radikalischen Prozesse müssten unmittelbar nach der intrazellulären Aufnahme und der reduktiven Spaltung durch die Nitroreduktase zu beobachten sein.

Es wurden Anstrengungen unternommen, die Aufnahmezeiträume und intrazellulären Konzentrationen von Nifurtimox in die Neuroblastom-Zellen zu bestimmen, um grob

einschätzen zu können, zu welchem Zeitpunkt metabolische oder molekularbiologische Reaktionen zu erwarten sind. Hierzu wurden große Zellkultur-Ansätze inkubiert und anschließend die zytosolische Fraktion isoliert. Anschließend sollte eine Konzentrations-Bestimmung von Nifurtimox im Rahmen einer HPTLC (high performance thin layer chromatography)-MS (Massenspektrometrie)-gekoppelten Analyse erfolgen. Nifurtimox konnte hier ab einer Gesamtmenge von 32 ng/10 µL quantitativ bestimmt werden. Die größten durchgeführten Versuchsansätze, die noch ökonomisch vertretbar waren, wurden auf 75 cm^2 Wachstumsfläche und in 10 mL Medium mit 25 µg/mL Nifurtimox (Gesamtmenge Nifurtimox: 250 µg) über 48 Stunden durchgeführt. Das kleinste Volumen, zu dem die zytosolische Fraktion lysiert werden konnte, waren 2000 µL. Um noch über der HPTLC-Nachweisgrenze zu liegen, müssten in diesen 2000 µL noch insgesamt 6,4 µg Nifurtimox vorliegen. Dies entspräche einer Aufnahme von etwa 2,6% Nifurtimox aus dem überstehenden Medium (ohne die Verluste bei der Aufreinigung gerechnet). Leider konnten bislang keine Nifurtimox-Konzentrationen mit Hilfe der HPTLC-MS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). An der Etablierung der Methode wird weiterhin gearbeitet.

Es wird vermutet, dass die Bildung der ROS vielmehr durch die vermehrt stattfindende oxidative Phosphorylierung verursacht wird. In den Versuchsansätzen wurde tert-Butyl-Hydroperoxid als Positivkontrolle verwendet. Hier wurden im DCF-Assay signifikant höhere intrazelluläre Gehalte an ROS gemessen, bei gleichzeitig geringerer Zellschädigung im Vergleich zu den Nifurtimox-Ansätzen mit den höchsten erzielten ROS-Messwerten (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die Bildung radikalischer Sauerstoffspezies nicht der einzige oder dominierende Effekt von Nifurtimox auf die Neuroblastom-Zellen sein kann. Die z.B. fluorimetrische Bestimmung von Acetyl-CoA könnte zur Aufklärung

dieser Hypothese beitragen.

IV.1.1 Nifurtimox reduziert die Expression von MYCN

Einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für die Risiko-Stratifizierung von Neuroblastom-Erkrankungen ist nach wie vor das Vorliegen einer MYCN-Amplifikation. Durch die Amplifikation kommt es zu einer signifikant erhöhten Transkription von Genen, die die Tumor-Proliferation und -Angiogenese, sowie (anti-)apoptotische Prozesse maßgeblich steuern (Huang und Weiss, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nifurtimox die intrazellulären Konzentrationen von MYCN-mRNA, sowie von N-Myc signifikant reduziert, was neben der Bildung von ROS (durch die angenommene vermehrt stattfindende oxidative Phosphorylierung), potentiell auch zum Zellzyklusarrest beitragen könnte.

Bis heute sind nur wenige Agenzien bekannt, die die Transkription von MYCN (z.B. Bromo-Domäne BET Inhibition (Puissant et al., 2013)), die Expression von N-Myc (z.B. cis-Retin-Säure), die onkogene Stabilisierung von N-Myc (z.B. Aurora A kinase) oder die DNA-Bindungseigenschaften von N-Myc mit Max (z.B. Omomyc) beeinflussen (Barone et al., 2013). Die Behandlung mit Nifurtimox stellt daher eine weitere Option mit MYCN als therapeutisches Ziel dar, auch wenn die spezifischen Hintergrund-Prozesse damit noch nicht eindeutig geklärt sind.

IV.1.2 Nifurtimox reduziert den „Warburg-Effekt“

N-Myc bildet ebenso wie sein Struktur-Analoges c-Myc heterodimere Komplexe mit dem Myc-associated factor X (Max). Dieser Komplex fungiert als Transkriptionsfaktor verschiedener Proteine, die in der Tumor-Proliferation, Apoptose, Angiogenese und verschiedener metabolischer Prozesse beteiligt sind, wie beispielsweise die Glykolyse-Enzyme Hexokinase 2 (HK2), LDH oder PDK (Kim et

al., 2007). Die PDK inhibiert die mitochondriale Atmung durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung der PDH. Die PDH wiederum katalysiert die Konversion von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Durch die Inaktivierung der PDH wird indirekt die Bildung von Laktat aus Pyruvat durch die LDH bevorzugt. Die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat auch in Gegenwart von Sauerstoff wird als aerobe Glykolyse oder als „Warburg-Effekt“ bezeichnet (Kim und Dang, 2006). Eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung dieser malignen Stoffwechselform spielt der Transkriptionsfaktor HIF-1. Dieser bildet unter hypoxen oder anoxen Bedingungen aktive Komplexe, die die Expression von Genen bedingt, die für die Adaption des Tumors auf genau diese Bedingungen essentiell ist (Stubbs und Griffiths, 2010). Der Subtyp HIF-1α stabilisiert die Myc-vermittelte Gen-Expression und stimuliert vermutlich die Bildung des Heterodimers aus Myc und Max. Dadurch wird wiederum die Expression der o.g. Target-Gene induziert (Huang, 2008). Die Analyse von Zellen aus über 100 primären Neuroblastom-Tumoren zeigte eine signifikant erhöhte Expression von HIF-1α und der Glykolyse-Enzyme LDH, HK2, und Phosphoglycerat-Kinase1 (PGK1) in MYCN-amplifizierten Tumor-Typen im Vergleich zu nicht-amplifizierten. Weiterhin zeigte die shRNA-vermittelte Depletion der LDH-Expression in zwei MYCN-amplifizierten Primär-Zelllinien, eine signifikant reduzierte Zell-Proliferation *in vitro* und ein signifikant vermindertes tumorigenes Potential im Mausmodell (Qing et al., 2010). Die Ergebnisse zeigen demgemäß eine deutliche Abhängigkeit der Malignität von der glykolytischen Leistung des Tumor-Stoffwechsels.

Der pathologisch verstärkte Transport von Glucose in die malignen Zellen und die resultierende vermehrte Laktat-Bildung sind entscheidende Faktoren für das Überleben und die Progression der Tumor-Zellen. Hierdurch kommt es nicht nur zur übermäßigen Produktion von Biomasse, sondern auch zur Azidifizierung es

umliegenden Gewebes durch die Sekretion von Laktat in das Interstitium. Gesundes Gewebe wird durch das saure Milieu zerstört, sodass die Invasion auch über Gewebsgrenzen hinweg erleichtert wird. Zusätzlich wird das Immunsystem durch das saure Milieu gehemmt. Die glykolytischen Enzyme,wie die LDH, sowie die Umkehr des Warburg-Effektes sind damit attraktives Ziel für neue chemotherapeutische Ansätze in der Neuroblastom-Behandlung (Chen et al., 2014).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass es in den MYCN-amplifizierten Neuroblastom-Zellen durch die Behandlung mit Nifurtimox zu einer Veränderung des Glucose-Stoffwechsels kommt, mit einem reduzierten Glucose-Verbrauch und einer reduzierten Laktat-Bildung. Außerdem konnte in diesen Zellen nach Nifurtimox-Behandlung eine reduzierte Laktat-Produktion relativ zum Glukose-Verbrauch nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte die Behandlung von der nicht-MYCN-amplifizierten Zelllinie SK-N-SH den Umkehrfall, was eine Verbindung zwischen N-Myc und der „aeroben Glykolyse“ vermuten lässt. Eine ähnliche Sonderstellung der Linie SK-N-SH wurde jedoch auch in anderen Arbeiten beobachtet. Das auch in der bildgebenden Neuroblastom-Diagnostik verwendete mIBG zeigte modulatorische Eigenschaften in der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung, sowie zytotoxische Eigenschaften z.B. in den MYCN-amplifizierten Zelllinien LS und N1E-115, aber nicht oder signifikant weniger ausgeprägt in der Zelllinie SK-N-SH (Loesberg et al., 1990, Cornelissen et al., 1995a, Cornelissen et al., 1995b, Larcher et al., 1991, Hampel et al., 2014). Auch hier wird die Hypothese unterstützt, dass eine Verbindung zwischen N-Myc und der Glykolyse existiert. Eine Validierung der Ergebnisse mit weiteren nicht-amplifizierten Neuroblastom-Zelllinien wäre notwendig, jedoch schwer umsetzbar. Leider existieren nur wenige kommerziell erhältliche nicht-MYCN-amplifizierte Neuroblastom-

Zelllinien, und diese sind meist stabil mutierte Tochter-Linien der Linie SK-N-SH.

Die LDH-Enzym-Aktivität war nach 4-stündiger Nifurtimox-Behandlung in Zellen aller Neuroblastom-Zelllinien signifikant reduziert. Diese Beobachtung stützt die Vermutung von Boiani et al., dass zumindest in Trypanosomen der Effekt von Nifurtimox hauptsächlich durch die Inhibition der Dehydrogenasen bedingt ist und weniger durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Boiani et al., 2010). In einem *in vivo*-Modell mit MYCN-amplifizierten Zelllinien verursachte die Depletion von LDH eine Inhibition der Tumorigenese. Diese Zelllinien wurden daher als „abhängig" von der LDH-Aktivität beschrieben (Qing et al., 2010). Ein ähnlicher Effekt durch die Behandlung mit Nifurtimox scheint daher denkbar. Die Untersuchungen in der qRT-PCR zeigten zudem eine verringerte Expression der LDH auf transkriptionaler Ebene nach 96-stündiger Behandlung mit Nifurtimox. Ob die verringerte intrazelluläre Produktion von LDH nun auf die direkte Inhibition der Enzymaktivität, das Expressionsniveau oder anderer vorgeschalteter Prozesse, wie die Aktivität der PDH zurückzuführen ist, lässt sich an Hand der vorliegenden Daten nicht entscheiden.

Der Gehalt an mitochondrialer phosphorylierter PDH war signifikant reduziert nach der Behandlung mit Nifurtimox. Der unphosphorylierte Zustand gilt als die aktive Form der PDH, in der die Konversion von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A möglich ist. Diese beiden beobachteten Prozesse, die Reduktion der inaktiven Form der PDH, sowie die Inaktivierung der LDH, verringern also den pathologischen Metabolismus der Tumor-Zellen (Bildung von Laktat aus Pyruvat) unter Förderung der oxidativen Phosphorylierung (Bildung von Acetyl-Coenzym A aus Pyruvat),die in gesunden Zellen in Gegenwart von Sauerstoff stattfindet.

Ein signifikant erhöhtes Expressions-Niveau des Transkriptionsfaktors HIF-1α in

MYCN-amplifizierten Neuroblastom-Zelllinien wurde gezeigt (Qing et al., 2010). HIF-1α interagiert mit dem Proto-Onkogen c-Myc unter Induktion der Expression der PDK1 (Pyruvat-Dehydrogenase Kinase Isoenzym 1), die wiederum die Phosphorylierung der PDH katalysiert (Qing et al., 2010). Demgemäß wird die Laktat-Produktion indirekt unterstützt (Huang, 2008). Wie oben beschrieben stützt HIF-1α die Myc-vermittelte Expression von Target-Proteinen. Damit ließe sich eine Verbindung zwischen der erniedrigten Expression von N-Myc und dem verminderten Vorliegen von phosphorylierter PDH nach Nifurtimox-Behandlung herstellen.

Das Pyruvat-Analogon Dichloracetat (DCA) versursacht konformationelle Änderungen sowohl der Lipoylbindestelle als auch der Nucletoidbindestelle der PDK und hemmt dadurch deren Aktivität. In der Folge liegt die PDH vermehrt in ihrer unphosphorylierten, also aktiven, Form vor. Experimente an Tumormodellen *in vivo* und *in vitro* konnten zeigen, dass durch DCA eine verminderte Laktat-Ausschüttung nach DCA-Behandlung stattfindet. Das therapeutische Potential von DCA in der Tumortherapie wurde daher vielfach untersucht (Tran et al., 2016). In Neuroblastom-Modellen *in vitro* konnte zwar eine Änderung der Laktat-Produktion nach DCA-Behandlung festgestellt werden, jedoch zeigten sich keine signifikanten Änderungen bezüglich Zellvitalität, Proliferation oder Apoptose (Niewisch et al., 2012). In einem murinen Tumor-Modell zeigte sich, dass die Behandlung von Neuro-2a-Tumoren mit DCA sogar zu einer Tumor-Progression führte. *In vitro*-Untersuchungen desselben Tumortyps konnten einen Einfluss auf die PDH-Aktivität durch DCA-Behandlung nicht belegen (Feuerecker et al., 2015). Da für unterschiedliche Tumor-Entitäten eine therapeutische Wirkung von DCA nachgewiesen werden konnte, scheint die Suszeptibilität des Tumors gegenüber einer DCA-Behandlung individuell von den Tumor-Charakteristika abzuhängen (Feuerecker et al., 2015, Tran et al., 2016).

Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um Inhibitoren der PDK im Hinblick auf eine Änderung der Glykolyse-Prozesse zu evaluieren.

Publizierte Studien, insbesondere auch in den letzten beiden Jahren zeigen, dass die Reprogrammierung des Glucose-Stoffwechsels und die Umkehr des Warburg-Effekts hin zur oxidativen Phosphorylierung weiterhin ein vielfach diskutiertes und attraktives Ziel in der Entwicklung neuer Therapie-Strategien in der onkologischen Forschung bleibt (Chen et al., 2015, Li und Zhang, 2016, Ngo et al., 2015, Olson et al., 2016, Sheng und Tang, 2016, Vatrinet et al., 2015, Yu et al., 2016).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Nifurtimox einen signifikanten Effekt auf die Umkehr des pathologischen Prozesses der aeroben Glykolyse hin zu der normalen oxidativen Phosphorylierung hat. Die exzessive Produktion von Biomasse, die im Rahmen des Tumor-Stoffwechsels stattfindet, wird dadurch behindert, und der apoptotische Zelltod induziert. Die direkte Vermittlung radikalischer Prozesse durch die reduktive Aktivierung von Nifurtimox trägt vermutlich zum zytotoxischen Potential bei, bedingt aber vermutlich nicht seine vorherrschende anti-tumorale Eigenschaft.

Anhand der Ergebnisse wird der in Abb. 32 schematisch gezeigte Wirkmechanismus vorgeschlagen: Durch Nifurtimox kommt es zu einer Verringerung der Expression des Transkriptionsfaktors N-Myc. In der Folge kommt es zu einer verringerten Kinase-Aktivität (z.B. transkriptionell bedingt) der PDK, wodurch es zu einer reduzierten Phosphorylierung der PDH kommt. Die damit bevorzugt in der unphosphorylierten, aktiven Form vorliegende PDH konvertiert Pyruvat zu Acetyl-CoA unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowie einer Verringerung der Bildung von Laktat aus Pyruvat. Diese „Re-Programmierung“ führt schließlich zum apoptotischen Untergang

der Tumor-Zellen.

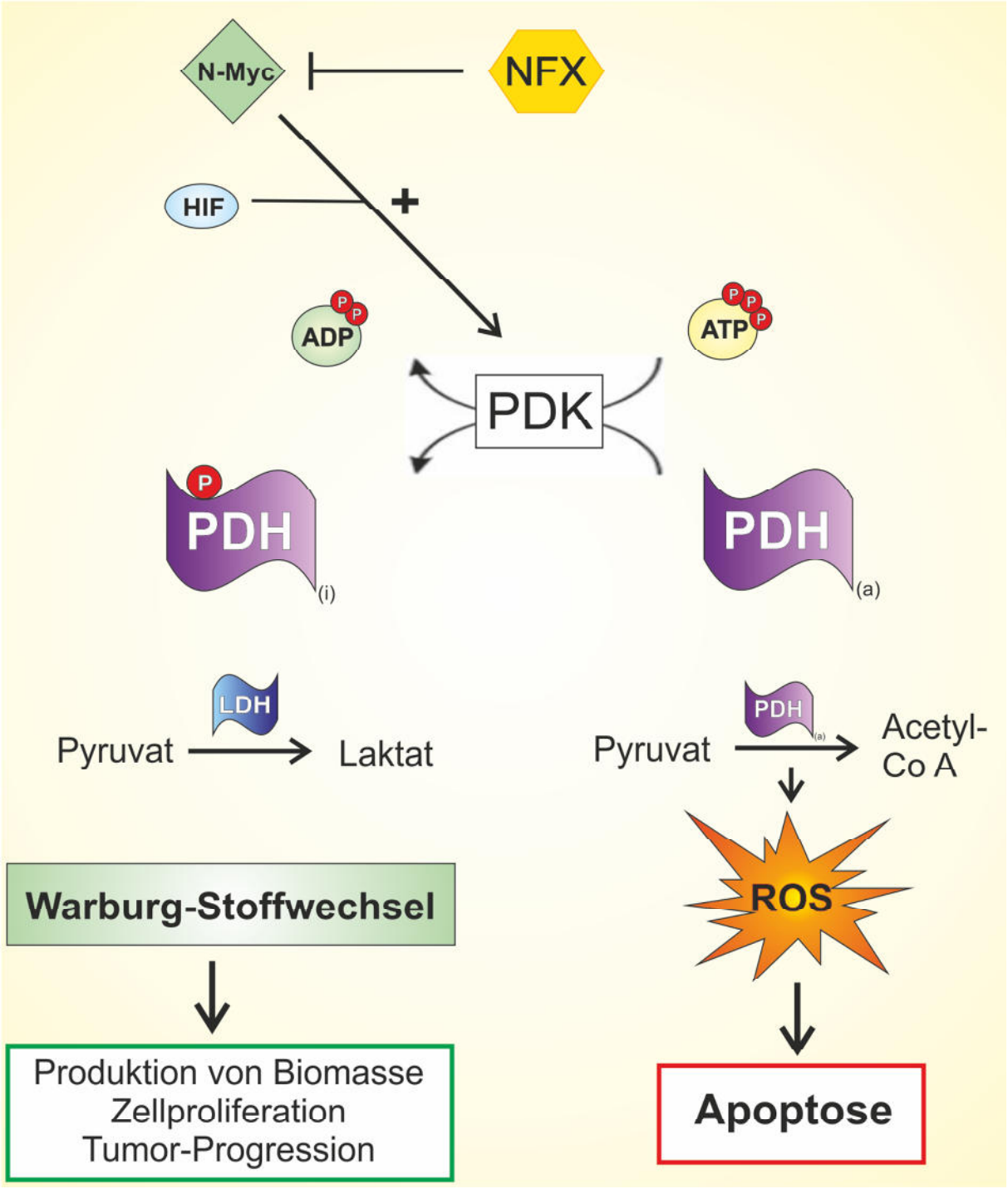


Abbildung 32: Vorgeschlagener Mechanismus der Auswirkung von Nifurtimox auf den Zellstoffwechsel. (a): aktiver Zustand; Acetyl-Co A: Acetyl-Coenzym A; ADP: Adenosin-Diphosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; HIF: Hypoxia-inducible factor 1α; (i): inaktiver Zustand; LDH: Laktat-Dehydrogenase; NFX: Nifurtimox; P: Phosphat-Rest; PDH: Pyruvat-Dehydrogenase; PDK: Pyruvat-Dehydrogenase Kinas; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; Teile der Ergebnisse wurden publiziert in (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis LLC, Philadelphia PA, USA.

IV.1.3 Kombinationen mit Nifurtimox

Die Daten aus der Literatur und die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass Nifurtimox die Bildung von ROS in Neuroblastom-Zellen induziert. Im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens sollte das Potential der Inhibition der DNA-Reparatursystems Topoisomerase I sowie der endogenen Zellschutzmechanismen (Hsp70, Hsp90 und SOD1) untersucht werden, um mögliche synergistische Effekte des kombinierten Einsatzes mit Nifurtimox zu erzielen.

Die Topoisomerase I selbst ist für die Entspiralisierung von Supercoils der DNA bei der Replikation oder Transkription zuständig. Sie verursacht dabei Einzelstrangbrüche, die sie bei der Entfernung von der DNA wieder repariert. Inhibitionen der Topoisomerase I führen zu Unterbrechungen des DNA-Strangs und beeinflussen damit alle DNA-abhängigen Prozesse, insbesondere Reparatur der DNA (Frank, 2004, Fuchs, 2012). Sie werden daher als Begleit-Medikationen bei der Chemotherapie eingesetzt um die Reparatur der durch die Therapeutika entstandenen DNA-Schäden in der Tumor-Zelle zu verhindern (Basili und Moro, 2009). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Kombination aus Nifurtimox und Topotecan einen additiven bzw. synergistischen Effekt hinsichtlich der Zytotoxizität der Behandlung gegenüber der Behandlung mit beiden Agenzien alleine aufweist. Damit wäre *in vitro* eine Dosisreduktion beider Medikamente bei gleichbleibendem therapeutischem Effekt möglich. Zur Bewertung dieser Ergebnisse müssten Versuche im Tiermodell bzw. in einer klinischen Untersuchung durchgeführt werden. Aktuell wird eine multizentrische klinische Studie mit Topotecan und Nifurtimox an pädiatrischen Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastom durchgeführt (Saulnier Sholler, 2008b).

Durch die Inhibition der SOD1 mit TETD sollte eine Entgiftung des durch Nifurtimox

entstandenen oxidativen Stresses verhindert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Zellen der beiden Zelllinien LS und IMR-32 ein größeres Ansprechen auf die Nifurtimox-TETD-Behandlung aufweisen, als die anderen verwendeten Zelllinien. Gleichzeitig zeigten sich für LS und IMR-32 in den DCF-Versuchen, dass für sie die absolute Bildung von ROS nach Nifurtimox-Behandlung am größten war im Gesamtvergleich. TETD hemmt den Abbau von ROS, sodass anhand dieses Versuches nachvollziehbar ist, dass die zytotoxische Wirkung von Nifurtimox auch durch die Bildung von ROS vermittelt wird. In Anbetracht der Ergebnisse für die Einzelbehandlung mit TETD oder Nifurtimox alleine im Vergleich mit der Nifurtimox-TETD-Kombinationstherapie wird jedoch deutlich, dass die Bildung von ROS nicht der vorherrschende oder alleinige zytotoxische Effekt von Nifurtimox zu sein scheint. Lediglich für die Zelllinien LS und LA-N-1 ist die Kombination beider Therapeutika effektiver, als die Einzelsubstanzen bei gleicher Dosierung alleine.

Untersuchungen an der katecholaminergen Neuroblastom-Zelllinie SK-SY5Y konnten zeigen, dass es durch die TETD-vermittelte Hemmung der ALDH zu einer Akkumulation von 3,4-Dihydroxyphenylaldehyd (DOPAL) kommt, welchem die Zytotoxizität maßgeblich zugeschrieben wurde. Für TETD wurde dabei die IC_{50} zu 0,7 µM über 24 Stunden bestimmt (Legros et al., 2004). Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die in der o.g. Arbeit verwendete Zelllinie SK-SY5Y geht aus einer stabilen genetischen Modifikation der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie SK-N-SH hervor (Thiele, 1998). Im Vergleich konnte die Behandlung von SK-N-SH mit 5 µM TETD (also etwa dem 10-fachen der o.g. Dosis) über 24 Stunden einen Vitalitätsverlust von lediglich 10-15 % erzielen. Eine Begründung dafür kann aktuell nicht gegeben werden. Der Wirkmechanismus von TETD in Neuroblastom-Zelllinien kann jedoch über die Inhibition der ALDH in den hier verwendeten Zelllinien

angenommen werden. Eine Kombination von TETD und Nifurtimox in der klinischen Anwendung scheint daher – trotz des hier nicht eindeutig nachgewiesenen synergistischen Effektes – denkbar. Die Effektivität und Sicherheit dieser Kombination muss jedoch in weiterführenden *in vivo*- und klinischen Studien untersucht werden.

Die Behandlung mit den HSP-Inhibitoren Pifithrin-μ und 17-DMAG zeigten in Kombination signifikante Reduktionen der Zellvitalität für Zellen aller verwendeten Zelllinien bei Inkubationen mit Konzentrationen von jeweils 5 bis 10 μM über 24 Stunden. Dies konnte bereits für die Kombinations-Behandlung von Blasenkrebs-Zellen *in vitro* beobachtet werden. Hier konnte außerdem gezeigt werden, dass die Kombination aus Hsp70- und Hsp90-Inhibition maßgeblich das invasive Potential von Blasenkrebszellen reduziert. Auch hier zeigte die kombinierte Inhibition der beiden HSP einen additiven Effekt im Vergleich zur Einzelbehandlung. Dies wurde auf die unterschiedliche Störung zentraler Signalwege durch beide Inhibitoren zurückgeführt (Cavanaugh et al., 2015).

Für die Kombination der Hsp90-Inhibition mit 17-DMAG mit Nifurtimox am Beispiel der Zelllinie LA-N-1 konnte beobachtet werden, dass die Zellvitalitäten nach der kombinierten Behandlung tendenziell höher waren, als mit Nifurtimox alleine. Dies scheint zunächst paradox, da angenommen wurde, dass die Inhibition von Hsp90 die Auswirkungen der ROS-vermittelten Schäden durch Nifurtimox noch verstärkt. In einem Atherosklerose-Modell konnte *in vitro* sowie in $ApoE^{-/-}$-Mäusen *in vivo* gezeigt werden, dass die Behandlung mit 17-DMAG zu einem erniedrigten ROS-Level führt. Erklärt wurde diese Beobachtung durch mehrere Effekte, die die Hsp90-Inhibition zur Folge hat. Die Hsp90-Inhibition führt zu einer Regulation des MAPK-Signalweges bei dem die TNF-α-vermittelte Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 reduziert und diese

damit inaktiviert wird. Dadurch kommt es zu einer verminderten Bildung von ROS. Weiterhin wurde gezeigt, dass 17-DMAG die NADPH-Oxidase inhibiert, die maßgeblich für die Bildung von ROS in Gefäßzellen verantwortlich ist. Die Inhibition von Hsp90 führte zudem zu einer Induktion der Expression von HSP27 und insbesondere HSP70 (Madrigal-Matute et al., 2012). Antioxidative Eigenschaften von Hsp70 konnten durch einen HSP70-knockdown ebenfalls gezeigt werden (Okada et al., 2004). Die Reduktion des intrazellulären ROS-Levels nach HSP-Inhibitor-Behandlung in Neuroblastom-Zellen könnte weiterführend in einem DCF-Assay untersucht werden. Die Induktion der Expression von HSP70 und HSP90 durch eine Pifithrin-μ bzw. 17-DMAG Behandlung konnte in der vorliegenden Arbeit für die Neuroblastom-Zelllinie LS gezeigt werden.

Mit dem Hsp70-Inhibitor Pifithrin-μ konnte in Kombination mit Nifurtimox für die Zelllinie SK-N-SH ein signifikanter, additiver Effekt erreicht werden. So führte die Kombination beider Wirkstoffe (5 μM Pifithrin-μ und 10 μg/mL Nifurtimox) zu einem Nachweis von 1% lebender Zellen. Für die Zelllinie LS konnte zwar die Vitalität durch die Kombinationsbehandlung signifikant reduziert werden, jedoch konnte kein statistisch signifikanter additiver Effekt der Kombination beider Wirkstoffe nachgewiesen werden.

Bislang gibt es keine publizierten Arbeiten über die klinische oder präklinische Anwendung von Pifithrin-μ (Stand: November 2017). Klinische Studien der Phasen I und II zur Anwendung von 17-DMAG in Patienten mit malignen Erkrankungen wurden durchgeführt (Aregbe et al., 2012, Jhaveri et al., 2012, Kummar et al., 2010, Lancet et al., 2010, Pacey et al., 2011, Ramanathan et al., 2010, Shadad und Ramanathan, 2006).

IV.1.4 Hedgehog-Signalweg

Die Sequenzierung möglicher betroffener Gene nach der Behandlung mit Nifurtimox zeigten weitere Charakteristika seiner Wirkungsweise und ermöglichen dadurch potentiell einen gezielteren Einsatz von Nifurtimox in Kombination mit klinisch angewandten Chemotherapeutika.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von GLI1 – einem der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Hedgehog-Signalweges – durch die Behandlung mit Nifurtimox signifikant reduziert werden konnte. Als wichtiger Transkriptionsfaktor der Embryogenese führt GLI1 durch Bindung an die DNA zur Expression von GLI1 selbst, sowie weiterer Gene, die an Zellwachstums- und Proliferationsprozessen beteiligt sind. Es ist bekannt, dass der Hedgehog-Signalweg in Neuroblastomen pathologisch konstitutiv aktiviert ist und es damit keiner Aktivierung durch die Liganden Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) oder Desert Hedgehog (Dhh) bedarf, wie es im Verlauf der Embryogenese erforderlich ist (Ruan et al., 2016, Wickstrom et al., 2013). Durch die dauerhafte Aktivierung kommt es zu einer übermäßigen Produktion von Biomasse und insbesondere auch zur Expression des Proto-Onkogens MYCN (Pasca di Magliano und Hebrok, 2003). Zu den Initiatoren des Hedgehog-Signalweges gehört das Protein Smoothened (Smo), welches nach Bindung eines Hedgehog-Proteins an das membranständige Protein Patched (Ptch1) in das primäre Zilium einwandert und dadurch die Signalkaskade mit Bindung der Transkriptionsfaktoren (z.B. Gli1) an die DNA. In den letzten Jahren wurde versucht, die Signalweiterleitung auf Ebene des Proteins Smo mit Hilfe von sogenannten Small Molecules (z.B. Cyclopamin oder SANT1) zu unterbinden, jedoch zeigte sich *in vivo* recht schnell eine Resistenzbildung (Scales und de Sauvage, 2009). Die Inhibition auf Gli1-Ebene scheint nach neusten Ergebnissen effektiver (Wickstrom et al., 2013,

Nayak et al., 2016, Shahi et al., 2011). Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die zuvor beobachtete Reduktion der Expression von MYCN vermutlich durch die verminderte Expression von GLI1 verursacht wird. Eine Verbindung zwischen dem Warburg-Metabolismus und dem Hedgehog-Signalweg scheint es über die Pyruvat-Kinase M2 (PKM2) zu geben. Die Pyruvat-Kinase übernimmt den letzten Schritt der Glycolyse (Phosphoenolpyruvat → Pyruvat) und liefert damit das Edukt für den „Warburg-Stoffwechsel“ (Li et al., 2016). In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PKM2 in HepG2-Zellen zu einer Hochregulation von Gli1 führt, und umgekehrt eine Inhibition der PKM2-Expression mittels siRNA zu einer verminderten Expression von Gli1 führt (Xu et al., 2014).

IV.1.5 HSP und Cancer Pathway Finder

Die qRT-PCR Analyse der Expression der Hitzeschockproteine zeigte die bereits auf Proteinebene beobachtete Hochregulation der HSP-Familien HSP70 und HSP90 (hier: HSPA1A, HSPA5, HSP90A1A). Die beiden HSP-Familien sind konstitutiv erhöht exprimiert in malignem Gewebe und werden als Reaktion auf oxidativen Stress hochreguliert (Gallo et al., 2011, Wang et al., 2014). Durch die Behandlung mit Nifurtimox kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Es wird vermutet, dass es durch den erhöhten oxidativen Stress zu einer verstärkten radikalischen Proteinschädigung kommt. Die Hitzeschockproteine der 70 und 90 kDa Familie kompensieren die Schädigung über den Abbau der stark beschädigten oder Rückfaltung der leicht degradierten Proteine. Die (vor allem simultane) Behandlung mit Hsp70 und Hsp90-Inhibitoren *in vitro* zeigte verbesserte therapeutische Effekte durch additive pro-apoptotische und anti-proliferative Effekte bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (Reikvam et al., 2013). Interessanterweise zeigte sich nach Nifurtimox-Behandlung ebenso eine reduzierte Expression von HSPA8 (Hsc70),

einem weiteren Vertreter der HSP70-Familie. Zum momentanen Zeitpunkt kann hierfür keine Ursache bestimmt werden.

Die Chaperon-Funktion von Hsp70 wird vermittelt über die Co-Chaperone Hsp40 und Bag-1. Durch die Bindung dieser Co-Chaperone an Hsp70 wird die Substratbindung sowie die Bindung des Energieträgers ATP und damit die Proteinfaltungseigenschaft von HSP70 ermöglicht. Bag-1 bindet ebenso spezifisch an die Kinase Raf-1 und aktiviert diese. Raf-1 unterstützt einige Prozesse des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Kommt es vermehrt zu Zellstress und Folge dessen zur Hochregulation von Hsp70, findet eine bevorzugte Bag-1-Hsp70-Komplexbildung statt, sodass Raf-1-vermittelte Kinase-Aktivitäten reduziert stattfinden (King et al., 2001). Die qRT-PCR-Analysen haben gezeigt, dass durch die Behandlung mit Nifurtimox die Expression von Bag-1, sowie Vertreter der 40 kDa HSP Familie (DNAJC11, DNAJC5G) vermindert exprimiert werden. Jedoch wurde ebenso die Expression von Vertretern der 40 kDa HSP Familie (DNAJB2, DNAJB) durch Nifurtimox-Behandlung induziert. Zum momentanen Zeitpunkt ist zu wenig über die spezifische Funktion der einzelnen Co-Chaperone bekannt, um eine differenzierte Einschätzung über die Ursache der unterschiedlichen Expressions-Niveaus zu treffen.

Das Chaperonin CCT6B ist essentiell an der korrekten Faltung der Zytoskelett-Proteine Actin und Tubulin beteiligt (Belousov et al., 2015, Love et al., 2012). Die Nifurtimox-Behandlung verursachte in den hier durchgeführten Experimenten eine reduzierte Expression von CCT6B. In durchlichtmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich im Laufe der Nifurtimox-Behandlung eine Deformation der Zellstruktur (hier nicht gezeigt), was auf die Degradation von Actin und Tubulin zurückzuführen sein könnte. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich keine klare Aussage über die Ursache der reduzierten Expression treffen, da bislang nur sehr wenig über die

molekularbiologische Umgebung von CCT6B in humanem Gewebe bekannt ist (Agarwal et al., 2016, Belousov et al., 2015, Love et al., 2012).

Die Serin-Protease-Inhibitoren SERPINF1 und SERPINB2 wurden nach Nifurtimox-Behandlung reduziert exprimiert (Yabe et al., 2001). SERPINF1 und sein korrespondierendes Protein PEDF werden in der frühen Embryogenese durch die RPE-Zellen (Retinal Pigment Epithelial) synthetisiert und sekretiert. Ebenso wird PEDF in sich entwickelnden und adulten Zellen des Nervensystems exprimiert. PEDF bindet an den Transmembran-Rezeptor PEDF-R. Dadurch kommt es zur Aktivierung der NFκB-Signal-Kaskade, die die Expression von anti-apoptotischen und neuroprotektiven Genen über die Aktivierung von IP3 (Inositol-(1,4,5)-Triphosphat) und der Akt-Kinase bewirkt (Yabe et al., 2001). Auf der anderen Seite ist PEDF in der Lage, pro-apoptotische Prozesse einzuleiten, z.B. über die Aktivierung des Transmembran-Proteins FasL welches mit Caspase 8 und Caspase 7 interagiert (Gong et al., 2014). In Granulosa-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von PEDF durch H_2O_2-vermittelten oxidativen Stress signifikant reduziert wird (Bar-Joseph et al., 2014). Analog dazu könnte die hier beobachtete Reduktion der PEDF-Expression durch die Nifurtimox-vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies stattgefunden haben.

Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen zeigten eine Korrelation zwischen der SERPINB2-Expression und der Chemoresistenz gegenüber Cisplatin. Niedrigere mRNA-Levels an SERPINB2 waren verbunden mit höherer Chemoresistenz und signifikant schlechterer Prognose. Weiterführende *in vitro*-Untersuchungen bestätigten eine funktionelle Rolle von SERPINB2 bei der erworbenen Chemoresistenz gegenüber Cisplatin (Huang et al., 2014). In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine Reduktion der SERPINB2-Expression nach

Nifurtimox-Therapie. Ähnliche Prozesse, wie sie bei der erworbenen Cisplatin-Resistenz in Plattenepithelkarzinomen beobachtet wurden, wären hier denkbar.

Ein hohes Expressionslevel von angiogenen Faktoren wie z.B. Angiopoetin-1 korreliert mit Fortschreiten des Tumorstadiums von Neuroblastomen (Eggert et al., 2000). Die hier beobachtete Reduktion des Expressions-Niveaus von ANGPT-1 nach Nifurtimox-Behandlung verhindert damit potentiell die Vaskularisierung und Angiogenese des Tumors. Sollte sich dieser Effekt von Nifurtimox *in vivo* bzw. in klinischen Studien bestätigen, wäre eine Kombination mit VEGFR-Inhibitoren (z.B. Bevacizumab) sinnhaft.

Das Protein Ki-67 wird als Proliferationsmarker verwendet. Durch immunhistologische Färbungen von Tumormaterial kann Ki-67 spezifisch detektiert und dadurch das Mitosestadium der Zellen identifiziert werden. Sich teilende Zellen, also Zellen in den Mitosephasen G_1, G_2, M und S, weisen Ki-67 im Nucleus auf. In ruhenden Phasen, also in der Mitosephase G_0 kann kein Ki-67 im Kern nachgewiesen werden (Scholzen und Gerdes, 2000). Ki-67 weist oberflächenaktive (surface-active) Eigenschaften im Chromatin auf. Durch sterische und elektrostatische Effekte verhindert Ki-67 die Aggregation der Chromosomen zu einer dichten Chromatin-Masse und ermöglicht damit die Motilität einzelner Chromosomen entlang des Spindelapparates während der Zellteilung (Cuylen et al., 2016). Der Transkriptionsfaktor Sp-1 reguliert die Gen-Expression von Ki-67 (Tian et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Sp-1 durch oxidativen Stress eine höhere Bindungsaffinität an die DNA aufweisen kann. Diese Aktivierung führt in der Folge unter Anderem zur erhöhten Expression von Ki-67 (Ryu et al., 2003, Schafer et al., 2003). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Nifurtimox-Behandlung konnte in den hier durchgeführten Experimenten nachgewiesen werden, was die Induktion

der Expression des Gens MKI67 erklären könnte. Weiterhin zeigte sich, dass sich die Zellen nach Nifurtimox-Behandlung verstärkt in der Zellzyklus-Phase G_2/M, also in der Teilungs-Phase, und weniger in der Phase G_0 befinden (Cabanillas Stanchi et al., 2015). Dies könnte ebenfalls auf die vermehrte Bildung von Ki-67 zurückzuführen sein.

CHOP reguliert die Transkription bestimmter Proteine des Zellzyklus. CHOP inhibiert die DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren C/EBP und LAP durch Heterodimer-Bildung, und führt damit zum Zellzyklusarrest. CHOP wird durch DNA-Schädigungen und Schäden am endoplasmatischen Retikulum aktiviert (Li und Han, 2015, Marwarha et al., 2012). Es wird vermutet, dass die hier beobachtete Induktion der Expression von CHOP (DDIT3) durch die radikalischen Schädigungen durch Nifurtimox begründet liegt. Passend dazu wurde im Rahmen der hier durchgeführten Experimente ein Zellzyklusarrest der Neuroblastom-Zellen nach Nifurtimox-Behandlung beobachtet.

Die in diesen Experimenten erhaltenen Resultate bieten Hinweise auf die Wirkungsweisen von Nifurtimox und könnten durch weiterführende Studien einen gezielten Einsatz von Nifurtimox in Kombination mit den bestehenden in der Neuroblastom-Therapie eingesetzten Chemotherapeutika ermöglichen. Weiterführende Projekte in der Arbeitsgruppe der Kinderklinik Tübingen sind geplant.

IV.2 Posaconazol

Die Untersuchungen zur Zellvitalität nach der Behandlung der Neuroblastom-Zellen mit den Azolen Posaconazol, Itraconazol und Fluconazol sowie den Nifurtimox-Struktur-Analoga Benznidazol und Nitrofurazon haben gezeigt, dass insbesondere Posaconazol hinsichtlich seines zytotoxischen Potentials gegenüber Neuroblastom-

Zellen interessant zu sein scheint. Daher wurden weitere Vorversuche mit Posaconazol durchgeführt um einen Hinweis auf dessen Wirkungsweise zu erhalten und dadurch Grundlagen für weiterführende Projekte zu schaffen.

Der Wirkmechanismus von Posaconazol beruht auf der Hemmung der CYP51A1. Durch die Hemmung von CYP51A1 kann der Pilz, gegen den Posaconazol eingesetzt wird, keine intakte Zellwand mehr bilden und geht zugrunde (Merck Sharp & Dohme, 2003). Die antimykotische Prophylaxe mit Posaconazol bei Kindern nach HSCT, Hochdosis-Chemotherapie und/oder prolongierter Neutropenie wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen im Hinblick auf Sicherheit und Effektivität bereits eingehend untersucht und bewertet (Döring et al., 2014, Döring et al., 2015, Döring et al., 2012).

Sein Struktur-Analoges Itraconazol inhibiert ebenso wie Posaconazol die CYP51A1. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Itraconazol den Hedgehog-Signalweg in verschiedenen Tumor-Entitäten antagonisiert (Kim et al., 2013, Kim et al., 2010). Dieser Wirkmechanismus scheint jedoch unabhängig von der Cholesterin-Biosynthese zu sein und ist eher darin begründet, dass die Akkumulation in das primäre Zilium verhindert wird. Diese Einwanderung geschieht als natürlicher Prozess bei der embryonalen Entwicklung durch Bindung von Hedgehog-Liganden und vermutlich auch bei der konstitutiven Aktivierung des Hedgehog-Signalweges in malignen Geweben. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass höhere Serum-Konzentrationen in den Versuchsansätzen die Signalweg-Inhibition durch Itraconazol blockiert. Die Azole Ketoconazol und Fluconazol wurden ebenfalls hinsichtlich ihres Einflusses auf den Hedgehog-Signalweges getestet. Hier stellte sich heraus, dass die inhibitorische Wirkung von Ketoconazol etwa 10-fach geringer war, als die von Itraconazol. Fluconazol hingegen zeigte auch in 50-fach höheren Dosierungen keine

Wirkung diesbezüglich (Kim et al., 2010). Einhergehend mit diesen Ergebnissen zeigten die hier durchgeführten Untersuchungen mit Fluconazol keine signifikante zytotoxische Wirkung auf Neuroblastom-Zellen.

Aktuelle Studien an Erwachsenen zeigen, dass durch die intravenöse Gabe von Posaconazol (2x300 mg/Tag) mittlere Plasma-Konzentrationen von etwa 2500 ng/mL (Maertens et al., 2014) bzw. bis zu 2840 ng/mL (Kersemaekers et al., 2014) erreicht werden können. Das entspricht etwa 3,6 bis 4,0 µM. Höhere Serumspiegel sind auf Grund der hydrophoben Eigenschaften von Posaconazol schwierig zu erreichen. Das Unternehmen MSD Sharp & Dohme, welches Posaconazol unter dem Handelsnamen Noxafil® herstellt und vertreibt, hat eine Tablette entwickelt, die in einem Hot-Melt-Extruder-Verfahren hergestellt wird. Die Tablette wurde in einer Phase-I-Studie hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik und Sicherheit an erwachsenen Patienten untersucht, mit einer mittleren maximalen Posaconazol Serum-Konzentration von 2090 ng/mL (Merck Sharp & Dohme, 2013). Aktuell wird eine weitere Phase I Studie mit intravenöser Gabe von Posaconazol zur antimykotischen Prophylaxe in immunkompromittierten pädiatrischen Patienten in der Kinderklinik Tübingen durchgeführt (Merck Sharp & Dohme, 2015).

Kürzlich konnte in einem *in vivo*-Modell mit Basal-Zell-Karzinomen eine Inhibition des Hedgehog-Signalweges auf Ebene des Proteins Smoothened durch Posaconazol nachgewiesen werden (Chen et al., 2016).

Die weiterführende Untersuchung der Rolle von Posaconazol in der Behandlung des Neuroblastoms soll im Rahmen eines Forschungsprojektes der Kinderklinik Tübingen im Anschluss an diese Arbeit erfolgen.

V Zusammenfassung

Das Neuroblastom zählt zu den häufigsten soliden Tumoren des Kindesalters und ist bei höhergradigen Stadien mit einer schlechten Prognose und schneller Tumor-Progression assoziiert. Die Amplifikation des Proto-Onkogens MYCN gilt dabei als der wichtigste prognostische Faktor. Sein korrespondierendes Protein N-Myc spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der aeroben Glykolyse. Diese besondere Form des Tumor-Stoffwechsels – auch als Warburg-Effekt bezeichnet – beinhaltet die Konversion von Pyruvat zu Laktat statt zu Acetyl-Coenzym A auch unter aeroben Bedingungen. Dadurch können vermehrt Enzyme und Substrate gebildet werden, die die Tumor-Progression, Angiogenese, Proliferation sowie die Inhibition der Apoptose unterstützen. Das Antiprotozoikum Nifurtimox, das eigentlich in der Behandlung der Chagas-Krankheit verwendet wird, zeigte in ersten Studien zytotoxische Eigenschaften gegenüber Neuroblastomen. Bislang waren jedoch nur wenige Informationen über den spezifischen Wirkmechanismus verfügbar. In der vorliegenden *in vitro* Studie bewirkte die Behandlung der Neuroblastom-Zelllinien LA-N-1, IMR-32, LS und SK-N-SH mit Nifurtimox einen erhöhten intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies, eine reduzierte Laktat-Dehydrogenase-Enzymaktivität und -Expression, sowie eine reduzierte Bildung von Laktat. Weiterhin zeigte sich eine reduzierte Genexpression des Proto-Onkogens MYCN und des Hedgehog-Transkriptionsfaktors GLI. Eine erhöhte Expression der Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Nifurtimox zu einem veränderten Glucose-Stoffwechsel in Neuroblastom-Zellen von der aeroben Glykolyse unter Bildung von Laktat in Richtung oxidative Phosphorylierung führt.

Versuche mit dem Antimykotikum Posaconazol konnten erstmals zytotoxische Wirkungen auf Neuroblastom-Zellen nachweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass Posaconazol den Hedgehog-Signalweg reguliert. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die hier gewonnene Ergebnisse zu evaluieren und die Wirkungsweise von Posaconazol hinreichend zu klären.

In (planaren) Zellkulturbedingungen liegt das Tumor-Modell vielmehr in einer „zweidimensionalen“ Ausdehnung vor, ohne Berücksichtigung metabolischer Prozesse, die in einem gesamten (menschlichen) Organismus stattfinden würden. Rückschlüsse auf biologische Prozesse *in vivo* oder im Patienten bei der Behandlung mit Nifurtimox oder Posaconazol sind daher nur nach eingehender Prüfung im Tiermodell sowie in klinischen Studien möglich. Die klinische Wirksamkeit von Nifurtimox wird aktuell in einer multizentrischen Studie an pädiatrischen Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastomen oder -Medulloblastomen durchgeführt (Saulnier Sholler, 2008a).

Nifurtimox und Posaconazol sind klinisch geprüfte, zugelassene und angewandte Medikamente und präsentieren sich hier als mögliche Kombinations-Chemotherapeutika. Eine Re-Evaluation in klinischen Studien für die Behandlung des Neuroblastoms ist jedoch notwendig, um diese Möglichkeit zu prüfen.

VI Literaturverzeichnis

AGARWAL, A., SHARMA, R., SAMANTA, L., DURAIRAJANAYAGAM, D. & SABANEGH, E. 2016. Proteomic signatures of infertile men with clinical varicocele and their validation studies reveal mitochondrial dysfunction leading to infertility. *Asian J Androl,* 18**,** 282-91.

AREGBE, A. O., SHERER, E. A., EGORIN, M. J., SCHER, H. I., SOLIT, D. B., RAMANATHAN, R. K., RAMALINGAM, S., BELANI, C. P., IVY, P. S. & BIES, R. R. 2012. Population pharmacokinetic analysis of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) in adult patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol,* 70**,** 201-5.

ASEA, A., KRAEFT, S. K., KURT-JONES, E. A., STEVENSON, M. A., CHEN, L. B., FINBERG, R. W., KOO, G. C. & CALDERWOOD, S. K. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med,* 6**,** 435-42.

ATTIYEH, E. F., LONDON, W. B., MOSSE, Y. P., WANG, Q., WINTER, C., KHAZI, D., MCGRADY, P. W., SEEGER, R. C., LOOK, A. T., SHIMADA, H., BRODEUR, G. M., COHN, S. L., MATTHAY, K. K. & MARIS, J. M. 2005. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med,* 353**,** 2243-53.

BAADER, S. L., BRUCHELT, G., CARMINE, T. C., LODE, H. N., RIETH, A. G. & NIETHAMMER, D. 1994. Ascorbic-acid-mediated iron release from cellular ferritin and its relation to the formation of DNA strand breaks in neuroblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol,* 120**,** 415-21.

BAADER, S. L., BRUCHELT, G., HANDGRETINGER, R. & NIETHAMMER, D. 1992. A simple assay for determination of iron release from ferritin in neuroblastoma cells. *J Biochem Biophys Methods,* 25**,** 11-5.

BAR-JOSEPH, H., BEN-AMI, I., RON-EL, R., SHALGI, R. & CHUDERLAND, D. 2014. Pigment epithelium-derived factor exerts antioxidative effects in granulosa cells. *Fertil Steril,* 102**,** 891-898.e3.

BARONE, G., ANDERSON, J., PEARSON, A. D., PETRIE, K. & CHESLER, L. 2013. New strategies in neuroblastoma: Therapeutic targeting of MYCN and ALK. *Clin Cancer Res,* 19**,** 5814-21.

BASILI, S. & MORO, S. 2009. Novel camptothecin derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Expert Opin Ther Pat,* 19**,** 555-74.

BASU, S., BINDER, R. J., SUTO, R., ANDERSON, K. M. & SRIVASTAVA, P. K. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol,* 12**,** 1539-46.

BELOUSOV, P. V., BOGOLYUBOVA, A. V., KIM, Y. S., ABROSIMOV, A. Y., KOPYLOV, A. T., TVARDOVSKIY, A. A., LANSHCHAKOV, K. V., SAZYKIN, A. Y., DVINSKIKH, N. Y., BOBROVSKAYA, Y. I., SELIVANOVA, L. S., SHILOV, E. S., SCHWARTZ, A. M., SHEBZUKHOV, Y. V., SEVERSKAIA, N. V., VANUSHKO, V. E., MOSHKOVSKII, S. A., NEDOSPASOV, S. A. & KUPRASH, D. V. 2015. Serum Immunoproteomics Combined With Pathological Reassessment of Surgical Specimens Identifies TCP-1zeta Autoantibody as a Potential Biomarker in Thyroid Neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab,* 100**,** E1206-15.

BERG, J. M., HELD, A., STRYER, L., LANGE, C., MAHLKE, K., MAXAM, G., SEIDLER, L., ZELLERHOFF, N., HÄCKER, B. & JAROSCH, B. 2015. *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg.

BIEDLER, J. L., HELSON, L. & SPENGLER, B. A. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res,* 33**,** 2643-52.

BOIANI, M., PIACENZA, L., HERNANDEZ, P., BOIANI, L., CERECETTO, H., GONZALEZ, M. & DENICOLA, A. 2010. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against Trypanosoma cruzi: is oxidative stress involved? *Biochem Pharmacol,* 79**,** 1736-45.

BRECHBIEL, J., MILLER-MOSLIN, K. & ADJEI, A. A. 2014. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer. *Cancer Treat Rev,* 40**,** 750-9.

BRODEUR, G. M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer,* 3**,** 203-16.

BRODEUR, G. M., PRITCHARD, J., BERTHOLD, F., CARLSEN, N. L., CASTEL, V., CASTELBERRY, R. P., DE BERNARDI, B., EVANS, A. E., FAVROT, M., HEDBORG, F. & ET AL. 1993. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol,* 11**,** 1466-77.

BRODEUR, G. M., SEEGER, R. C., SCHWAB, M., VARMUS, H. E. & BISHOP, J. M. 1984. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science,* 224**,** 1121-4.

BRODEUR, G. M., SEEGER, R. C., SCHWAB, M., VARMUS, H. E. & BISHOP, J. M. 1985. Amplification of N-myc sequences in primary human

neuroblastomas: correlation with advanced disease stage. *Prog Clin Biol Res,* 175**,** 105-13.

BRUCHELT, G., HANDGRETINGER, R., SCHILBACH-STUCKLE, K., SCHILLING, F. H., POLLWEIN, P., SCHWAB, M., TREUNER, J. & NIETHAMMER, D. 1990. [The role of interferons in neuroblastoma. 1: Antiproliferative effects]. *Klin Padiatr,* 202**,** 202-5.

BUCKNER, F. S. & NAVABI, N. 2010. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis,* 23**,** 609-16.

BUDINA-KOLOMETS, A., BALABURSKI, G. M., BONDAR, A., BEEHARRY, N., YEN, T. & MURPHY, M. E. 2014. Comparison of the activity of three different HSP70 inhibitors on apoptosis, cell cycle arrest, autophagy inhibition, and HSP90 inhibition. *Cancer Biol Ther,* 15**,** 194-9.

CABANILLAS STANCHI, K. M., BRUCHELT, G., HANDGRETINGER, R. & HOLZER, U. 2015. Nifurtimox reduces N-Myc expression and aerobic glycolysis in neuroblastoma. *Cancer Biol Ther,* 16**,** 1353-63.

CANNIZZARO, A., VERGA FALZACAPPA, C. V., MARTINELLI, M., MISITI, S., BRUNETTI, E. & BUCCI, B. 2007. O(2/3) exposure inhibits cell progression affecting cyclin B1/cdk1 activity in SK-N-SH while induces apoptosis in SK-N-DZ neuroblastoma cells. *J Cell Physiol,* 213**,** 115-25.

CASTLEBERRY, R. P., SHUSTER, J. J. & SMITH, E. I. 1994. The Pediatric Oncology Group experience with the international staging system criteria for neuroblastoma. Member Institutions of the Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol,* 12**,** 2378-81.

CAVANAUGH, A., JUENGST, B., SHERIDAN, K., DANELLA, J. F. & WILLIAMS, H. 2015. Combined inhibition of heat shock proteins 90 and 70

leads to simultaneous degradation of the oncogenic signaling proteins involved in muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget,* 6**,** 39821-38.

CERECETTO, H. & GONZALEZ, M. 2011. Antiparasitic prodrug nifurtimox: revisiting its activation mechanism. *Future Microbiol,* 6**,** 847-50.

CHEN, B., TRANG, V., LEE, A., WILLIAMS, N. S., WILSON, A. N., EPSTEIN, E. H., JR., TANG, J. Y. & KIM, J. 2016. Posaconazole, a Second-Generation Triazole Antifungal Drug, Inhibits the Hedgehog Signaling Pathway and Progression of Basal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther,* 15**,** 866-76.

CHEN, H., MIAO, Q., GENG, M., LIU, J., HU, Y., TIAN, L., PAN, J. & YANG, Y. 2013. Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *ScientificWorldJournal,* 2013**,** 269165.

CHEN, R. L., REYNOLDS, C. P. & SEEGER, R. C. 2000. Neutrophils are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with an anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating. *Cancer Immunol Immunother,* 48**,** 603-12.

CHEN, X., QIAN, Y. & WU, S. 2014. The Warburg Effect: Evolving Interpretations Of An Established Concept. *Free Radic Biol Med*.

CHEN, X., QIAN, Y. & WU, S. 2015. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free Radic Biol Med,* 79**,** 253-63.

CLAUSEN, N., ANDERSSON, P. & TOMMERUP, N. 1989. Familial occurrence of neuroblastoma, von Recklinghausen's neurofibromatosis, Hirschsprung's agangliosis and jaw-winking syndrome. *Acta Paediatr Scand,* 78**,** 736-41.

COOPER, M. K., WASSIF, C. A., KRAKOWIAK, P. A., TAIPALE, J., GONG, R., KELLEY, R. I., PORTER, F. D. & BEACHY, P. A. 2003. A defective

response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet,* 33**,** 508-13.

CORNELISSEN, J., WANDERS, R. J., VAN DEN BOGERT, C., VAN KUILENBURG, A. B., ELZINGA, L., VOUTE, P. A. & VAN GENNIP, A. H. 1995a. Meta-iodobenzylguanidine (MIBG) inhibits malate and succinate driven mitochondrial ATP synthesis in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE(2c). *Eur J Cancer,* 31a**,** 582-6.

CORNELISSEN, J., WANDERS, R. J., VAN GENNIP, A. H., VAN DEN BOGERT, C., VOUTE, P. A. & VAN KUILENBURG, A. B. 1995b. Meta-iodobenzylguanidine inhibits complex I and III of the respiratory chain in the human cell line Molt-4. *Biochem Pharmacol,* 49**,** 471-7.

CORVI, R., SAVELYEVA, L., AMLER, L., HANDGRETINGER, R. & SCHWAB, M. 1995. Cytogenetic evolution of MYCN and MDM2 amplification in the neuroblastoma LS tumour and its cell line. *Eur J Cancer,* 31a**,** 520-3.

CUYLEN, S., BLAUKOPF, C., POLITI, A. Z., MULLER-REICHERT, T., NEUMANN, B., POSER, I., ELLENBERG, J., HYMAN, A. A. & GERLICH, D. W. 2016. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature,* 535**,** 308-12.

CVEK, B. 2011. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets,* 11**,** 332-7.

CVEK, B. & DVORAK, Z. 2008. The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov Today,* 13**,** 716-22.

DA SILVA, V. C. & RAMOS, C. H. 2012. The network interaction of the human cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. *J Proteomics,* 75**,** 2790-802.

DO, K., SPERANZA, G., CHANG, L. C., POLLEY, E. C., BISHOP, R., ZHU, W., TREPEL, J. B., LEE, S., LEE, M. J., KINDERS, R. J., PHILLIPS, L., COLLINS, J., LYONS, J., JEONG, W., ANTONY, R., CHEN, A. P., NECKERS, L., DOROSHOW, J. H. & KUMMAR, S. 2015. Phase I study of the heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitor onalespib (AT13387) administered on a daily for 2 consecutive days per week dosing schedule in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs,* 33**,** 921-30.

DOMINGO-FERNANDEZ, R., WATTERS, K., PISKAREVA, O., STALLINGS, R. L. & BRAY, I. 2013. The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis. *Pediatr Surg Int,* 29**,** 101-19.

DÖRING, M., BLUME, O., HAUFE, S., HARTMANN, U., KIMMIG, A., SCHWARZE, C. P., LANG, P., HANDGRETINGER, R. & MÜLLER, I. 2014. Comparison of itraconazole, voriconazole, and posaconazole as oral antifungal prophylaxis in pediatric patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis,* 33**,** 629-38.

DÖRING, M., EIKEMEIER, M., CABANILLAS STANCHI, K. M., HARTMANN, U., EBINGER, M., SCHWARZE, C. P., SCHULZ, A., HANDGRETINGER, R. & MÜLLER, I. 2015. Antifungal prophylaxis with posaconazole vs. fluconazole or itraconazole in pediatric patients with neutropenia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.

DÖRING, M., MÜLLER, C., JOHANN, P. D., ERBACHER, A., KIMMIG, A., SCHWARZE, C. P., LANG, P., HANDGRETINGER, R. & MÜLLER, I.

2012. Analysis of posaconazole as oral antifungal prophylaxis in pediatric patients under 12 years of age following allogeneic stem cell transplantation. *BMC Infect Dis,* 12**,** 263.

DU, M., ZHANG, L., SCORSONE, K. A., WOODFIELD, S. E. & ZAGE, P. E. 2016. Nifurtimox Is Effective Against Neural Tumor Cells and Is Synergistic with Buthionine Sulfoximine. *Sci Rep,* 6**,** 27458.

EGGERT, A., IKEGAKI, N., KWIATKOWSKI, J., ZHAO, H., BRODEUR, G. M. & HIMELSTEIN, B. P. 2000. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res,* 6**,** 1900-8.

FEUERECKER, B., SEIDL, C., PIRSIG, S., BRUCHELT, G. & SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE, R. 2015. DCA promotes progression of neuroblastoma tumors in nude mice. *Am J Cancer Res,* 5**,** 812-20.

FRANK, B. 2004. NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma. *In:* HÄMATOLOGIE, G. F. P. O. U. (ed.). Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie.

FUCHS, J. 2012. *Solide Tumoren im Kindesalter: Grundlagen - Diagnostik - Therapie ; mit 72 Tabellen ; inkl. DVD mit Tumoroperationen*, Schattauer.

GALLO, L. I., LAGADARI, M., PIWIEN-PILIPUK, G. & GALIGNIANA, M. D. 2011. The 90-kDa heat-shock protein (Hsp90)-binding immunophilin FKBP51 is a mitochondrial protein that translocates to the nucleus to protect cells against oxidative stress. *J Biol Chem,* 286**,** 30152-60.

GOLOUDINA, A. R., DEMIDOV, O. N. & GARRIDO, C. 2012. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett,* 325**,** 117-24.

GOMEZ-MONTERREY, I., SALA, M., MUSELLA, S. & CAMPIGLIA, P. 2012. Heat shock protein 90 inhibitors as therapeutic agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov,* 7**,** 313-36.

GOMEZ, S., CASTELLANO, G., MAYOL, G., QUEIROS, A., MARTIN-SUBERO, J. I. & LAVARINO, C. 2015. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Genom Data,* 5**,** 360-3.

GONG, Q., QIU, S., LI, S., MA, Y., CHEN, M., YAO, Y., CHE, D., FENG, J., CAI, W., MA, J., YANG, X., GAO, G. & YANG, Z. 2014. Proapoptotic PEDF functional peptides inhibit prostate tumor growth--a mechanistic study. *Biochem Pharmacol,* 92**,** 425-37.

GONNERT, R. & BOCK, M. 1972. The effect of nifurtimox on Trypanosoma cruzi in tissue cultures. *Arzneimittelforschung,* 22**,** 1582-6.

GUPTA, M., NOTTER, M. F., FELTEN, S. & GASH, D. M. 1985. Differentiation characteristics of human neuroblastoma cells in the presence of growth modulators and antimitotic drugs. *Brain Res,* 351**,** 21-9.

HALD, J., JACOBSEN, E. & LARSEN, V. 1949. Formation of acetaldehyde in the organism in relation to dosage of antabuse (tetraethylthiuramdisulphide) and to alcohol-concentration in blood. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh),* 5**,** 179-88.

HAMPEL, T., BRUNS, M., BAYER, M., HANDGRETINGER, R., BRUCHELT, G. & BRÜCKNER, R. 2014. Synthesis and biological effects of new hybrid compounds composed of benzylguanidines and the alkylating group of busulfan on neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett,* 24**,** 2728-33.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell,* 100**,** 57-70.

HATZIAGAPIOU, K., BRAOUDAKI, M., KARPUSAS, M. & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, F. 2011. Evaluation of antitumor activity of gefitinib in pediatric glioblastoma and neuroblastoma cells. *Clin Lab,* 57**,** 781-4.

HERO, B. & BERTHOLD, F. 2011. Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Neuroblastom. *AWMF online*.

HERTWIG, F., PEIFER, M. & FISCHER, M. 2015. Telomere maintenance is pivotal for high-risk neuroblastoma. *Cell Cycle***,** 0.

HSEU, Y. C., LEE, M. S., WU, C. R., CHO, H. J., LIN, K. Y., LAI, G. H., WANG, S. Y., KUO, Y. H., KUMAR, K. J. & YANG, H. L. 2012. The chalcone flavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. *J Agric Food Chem,* 60**,** 2385-97.

HUANG, L., YU, Z., ZHANG, T., ZHAO, X. & HUANG, G. 2014. HSP40 interacts with pyruvate kinase M2 and regulates glycolysis and cell proliferation in tumor cells. *PLoS One,* 9**,** e92949.

HUANG, L. E. 2008. Carrot and stick: HIF-alpha engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ,* 15**,** 672-7.

HUANG, M. & WEISS, W. A. 2013. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med,* 3**,** a014415.

HUGHES, M., MARSDEN, H. B. & PALMER, M. K. 1974. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer,* 34**,** 1706-11.

JANNIN, J. & VILLA, L. 2007. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 102 Suppl 1**,** 95-7.

JAVID, B., MACARY, P. A. & LEHNER, P. J. 2007. Structure and Function: Heat Shock Proteins and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology,* 179**,** 2035-2040.

JHAVERI, K., MILLER, K., ROSEN, L., SCHNEIDER, B., CHAP, L., HANNAH, A., ZHONG, Z., MA, W., HUDIS, C. & MODI, S. 2012. A phase I dose-escalation trial of trastuzumab and alvespimycin hydrochloride (KOS-1022; 17 DMAG) in the treatment of advanced solid tumors. *Clin Cancer Res,* 18**,** 5090-8.

JONES, R. O. 1949. Death following the ingestion of alcohol in an antabuse treated patient. *Can Med Assoc J,* 60**,** 609-12.

JORGENSEN, C. H., PEDERSEN, B. & TONNESEN, H. 2011. The efficacy of disulfiram for the treatment of alcohol use disorder. *Alcohol Clin Exp Res,* 35**,** 1749-58.

KAATSCH, C. & SPIX, C. 2013. German Childhood Cancer Registry - Report 2012 (1980-2012). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz*.

KANEKO, M., NISHIHIRA, H., MUGISHIMA, H., OHNUMA, N., NAKADA, K., KAWA, K., FUKUZAWA, M., SUITA, S., SERA, Y. & TSUCHIDA, Y. 1998. Stratification of treatment of stage 4 neuroblastoma patients based on N-myc amplification status. Study Group of Japan for Treatment of Advanced Neuroblastoma, Tokyo, Japan. *Med Pediatr Oncol,* 31**,** 1-7.

KARDEH, S., ASHKANI-ESFAHANI, S. & ALIZADEH, A. M. 2014. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur J Pharmacol,* 735**,** 150-68.

KAST, R. E. & HALATSCH, M. E. 2012. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in glioblastoma: a trio of old drugs-captopril, disulfiram and nelfinavir-are inhibitors with potential as adjunctive treatments in glioblastoma. *Arch Med Res,* 43**,** 243-7.

KATO, H., OKAMURA, K., KUROSAWA, Y., KISHIKAWA, T. & HASHIMOTO, K. 1989. Characterization of DNA rearrangements of N-myc gene amplification in three neuroblastoma cell lines by pulsed-field gel electrophoresis. *FEBS Lett,* 250**,** 529-35.

KAUR, G., BELOTTI, D., BURGER, A. M., FISHER-NIELSON, K., BORSOTTI, P., RICCARDI, E., THILLAINATHAN, J., HOLLINGSHEAD, M., SAUSVILLE, E. A. & GIAVAZZI, R. 2004. Antiangiogenic properties of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin: an orally bioavailable heat shock protein 90 modulator. *Clin Cancer Res,* 10**,** 4813-21.

KERSEMAEKERS, W. M., VAN IERSEL, T., NASSANDER, U., O'MARA, E., WASKIN, H., CACERES, M. & VAN IERSEL, M. L. 2014. Pharmacokinetics and Safety Study of Posaconazole IV Solution by Peripheral Administration in Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother*.

KHALIL, A. A., KABAPY, N. F., DERAZ, S. F. & SMITH, C. 2011. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta,* 1816**,** 89-104.

KIM, J., AFTAB, B. T., TANG, J. Y., KIM, D., LEE, A. H., REZAEE, M., KIM, J., CHEN, B., KING, E. M., BORODOVSKY, A., RIGGINS, G. J., EPSTEIN, E. H., JR., BEACHY, P. A. & RUDIN, C. M. 2013. Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell,* 23**,** 23-34.

KIM, J., TANG, J. Y., GONG, R., KIM, J., LEE, J. J., CLEMONS, K. V., CHONG, C. R., CHANG, K. S., FERESHTEH, M., GARDNER, D., REYA, T., LIU, J. O., EPSTEIN, E. H., STEVENS, D. A. & BEACHY, P. A. 2010. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell,* 17**,** 388-99.

KIM, J. W. & DANG, C. V. 2006. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res,* 66**,** 8927-30.

KIM, J. W., GAO, P., LIU, Y. C., SEMENZA, G. L. & DANG, C. V. 2007. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol,* 27**,** 7381-93.

KING, F. W., WAWRZYNOW, A., HOHFELD, J. & ZYLICZ, M. 2001. Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *Embo j,* 20**,** 6297-305.

KLIKOVA, K., PILCHOVA, I., STEFANIKOVA, A., HATOK, J., DOBROTA, D. & RACAY, P. 2016. The Role of Heat Shock Proteins in Leukemia. *Klin Onkol,* 29**,** 29-38.

KONA, F. R., BUAC, D. & A, M. B. 2011. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr Cancer Drug Targets,* 11**,** 338-46.

KOTO, K. S., LESCAULT, P., BRARD, L., KIM, K., SINGH, R. K., BOND, J., ILLENYE, S., SLAVIK, M. A., ASHIKAGA, T. & SAULNIER SHOLLER, G. L. 2011. Antitumor activity of nifurtimox is enhanced with tetrathiomolybdate in medulloblastoma. *Int J Oncol,* 38**,** 1329-41.

KUCI, Z., BRUCHELT, G., SEITZ, G., KAROV, Y., OR, R., HANDGRETINGER, R., NIETHAMMER, D. & HAHN, T. 2002. Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. *Anticancer Res,* 22**,** 4325-9.

KUMAR, S., STOKES, J., 3RD, SINGH, U. P., SCISSUM GUNN, K., ACHARYA, A., MANNE, U. & MISHRA, M. 2016. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett,* 374**,** 156-66.

KUMMAR, S., GUTIERREZ, M. E., GARDNER, E. R., CHEN, X., FIGG, W. D., ZAJAC-KAYE, M., CHEN, M., STEINBERG, S. M., MUIR, C. A., YANCEY, M. A., HORNEFFER, Y. R., JUWARA, L., MELILLO, G., IVY, S. P., MERINO, M., NECKERS, L., STEEG, P. S., CONLEY, B. A., GIACCONE, G., DOROSHOW, J. H. & MURGO, A. J. 2010. Phase I trial of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a heat shock protein inhibitor, administered twice weekly in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer,* 46**,** 340-7.

LANCET, J. E., GOJO, I., BURTON, M., QUINN, M., TIGHE, S. M., KERSEY, K., ZHONG, Z., ALBITAR, M. X., BHALLA, K., HANNAH, A. L. & BAER, M. R. 2010. Phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (KOS-1022, 17-DMAG) administered intravenously twice weekly to patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia,* 24**,** 699-705.

LARCHER, J. C., VAYSSIERE, J. L., LOSSOUARN, L., GROS, F. & CROIZAT, B. 1991. Regulation of c- and N-myc expression during induced differentiation of murine neuroblastoma cells. *Oncogene,* 6**,** 633-8.

LEGROS, H., DINGEVAL, M. G., JANIN, F., COSTENTIN, J. & BONNET, J. J. 2004. Toxicity of a treatment associating dopamine and disulfiram for

catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells: relationships with 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde formation. *Neurotoxicology,* 25**,** 365-75.

LEU, J. I., PIMKINA, J., FRANK, A., MURPHY, M. E. & GEORGE, D. L. 2009. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell,* 36**,** 15-27.

LI, C., ZHAO, Z., ZHOU, Z. & LIU, R. 2016. PKM2 Promotes Cell Survival and Invasion Under Metabolic Stress by Enhancing Warburg Effect in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Dig Dis Sci,* 61**,** 767-73.

LI, K. & HAN, X. 2015. Endoplasmic reticulum stress is involved in the lidocaine-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Mol Neurosci,* 56**,** 122-30.

LI, Z. & ZHANG, H. 2016. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci,* 73**,** 377-92.

LIANOS, G. D., ALEXIOU, G. A., MANGANO, A., MANGANO, A., RAUSEI, S., BONI, L., DIONIGI, G. & ROUKOS, D. H. 2015. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett,* 360**,** 114-8.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods,* 25**,** 402-8.

LOESBERG, C., VAN ROOIJ, H., NOOIJEN, W. J., MEIJER, A. J. & SMETS, L. A. 1990. Impaired mitochondrial respiration and stimulated glycolysis by m-iodobenzylguanidine (MIBG). *Int J Cancer,* 46**,** 276-81.

LOUIS, C. U. & SHOHET, J. M. 2015. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med,* 66**,** 49-63.

LOVE, C., SUN, Z., JIMA, D., LI, G., ZHANG, J., MILES, R., RICHARDS, K. L., DUNPHY, C. H., CHOI, W. W., SRIVASTAVA, G., LUGAR, P. L., RIZZIERI, D. A., LAGOO, A. S., BERNAL-MIZRACHI, L., MANN, K. P., FLOWERS, C. R., NARESH, K. N., EVENS, A. M., CHADBURN, A., GORDON, L. I., CZADER, M. B., GILL, J. I., HSI, E. D., GREENOUGH, A., MOFFITT, A. B., MCKINNEY, M., BANERJEE, A., GRUBOR, V., LEVY, S., DUNSON, D. B. & DAVE, S. S. 2012. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet,* 44**,** 1321-5.

MADRIGAL-MATUTE, J., FERNANDEZ-GARCIA, C. E., GOMEZ-GUERRERO, C., LOPEZ-FRANCO, O., MUNOZ-GARCIA, B., EGIDO, J., BLANCO-COLIO, L. M. & MARTIN-VENTURA, J. L. 2012. HSP90 inhibition by 17-DMAG attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis. *Cardiovasc Res,* 95**,** 116-23.

MAERTENS, J., CORNELY, O. A., ULLMANN, A. J., HEINZ, W. J., KRISHNA, G., PATINO, H., CACERES, M., KARTSONIS, N., WASKIN, H. & ROBERTSON, M. N. 2014. Phase 1B study of the pharmacokinetics and safety of posaconazole intravenous solution in patients at risk for invasive fungal disease. *Antimicrob Agents Chemother,* 58**,** 3610-7.

MARIS, J. M. 2005a. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr,* 17**,** 7-13.

MARIS, J. M. 2005b. How does MYCN amplification make neuroblastomas behave aggressively? Still more questions than answers. *Pediatr Blood Cancer,* 45**,** 869-70.

MARIS, J. M. 2010. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med,* 362**,** 2202-11.

MARWARHA, G., DASARI, B. & GHRIBI, O. 2012. Endoplasmic reticulum stress-induced CHOP activation mediates the down-regulation of leptin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with the oxysterol 27-hydroxycholesterol. *Cell Signal,* 24**,** 484-92.

MAYA, J. D., CASSELS, B. K., ITURRIAGA-VASQUEZ, P., FERREIRA, J., FAUNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A. & MORELLO, A. 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol,* 146**,** 601-20.

MAYA, J. D., REPETTO, Y., AGOSIN, M., OJEDA, J. M., TELLEZ, R., GAULE, C. & MORELLO, A. 1997. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol,* 86**,** 101-6.

MCCABE, J. M. & LEAHY, D. J. 2015. Smoothened goes molecular: new pieces in the hedgehog signaling puzzle. *J Biol Chem,* 290**,** 3500-7.

MCNEIL, E. M., RITCHIE, A. M. & MELTON, D. W. 2013. The toxicity of nitrofuran compounds on melanoma and neuroblastoma cells is enhanced by Olaparib and ameliorated by melanin pigment. *DNA Repair (Amst),* 12**,** 1000-6.

MERCK SHARP & DOHME 2003. Posaconazole: SCH 56592. *Drugs R D,* 4**,** 258-63.

MERCK SHARP & DOHME. 2013. *Pharmacokinetics and Safety of Posaconazole Tablet in Participants at High Risk for Invasive Fungal Infections (MK-5592-065/P05615).* [Online]. Merck Sharp & Dohme Corp. . Available: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01777763 [Accessed 19 May 2017].

MERCK SHARP & DOHME. 2015. *Safety and Pharmacokinetics of Intravenous and Oral Posaconazole in Immunocompromised Children (MK-5592-097)* [Online]. Merck Sharp & Dohme Corp. . Available: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02452034 [Accessed 19 May 2017].

MILKOVIC, L., SIEMS, W., SIEMS, R. & ZARKOVIC, N. 2014. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr Pharm Des,* 20**,** 6529-42.

MUNTAU, A. 2009. *Intensivkurs Pädiatrie: mit 130 Tabellen*, Elsevier, Urban & Fischer.

MURPHY, M. E. 2013. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis,* 34**,** 1181-8.

NAYAK, A., SATAPATHY, S. R., DAS, D., SIDDHARTH, S., TRIPATHI, N., BHARATAM, P. V. & KUNDU, C. 2016. Nanoquinacrine induced apoptosis in cervical cancer stem cells through the inhibition of hedgehog-GLI1 cascade: Role of GLI-1. *Sci Rep,* 6**,** 20600.

NECKERS, L. 2007. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci,* 32**,** 517-30.

NGO, H., TORTORELLA, S. M., VERVERIS, K. & KARAGIANNIS, T. C. 2015. The Warburg effect: molecular aspects and therapeutic possibilities. *Mol Biol Rep,* 42**,** 825-34.

NIESSEN, K. H. & BACHERT, C. 2001. *Pädiatrie*, Thieme.

NIEWISCH, M. R., KUCI, Z., WOLBURG, H., SAUTTER, M., KRAMPEN, L., DEUBZER, B., HANDGRETINGER, R. & BRUCHELT, G. 2012. Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy? *Cell Physiol Biochem,* 29**,** 373-80.

NOVARTIS PHARMACEUTICALS. 2010. *A Phase I/II Study of LDE225 in Pediatric Patients With Recurrent or Refractory Medulloblastoma or Other Tumors Potentially Dependent on the Hedgehog-signaling Pathway and Adult Patients With Recurrent or Refractory Medulloblastoma* [Online]. Available: https://clinicaltrials.gov/show/NCT01125800 [Accessed 19 May 2017].

NÜSSLEIN-VOLHARD, C. & WIESCHAUS, E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature,* 287**,** 795-801.

OHTA, S., IGARASHI, S., HONDA, A., SATO, S. & HANAI, N. 1993. Cytotoxicity of adriamycin-containing immunoliposomes targeted with anti-ganglioside monoclonal antibodies. *Anticancer Res,* 13**,** 331-6.

OKADA, M., HASEBE, N., AIZAWA, Y., IZAWA, K., KAWABE, J. & KIKUCHI, K. 2004. Thermal treatment attenuates neointimal thickening with enhanced expression of heat-shock protein 72 and suppression of oxidative stress. *Circulation,* 109**,** 1763-8.

OLDRIDGE, D. A., WOOD, A. C., WEICHERT-LEAHEY, N., CRIMMINS, I., SUSSMAN, R., WINTER, C., MCDANIEL, L. D., DIAMOND, M., HART, L. S., ZHU, S., DURBIN, A. D., ABRAHAM, B. J., ANDERS, L., TIAN, L., ZHANG, S., WEI, J. S., KHAN, J., BRAMLETT, K., RAHMAN, N., CAPASSO, M., IOLASCON, A., GERHARD, D. S., GUIDRY AUVIL, J. M., YOUNG, R. A., HAKONARSON, H., DISKIN, S. J., LOOK, A. T. & MARIS, J. M. 2015. Genetic predisposition to neuroblastoma mediated by a LMO1 super-enhancer polymorphism. *Nature,* 528**,** 418-21.

OLSON, K. A., SCHELL, J. C. & RUTTER, J. 2016. Pyruvate and Metabolic Flexibility: Illuminating a Path Toward Selective Cancer Therapies. *Trends Biochem Sci,* 41**,** 219-30.

ORTEL, B. & CALZAVARA-PINTON, P. 2010. Advances in photodynamic therapy. A review. *G Ital Dermatol Venereol,* 145**,** 461-75.

PACEY, S., WILSON, R. H., WALTON, M., EATOCK, M. M., HARDCASTLE, A., ZETTERLUND, A., ARKENAU, H. T., MORENO-FARRE, J., BANERJI, U., ROELS, B., PEACHEY, H., AHERNE, W., DE BONO, J. S., RAYNAUD, F., WORKMAN, P. & JUDSON, I. 2011. A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res,* 17**,** 1561-70.

PANETTA, J. C., SCHAIQUEVICH, P., SANTANA, V. M. & STEWART, C. F. 2008. Using pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling and simulation to evaluate importance of schedule in topotecan therapy for pediatric neuroblastoma. *Clin Cancer Res,* 14**,** 318-25.

PARK, J. R., BAGATELL, R., LONDON, W. B., MARIS, J. M., COHN, S. L., MATTAY, K. K. & HOGARTY, M. 2013. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer,* 60**,** 985-93.

PASCA DI MAGLIANO, M. & HEBROK, M. 2003. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer,* 3**,** 903-11.

PATEL, H. J., MODI, S., CHIOSIS, G. & TALDONE, T. 2011. Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin Drug Discov,* 6**,** 559-587.

PATTERSON, R. E., WHITE, E., KRISTAL, A. R., NEUHOUSER, M. L. & POTTER, J. D. 1997. Vitamin supplements and cancer risk: the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control,* 8**,** 786-802.

PATURY, S., MIYATA, Y. & GESTWICKI, J. E. 2009. Pharmacological targeting of the Hsp70 chaperone. *Curr Top Med Chem,* 9**,** 1337-51.

PHILIP, T., LADENSTEIN, R., LASSET, C., HARTMANN, O., ZUCKER, J. M., PINKERTON, R., PEARSON, A. D., KLINGEBIEL, T., GARAVENTA, A., KREMENS, B., BERNARD, J. L., ROSTI, G. & CHAUVIN, F. 1997. 1070 myeloablative megatherapy procedures followed by stem cell rescue for neuroblastoma: 17 years of European experience and conclusions. European Group for Blood and Marrow Transplant Registry Solid Tumour Working Party. *Eur J Cancer,* 33**,** 2130-5.

PISOSCHI, A. M. & POP, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem,* 97**,** 55-74.

PORTER, L. A. & DONOGHUE, D. J. 2003. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res,* 5**,** 335-47.

POWERS, M. V., JONES, K., BARILLARI, C., WESTWOOD, I., VAN MONTFORT, R. L. & WORKMAN, P. 2010. Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle,* 9**,** 1542-50.

PUISSANT, A., FRUMM, S. M., ALEXE, G., BASSIL, C. F., QI, J., CHANTHERY, Y. H., NEKRITZ, E. A., ZEID, R., GUSTAFSON, W. C., GRENINGER, P., GARNETT, M. J., MCDERMOTT, U., BENES, C. H., KUNG, A. L., WEISS, W. A., BRADNER, J. E. & STEGMAIER, K. 2013. Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discov,* 3**,** 308-23.

PUTCHALA, M. C., RAMANI, P., SHERLIN, H. J., PREMKUMAR, P. & NATESAN, A. 2013. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity -- a systematic review. *Arch Oral Biol,* 58**,** 563-74.

QING, G., SKULI, N., MAYES, P. A., PAWEL, B., MARTINEZ, D., MARIS, J. M. & SIMON, M. C. 2010. Combinatorial regulation of neuroblastoma tumor

progression by N-Myc and hypoxia inducible factor HIF-1alpha. *Cancer Res,* 70**,** 10351-61.

RAFIEIAN-KOPAIE, M. & NASRI, H. 2015. On the Occasion of World Cancer Day 2015; the Possibility of Cancer Prevention or Treatment with Antioxidants: The Ongoing Cancer Prevention Researches. *Int J Prev Med,* 6**,** 108.

RAMANATHAN, R. K., EGORIN, M. J., ERLICHMAN, C., REMICK, S. C., RAMALINGAM, S. S., NARET, C., HOLLERAN, J. L., TENEYCK, C. J., IVY, S. P. & BELANI, C. P. 2010. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat-shock protein 90, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol,* 28**,** 1520-6.

REGAN, P. L., JACOBS, J., WANG, G., TORRES, J., EDO, R., FRIEDMANN, J. & TANG, X. X. 2011. Hsp90 inhibition increases p53 expression and destabilizes MYCN and MYC in neuroblastoma. *Int J Oncol,* 38**,** 105-12.

REIKVAM, H., BRENNER, A. K., NEPSTAD, I., SULEN, A. & BRUSERUD, O. 2014. Heat shock protein 70 - the next chaperone to target in the treatment of human acute myelogenous leukemia? *Expert Opin Ther Targets,* 18**,** 929-44.

REIKVAM, H., NEPSTAD, I., SULEN, A., GJERTSEN, B. T., HATFIELD, K. J. & BRUSERUD, O. 2013. Increased antileukemic effects in human acute myeloid leukemia by combining HSP70 and HSP90 inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs,* 22**,** 551-63.

ROHRER, K. M., HAUG, M., SCHWORER, D., KALBACHER, H. & HOLZER, U. 2014. Mutations in the substrate binding site of human heat-shock protein 70 indicate specific interaction with HLA-DR outside the peptide binding groove. *Immunology,* 142**,** 237-47.

ROSTOMILY, R. C., BERMINGHAM-MCDONOGH, O., BERGER, M. S., TAPSCOTT, S. J., REH, T. A. & OLSON, J. M. 1997. Expression of neurogenic basic helix-loop-helix genes in primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res,* 57**,** 3526-31.

RUAN, H., LUO, H., WANG, J., JI, X., ZHANG, Z., WU, J., ZHANG, X. & WU, X. 2016. Smoothened-independent activation of hedgehog signaling by rearranged during transfection promotes neuroblastoma cell proliferation and tumor growth. *Biochim Biophys Acta,* 1860**,** 1961-1972.

RUDOLPH, G., SCHILBACH-STUCKLE, K., HANDGRETINGER, R., KAISER, P. & HAMEISTER, H. 1991. Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Hum Genet,* 86**,** 562-6.

RYU, H., LEE, J., ZAMAN, K., KUBILIS, J., FERRANTE, R. J., ROSS, B. D., NEVE, R. & RATAN, R. R. 2003. Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J Neurosci,* 23**,** 3597-606.

SAIF, M. W., ERLICHMAN, C., DRAGOVICH, T., MENDELSON, D., TOFT, D., BURROWS, F., STORGARD, C. & VON HOFF, D. 2013. Open-label, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered CNF1010 (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin [17-AAG]) in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol,* 71**,** 1345-55.

SAULNIER SHOLLER, G. L. 2008a. *Study of Nifurtimox to Treat Refractory or Relapsed Neuroblastoma or Medulloblastoma* [Online]. U.S. National Institutes of Health. Available: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00601003?term=nifurtimox+neuroblastoma&rank=2 [Accessed 19 May 2017].

SAULNIER SHOLLER, G. L. 2008b. *Study of Nifurtimox to Treat Refractory or Relapsed Neuroblastoma or Medulloblastoma* [Online]. Available: http://clinicaltrials.gov/show/NCT00601003; 19.05.2017 [Accessed].

SAULNIER SHOLLER, G. L., BERGENDAHL, G. M., BRARD, L., SINGH, A. P., HEATH, B. W., BINGHAM, P. M., ASHIKAGA, T., KAMEN, B. A., HOMANS, A. C., SLAVIK, M. A., LENOX, S. R., HIGGINS, T. J. & FERGUSON, W. S. 2011. A phase 1 study of nifurtimox in patients with relapsed/refractory neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol,* 33**,** 25-30.

SAULNIER SHOLLER, G. L., BRARD, L., STRAUB, J. A., DORF, L., ILLEYNE, S., KOTO, K., KALKUNTE, S., BOSENBERG, M., ASHIKAGA, T. & NISHI, R. 2009. Nifurtimox induces apoptosis of neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *J Pediatr Hematol Oncol,* 31**,** 187-93.

SAULNIER SHOLLER, G. L., KALKUNTE, S., GREENLAW, C., MCCARTEN, K. & FORMAN, E. 2006. Antitumor activity of nifurtimox observed in a patient with neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol,* 28**,** 693-5.

SAUNA, Z. E., SHUKLA, S. & AMBUDKAR, S. V. 2005. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol Biosyst,* 1**,** 127-34.

SCALES, S. J. & DE SAUVAGE, F. J. 2009. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci,* 30**,** 303-12.

SCHAFER, G., CRAMER, T., SUSKE, G., KEMMNER, W., WIEDENMANN, B. & HOCKER, M. 2003. Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. *J Biol Chem,* 278**,** 8190-8.

SCHIEBER, M. & CHANDEL, N. S. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol,* 24**,** R453-62.

SCHILBACH, K., POLLWEIN, P., SCHWAB, M., HANDGRETINGER, R., TREUNER, J., NIETHAMMER, D. & BRUCHELT, G. 1990. Reduction of N-myc expression by antisense RNA is amplified by interferon: possible involvement of the 2-5A system. *Biochem Biophys Res Commun,* 170**,** 1242-8.

SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc,* 3**,** 1101-8.

SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol,* 182**,** 311-22.

SEEGER, R. C., RAYNER, S. A., BANERJEE, A., CHUNG, H., LAUG, W. E., NEUSTEIN, H. B. & BENEDICT, W. F. 1977. Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res,* 37**,** 1364-71.

SHADAD, F. N. & RAMANATHAN, R. K. 2006. 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced-stage solid tumors and lymphoma: a phase I study. *Clin Lymphoma Myeloma,* 6**,** 500-1.

SHAHI, M. H., SCHIAPPARELLI, P., AFZAL, M., SINHA, S., REY, J. A. & CASTRESANA, J. S. 2011. Expression and epigenetic modulation of sonic hedgehog-GLI1 pathway genes in neuroblastoma cell lines and tumors. *Tumour Biol,* 32**,** 113-27.

SHENG, H. & TANG, W. 2016. Glycolysis Inhibitors for Anticancer Therapy: A Review of Recent Patents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov,* 11**,** 297-308.

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. 1999. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer,* 86**,** 364-72.

SHIMADA, H., UMEHARA, S., MONOBE, Y., HACHITANDA, Y., NAKAGAWA, A., GOTO, S., GERBING, R. B., STRAM, D. O., LUKENS, J. N. & MATTHAY, K. K. 2001. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer,* 92**,** 2451-61.

SINGH, R. K., DORF, L., DEMARTINO, A., ILLENYE, S., KOTO, K., CURRIER, E. A., ASHIKAGA, T., KIM, K. K., BRARD, L. & SHOLLER, G. L. 2011a. Oral RKS262 reduces tumor burden in a neuroblastoma xenograft animal model and mediates cytotoxicity through SAPK/JNK and ROS activation in vitro. *Cancer Biol Ther,* 11**,** 1036-45.

SINGH, R. K., LANGE, T. S., KIM, K. K. & BRARD, L. 2011b. A coumarin derivative (RKS262) inhibits cell-cycle progression, causes pro-apoptotic signaling and cytotoxicity in ovarian cancer cells. *Invest New Drugs,* 29**,** 63-72.

SITZMANN, F. C. & BARTMANN, P. 2002. *Pädiatrie*, Thieme.

SJOSTROM, S. K., FINN, G., HAHN, W. C., ROWITCH, D. H. & KENNEY, A. M. 2005. The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-myc phosphorylation and turnover in neural precursors. *Dev Cell,* 9**,** 327-38.

SMITH, M. A., MORTON, C. L., PHELPS, D. A., KOLB, E. A., LOCK, R., CAROL, H., REYNOLDS, C. P., MARIS, J. M., KEIR, S. T., WU, J. & HOUGHTON, P. J. 2008. Stage 1 testing and pharmacodynamic evaluation of the HSP90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG, KOS-1022) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer,* 51**,** 34-41.

SPIX, C., PASTORE, G., SANKILA, R., STILLER, C. A. & STELIAROVA-FOUCHER, E. 2006. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer,* 42**,** 2081-91.

SRIVASTAVA, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol,* 2**,** 185-194.

STAFMAN, L. L. & BEIERLE, E. A. 2016. Cell Proliferation in Neuroblastoma. *Cancers (Basel),* 8.

STUBBS, M. & GRIFFITHS, J. R. 2010. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. *Adv Enzyme Regul,* 50**,** 44-55.

THIELE, C. J. 1998. Neuroblastoma: In (Ed.) Masters. *J Hum Cell Culture,* 1**,** 21-53.

TIAN, H., QIAN, G. W., LI, W., CHEN, F. F., DI, J. H., ZHANG, B. F., PEI, D. S., MA, P. & ZHENG, J. N. 2011. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating the human Ki-67 gene expression. *Tumour Biol,* 32**,** 273-83.

TONG, L., CHUANG, C. C., WU, S. & ZUO, L. 2015. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Lett,* 367**,** 18-25.

TRAN, Q., LEE, H., PARK, J., KIM, S. H. & PARK, J. 2016. Targeting Cancer Metabolism - Revisiting the Warburg Effects. *Toxicol Res,* 32**,** 177-93.

TRISCOTT, J., ROSE PAMBID, M. & DUNN, S. E. 2015. Concise review: bullseye: targeting cancer stem cells to improve the treatment of gliomas by repurposing disulfiram. *Stem Cells,* 33**,** 1042-6.

TUMILOWICZ, J. J., NICHOLS, W. W., CHOLON, J. J. & GREENE, A. E. 1970. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res,* 30**,** 2110-8.

TUTAR, Y. 2011. Hsp70 in oncology. *Recent Pat DNA Gene Seq,* 5**,** 214-8.

VABULAS, R. M., BRAEDEL, S., HILF, N., SINGH-JASUJA, H., HERTER, S., AHMAD-NEJAD, P., KIRSCHNING, C. J., DA COSTA, C., RAMMENSEE, H. G., WAGNER, H. & SCHILD, H. 2002. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem,* 277**,** 20847-53.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact,* 160**,** 1-40.

VATRINET, R., IOMMARINI, L., KURELAC, I., DE LUISE, M., GASPARRE, G. & PORCELLI, A. M. 2015. Targeting respiratory complex I to prevent the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol,* 63**,** 41-5.

VILLALTA, F., DE SOUZA, W. & LEON, W. 1979. The effect of lampit on Trypanosoma cruzi in mice organs and in the bloodstream. *Z Parasitenkd,* 61**,** 21-7.

WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2009. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*, Thieme.

WANG, H., TAN, M. S., LU, R. C., YU, J. T. & TAN, L. 2014. Heat shock proteins at the crossroads between cancer and Alzheimer's disease. *Biomed Res Int,* 2014**,** 239164.

WARBURG, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science,* 123**,** 309-14.

WARBURG, O., WIND, F. & NEGELEIN, E. 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol,* 8**,** 519-30.

WEST, G. J., UKI, J., HERSCHMAN, H. R. & SEEGER, R. C. 1977. Adrenergic, cholinergic, and inactive human neuroblastoma cell lines with the action-potential Na+ ionophore. *Cancer Res,* 37**,** 1372-6.

WICKSTROM, M., DYBERG, C., SHIMOKAWA, T., MILOSEVIC, J., BARYAWNO, N., FUSKEVAG, O. M., LARSSON, R., KOGNER, P., ZAPHIROPOULOS, P. G. & JOHNSEN, J. I. 2013. Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer,* 132**,** 1516-24.

XU, L., WANG, X., WAN, J., LI, T., GONG, X., ZHANG, K., YI, L., XIANG, Z., XU, M. & CUI, H. 2012. Sonic Hedgehog pathway is essential for neuroblastoma cell proliferation and tumor growth. *Mol Cell Biochem,* 364**,** 235-41.

XU, Q., LIU, X., ZHENG, X., YAO, Y. & LIU, Q. 2014. PKM2 regulates Gli1 expression in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett,* 8**,** 1973-1979.

YABE, T., WILSON, D. & SCHWARTZ, J. P. 2001. NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem,* 276**,** 43313-9.

YI, B., YANG, J. & WANG, L. 2014. The growth inhibitory effect of 17-DMAG on ALK and MYCN double-positive neuroblastoma cell line. *Tumour Biol,* 35**,** 3229-35.

YONG, K., CAVET, J., JOHNSON, P., MORGAN, G., WILLIAMS, C., NAKASHIMA, D., AKINAGA, S., OAKERVEE, H. & CAVENAGH, J. 2016. Phase I study of KW-2478, a novel Hsp90 inhibitor, in patients with B-cell malignancies. *Br J Cancer,* 114**,** 7-13.

YU, L., CHEN, X., WANG, L. & CHEN, S. 2016. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*.

ZELKO, I. N., MARIANI, T. J. & FOLZ, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-

SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med,* 33**,** 337-49.

VII Veröffentlichungen

VII.1 Beiträge in Fachzeitschriften

12. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Queudeville M, Feucht J, Blaeschke F, Schlegel P, Feuchtinger T, Lang P, Müller I, Handgretinger R, Heinz WJ: Efficacy, safety and feasibility of antifungal prophylaxis with posaconazole tablet in paediatric patients after haematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017, 143(7):1281-1292.

11. Heinz WJ, Cabanillas Stanchi KM, Klinker H, Blume O, Feucht J, Hartmann U, Feuchtinger T, Lang P, Handgretinger R, Döring M: Posaconazole plasma concentration in pediatric patients receiving antifungal prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Mycol* 2016, 54(2):128-137.

10. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Klinker H, Eikemeier M, Feucht J, Blaeschke F, Schwarze CP, Ebinger M, Feuchtinger T, Handgretinger R et al: Posaconazole plasma concentrations in pediatric patients receiving antifungal prophylaxis during neutropenia. *Med Mycol* 2016, 55(4):375-384

9. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Feucht J, Queudeville M, Teltschik HM, Lang P, Feuchtinger T, Handgretinger R, Müller I: Ferritin as an early marker of graft rejection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Ann Hematol* 2016, 95(2):311-323.

8. Döring M, Rohrer KM, Erbacher A, Gieseke F, Schwarze CP, Bader P, Handgretinger R, Hofbeck M, Kerst G: Human leukocyte antigen DR surface expression on CD14+ monocytes during adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2015, 94(2):265-273.

7. Döring M, Eikemeier M, Cabanillas Stanchi KM, Hartmann U, Ebinger M,

Schwarze CP, Schulz A, Handgretinger R, Müller I: Antifungal prophylaxis with posaconazole vs. fluconazole or itraconazole in pediatric patients with neutropenia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015, 34(6):1189-1200.

6. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Mezger M, Erbacher A, Feucht J, Pfeiffer M, Lang P, Handgretinger R, Müller I: Cytokine serum levels during post-transplant adverse events in 61 pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Cancer* 2015, 15:607.

5. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Haufe S, Erbacher A, Bader P, Handgretinger R, Hofbeck M, Kerst G: Patterns of monocyte subpopulations and their surface expression of HLA-DR during adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2015, 94(5):825-836.

4. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Erbacher A, Haufe S, Schwarze CP, Handgretinger R, Hofbeck M, Kerst G: Phagocytic activity of monocytes, their subpopulations and granulocytes during post-transplant adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Immunobiol* 2015, 220(5):605-613.

3. Cabanillas Stanchi KM, Bruchelt G, Handgretinger R, Holzer U: Nifurtimox reduces N-Myc expression and aerobic glycolysis in neuroblastoma. *Cancer Biol Ther* 2015, 16(9):1353-1363.

2. Rohrer KM, Haug M, Schwörer D, Kalbacher H, Holzer U: Mutations in the substrate binding site of human heat-shock protein 70 indicate specific interaction with HLA-DR outside the peptide binding groove. *Immunol* 2014, 142(2):237-247.

1. Döring M, Rohrer KM, Tsiflikas I, Buchenau W, Wilke M, Handgretinger R, Poets CF, Goelz R: A newborn with grouped facial skin lesions and subsequent seizures. *BMC Pediatr* 2014, 14:126.

VII.2 Kongressbeiträge

4. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Queudeville M, et al. Antifungal prophylaxis with posaconazole suspension versus tablet in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. 17th International Congress on Infectious Diseases (**ICID 2016**); April 2016, 2016; Hyderabad, India.

3. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Queudeville M, et al. Pharmacokinetic Analysis during Antifungal Prophylaxis with Posaconazole Suspension in Pediatric and Adolescent Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 57th Annual Meeting of The American Society of Hematology 05 - 08 Dec 2015 (**ASH 2015**); Orlando, FL, USA.

2. Döring M, Cabanillas Stanchi KM, Queudeville M, et al. Posaconazole plasma concentration in pediatric patients receiving antifungal prophylaxis during neutropenia or after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 19th International Society for Human and Animal Mycology Congress; 04 - 08 May 2015, (**ISHAM 2015**); Melbourne, Australia.

1. Rohrer KM, Bruchelt G, Handgretinger R, Holzer U. Synergistic Effect Of Nifurtimox and Inhibition Of Hsp70/Hsp90 In Treatment Of Neuroblastoma. 55th Annual Meeting of The American Society of Hematology; 07-10 Dec 2013, (**ASH 2013**); New Orleans, LA, USA.

Danksagung

Vorab gilt mein Dank den Professoren und Professorinnen, die zum Gelingen meiner akademischen Ausbildung den größten Teil beigetragen haben, und die ich nachfolgend in aufsteigender chronologischer Reihenfolge nennen möchte.

Prof. Dr. Gerd Becker, Prof. Dr. Wolfgang Kaim, Prof. Dr. Thomas Schleid, Prof. Dr. Dieter Wolf, Prof. Dr. Sabine Laschat, Prof. Dr. Helmut Bertagnolli, Prof. Dr. Hermann Stoll, Dr. Wolf Wölfel, Prof. Dr. Christina Wege, Prof. Dr. Christian P. Speer, Prof. Dr. Wolfgang Schwack, Prof. Dr. Walter Vetter, Prof. Dr. Gertrud Morlock, Dr. Wolfgang Armbruster, Prof. Dr. Tilman Grune, Prof. Dr. Arnd Heyer, Prof. Dr. Dietmar Breithaupt, Prof. Dr. Reinhard Kohlus, Prof. Dr. Herbert Schmidt, Prof. Dr. Hans Konrad Biesalski, Prof. Dr. Lutz Graeve, Prof. Dr. Jan Frank, Dr. Nicolle Breusing, Prof. Dr. Rupert Handgretinger, PD Dr. Ursula Holzer, Prof. Dr. Gernot Bruchelt und Prof. Dr. Stefan Stevanovic.

Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger danke ich für die wissenschaftliche und menschliche Begleitung, die Bereitstellung der Laboratorien und die Möglichkeit, diese Arbeit an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen anfertigen zu können.

PD Dr. Ursula Holzer danke ich von Herzen für die wissenschaftliche und menschliche Begleitung durch diese Arbeit, für das große Vertrauen in die Fähigkeiten und Verantwortung der Arbeitsgruppe und im Besonderen für das freie und gelassene Arbeitsklima.

Prof. Dr. Gernot Bruchelt danke ich besonders für die Inspiration, die vielen und zu allen Zeiten bereichernden wissenschaftlichen Diskurs, dafür, dass er seine Erlebnisse

und Erfahrungen im Bereich seines wissenschaftlichen Schaffens so großzügig mit mir geteilt hat.

Dr. med. Michaela Döring danke ich für die vielen besonderen Momente, die produktive Zusammenarbeit, ihr großes Vertrauen in meine Fähigkeiten und ihre besondere Haltung gegenüber dem Leben, den Menschen und der Arbeit, die mich tief berührt und inspiriert haben.

Der Bayer HealthCare AG, Leverkusen danke ich für die großzügige und kostenlose Bereitstellung von Nifurtimox (Lampit). Herrn Dr. Adam Nitsche und Herrn Dr. Martin Springsklee danke ich für die Betreuung in dieser Zeit.

Der Jürgen-Manchot-Stiftung danke ich von Herzen für die Förderung durch Vergabe des Doktoranden-Stipendiums, die die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht haben. Mein Dank gilt dabei auch besonders Frau Elvira Thormann für ihre Unterstützung und Betreuung über diese Zeit.

Dem Förderverein für krebskranke Kinder e.V. Tübingen danke ich für die Überbrückung der finanziellen Unterstützung.

Dr. Sabine Schleicher danke ich für unzählige Ratschläge, Tipps und Tricks für die Arbeiten im Labor und für den Umgang mit den Zellen, die mir meine Arbeit um einiges erleichtert haben.

Meinen Leidens- aber in erster Linie wohl „Freudens“-GenossInnen und - mehr oder weniger - täglichen WegbegleiterInnen Dr. Katharina Reinhardt, Karla Baltner, Dr. Marina Pal, Renate Koch, Franziska Wiese, Barbara Goecke, Lisa Schwab, Dr. Dr. Markus Mezger, Dr. Jeannette Woiterski, Kathrin Stauß, Anne Krahl, Dr. Ayline Kübler, Darina Siegmund, Sarah Bühler, Dr. Manon Queudeville mit Claire, Jenny

Rottenberger, Prof. Dr. Karin Schilbach, Marco Sterk, Christian Welker, Katja Sonntag, Dr. Evi Schmid und allen anderen, die hier nicht namentlich genannt sind, aber dennoch ein Stück des Weges mitgegangen sind, danke ich für alle Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit, aber vor allen Dingen dafür, dass die Zeit auf dem Weg zur Vollendung dieser Arbeit geprägt war von schönen, unendlich lustigen, einmaligen und besonderen Momenten und ich mich stets mit einem guten Gefühl daran erinnern werden kann.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie sowie meinen Freunden, die hier nicht namentlich genannt sind, aber nicht minder zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Berufliche Erfahrung

02/2012 – heute	Forschungsdoktorat/wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung I Hämatologie/Onkologie; unterstützt durch die Jürgen Manchot Stiftung sowie die Bayer HealthCare AG
02/2012 – 02/2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung I Hämatologie/Onkologie DFG-Projekt HO-2340/2-1

Weiterbildung

2010	Zertifizierung als Qualitätsmanagement-Fachkraft (QM-B) durch den TÜV-Süd

Stipendien

06/2013-06/2016	Stipendiatin der Jürgen-Manchot-Stiftung, Düsseldorf

Universität

01/2011 – 11/2012	Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften, Universität Hohenheim, Diplomvergabe
10/2005 – 01/2011	Studium der Lebensmittelchemie (StEx./Dipl.), Schwerpunkt Analytische Chemie an den Universitäten Stuttgart und Hohenheim

Schule

1996 – 2005	Maria-von-Linden-Gymnasium, Calw-Stammheim; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1992-1996	Grundschule Wildberg-Gültlingen

Weitere Aktivitäten

2009 - heute	Mitarbeit in der AG Junge Lebensmittelchemiker (AGJLC)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Wirkung von Nifurtimox in der Behandlung des Neuroblastoms *in vitro*“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

_____ _____

Datum, Ort Unterschrift