

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Jörg Dötsch

Untersuchung von Telomerase-interagierenden Substanzen in Kombinationstherapien beim Neuroblastom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Felix Lennard Otte

promoviert am 05.12.2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Fischer
2. Gutachter: Professor Dr. med. S. J. Grau

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

- Die Planung der Experimente und Auswertung der erhobenen Daten erfolgte selbstständig. Herr Prof. Dr. Matthias Fischer., Frau Dr. Sandra Ackermann und Herr Dr. Christoph Bartenhagen lieferten fachliche Unterstützung.
- Die dieser Arbeit zugrunde liegende Etablierung der Substanzscreeningmethode wurde nach Konsultation und Unterstützung durch Beckman Coulter sowie durch das Biomek Training in einer ersten Version erarbeitet. Eine umfassende Überarbeitung, die Optimierungsschritte und darauffolgenden Experimente auf der Biomek 4000 Workstation wurden in Planung und Umsetzung eigenständig durchgeführt.
- Die Western Blot Experimente mit den Antikörpern Beta-Aktin, caspase-7, p21 und PCNA wurden mit der Unterstützung von Frau Yvonne Kahlert umgesetzt. Die Daten aus den erweiterten Western Blot Experimenten mit den Antikörpern Beta-Aktin, pCDK-1 und PARP sowie die Durchflusszytometrie-Experimente wurden nach meiner Planung von Frau Dr. Anna-Maria Hellmann ohne meine Mitarbeit im Labor durchgeführt.

Mein Beitrag an den Vorabveröffentlichungen ergab sich wie folgt:

- doi:10.1007/s13402-022-00702-8 (geteilte Erstautorenschaft): Die *in vitro* Experimente und die statistische Auswertung der Arbeit wurden, wie oben beschrieben, durch mich durchgeführt. Gemeinsam mit Frau Dr. Janina Fischer-Mertens, die für die *in vivo* Experimente verantwortlich war, leiste ich den wesentlichen Teil der Arbeit.
- doi:10.1200/PO.19.00072 (Mitautorenschaft): Die *in vitro* Substanzscreening-Experimente mit den telomerase-interagierenden Substanzen wurden mit der etablierten semi-automatischen Methode eigenständig durch mich umgesetzt und ausgewertet.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 15.04.2025

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Matthias Fischer für die Betreuung, Förderung und die konstruktive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit bedanken. Insbesondere die Ausbildungsmöglichkeit durch das Biomek Consumer Training in der Schweiz habe ich als großes Vertrauen in meine selbstständige Arbeit wahrgenommen und wird mir positiv in Erinnerung bleiben.

Frau Dr. Janina Fischer-Mertens gilt mein besonderer Dank im Rahmen der gemeinsamen wissenschaftlichen Publikation. Darüber hinaus dienten mir die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene als große Hilfe und zur stetigen Ermutigung.

Für die experimentelle Ausbildung und herzliche Unterstützung bin ich besonders Frau Yvonne Kahlert und Frau Anne Welte aus dem Labor für experimentelle Kinderonkologie Köln verbunden. Bei Frau Dr. Andrea Roderwieser bedanke ich mich ebenfalls für die fundierte fachliche Beratung und Ermöglichung zur Teilhabe an meiner ersten wissenschaftlichen Publikation. Auch danke ich Frau Dr. Anna-Maria Hellmann für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Für die finanzielle Unterstützung durch das Köln Fortune Stipendium, welches mir ermöglichte, mich im vollen Umfang auf meine Arbeit zu konzentrieren, möchte ich mich beim Forschungsbeirat des Köln Fortune Programms bedanken.

Meinen besonderen Dank möchte ich schließlich meiner Partnerin Lara Drogosch, meinen guten Freunden Sebastian Krautstrunk und Luca Pesch und auch meinen Eltern Britta und Christian Otte sowie meinen Brüdern Moritz und Tim Otte für ihre uneingeschränkte Unterstützung aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ZUSAMMENFASSUNG	7
1. EINLEITUNG	8
1.1 Neuroblastom	8
1.1.1. Definition	8
1.1.2. Ätiologie	8
1.1.3. Risikofaktoren	8
1.1.4. Therapie und Prognose	11
1.2 Antitumorale Substanzen	13
1.2.1. Chemotherapeutika – Topoisomerase-II-Inhibitoren	13
1.2.2. ALK-Inhibitoren	13
1.2.3. Telomerase-interagierende Substanzen	14
1.2.4. MEK-Inhibitoren	15
1.3 Substanzsynergismus	16
1.3.1. Definition	16
1.3.2. Modelle	16
1.4 Zielsetzung und Fragestellungen	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1. Zelllinien	19
2.1.2. Bedarfsmittel und Geräte	19
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	21
2.2 Methoden	22
2.2.1. Zellkultur	22
2.2.2. Substanzscreening	23
2.2.3. Western Blot	23
2.2.4. Durchflusszytometrie	24
2.2.5. Statistische Auswertung und Darstellung	24

3. ERGEBNISSE	25
3.1 Etablierung einer halbautomatisierten Substanzscreening-Methode	25
3.1.1. Experimenteller Aufbau	25
3.1.2. Optimierung	32
3.1.3. Evaluation	39
3.2 <i>In vitro</i> Behandlung mit Einzelsubstanzen	42
3.2.1. Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin	43
3.2.2. Behandlung mit den ALK-Inhibitoren Ceritinib und Lorlatinib	45
3.2.3. Behandlung mit telomerase-interagierenden Substanzen	48
3.2.4. Behandlung mit dem MEK-Inhibitor Trametinib	52
3.3 <i>In vitro</i> Kombinationsbehandlung mit 6-thio-dG	53
3.3.1. Synergismus und Zytotoxizität	53
3.3.2. Mechanismen der Zellwachstumsinhibition	55
4 DISKUSSION	59
5 LITERATURVERZEICHNIS	64
6 ANHANG	71
6.1 Abbildungsverzeichnis	71
6.2 Tabellenverzeichnis	72
7 VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	73

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
6-thio-dG	6-Thio-2'-Deoxyguanosine
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
ALT	Alternative Lengthening of Telomers
ATP	Adenosintriphosphat
CI	Combination Index
CTG	CellTiter-Glo
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GI50	Growth-Inhibition 50. Konzentration des Wirkstoffs, die erforderlich ist, um die Zellviabilität 50 % zu hemmen.
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
n.d.	not determined (nicht bestimmbar)
Gene und Proteine¹	
ALK	ALK receptor tyrosine kinase
ATRX	ATRX chromatin remodeler
BRAF	B-Raf proto-oncogene
CDK, CDK4/6, pCDK1	cyclin-dependent kinases, phosphorylated CDK1
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
MAPK, MEK1/2	mitogen activated kinase-like protein
MYCN	MYCN proto-oncogene
NF1	neurofibromin 1
p21	CDKN1A, cyclin dependent kinase inhibitor 1A
p53	tumor protein p53
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PTPN11	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
RAS, HRAS, KRAS, NRAS,	RAS proto-oncogene, HRAS proto-oncogene, KRAS proto-oncogene, NRAS proto-oncogene,
ROS1	ROS proto-oncogene 1
TERT	telomerase reverse transcriptase; Telomerase
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist eine sich aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervengewebes entwickelnde pädiatrische Tumorerkrankung und zählt zu den häufigsten malignen Tumoren im Kindesalter. Während der Erkrankungsverlauf in etwa der Hälfte der Fälle selbst mit limitierter Therapie äußerst positiv verläuft, weisen Hoch-Risiko-Neuroblastome trotz intensivster Behandlungsstrategien eine ungünstige Prognose auf. Da die multimodale Hoch-Dosis-Therapie keinen Raum zur weiteren Eskalation bietet, liegt ein wesentlicher Fokus der aktuellen Forschung auf der Etablierung neuer Behandlungsmöglichkeiten für Hoch-Risiko-Patienten. Auf molekularer Ebene sind diese Tumoren unter anderem durch eine Überaktivität des Enzyms Telomerase gekennzeichnet. Weitere angreifbare Alterationen stellen aktivierende Mutationen der ALK-Kinase und des RAS-MAPK-Signalwegs dar. Zielgerichtete molekulare Therapien könnten zu einem verbesserten therapeutischen Ansprechen und weniger Nebenwirkungen führen.

Zum *in vitro* Screening tumortoxischer Wirkstoffe wurde eine präzise und effiziente semi-automatische Methode zur Testung von Einzelsubstanzen und Substanzkombinationen auf der Biomek 4000 Plattform etabliert. An einem Kollektiv aus Neuroblastomzelllinien wurden die wachstumsinhibierenden Effekte der telomerase-interagierenden Substanzen Imetelstat, 6-thio-dG, Costunolide und BIBR-1532, der ALK-Inhibitoren Ceritinib und Lorlatinib, dem MEK-Inhibitor Trametinib sowie der konventionellen Chemotherapeutika Etoposid und Doxorubicin untersucht. Ergänzend wurden Kombinationsbehandlungen mit 6-thio-dG und den Topoisomeraseinhibitoren sowie dem ALK-Inhibitor Ceritinib durchgeführt.

Die telomer-schädigende Substanz 6-thio-dG wies *in vitro* eine effektivere wachstumsinhibierende Wirkung als direkte Telomeraseinhibitoren auf. Hierbei zeigte sich ein signifikant stärkeres therapeutisches Ansprechen in telomerase-positiven Zelllinien. Ferner konnten in den Kombinationen aus 6-thio-dG mit Etoposid oder Doxorubicin, jedoch nicht mit Ceritinib, hochpotente Synergien nachgewiesen werden. Auf mechanistischer Ebene war der therapeutische Effekt vorwiegend durch eine gesteigerte Apoptose sowie zelllinienabhängig durch einen Zellzyklusarrest begründet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Telomerase in telomerase-abhängigen Neuroblastomen ein wirksames therapeutisches Ziel darstellen könnte. Darüber hinaus konnte eine starke synergistische Wirkung von 6-thio-dG in Kombination mit etablierten zytotoxischen Substanzen nachgewiesen werden. Zielgerichtete Therapien gegen Telomerase könnten daher eine neue therapeutische Option für Neuroblastompatienten darstellen. Da Telomerase generell in zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert ist, könnte eine solche Therapie über das Neuroblastom hinaus weitreichende Anwendungsmöglichkeiten finden.

1. Einleitung

1.1 Neuroblastom

1.1.1. Definition

Das Neuroblastom ist eine sich aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervengewebes entwickelnde pädiatrische Tumorerkrankung. Die Inzidenzraten nehmen mit zunehmendem Alter ab². Mit jährlich ca. 120 Erkrankungen in Deutschland ist das Neuroblastom allgemein der dritthäufigste³ und im ersten Lebensjahr der häufigste maligne pädiatrische Tumor⁴.

1.1.2. Ätiologie

Während der Embryonalentwicklung stellt die Neuralleiste eine Ansammlung von pluripotenten Vorläuferzellen für Gewebe neuroektodermalen Ursprungs dar. Eine Gewebsdifferenzierung erfolgt unter anderem in das sympathische und periphere Nervensystem, Chromaffinzellen der Nebenniere, Melanozyten sowie Zellen des kraniofazialen Skeletts.⁵ Neuroblastome entstehen durch genetische Aberrationen in den sympathoadrenalen Progenitorzellen (Neuroblasten), die zu einem Entwicklungsstillstand mit verzögerter Differenzierung führen⁶.

Entsprechend der Lokalisation von Neuroblasten finden sich Primärtumoren am häufigsten in Zellen der Nebennieren, entlang des Grenzstrangs und in abdominellen Paraganglien. In fortgeschrittenen Stadien erfolgen Metastasierungen vorwiegend durch eine Infiltration von Knochenmark, Knochen, Lymphknoten und Leber sowie seltener intrakraniell, pulmonal, oder in das zentrale Nervensystem.⁷.

1.1.3. Risikofaktoren

Als prognostische Marker für eine Hochrisiko-Erkrankung berücksichtigt die INRG-Risikostratifizierung von Neuroblastompatienten ein Patientenalter über 18 Monate, ein metastasiertes Krankheitsstadium und genetische Marker, wie eine *MYCN*-Amplifikation, eine 11q-Abberation sowie den DNA-Ploiditätsstatus⁸.

Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)

Die Tyrosinkinase Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) nimmt Einfluss auf Proliferation, Überleben, und Differenzierung von Zellen und hat insbesondere für die Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Funktion⁹.

Im Allgemeinen sind die häufigsten *ALK*-Aberrationen in menschlichen Tumorzellen chromosomale Translokationen, die zu Fusionsgenen führen⁹. Für Neuroblastome hingegen sind aktivierende Punkt-Mutationen im *ALK*-Gen von besonderer Bedeutung, die in 6-11 % der Fälle vorliegen¹⁰. Die häufigsten Mutationen R1275Q und F1174L sind mit einem Hoch-Risiko-Status assoziiert¹¹, kommen jedoch auch bei prognostisch günstigen Neuroblastomen vor¹². Daneben führen genomische Amplifikationen zu einer gesteigerten *ALK*-Aktivität. Außerdem stellen hereditäre *ALK*-Mutationen die Hauptursache für familiäre Neuroblastome dar.¹³

Telomer-Verlängerungsmechanismen

Somatische Zellen gehen nach einer limitierten Anzahl von Zellteilungen in die zelluläre Seneszenz über. Im Kontrast dazu eignen sich Tumorzellen im Allgemeinen telomer-erhaltende Mechanismen an, die zur replikativen Unsterblichkeit und damit zu unkontrolliertem Zellwachstum führen.¹⁴

Seit über 30 Jahren ist bekannt, dass das Vorliegen einer *MYCN*-Amplifikation, die in etwa 20 % aller Neuroblastome vorliegt¹⁵, mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert ist¹⁶. Die Überexpression des kodierten Proteins N-MYC stimuliert Zellproliferation, führt zu einem stammzellähnlichen, selbst-erneuernden Status und ist somit ein Treiber für die Tumorentstehung¹⁷. Neben vielen anderen Funktionen induziert N-MYC die Expression des Telomerase-Gens (*TERT*) und führt hierdurch zu einer gesteigerten Aktivität der Telomerase^{18,19}. Ähnlich wie *MYCN*-Amplifikationen¹⁸ führen strukturelle *TERT*-Rearrangements ebenfalls zu einer gesteigerten Telomeraseaktivität¹⁹. Ein Erhalt der Telomere kann daneben auch über den Mechanismus des „Alternative Lengthening of Telomeres“ (ALT) erfolgen, welcher unabhängig von der Telomeraseaktivität eine Telomerverkürzung verhindert²⁰.

RAS-MAPK-Signalweg

Eine Deregulation innerhalb der RAS-MAPK-Signalkaskade findet sich in zahlreichen Tumorentitäten, da *RAS* zu den am häufigsten mutierten Onkogenen zählt. Besonders betroffen sind dabei Pankreas- und intestinale Karzinome. Dem Signalweg werden essenzielle regulatorische Einflüsse auf die Regulierung von Wachstum sowie Teilung und Differenzierung der Zelle zugeschrieben.²¹

Beim Neuroblastom finden sich Mutationen innerhalb des RAS-MAPK-Signalwegs besonders häufig in Tumorrezidiven. Hierzu zählen aktivierende Alterationen in *ALK*, *NF1*, *BRAF*, *PTPN11*, *FGFR1* und den drei *RAS*-Genen *KRAS*, *HRAS* und *NRAS*. Da Rezidive typischerweise Resistenzen gegen klassische Chemotherapeutika aufweisen und mit einer

hohen Mortalität einhergehen, wird der genetischen Analyse und einer folgenden zielgerichteten Therapie eine besondere Bedeutung zugesprochen.²²

Molekulare Risikostratifizierung

Basierend auf den oben aufgeführten Erkenntnissen unterteilt ein neuer Ansatz zur molekularen Risikostratifizierung Neuroblastome in Gruppen mit und ohne telomer-erhaltende Mechanismen²³ (Abb. 1). Neuroblastome mit Telomeraseaktivierung durch *MYCN*-Amplifikationen, *TERT*-Rearrangements, oder mit Aktivierung des ALT-Signalwegs wird ein hohes Risiko zugesprochen. Zusätzliche aktivierende Alterationen im RAS- oder p53-Signalweg erhöhen die Aggressivität des Tumors. Im Gegensatz dazu zeigen Tumore ohne telomer-erhaltende Mechanismen ein günstiges Risikoprofil durch häufige spontane Regression und Differenzierung. Die molekularen Risikogruppen sind dabei in weiten Teilen mit den Risikogruppen der INRG-Einteilung assoziiert.

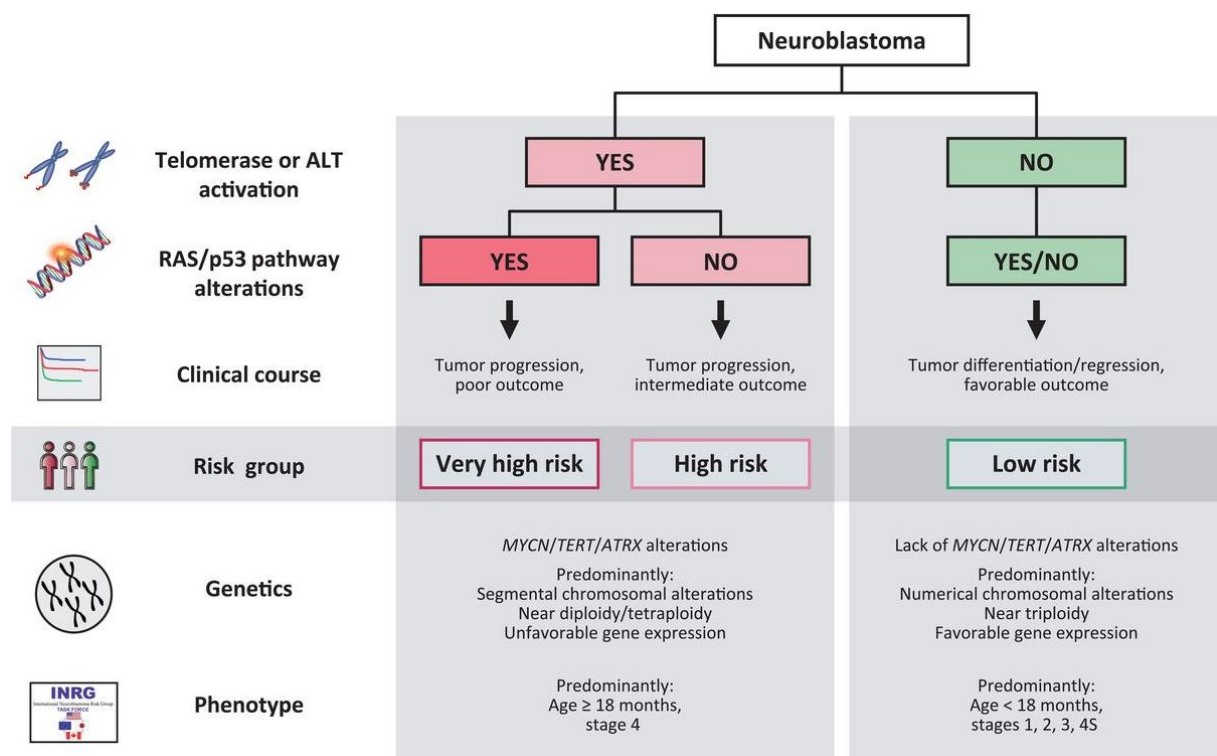


Abbildung 1: Molekulare Risikostratifizierung von Neuroblastomen

Risikogruppen sind definiert durch das Vorliegen, oder Fehlen von telomer-erhaltenden Mechanismen (*MYCN*-Amplifikation, *TERT*-Rearrangement, oder ALT-Aktivierung) und aktivierenden Alterationen des RAS-, oder p53-Signalwegs. Abbildung von Ackermann et al.²³.

1.1.4. Therapie und Prognose

In ungefähr der Hälfte der Fälle verläuft die Erkrankung selbst ohne oder mit nur milden Therapiemaßnahmen äußerst limitierend, während in der anderen Hälfte die Prognose trotz intensivster Behandlung weiterhin ungünstig bleibt (Abb. 2). Diese Heterogenität stellt im klinischen Alltag eine relevante Herausforderung für die Prognoseabschätzung und individuelle Therapieanpassung dar²⁴. Die Gesamtüberlebensrate nach 5 Jahren konnte in den letzten 30 Jahren von insgesamt 56 % auf 74 % angehoben werden². Die multimodale Behandlungsstrategie von Hoch-Risiko-Patienten zeigt jedoch weiterhin unzureichende Fortschritte mit 5-Jahresüberlebensraten von weniger als 50 %²⁵.

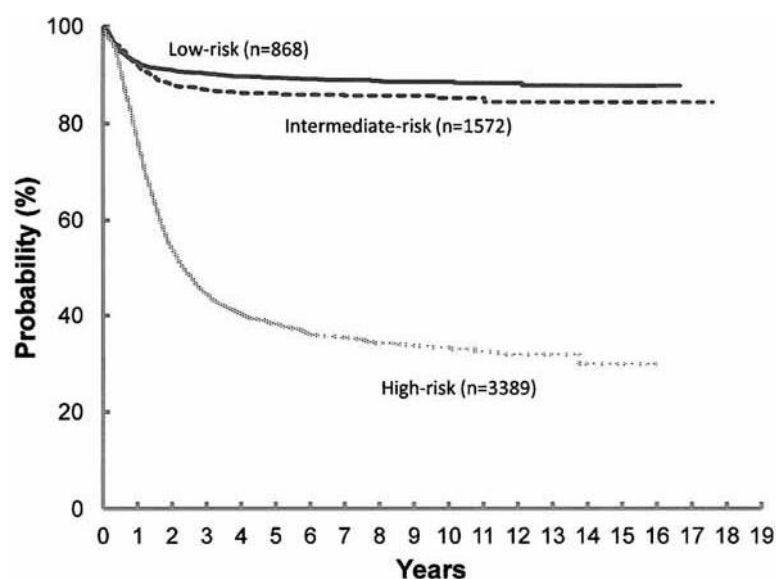


Abbildung 2: Ereignis-freies Überleben von Neuroblastompatienten nach Risikogruppen

Ereignis-freies Überleben behandelter Patienten aus Studien der Children's Cancer Group, Pediatric Oncology Group (<2001), oder der ANBL00B1-Studie (>2001) ab Zeitpunkt der Diagnosestellung. Abbildung von Park et al.²⁶. Die Einteilung in Risikogruppen erfolgte abhängig von klinischen und biologischen Faktoren (Alter, INSS-Staging, *MYCN*-Status, DNA copy number, histologisches Grading).

Patienten mit niedrigem und mittlerem INRG-Risikostatus zeigen ein 5- bzw. 3-Jahresüberleben von 97 % bzw. 95 %^{27,28}. Bei niedrigem Risiko ist die chirurgische Resektion ohne adjuvante Chemotherapie meist die einzige Therapieintervention. Das spezielle Stadium 4S nach der Klassifikation des INSS-Staging Systems mit kleinen regionalen Tumoren, ausgeprägten Leber-, Haut- und minimalen Knochenmarksmetastasen weist aufgrund einer häufig auftretenden spontanen Regression eine äußerst gute Prognose auf²⁹. Aber auch bei Säuglingen mit lokalisierten Tumoren lässt sich oftmals eine Spontanregression beobachten³⁰. Diese Subgruppen werden oft ohne Therapie bis zur spontanen Remission observiert. Mit mittlerem Risiko wird die operative Therapie durch Chemotherapie und gegebenenfalls

Bestrahlung ergänzt, oder auch ersetzt. Das Chemotherapieregime besteht dabei aus einer Kombination aus unter anderem Carboplatin, Etoposid, Cyclophosphamid und Doxorubicin.²⁴

Hoch-Risiko-Patienten werden mit einer multimodalen Chemotherapie, chirurgischen Resektion, Bestrahlung, Stammzelltransplantation und Immunotherapie behandelt³¹. Trotz der intensiven Therapie ist das langfristige therapeutische Ansprechen in fortgeschrittenen Stadien immer noch unbefriedigend. Zusätzlich weist die Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation relevante Nebenwirkungen auf³². Dazu zählen Infektionen unter der Immunsuppression sowie toxische Wirkungen auf innere Organe, wie Gehörschäden, Niereninsuffizienz und eine venös okklusive Leberkrankheit. Das breite Spektrum an schweren toxischen Wirkungen liefert nicht selten zusätzliche Gründe für eine eingeschränkte Lebensqualität oder niedrige Überlebensraten.

Stärkere antitumorale Effekte und geringere Nebenwirkungen könnten mittels zielgerichteter molekularer Therapien erreicht werden. Mit einem zunehmenden Verständnis von den molekularen Pathomechanismen der Hoch-Risiko-Neuroblastome wurden zahlreiche klinische Studien zur Etablierung neuer Behandlungsmöglichkeiten initiiert³³. Nichtsdestotrotz bleiben konventionelle Chemotherapeutika aufgrund der Seltenheit geeigneter molekularer Zielstrukturen und z.T. auch aufgrund begrenzter Wirksamkeit der verfügbaren zielgerichteten Medikamente³⁴ zentrale Bestandteile der Erstlinientherapie²⁴. Kombinationen von zielgerichteten Therapien mit klassischen Chemotherapeutika oder mit Substanzen, die gezielt weitere Signalwege ausschalten, könnten eine Resistenzbildung vorbeugen sowie eine höhere Effektivität bei gleichbleibender oder geringerer Toxizität aufweisen³⁵. Die Etablierung effektiver Kombinationstherapien ist daher eine wichtige Fragestellung in der präklinischen und klinischen Onkologie.

1.2 Antitumorale Substanzen

1.2.1. Chemotherapeutika – Topoisomerase-II-Inhibitoren

Topoisomerasen stabilisieren als DNA-Reperaturenzyme die genomische Integrität, indem fehlerhafte Windungen der DNA-Struktur durch vorübergehende Brüche der Doppelhelix gelöst werden. Hierbei ist die Topoisomerase-II entscheidend für die Chromosomenkondensation und Trennung während der Zellproliferation. Durch diese zentrale Funktion bietet sich die Topoisomerase-II als therapeutisches Ziel in zahlreichen Tumorentitäten an. Topoisomerase-II-Inhibitoren hemmen meistens nicht direkt die enzymatische Aktivität, sondern stabilisieren die intermediären DNA-Spaltungskomplexe, sodass diese Substanzklasse auch unter der Bezeichnung Topoisomerase-II-Gifte bekannt ist.³⁶

Ein relevanter Anteil aller Chemotherapieprotokolle beinhaltet in der Erstlinientherapie Topoisomerase-II-Inhibitoren wie Etoposid und Doxorubicin³⁶. Etoposid stabilisiert den intermediären Topoisomerase-II-DNA-Komplex, wodurch Doppelstrangbrüche in der DNA-Struktur entstehen³⁷. Das Anthrazyklin Doxorubicin verursacht eine Interkalation benachbarter Basenpaare, eine Hemmung der Topoisomerase-II und eine direkte toxische Wirkung auf die Zellmembran durch freie Radikale im Rahmen der Metabolisierung³⁸.

Klassische Zytostatika werden in der Neuroblastom-Therapie in Kombinationen und meist neoadjuvant eingesetzt. Ziel der Therapie ist eine Tumorreduktion sowie eine Elimination von Metastasen vor einer chirurgischen Resektion. Zu den kurzfristigen Nebenwirkungen zählt insbesondere eine Knochenmarksuppression. Durch die weitreichenden DNA-Schäden an gesunden Körperzellen können im weiteren Verlauf Zweitmalignome wie eine AML entstehen. Darüber hinaus ist eine spezifische Nebenwirkung der Anthrazykline die dosiskumulative Kardiotoxizität durch die Empfindlichkeit der kardialen Zellen auf die Membranschädigung. Neben den umfassenden und dosislimitierenden Off-target Toxizitäten stellt auch die Resistenzbildung ein großes Problem dar.³⁹

1.2.2. ALK-Inhibitoren

ALK-Inhibitoren sind Tyrosinkinase-Inhibitoren. Der erste zugelassene ALK-Inhibitor Crizotinib fand Einsatz in der Erstlinientherapie von *ALK*-mutierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, nachdem eine Überlegenheit gegenüber der platinhaltigen Therapie festgestellt wurde⁴⁰. Unter Neuroblastompatienten konnten jedoch nur wenig erfolversprechende Ergebnisse erzielt werden⁴¹.

Der ALK-Inhibitor Ceritinib stellt eine Alternative für Crizotinib-resistente Tumoren mit *ALK*-Mutationen dar. In einer multizentrischen Phase-1-Studie wurde in 20 % der vorbehandelten Neuroblastompatienten eine Therapieantwort erzielt⁴². In präklinischen Experimenten konnte

gezeigt werden, dass eine Ceritinib-Behandlung eine Wirksamkeit gegen zahlreiche Crizotinib-resistente ALK-Mutationen aufweist⁴³.

Lorlatinib aus der 3. Generation ist ein hochpotenter ALK/ROS1-Inhibitor, der durch eine stark erhöhte ALK-Affinität der Resistenzbildung vorbeugen könnte. Innerhalb von *in vitro* Experimenten konnte eine hochselektive Wirkung auf ALK-mutierte Neuroblastomzellen erzielt werden⁴⁴.

Eine ALK-Inhibition zeigte in Neuroblastom-Zelllinien anstelle einer Apoptose-Reaktion vorwiegend eine Hemmung des Zellzyklus. Dabei führte ein Arrest in der G₁-Phase zu einer gehemmten Zellproliferation. Dieser Arrest war nach Beendigung der Inhibition reversibel und verdeutlichte, dass der Einsatz von Substanzkombinationen für eine anhaltende therapeutische Wirkung vermutlich wichtig ist.⁴⁵

Resistenzen gegenüber einer ALK-Inhibitorthherapie können durch sekundäre Mutationen am Wirkort, aber auch durch eine kompensatorische Aktivierung alternativer Signalwege begründet sein⁴³. Kombinationstherapien mit ALK-Inhibitoren könnten Resistenzbildungen verhindern und die Ansprechraten erhöhen. So konnte eine Kombination aus Ceritinib und dem CDK4/6-Inhibitor Ribociclib in präklinischen Experimenten starke Synergien in ALK-mutierten Zelllinien aufweisen und in Xenograft-Modellen eine vollständige Remission erzielen⁴⁶.

1.2.3. Telomerase-interagierende Substanzen

Eine Vielzahl von Tumoren ist abhängig von einer erhöhten Telomeraseaktivität¹⁴. Da in somatischen Zellen die Telomerase kaum aktiv ist und telomerase-abhängige Krebszellen in der Regel kürzere Telomere als gesunde Zellen aufweisen, könnte eine zielgerichtete Hemmung der Telomererhaltung einen hochspezifischen Therapieansatz bieten⁴⁷.

Der Telomeraseinhibitor Imetelstat (GRN163L) wirkt durch eine Blockierung der Bindungsstelle für Telomerbausteine als kompetitiver Enzyminhibitor⁴⁸. Präklinische Ergebnisse zeigten eine hochwirksame Telomerasehemmung, wodurch ein verringertes Tumorwachstum und eine Sensibilisierung für konventionelle Chemotherapeutika bei allgemein guter Verträglichkeit beobachtet werden konnten. Diese vielversprechenden Ergebnisse führten zur Initiierung von ersten Phase-I- und II-Studien mit rezidierten oder therapierefraktären soliden Tumoren.⁴⁹ Hierbei zeigten jedoch nur zwei von zwanzig Patienten und keiner von sechs Neuroblastompatienten ein partielles therapeutisches Ansprechen⁵⁰. Die wesentlichen Toxizitäten waren Zytopenien.

BIBR-1532 ist ein synthetischer, nicht-kompetitiver Telomeraseinhibitor⁵¹. In niedrigen Dosierungen treten therapeutische Wirkungen nach einer Latenzperiode durch Telomerverkürzungen auf. Unter hohen Dosierungen über 30 µM können dazu direkte zytotoxische und antiproliferative Effekte bereits nach kurzer Zeit erzielt werden⁵². Einen weiteren Telomeraseinhibitor stellt das natürlich vorkommende Sequiterpen Costunolide dar, welches in *in vitro* Studien eine Zellwachstumshemmung innerhalb von nur 48 Stunden verursachte⁵³.

Ein potentieller Nachteil einer Erstlinientherapie mit Telomeraseinhibitoren könnte der verzögerte Wirkungseintritt bis zur kritischen Telomerverkürzung sein⁴⁷. In dieser Zeit könnten die Tumorzellen ungehemmt weiter proliferieren. Dieses Intervall könnte durch das Nukleosidanalogen 6-Thio-2'-Deoxyguanosine (6-thio-dG) umgangen werden. Dabei wirkt die Substanz als Vorstufe für ein Substrat der Telomerase. Dieses wird mit hoher Affinität durch das Enzym in die Telomersequenz eingebaut und führt zu einer rapiden Zerstörung der Telomerstruktur, dem sogenannten Uncapping. Der hauptsächliche therapeutische Effekt beruht auf der folgenden Signalkaskade dysfunktionaler Telomere, die einen Zellzyklusarrest und Apoptose verursacht. Dieser Wirkmechanismus scheint unabhängig von der Telomerlänge zu einem früheren Ansprechen gegenüber einer direkten Telomeraseinhibition zu führen.⁵⁴

1.2.4. MEK-Inhibitoren

Trametinib ist ein MEK1/2-Inhibitor, der in der Therapie von nicht-resezierbaren Melanomen zugelassen ist und in zahlreichen weiteren klinischen Studien Einsatz findet⁵⁵. In präklinischen Neuroblastommodellen konnte eine starke Korrelation zwischen einem *RAS-MAPK*-Mutationsstatus und einem therapeutischen Ansprechen auf eine MEK-Inhibitortherapie nachgewiesen werden²². Hierbei zeigten Zelllinien mit *RAS/BRAF*-Mutationen die höchste Empfindlichkeit auf eine gezielte Inhibition *in vitro*, gefolgt von Zelllinien mit *NF1*-, oder *ALK*-Mutationen. Xenograft-Modelle konnten diese Ergebnisse zum Teil bestätigen. So wurde das Tumorwachstum in den *RAS-MAPK*-mutierten Zelllinien unter der Inhibitortherapie *in vivo* wirksam verzögert, während eine Wildtyp-Zelllinie ein unbeeinträchtigtes Zellwachstum zeigte. Diese Untersuchungen legten einen möglichen therapeutischen Vorteil einer *RAS-MAPK* Inhibition vor allem in rezidierten Neuroblastomen nahe.

1.3 Substanzsynergismus

1.3.1. Definition

Der Effekt einer Substanzkombination wird abhängig von der Differenz zwischen der erwarteten und der beobachteten therapeutischen Wirkung klassifiziert⁵⁶. Liegen beide Werte nah beieinander spricht man von Additivität. Synergismus besteht, wenn der beobachtete Effekt stärker als der erwartete ist und daher von einer Potenzierung der Substanzwirkungen durch Interaktion ausgegangen wird. Gegenüberliegend dazu liegt ein Kombinationsantagonismus vor, wenn durch gegenseitige Wirksamkeitshemmung die gemessene therapeutische Antwort geringer als die berechnete ausfällt.

Nach Greco et. al⁵⁷ gibt es vier Gründe, Substanzkombinationen in der Antitumorthherapie einzusetzen. Erstens wird eine direkte Potenzierung der tumortoxischen Effekte durch Interaktion der Einzelsubstanzen erhofft. Zweitens könnte die Resistenzbildung gegen eine einzelne Substanz verringert werden. Ähnlich dazu könnte eine stärkere Wirkung bei heterogenen Tumoren mit teilweiser klonaler Resistenz erzielt werden. Zuletzt wird angenommen, dass durch unterschiedliche Nebenwirkungsspektren insgesamt höhere tumortoxische Dosen toleriert werden könnten.

Um ein breites Spektrum an möglichen Interaktionen zu überblicken, werden Kombinationen in aufsteigenden Konzentrationsschritten und teilweise in verschiedenen Verhältnissen analysiert⁵⁸. Dennoch können stochastische Synergismusvorhersagen auf der Basis von Zellkulturdaten die Komplexität von biologischen Systemen nur unvollständig abbilden. Sie werden daher als Screeningmethode verwendet, um potenzielle Kombinationen zu identifizieren, die dann in *in vivo* Experimenten zu validieren sind⁵⁹.

1.3.2. Modelle

Statistische Modelle zur Beurteilung der therapeutischen Effekte von Substanzkombinationen berufen sich auf die grundsätzlichen Definitionen von Additivität, Synergismus und Antagonismus. Jedoch bestehen maßgebliche Unterschiede in der Berechnung der zu erwartenden Additivität und der Interpretation der Differenz zwischen vorhergesagtem und beobachtetem Effekt. Diese Implementierungsunterschiede können zu widersprüchlichen Beurteilungen verschiedener Modelle führen⁵⁶.

Die simple Hypothese, dass eine Substanz synergistisch ist, wenn der therapeutische Effekt größer als die Summe beider Einzeleffekte ist, wird als Response Additivity bezeichnet⁵⁹. Hierbei wird jedoch der meist logarithmische Charakter experimenteller Dosis-Effekt Kurven vernachlässigt, wodurch eine synergistische Wirkung eher unterschätzt wird. Dies ist intuitiv nachvollziehbar, da eine Kombination aus zwei Einzelwirkungen, die jeweils eine 60-

prozentige Reduktion der Viabilität verursachen, keine 120-prozentige Senkung erzielen kann⁵⁸. Zwei weitere historisch etablierte Modelle stellen das Bliss-Unabhängigkeit-Modell und das Loewe-Additivität-Modell dar, welche auf jeweils gegensätzlichen Grundsätzen beruhen. Das Bliss-Unabhängigkeit-Modell⁶⁰ berechnet den erwarteten Effekt unter der Annahme, dass die Wirkstoffe einer Kombination unabhängig voneinander agieren. Im Gegensatz dazu geht das Loewe-Additivität-Modell davon aus, dass zwei Substanzen, die über den gleichen Wirkmechanismus verfügen, immer additiv wirken⁶¹. Beide Modelle setzen Kenntnisse über die genauen Wirkmechanismen voraus und lassen sich daher nur eingeschränkt auf biologische Systeme anwenden.

Die Chou-Talalay-Methode beruht auf der Median-Effect-Gleichung, welche aus dem Massenwirkungsgesetz und nicht aus stochastischen Gleichungen abgeleitet wurde^{62,63}. Die Kombinationsindex-Werte (CI) werden aus der experimentell ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehung der einzelnen Substanzen berechnet und geben an, ob die Wirkung der Kombinationen synergistisch ($CI < 1$), additiv ($CI = 1$) oder antagonistisch ($CI > 1$) ist. Durch die Berechnung wird die gesamte Dosis-Wirkungs-Kurve in die Beurteilung miteingeschlossen. Dabei sind Kenntnisse über die exakte Wirkweise und Interaktionen der Substanzen nicht erforderlich. Ferner können Substanzen in verschiedenen Verhältnissen miteinander vermischt werden. Aufgrund der genannten Vorteile findet dieses Modell weitreichenden Einsatz in der pharmakologischen Forschung.

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen

Das Ziel dieser Arbeit liegt darin, neue Ansätze für die zielgerichtete molekulare Therapie von Neuroblastomen zu identifizieren. Hierbei sollen zytotoxische Effekte verschiedener Substanzen singulär und in Kombination an Neuroblastom-Zelllinien *in vitro* getestet werden. Im Mittelpunkt stehen hierbei telomerase-interagierende Substanzen.

Zur systematischen und effizienten Durchführung der *in vitro* Substanztestungen soll zunächst eine semi-automatische Methode auf dem Biomek 4000 Automated Workstation Pipettierroboter etabliert werden. Die konventionellen Chemotherapeutika Etoposid und Doxorubicin, die ALK-Inhibitoren Ceritinib und Lorlatinib, der MEK-Inhibitor Trametinib sowie die telomerase-interagierenden Substanzen 6-thio-dG, Imetelstat, Costunolide und BIBR-1532 sollen untersucht werden.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Wie stark ist der wachstumsinhibierende Effekt der untersuchten Substanzen in singulärer Anwendung?
2. Wie hoch ist die Effektivität der eingesetzten Substanzen in Abhängigkeit der genomischen Veränderungen der untersuchten Zelllinien (z.B. *TERT*-Rearrangement oder *ALK*-Mutation)?
3. Lassen sich synergistische Effekte durch eine Kombination von Substanzen erzielen?
4. Welche biologischen Mechanismen begründen die Zellwachstumsinhibition effektiver Substanzen?

Es wird erwartet, dass diese Untersuchungen neue Erkenntnisse über die therapeutische Nutzbarkeit molekularer Veränderungen beim Neuroblastom liefern werden. Vielversprechende Substanzkombinationen sollen anschließend in weiteren Projekten in Tierversuchen *in vivo* getestet werden und somit die Grundlage für die Entwicklung innovativer, zielgerichteter Therapien bieten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Zelllinien

Die Zelllinien IMR-32, GI-MEN, LS, LAN-6, SH-SY5Y und KELLY wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, BE(2)-C von der AG Deubzer (Berlin), BJ, SK-N-FI und TR-14 von der American Tissue Culture Collection (ATCC), CLB-GA vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und CHLA-90 von der Children's Oncology Group (Texas) erworben.

2.1.2. Bedarfsmittel und Geräte

Tabelle 1: Verwendete Bedarfsmittel und Geräte

Name	Hersteller	Informationen
25-, 75-, 175 cm ² Zellkulturflasche	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AUT)	
SpectraMax® i3x Multi-Mode microplate reader	Molecular Devices (San Jose, CA, USA)	
Cedex® XS Analyzer	Roche Diagnostics (Rotkreuz, CH)	
Mini-Blot-Modul	Invitrogen (Waltham, MA, USA)	
BD FACSCanto™ II Clinical Flow Cytometry System	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)	Mit Verwendung der FlowJo- Software

Biomek 4000 Automated Workstation

Repetitive Pipettierschritte wurden mit Hilfe des Pipettierroboters Biomek 4000 Automated Workstation durchgeführt. Dieser ist mit einer Abzugshaube für steriles Arbeiten ausgestattet. Ferner wurden die 8-Kanalpipettierköpfe MP1000, MP200 und der Einkanalpipettierkopf mit eingebautem Flüssigkeitssensor P200L verwendet. Zusätzlich ist ein Orbital Shaker-Tool zum Mischen von Flüssigkeiten und ein Gripper-Tool eingebaut.

Tabelle 2: *Verwendetes Material auf der Biomek 4000 Automated Workstation*

Name	Hersteller	Informationen
Biomek 4000 Automated Liquid Handler	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
Abzugshaube	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
Dual Disposal	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
Orbital Shaker ALP	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
MP1000-Tool	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
MP200-Tool	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
P200L-Tool	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
Gripper-Tool	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
24-Position Tube Rack Holder	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	
Quarter Reservoir Sterile Divided by Length	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	19 ml Maximalvolumen
Quarter Reservoir Sterile	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	38 ml Maximalvolumen
Biomek P50 Tips, pre-sterile with barrier	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	50 µl Maximalvolumen
Biomek P250 Tips, pre-sterile with barrier	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	190 µl Maximalvolumen
Biomek P1000 Tips, Span-8 Sterile Filtered Wide Bore	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)	1025 µl Maximalvolumen
96-Well Zellkulturplatte, ZELLKULTUR MICROPLATTE, 96 WELL, PS, F-BODEN	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AUT)	Art. Nr.: 655083
96-Well Konusplatte, MICROPLATTE, 96 WELL, PP, V-BODEN (KAMINFORM)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AUT)	Art. Nr.: 651204

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Die Experimente wurden unter Verwendung der nachfolgend aufgelisteten Substanzen, Chemikalien, Reagenzien und Antikörper durchgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Substanzen

Name	Hersteller / Vertreiber	Informationen
6-thio-dG	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO
Costunolide	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO
BIBR-1532	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO
Imetelstat	Geron (Foster City, CA, USA)	Lösungsmittel H ₂ O
Etoposid	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO
Doxorubicin	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO
Ceritinib	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO
Lorlatinib	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO
Trametinib	Selleckchem (München, DE)	Lösungsmittel DMSO

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Name	Hersteller	Informationen
Anti-beta Actin antibody	Abcam (Cambridge, UK)	aus Maus, IgG
Anti-beta Actin antibody	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	aus Kaninchen, IgG
Cleaved Caspase-7 (Asp198) (D6H1) Rabbit mAb #8438	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	aus Kaninchen, IgG
Phospho-CDK1 (Thr14, Tyr15) Antibody (44-686G)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	aus Kaninchen, IgG
PCNA (D3H8P) XP® Rabbit mAb #13110	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	aus Kaninchen, IgG
p21 Waf1/Cip1 (12D1) Rabbit mAb #2947	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	aus Kaninchen, IgG
polyclonal goat anti-mouse IgG HRP	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	
anti-rabbit IgG HRP linked	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	

Tabelle 5: *Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Assays*

Name	Hersteller/Lieferant	Informationen
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	Promega (Madison, USA)	
Fötale Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	
Trypanblau	Roche Diagnostics (Rotkreuz, CH)	
Accutase	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
Nitrocellulosemembran	Biosharp (Hefei, China)	
Chemilumineszenz Nukleinsäure-Detektionsmodul	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	
Annexin V Binding Buffer, Propidiumiodid, Annexin V	Biolegend (San Diego, CA, USA)	

2.2 Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 175 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) bei 37 °C und 5 % CO₂, und die temporäre Lagerung in DMSO bei -80 °C. Arbeitsschritte an Zellen wurden aseptisch unter einer Sterilbank durchgeführt. BE(2)-C, CLB-GA, GI-MEN, IMR-32, KELLY, LS, SH-SY5Y und TR-14 wurden in RPMI 1640 GlutaMAX™ mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert, während SK-N-FI in DMEM mit 10 % FCS und 1 % non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific), LAN-6 in DMEM mit 20 % FCS, CHLA-90 in DMEM mit 20 % FCS und 1x Insulin-Transferrin-Selen sowie BJ in DMEM mit 10 % FCS in Kultur gehalten wurde. Kontaminationen mit Mykoplasmen wurden durch den Mycoplasmacheck Service (Eurofins Genomics, Ebersberg, DE) ausgeschlossen.

2.2.2. Substanzscreening

Ein semi-automatisches Substanzscreeningprotokoll wurde auf der Biomek 4000 Automated Workstation etabliert. Die Zelllinien wurden in Kultur gehalten bis eine visuelle Konfluenz von 50 – 75 % erreicht wurde. Ein Passagelimit von 25 wurde nicht überschritten. Anschließend erfolgte eine manuelle Ablösung der Zellen und eine Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung des Trypanblau-Assays⁶⁴ und Analyse auf einem Cedex® XS Analyzer (Roche Diagnostics). 24 Stunden nachdem die Zellen in einer Konzentration von 3000 Zellen in 100 µl pro Well auf einer 96-Well Platte ausplattiert wurden, erfolgte die Zugabe von Einzelsubstanzen oder Kombinationen in neun verschiedenen Konzentrationen und dem entsprechenden Lösungsmittel DMSO oder H₂O als Kontrolle (jeweils in Triplikaten).

Die inhibitorischen Effekte auf das Zellwachstum wurden mit dem CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay⁶⁵ (Promega) gemessen. Hierbei wird die ATP-Aktivität, als Marker für metabolisch aktive Zellen, durch das Enzym Luciferase in Lichtintensität umgewandelt und quantifiziert. Nach 96-stündiger Substanzinkubation wurden die Lumineszenzsignale nach Hinzugabe von 100 µl CTG-Reagenz pro Well, zweiminütigem Schwenken mit einer Frequenz von 150 Umdrehungen pro Minute und einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem SpectraMax® i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices) gemessen. Dieser Prozess wurde an einem separaten Tag wiederholt, sodass für jede Substanz und jede Konzentrationsstufe mindestens sechs Messpunkte vorlagen. Die Zellviabilitäten einer Konzentrationsstufe wurden als Mittelwert mit Standardabweichung der prozentuellen Abweichung zu dem Mittelwert der jeweiligen Kontrollsignale angegeben.

2.2.3. Western Blot

Die Neuroblastom-Zelllinien BE(2)-C, CLB-GA und SH-SY5Y wurden in 25 cm² Zellkulturflächen (Greiner Bio-One) ausgesät und bei mittlerer visueller Konfluenz (ca. 50 %) mit jeweils drei verschiedenen Konzentrationen der Kombinationen 6-thio-dG + Etoposid, 6-thio-dG + Doxorubicin und 6-thio-dG + Ceritinib sowie DMSO als Kontrollsubstanz inkubiert. Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford⁶⁶ quantifiziert. 50 µg Proteinlysate wurden auf einem 4-12 % Bis-Tris Gel mittels Elektrophorese separiert und auf eine Nitrocellulosemembran (Biosharp) elektrotransferiert. Die Membranen wurden in Lösung aus TBST und 5 % Magermilch geblockt und in TBST mit Primärantikörpern gegen β-Actin (rabbit), β-Actin (mouse), cleaved caspase-7 (rabbit), p21^{Waf1/Cip1} (rabbit), PARP (rabbit), pCDK1 (rabbit), oder PCNA (rabbit) inkubiert und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Zuletzt wurden die Membranen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern anti-rabbit IgG oder anti-mouse IgG inkubiert und unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Detektionsmoduls (ThermoFisher Scientific) auf dem Mini-Blot-Modul (Invitrogen) visualisiert.

2.2.4. Durchflusszytometrie

Die Neuroblastom-Zelllinien BE(2)-C, CLB-GA und SH-SY5Y wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) in einer Konzentration von $0,1 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationsstufen der Kombination aus 6-thio-dG + Etoposid oder DMSO als Kontrollsubstanz für 48 Stunden behandelt. Die Zellablösung erfolgte mit Accutase (Sigma-Aldrich). Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen mitsamt Überstand geerntet, zweimalig mit FACS-Puffer (PBS, 5 % FCS, 2 mM EDTA) gewaschen und durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Nach zwei PBS-Waschschritten wurden die Zellen mit Propidiumiodid (40 g/ml) gefärbt und mit RNase A (100 µg/ml) versetzt. Für die Analyse von Apoptose wurden die Zellen mit Überstand geerntet und zweimalig mit Zellfärbepuffer (Biolegend, USA) gewaschen. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Zellen wurden in Annexin-Bindungspuffer, Propidiumiodid und Annexin-Alexa 488 nach Herstellerangaben (Biolegend) resuspendiert. Anschließend wurde RNase A hinzugegeben. Für die Durchflusszytometrie und die anschließende Datenanalyse wurde ein FACSCanto II und die FlowJo-Software (BD Biosciences) genutzt.

2.2.5. Statistische Auswertung und Darstellung

Die statistische Auswertung erfolgte unter der Verwendung von python Version 3.8.10 mit den Paketen pandas und scipy. Für die grafische Darstellung wurden die python Pakete seaborn und matplotlib genutzt. Flussdiagramme wurden mit Diagrams.net erstellt.

Halbinhibitorische Konzentrationen (GI₅₀-Werte) der Inhibitionskurven von Einzelsubstanzen wurden durch eine Python-Implementierung der four-parameter log-logistic Funktion LL.4 des R-Pakets *drc*⁶⁷ und der Parameteroptimierung mit dem python paket scipy berechnet. Maximalwerte wurden mit $d=100$ begrenzt und GI₅₀-Werte bei $f(x)=50$ ausgelesen.

Substanzsynergismus wurde anhand der Chou-Talalay Combination Index Methode mit der Software CompuSyn berechnet⁶⁸. Dafür wurde die prozentuelle Viabilität anhand der CTG-Werte in prozentuelle Inhibition umgerechnet. Negative Inhibitionswerte bei relativen Viabilitäten über 100 % unter dem Einfluss von geringen Substanzkonzentrationen wurden ausgeschlossen.

Für Vergleiche zwischen Werten aus parametrischen, unabhängigen Stichproben wurde der t-Test und für nichtparametrische, unabhängige Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Analyse von Korrelationen zwischen metrischen Variablen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient, während für nichtparametrische Variablen die Rangkorrelation nach Spearman verwendet wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer halbautomatisierten Substanzscreening-Methode

Im Folgenden werden die Planung, Umsetzung und Optimierung einer semiautomatischen experimentellen Methode anhand der Etablierung einer Substanzscreening-Methode auf der Biomek 4000 Laboratory Automated Workstation von Beckman & Coulter erläutert.

3.1.1. Experimenteller Aufbau

Methode 1: Ausplattieren von Zellen

Die Zellen wurden manuell abgelöst und die Zellzahl pro μl mit einer Trypanblau-Färbung auf einem Cedex® XS Analyzer bestimmt. Es erfolgte eine Verdünnung der Zellsuspension, sodass die gewünschte Zellzahl mit dem zu pipettierenden Volumen pro Well erreicht wurde. Dann wurde die gemischte Zellsuspension in eine Sektion eines geteilten Reservoirs auf dem Biomek 4000 gefüllt. Die folgenden Schritte erfolgten automatisiert. Der Deckel der Platte wurde umgesetzt und das Reservoir mit 1000 μl Spitzen gründlich gemischt. Die Spitzen wurden auf die 125 μl Größe gewechselt und das Zellmedium mit dem 8-Kanal-Pipettierkopf spaltenweise ausgesät. Die Spitzen wurden zwischen den einzelnen Spalten einer Platte nicht gewechselt, um Material und Zeit zu sparen. Ein langsames Pipettieren und ein Blow-Out Schritt minimierten Restvolumina innerhalb der Pipettierspitzen. Zum Ende wurde der Deckel der Platte zurückgesetzt. Es ließen sich bis zu vier Platten in einem Lauf pipettieren.

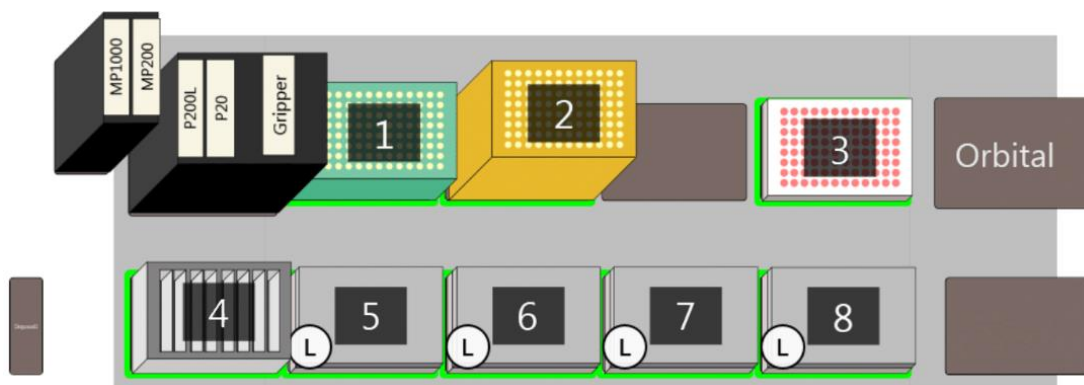


Abbildung 3: Aufbau der Zellausplattierungs-Methode

(1) P250 Pipettierspitzen, (2) P1000 Pipettierspitzen, (3) Deckelablage, (4) Reservoir mit Zellauslösung, (5-8) Zellkulturplatten. Verwendung von MP1000, MP200 und Gripper. Mischen auf Orbital. Verwerfen der Pipettierspitzen in Trash. Abbildung aus Biomek Software.

Methode 2: Berechnung der Pipettier Volumina

Die Substanzscreeningmethode sollte verschiedene Substanzen in variablen Konzentrationen und beliebigen Anordnungen auf der Zellkulturplatte erlauben. Hierfür wurde eine Excel-Datei erstellt, die es ermöglicht, die gewünschten Konzentrationen verschiedener Substanzen übersichtlich in den Wells der Zellkulturplatten zu platzieren (Abb. 4). Aus diesen Daten erfolgte die automatisierte Berechnung aller erforderlichen Pipettier Volumina der Verdünnungsreihe und der Transferschritte auf die Zellkulturplatten. Die berechneten Werte können als csv-Datei ausgegeben und automatisiert in die Biomek-Software importiert werden.

A

Volume FinalPlate [μl]	100	Different concentrations in FinalPlate [μmol/l]											
TransferVolume in FinalPlate [μl]	1,5												
Zwischenvolumen DiluentPlate	50	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Substanz 1 Name	6-tdg	StockVolume: 38,83μl											
StockConcentration [mmol/l]	10	100	30	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01			

B

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		100	30	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01		
C		100	30	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01		
D		100	30	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01		
E		100	30	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01		
F		100	30	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01		
G		100	30	10	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01		
H												

C

Concentration required in Dilution Plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6766,7	2030	676,67	203	67,667	20,3	6,7667	2,03	0,6767	0	0	0

SubstanceVolume from previous well with higher concentration [μl] (vvd)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	33,833	15	16,667	15	16,667	15	16,667	15	16,667	0	0	0

DiluentVolume [μl]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16,167	35	33,333	35	33,333	35	33,333	35	33,333	0	0	0

Abbildung 4: Excel-Datei für die Berechnung der zu pipettierenden Volumina

Ausschnitte der Excel-Datei mit einer exemplarischen Konfiguration (A) einer Substanz in neun verschiedenen Konzentrationsstufen und (B) variabler Platzierung auf einer Zellkulturplatte mit (C) Berechnung der Verdünnungsreihe. Hiermit werden automatisch die Volumina aller Pipettierschritte für bis zu acht verschiedenen Substanzen mit Kontrollsubstanz in jeweils bis zu zwölf Konzentrationsstufen in einer bis vier Zellkulturplatten kalkuliert und in die Biomek-Software importiert. Aus diesen Berechnungen ergeben sich bis zu 3552 Pipettierschritte.

Tabelle 6: Variablen für die Berechnung der zu pipettierenden Volumina

Name		Beschreibung
Verdünnungsreihe		
$V_{d(x)},$ V_d	Dilutionsvolumen	Maximal erreichtes Volumen des x-ten Wells der Verdünnungsreihe, nachdem Diluentvolumen und Dilutionstransfervolumen im Well platziert wurden und bevor Volumen in das nächste Well weitergegeben wird. Je nach Berechnungsmethode konstant oder variabel.
$c_{d(x)}$	Dilutionskonzentration	Substanzkonzentration des x-ten Wells der Verdünnungsreihe. Konstant.
$n_{d(x)}$	Dilutionsstoffmenge	Substanzstoffmenge im Dilutionsvolumen.
$V_{td(x)},$ V_{td}	Dilutionstransfervolumen	Transferiertes Substanzvolumen aus vorherigem Well der Verdünnungsreihe oder Stocklösung in x-tes Well der Verdünnungsreihe. Je nach Berechnungsmethode konstant oder variabel.
$c_{td(x)}$	Dilutionstransferkonzentration	Substanzkonzentration im Dilutionstransfervolumen.
$n_{td(x)}$	Dilutionstransferstoffmenge	Substanzstoffmenge im Dilutionstransfervolumen.
$V_{dil(x)}$	Diluentvolumen	Lösungsmittelvolumen, welches in x-tes Well der Verdünnungsplatte hinzugegeben wurde, um die vorherige Konzentration auf die x-te Konzentration zu verdünnen.
Finalplatte		
n	Substanzanzahl	Anzahl verschiedener Substanzen innerhalb eines Wells der Finalplatte. Konstant für alle Wells der Finalplatte.
V_{tf}	Finaltransfervolumen	Substanzvolumen, welches aus der Verdünnungsreihe in die Finalplatte transferiert wird. Konstant für alle Wells der Finalplatte.
$c_{tf(x)}$	Finaltransferkonzentration	Substanzkonzentration im Finaltransfervolumen aus x-tem Well der Verdünnungsreihe.
$n_{tf(x)}$	Finaltransferstoffmenge	Substanzstoffmenge im Finaltransfervolumen aus x-tem Well der Verdünnungsreihe.
V_f	Finalplattenvolumen	Gesamtvolumen in Finalplatte nach Transfer aller Substanzen.
V_{mf}	Finalplattenmediumvolumen	Volumen in Finalplatte vor Transfer der Substanzvolumina, bestehend aus Medium und Zellen. Konstant für alle Wells der Finalplatte.
$c_{f(x)}$	Finalplattenkonzentration	Substanzkonzentration in Finalplatte der Konzentrationsstufe x.
$n_{f(x)}$	Finalplattenstoffmenge	Substanzstoffmenge in Finalplatte der Konzentrationsstufe x.

Die benötigte Substanzkonzentration des x -ten Wells innerhalb der Verdünnungsreihe (Dilutionskonzentration $c_{d(x)}$) wurde aus der gewünschten Konzentration in der Zellkulturplatte (Finalplattenkonzentration $c_{f(x)}$), dem Zellmediumvolumen (Finalplattenmediumvolumen V_{mf}) und dem insgesamt beigefügten Substanzvolumen $n * V_{tf}$ des zugehörigen Wells der Finalplatte berechnet.

$$c_{d(x)} = c_{tf(x)} = \frac{n_{tf(x)}}{V_{tf}} = \frac{c_{f(x)} * V_f}{V_{tf}} = \frac{c_{f(x)} * (V_{mf} + n * V_{tf})}{V_{tf}}$$

Abbildung 5: Berechnung der Dilutionskonzentration

Das Transfervolumen (Dilutionstransfervolumen $V_{td(x)}$) aus der nächsthöheren Stufe der Verdünnungsreihe ($x - 1$), welches für den x -ten Verdünnungsschritt benötigt wurde, setzte sich aus der berechneten Verdünnungskonzentration ($c_{d(x)}$), dem festgelegten Maximalvolumen eines Wells der Dilutionsplatte (Dilutionsvolumen V_d) und der Konzentration aus dem vorherigen Verdünnungsschritt ($c_{d(x-1)}$) zusammen.

$$V_{td(x)} = \frac{n_{td(x)}}{c_{td(x)}} = \frac{n_{td(x)}}{c_{d(x-1)}} = \frac{c_{d(x)} * V_d}{c_{d(x-1)}}$$

Abbildung 6: Berechnung des Dilutionstransfervolumens mit konstantem Dilutionsvolumen

Das Maximalvolumen jeder Verdünnungsstufe setzte sich aus dem transferierten Substanzvolumen (Dilutionstransfervolumen $V_{td(x)}$) und dem benötigten Lösungsmittelvolumen (Diluentvolumen $V_{dil(x)}$) zusammen, sodass das Diluentvolumen umgekehrt berechnet werden konnte.

$$V_{dil(x)} = V_d - V_{td(x)}$$

Abbildung 7: Berechnung des Diluentvolumens

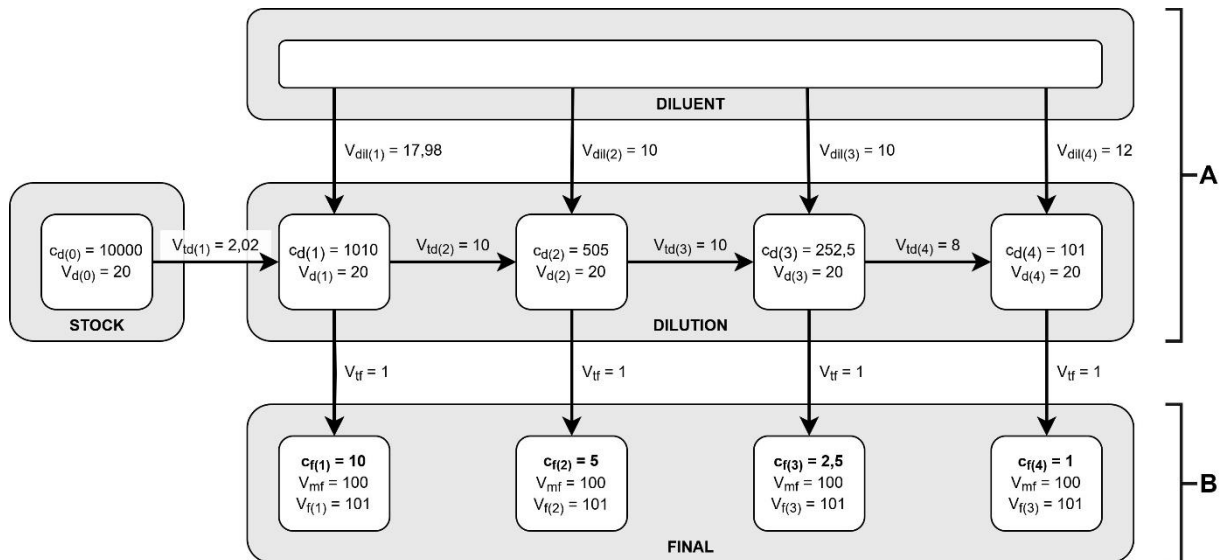


Abbildung 8: Beispiel für pipettierte Volumina einer Substanz

Schematische Darstellung der Vorbereitung einer Verdünnungsreihe und Transfer auf die Zellkulturplatte. Konzentrationen (c) in $\mu\text{mol/L}$, Volumina (V) in μl . Konstante Parameter sind ein Finalplattenmediumvolumen (V_{mf}) von 100 μl , ein Finaltransfervolumen (V_{tf}) von 1 μl , ein maximales Dilutionsvolumen (V_d) von 20 μl sowie die gewünschten Konzentrationsstufen von 10 μM , 5 μM , 2,5 μM und 1 μM auf der Finalplatte (Final).

(A) Vorbereitung der Verdünnungsplatte (Dilution) aus der Ausgangskonzentration (Stock) und Lösungsmittel (Diluent) und folgende Weitergabe in die Wells der nächstniedrigeren Konzentration.

(B) Substanztransfer aus der Verdünnungsplatte in die Finalplatte mit bereits vorliegendem Zellmedium.

Methode 2: Verdünnung und Hinzugeben von Substanzen

Die gewünschten Substanzkonzentrationen wurden in aufsteigender Sortierung reihenweise auf der 96-Well Platte in Dreifachbestimmungen platziert. Da sechs Reihen zur Verfügung standen, bedeutete dies, dass zwei verschiedene Substanzen untereinander analysiert werden konnten.

Auf dem Deck des Roboters wurden Boxen mit Pipettenspitzen in der Größe 50 µl (Biomek P50 Filter) und 125 µl (Biomek P250 Filter) entsprechend für Volumina bis zu 20 µl und über 20 µl manuell platziert. Die benötigten Substanzen wurden jeweils in einem 1,5 ml Röhrchen in einer Ausgangskonzentration auf dem Roboter platziert. Zusätzlich wurde ein Lösungsmittel (DMSO, oder H₂O) in ein Reservoir gefüllt. Der Roboter las die zuvor mittels Excel erstellte csv-Datei ein, in der die zu pipettierenden Volumina für die Erstellung der Verdünnungsreihe und für den Transfer in die Zellkulturplatten aufgelistet waren. Dann begann die automatisierte Zubereitung der Verdünnungsreihen für jede Substanz und das folgende Pipettieren in die Zellkulturplatten. Damit eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen gewährleistet und möglicherweise entstandene Luftblasen entfernt werden konnten, wurde die Platte langsam für zwei Minuten auf dem Schüttler geschwenkt.

Insgesamt konnten in einem Lauf bis zu vier Platten pipettiert werden, wobei nach zwei Platten das Programm automatisch pausiert und die leeren Spitzenboxen manuell ausgetauscht werden mussten. Für das Pipettieren von Kombinationssubstanzen, bei der Wells auf der Zielplatte mehrfach pipettiert wurden, wurde eine Abwandlung des Programms erstellt.

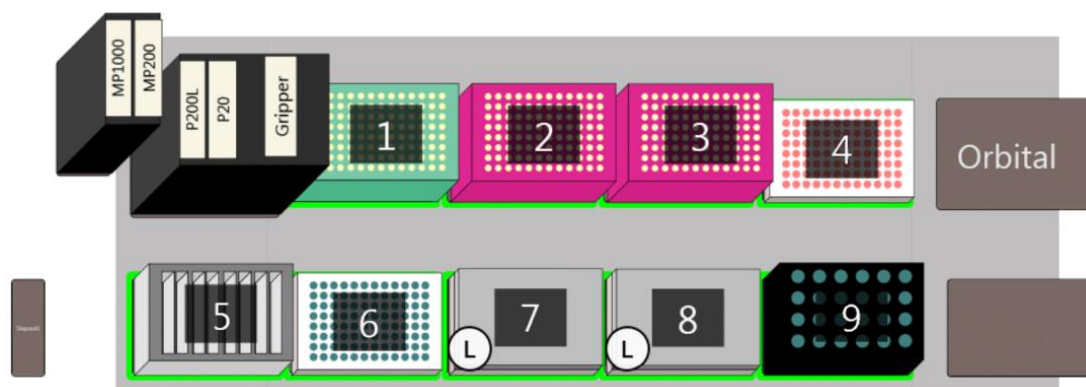


Abbildung 9: Aufbau der Substanzverteilungsmethode

(1) P250 Pipettenspitzen, (2,3) P50 Pipettenspitzen, (4) Deckelablage, (5) Lösungsmittelreservoir, (6) Verdünnungsreihe, (7,8) Zellkulturplatten, (9) Substanzreservoir. Verwendung von P200L und Gripper, Mischen auf Orbital. Verwerfen der Pipettierspitzen in Trash. Abbildung aus Biomek Software.

Methode 3: Analyse des Zellwachstums

Das CellTiter-Glo Reagenz wurde nach Herstellerangaben mit dem beigefügten Puffer vorbereitet. Das Reagenz und die zu analysierenden Platten wurden auf Raumtemperatur gebracht. Dies war wichtig, damit kein Temperaturgradient zwischen beiden Flüssigkeiten bestand, welcher zu ungleichmäßigen Signalen geführt hätte. Bis zu vier Platten wurden auf das Deck gestellt. Das CellTiter-Glo Reagenz wurde in das Reservoir gefüllt und auf einer Platte spaltenweise über die Wells verteilt. Anschließend wurde die Zelllyse mit zweiminütigem Mixen auf dem integrierten Schüttler unterstützt. Dreißig Minuten später wurden die Lumineszenz-Signale mit dem SpectraMax® i3xReader detektiert.

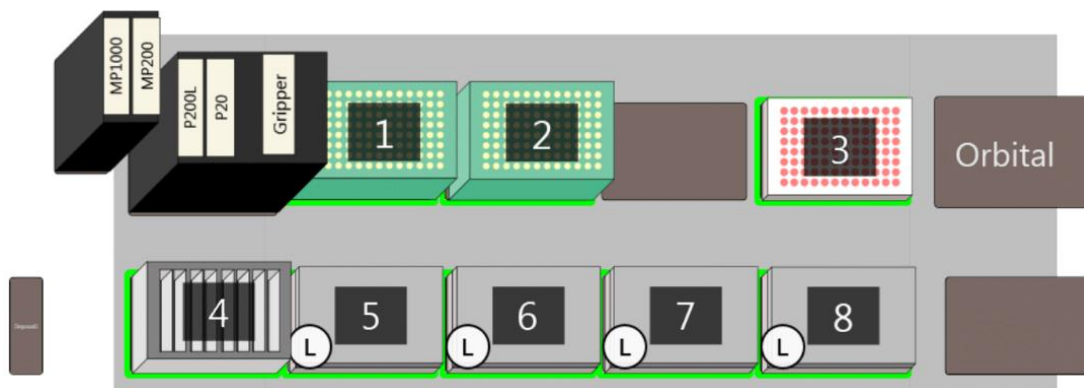


Abbildung 10: Aufbau der Zellwachstumsanalyse-Methode

(1,2) P250 Pipettierspitzen mit fehlenden Spitzen in Reihe 1 und 8, (3) Deckelablage, (4) CellTiter-Glo-Reservoir, (5-8) Zellkulturplatten. Verwendung von MP200 und Gripper. Mischen auf Orbital. Verwerfen der Pipettierspitzen in Trash. Abbildung aus Biomek Software.

3.1.2. Optimierung

Flüssigkeitsabhängige Pipettiertechniken

Die physikalischen Eigenschaften unterschiedlicher Flüssigkeiten können einen maßgeblichen Einfluss auf die Versuchsgenauigkeit ausüben^{69,70}.

Für eine optimale Genauigkeit sollten wasserähnliche Flüssigkeiten mit vorgewässerten Spitzen wenige Millimeter unterhalb des Flüssigkeitsspiegels pipettiert werden. Die Pipette sollte in jedem Fall erst nach Einpendeln des Spitzenvolumens bewegt werden. Eine Abgabe sollte mit Kontakt des Flüssigkeitsspiegels erfolgen. Eine vorherige Aspiration einer Luftblase führt bei der Abgabe dazu, dass letzte Tropfen aus der Spitze geschoben werden (Blow-out). Dabei muss die Luftblase in das Maximalvolumen der Spitze eingeplant werden.

Visköse und dichte Flüssigkeiten, wie beispielsweise DMSO, werden mit Standardtechniken sowohl unzureichend aspiriert als auch abgegeben. Die höhere Massenträgheit führt bei Aspiration zu geringeren Volumina innerhalb der Spitze. Um die Flüssigkeiten nur geringfügig in der Spitze zu beschleunigen, sollte darauf geachtet werden, Flüssigkeiten mit diesen Eigenschaften sowohl langsam zu aspirieren als auch abzugeben. Nach einem Aspirationsschritt ist es empfehlenswert, die Pipette eine Sekunde ruhen zu lassen, damit sich der Flüssigkeitsspiegel auspendelt (Delay). Beim Abgeben führt die Viskosität dazu, dass Restvolumina in den Spitzen zurückbleiben, sodass ein Blow-out Schritt erfolgen sollte.

Substanzen, wie Zellkulturmedia, die einen hohen Proteingehalt aufweisen, neigen zu einer Schaumbildung. Schaum kann dazu führen, dass Flüssigkeiten nicht vollständig ausgegeben werden. Zudem können photometrische Messungen oder ein regelmäßiges Zellwachstum beeinträchtigt werden. Langsameres Pipettieren ohne Blow-out verhindert die Luftblasenbildung. Beim mehrfachen Mischen von Zellen sollten ebenfalls Verzögerungen zwischen Aspiration und Dispension eingehalten werden. Eine weitere Voraussetzung ist die Verwendung von Pipettierspitzen mit Filter, sodass entstandene Luftblasen nicht bis in den Spitzenkopf aufsteigen und zu einer Kontamination führen.

Volatile Flüssigkeiten wie Ethanol und Glycerol tropfen bei langsamen Geschwindigkeiten aus den Spitzen heraus. Evaporationseffekte können durch ein Vornässen der Pipettenspitzen und schnellen Pipettierschritten minimiert werden.

Anhand dieser Empfehlungen für flüssigkeitsabhängige Pipettiertechniken (Tbl. 7) wurden benutzerdefinierte Profile in der Biomek Software erstellt (Tbl. 8).

Tabelle 7: Pipettierempfehlungen nach physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeiten

Eigenschaft	Beispiel	Technik
Allgemein, Wasserähnlich	H ₂ O, CTG-Reagenz	- Flüssigkeitspendeln abwarten - Pipettieren wenige Millimeter unter dem Flüssigkeitsspiegel
Viskös	DMSO	- Langsames Pipettieren - Verzögerung bei Aspiration und Abgabe - Blow-out
Proteinhaltig	Zellkulturmedium	- Langsames Pipettieren - Verzicht auf Blow-out - Verwendung von Spitzen mit Filter
Volatil	Ethanol	- Schnelles Pipettieren - Vornässen der Pipettenspitzen

Tabelle 8: Benutzerdefinierte Pipettiertechniken

Name	Verwendung	Technik
<i>CellMix</i> *	- Methode 1: Zellen mischen	- MP1000-Tool, P1000 Filter Tips - Aufziehen: 50 µl/s, 500 ms Delay - Abgeben: 50 µl/s - 150 µl/s, 1 s Delay, Tip-touch 3 mm über der Lösung
<i>CellDistrib</i> *	- Methode 1: Zellen verteilen	- MP200-Tool, P250 Filter Tips - Aufziehen: Leading Bubble, Vornässen, 50 µl/s - Abgeben: 50 µl/s, 15 µl Blow-out, 1 s Delay, Tip-touch
<i>DMSO</i>	- Methode 2: Transfer von Substanz- und Verdünnungsmittel	- P20/P200L-Tool, P50/ P250 Filter Tips - Aufziehen: kein Vornässen, 5 µl/s, 500 ms Delay - Abgeben: 5 µl/s, 15 µl Blow-out, 1 s Delay, Tip-touch
<i>CTG</i> **	- Methode 3: CTG-Transfer in Finalplatte	- MP200-Tool, P250 Filter Tips - Aufziehen: 50 µl/s, 500 ms Delay - Abgeben***: 0 mm über der Lösung, 30 µl/s, 1 s Delay

*Die *CellMix* und *CellDistrib* wurden für das Pipettieren von in Zellmedium gelösten Zellen optimiert.

**Das CTG-Reagenz hat eine wasserähnliche Konsistenz.

***Spitzen wurden bei der CTG-Technik direkt über dem Flüssigkeitsspiegel positioniert, um eine Kontamination bei Mehrfachverwendung der Pipettierspitzen zu vermeiden.

Volumenabhängige Pipettiertechniken

Die variablen Volumina innerhalb der Substanzverdünnungsreihe konnten zwischen 0,75 µl bis 100 µl liegen. Die P250 Biomek Pipettenspitzen sind aufgrund des breiteren Konus für kleinere Volumina nicht optimiert. Diese Problematik konnte mit einer If-Else-Bedingung (Abb. 11) in der Biomek Plattform gelöst werden, sodass für Volumen unter 20 µl die P50- und darüber die P250-Spitzen variabel aufgesetzt wurden.

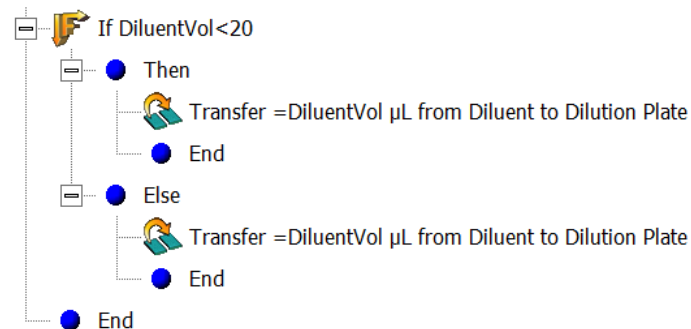


Abbildung 11: Biomek If-Else-Bedingung für volumenabhängigen Spitzenwechsel
Volumenabhängige Pipettierschritte durch eine If-Else-Bedingung in der Biomek-Software.

Handhabung von Zellen

Je nach Adhärenz der Zellen zu ihrer Umgebung zeigte sich, dass eine längere Inkubationszeit mit Trypsin benötigt wird, um feste Zellgruppen voneinander zu lösen. Zellverbände führen zu einer ungleichmäßigen Verteilung zwischen verschiedenen Wells. Im Gegenzug wirkt sich eine lange Trypsininkubation negativ auf die Zellviabilität aus⁷¹. Alternativ kann Accutase verwendet werden, welche die Zellen meist schonender vom Boden der Kultuflasche ablöst⁷¹. Da sich innerhalb der durchgeführten Experimente dafür keine Notwendigkeit zeigte, wurde aus Kostengründen weiterhin Trypsin verwendet.

Abgelöste Zellen sinken zunehmend zum Boden eines Reservoirs, sodass mit zunehmender Methodendauer ein Konzentrationsgradient besteht. Aus diesem Grund ist bei der Verteilung von einzeln in Medium vorliegenden Zellen ein regelmäßiges Mischen einzuplanen. So wurden in Methode 1 vor jedem Verteilen über eine Platte die Zellen mit dem MP1000-Tool und der „CellMix“-Technik (Tbl. 8) mehrfach aspiriert und abgegeben. Dies sollte eine gleichmäßige Zellkonzentration innerhalb des Reservoirs begünstigen. Zusätzlich wurde mit dem MP200-Tool vor jedem spaltenweisen Pipettierungsschritt einmal auf und ab pipettiert.

Durch eine Zellverteilung mit dem MP1000-Tool könnten Volumina für bis zu zehn Spalten der Zellkulturplatte in einem Schritt aufgenommen werden und somit eine Zeitersparnis erzielt

werden. Es bestand jedoch die Vermutung, dass die Zellsedimentation zu Konzentrationsgradienten zwischen den Spalten führen würde. Ein experimenteller Vergleich der Zellviabilitätssignale nach Aussäen zwischen dem MP1000- und MP200-Tool bestätigte diese Vermutung (Abb. 12). So zeigte die Methode mit dem MP1000-Tool eine signifikant höhere Messvarianz (F-Test; $F_{(43,0; 11,0)}=3,6$; $p=0,035$). Darüber hinaus konnte ein Konzentrationsgradient als Korrelation zwischen den gemessenen Zellviabilitäten und der Spaltenzahl nach Aussäen mit dem MP1000-Tool (Korrelation nach Pearson; $r=0,65$, $p=0,04$), jedoch nicht mit dem MP200-Tool (Korrelation nach Pearson; $r=-0,4$; $p=0,25$) nachgewiesen werden. Ein spaltenweises, identisches Pipettieren mit dem MP200-Tool lässt somit weniger Fehlerquellen zu.

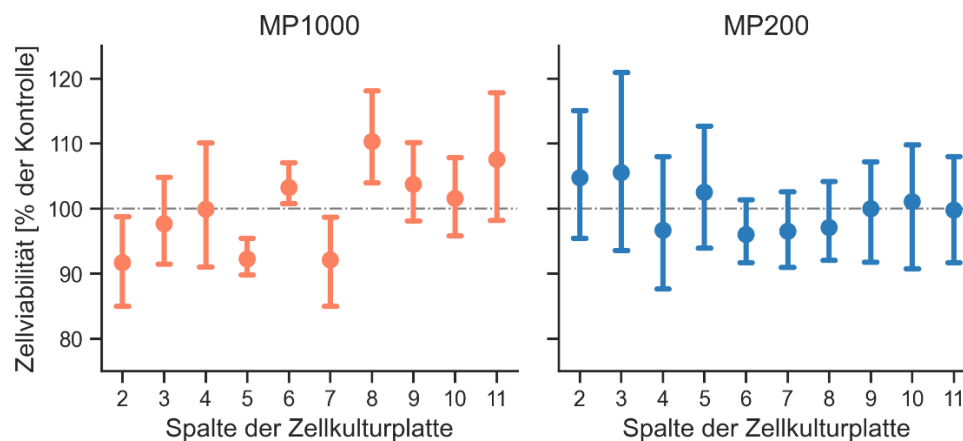


Abbildung 12: Vergleich zwischen einer Zellverteilung mit dem MP1000- oder MP200-Tool

Darstellung der mittels CTG-Assay gemessenen Zellviabilitäten als Mittelwert und Standardabweichung einer Zellkulturplatte und normiert auf den Mittelwert aller Messwerte einer Platte. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen erfolgte eine Zellverteilung mit dem MP1000-Pipettierkopf (links, orange) und auf einer separaten Platte mit dem MP200-Pipettierkopf (rechts, blau).

Nach dem Aussäen sollte die Zellkulturplatte für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur ruhen, um ein erstes Anwachsen zu ermöglichen. Dies kann verhindern, dass Temperaturgradienten und minimale Vibrationen des Inkubators zu einer ungleichmäßigen Zellverteilung führen.⁷²

Zellwachstumsanalyse

Die Inhibition des Zellwachstums wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo 2.0 Assays auf einem Microplate Reader bestimmt. Bei Verteilung des CTG-Reagenzes muss eine Kontamination des Zellmediums zwischen aufeinanderfolgenden Wells verhindert werden. Ein Spitzenwechsel zwischen dem spaltenweisen Pipettieren wäre zu zeitintensiv und würde dazu führen, dass die Lumineszenzsignale zu gestaffelten Zeitpunkten ihren Spitzenwert erreichen.

Das Kontaminationsrisiko kann minimiert werden, indem ein Eintauchen der Spitzen in das Zellmedium verhindert wird. Zusätzlich sollte eine Verteilung ausgehend von Wells mit niedriger hin zu hoher Viabilität erfolgen, sodass der Einflussfaktor einer Kontamination reduziert wird.

Die äußeren Wells der Zellkulturplatte wurden aufgrund des Einflusses von Temperaturgradienten auf das Lumineszenzsignal nicht für die Wachstumsanalyse verwendet⁶⁵. Darüber hinaus zeigte sich, dass ein starkes Signal ein benachbartes Well mit schwachem Signal falsch positiv beeinflusste (Abb. 13). Bei einem großen Unterschied der Zellviabilität zwischen benachbarten Wells, entweder durch zu große Konzentrationssprünge einer Substanz innerhalb einer Reihe, oder unterschiedlicher Toxizität zweier Substanzen innerhalb einer Spalte, verursachte dies eine Verfälschung des tatsächlichen Signals. Da die weiß-geöteten Zellkulturplatten (Greiner Bio-One) laut Hersteller für Lumineszenz-Messungen geeignet sind, lies sich an dieser Stelle keine Verbesserung erzielen. Um den Einfluss eines solchen Effekts zu minimieren, wurden die Substanzkonzentrationen so auf der Platte platziert, dass Gradienten zwischen den Viabilitäten benachbarter Wells möglichst minimiert wurden.

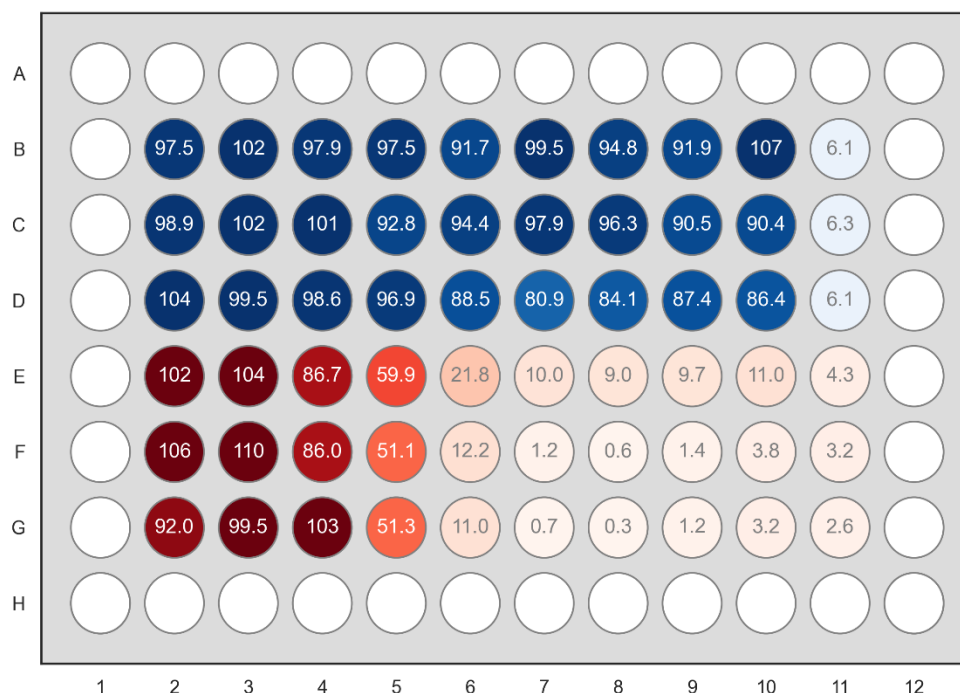


Abbildung 13: Einfluss benachbarter Viabilitätsunterschiede auf das CTG-Lumineszenzsignal

Darstellung der relativen Zellviabilität aus Signalen des CTG-Assays in Prozent zur Kontrolle (Spalte 2) nach 96-stündiger Substanzinkubation. Es wurden spaltenweise ansteigende Konzentrationen der Substanzen Imetelstat in Reihe B-D und Doxorubicin in Reihe E-G zwischen den Spalten 3-11 und das Lösungsmittel als Kontrolle in Spalte 2 platziert. Die Reihen B-D sowie Reihen E-G sind hierbei jeweils Triplikate einer identischen Konzentrationsreihe. Es zeigt sich eine falsch positive Beeinflussung schwacher Lumineszenzsignale in Reihe E5-E10 durch benachbarte Wells mit stärkerer Signalintensität in Reihe D5-D10.

Verringerung des Materialverbrauchs

Zunächst wurde die Verdünnungsreihe mit einem konstanten Dilutionstransfervolumen vorbereitet. Als Grundlage für die Berechnung der benötigten Gesamtvolumina (Dilutionsvolumen $V_{d(x)}$) der Verdünnungsreihe dienten die Konzentration im vorherigen Dilutionswell, die gewünschte Konzentration im aktuellen Dilutionswell sowie das konstante Dilutionstransfervolumen.

$$V_{d(x)} = \frac{n_{d(x)}}{c_{d(x)}} = \frac{n_{td(x)}}{c_{d(x)}} = \frac{c_{td(x)} * V_{td}}{c_{d(x)}} = \frac{c_{d(x-1)} * V_{td}}{c_{d(x)}}$$

Abbildung 14: Berechnung des Dilutionsvolumens mit konstantem Dilutionstransfervolumen

Durch konstante Transfervolumina entstand eine höhere Varianz zwischen den einzelnen Dilutionsvolumina (Abb. 15), die abhängig von den Konzentrationssprüngen innerhalb der Verdünnungsreihe größere Ausmaße annehmen konnte. Dies führte dazu, dass ein Maximalvolumen einzelner Wells überschritten wurde, oder Restbestände in der Verdünnungsreihe verblieben. Als Optimierung wurde die Verdünnungsreihe mit maximalen Dilutionsvolumina und damit variablen Transfervolumina berechnet (Abb. 6). Ein weiterer Vorteil einer kleinen Spannweite zwischen pipettierten Volumina innerhalb der Verdünnungsreihe ist die Verwendung identischer Pipettiertechniken. Dabei wird der Einfluss einer von der Volumengröße abhängigen Pipettierpräzision reduziert und die Ergebnisqualität verbessert.

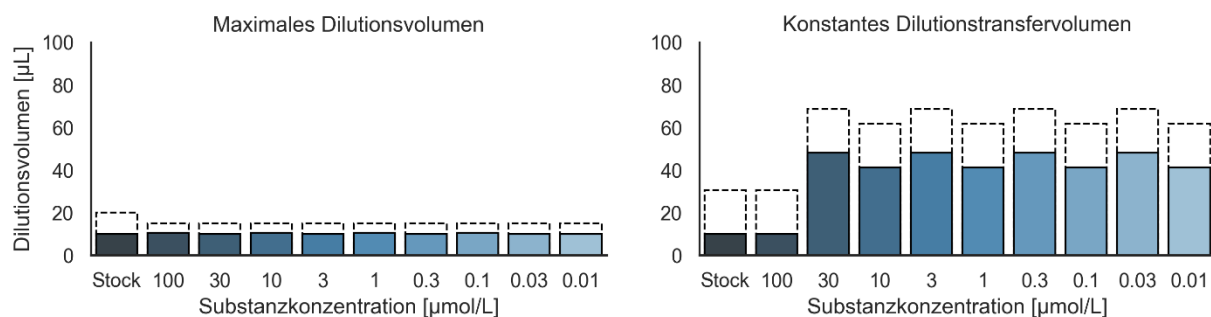


Abbildung 15: Dilutionsvolumina bei unterschiedlicher Berechnung der Verdünnungsreihe

Dilutionsvolumina nach Vorbereitung einer exemplarischen Verdünnungsreihe mit einem Mindestvolumen von 10 µl bei einer Zubereitung mit konstanten maximalen Dilutionsvolumina und variablen Dilutionstransfervolumina (links) im Vergleich zu konstanten Dilutionstransfervolumina (rechts).

Der Verbrauch von CellTiter-Glo Reagenz sollte durch die hohen Kosten auf ein Minimum reduziert werden. Aus diesem Grund wurde bei der Analyse des Zellwachstums das Reagenz nicht in die unbenutzten äußeren Wells der Zellkulturplatte pipettiert. Dabei bestand das Problem, dass das MP200-Tool über alle acht Kanäle nur eine identische Pipettiertechnik sowie ausschließlich spaltenweises Pipettieren durch eine fehlende Rotationsmöglichkeit zugelassen hat. Ein einzelnes Pipettieren mit dem Single-Channel-Tool wäre zum einen weitaus langsamer gewesen und hätte zudem zu fehlerbehafteten Ergebnissen geführt, da die zuerst pipettierten Wells bereits länger in Kontakt mit dem Reagenz gestanden hätten. Damit das 8-Kanal-Tool trotzdem verwendet werden konnte, bestand die einzige Umgehungslösung darin, die Spitzenboxen individuell zu bestücken. Im konkreten Fall bedeutete dies, dass die beiden äußeren Spitzen einer Spalte aus der Box entfernt wurden. Der Nachteil dieser Lösung war die Notwendigkeit und damit mögliche Fehlerquelle eines manuellen Arbeitsschrittes. Für eine weitere Minimierung des benötigten CTG-Volumens wurden „Beckman Quarter Reservoir – Divided By Length“ Behälter mit einem kalkulierten Restvolumen von 0,5 ml verwendet.

3.1.3. Evaluation

Zur Einschätzung der Ergebnisqualität wurde die hier etablierte semi-automatische Substanzscreeningmethode mit vor der Methodenoptimierung erhobenen experimentellen Daten und vollständig manuell durchgeführten Versuchen verglichen. Für die manuellen Versuche wurden Zell- und Substanzverteilung sowie die Viabilitätsanalyse händisch von einer erfahrenen technischen Assistentin mit einer Mehrkanalpipette an den Zelllinien BE(2)-C, CHLA-90, CLB-GA, GI-MEN, IMR-32, LAN-6, und SK-NFI durchgeführt. Um eine Aussagekraft über verschiedene Versuchsreihen hinweg zu gewährleisten, wurden ausschließlich die Viabilitätssignale der Kontrollsubstanz DMSO analysiert. Eine statistische Evaluation der individuellen Optimierungsschritte war aufgrund der mit den benötigten Fallzahlen verbundenen Kosten erschwert. Die Ergebnisse wurden somit im Gesamten bewertet.

Zu den Veränderungen, die einen Einfluss auf die Ergebnisqualität der semi-automatischen Methode ausübten, zählen zum einen die flüssigkeits- und volumenabhängigen Pipettiertechniken (Tbl. 8 und Abb. 11), die verbesserte Handhabung der Zellen mit regelmäßigem Mischen der Zellsuspension im Reservoir und einer Pause nach dem Aussäen der Zellen sowie die zuvor beschriebene Minimierung von Störfaktoren in der Zellwachstumsanalyse. Einsparungen von Verbrauchsmaterial ergaben sich durch die Erstellung der Verdünnungsreihe mit maximalen Dilutionsvolumina, durch die Verwendung kleinerer Reservoirs für das CellTiter-Glo Reagenz und durch eine Wiederverwendung von Spitzen bei geeigneten Pipettierschritten nach Ausschluss eines Kontaminationsrisikos.

Gemessen an einer mittleren Standardabweichung von 14,1 % der einzelnen technischen Replikate wies die manuelle Methode sogar eine höhere Ergebnisqualität als die nicht-optimierte semi-automatische Methode auf (t-Test; $T=-2.3$; $p=0,023$). Signifikante Unterschiede in den Varianzen aller Datenpunkte wurden hierbei jedoch nicht beobachtet (F-Test; $F_{(243,6; 301,8)}=0,81$; $p=0,98$). Im Gegensatz dazu zeigte die optimierte semi-automatische Methode gegenüber der manuellen Methode eine signifikante Verbesserung der Ergebnisqualität. Hierbei konnten jeweils eine deutliche Reduktion der Varianz (F-Test; $F_{(243,6; 38,1)}=6,4$; $p=1,11 \times 10^{-16}$) und eine signifikante Reduktion von 7,5 Prozentpunkten der relativen Standardabweichungen (t-Test; $T=9,1$; $p=1,2 \times 10^{-16}$) nachgewiesen werden.

Die Optimierungsschritte der semi-automatischen Methode lieferten eine relevante Steigerung der Ergebnisqualität durch Reduktion der Ergebnisvarianzen (Abb. 16A) aller Datenpunkte (F-Test; $F_{(301,8; 38,1)}=7,93$; $p=1,11 \times 10^{-16}$). Einhergehend zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Standardabweichungen innerhalb der technischen Replikate (Abb. 16B) mit einer Senkung des Mittelwerts von 17,8 auf 6,6 % (t-Test; $T=12,7$; $p=9,1 \times 10^{-28}$). Der Anteil der Replikate, die eine relative Standardabweichung von unter 10 % aufwiesen, konnte damit von 23,2 auf 97,3 % gesteigert werden.

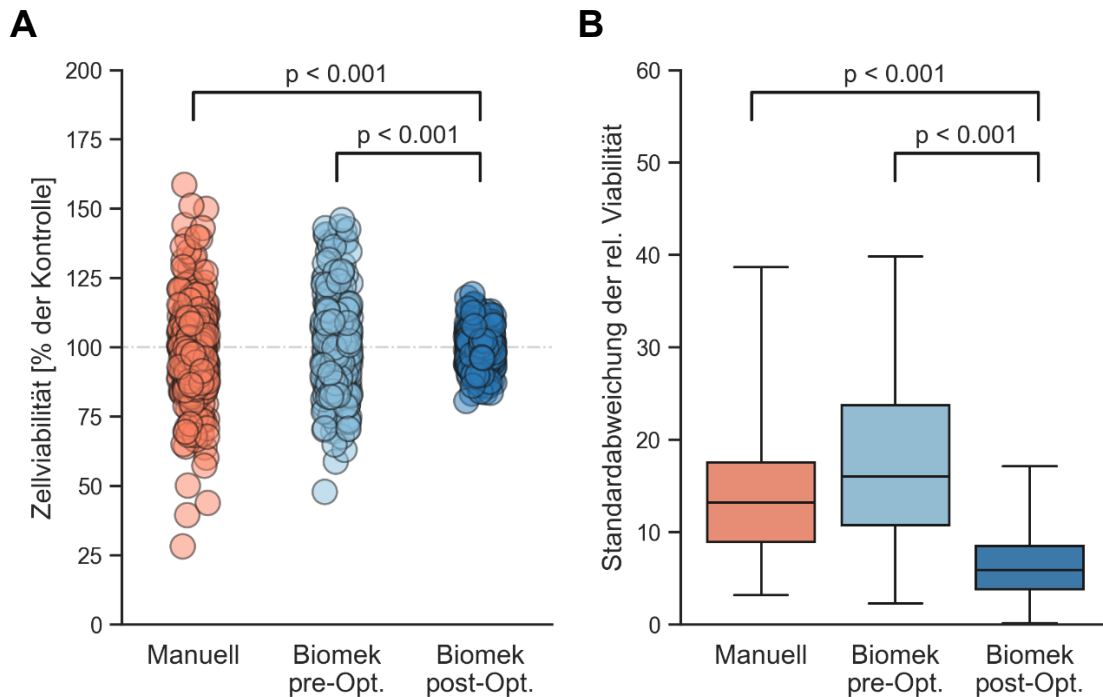


Abbildung 16: Ergebnisqualitäten der Substanzscreeningmethoden

Vergleich der CTG-Viabilitätssignale aus Wells mit der Kontrollsubstanz DMSO zwischen manuellen Versuchen und Experimenten auf der Biomek-Plattform vor (pre-Opt.) und nach (post-Opt.) Optimierung der semi-automatischen Methode. Für die manuellen Versuche liegen Daten der Zelllinien BE(2)-C, CHLA-90, CLB-GA, GI-MEN, IMR-32, LAN-6, und SK-NFI vor. Die Daten der semi-automatischen Methode ergeben sich vor Optimierung aus Versuchen an den Zelllinien BE(2)-C, CHLA-90, CLB-GA, GI-MEN, IMR-32, KELLY und SK-N-FI und nach Optimierung aus BE(2)-C, CLB-GA, GI-MEN, IMR-32, KELLY, LS, SH-SY5Y, TR-14.

(A) Darstellung der Varianz der relativen Viabilität aller Kontrolldatenpunkte der jeweiligen Versuchsreihe. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Varianz unter Verwendung der etablierten semi-automatischen Methode (F-Test).

(B) Darstellung der Standardabweichungen der jeweiligen Datenpunkte aus technischen Replikaten der verschiedenen Versuchsreihen (t-Test).

Ein manuelles Durchführen von Substanzscreeningexperimenten erfordert eine konstant hohe Aufmerksamkeit über eine Vielzahl an Pipettierschritten. Die Biomek-Methode minimiert die Fehlerrate durch Automatisierung. Ferner wird das Zeitmanagement durch definierte Methodendauern vereinfacht (Tbl. 9) und es besteht die Möglichkeit einer präzisen Verbrauchskalkulation (Tbl. 10).

Nach den anfänglichen Anschaffungskosten für die Biomek Automated Workstation bleiben die absoluten Materialkosten mit der manuellen Methode vergleichbar. Jedoch werden finanzielle Mittel durch den deutlich reduzierten personellen Aufwand eingespart.

Durch die Verwendung vergleichbarer Pipetten besteht im Einzelnen kein zeitlicher Vorteil gegenüber der manuellen Methode. Durch eine nahtlose Verknüpfung der einzelnen Schritte, reduzierten kognitiven Aufwand und Minimierung der Fehlerrate kann die Automatisierung dennoch eine deutliche Zeitersparnis ermöglichen.

Tabelle 9: Dauer der Substanzscreening-Methoden

Methoden	1 Platte	4 Platten
1 Zellaussäen	00:06:42	00:25:34
2 Substanzzugabe	00:59:22	02:22:56
3 Zellwachstumsanalyse	00:06:00	00:16:25

Zeit in Stunden, Minuten und Sekunden aus der Biomek Software übernommen. Für die Zugabe von Einzelsubstanzen und Kombinationen wurde mit jeweils zwei Substanzen, bzw. Kombinationen in neun verschiedenen Konzentrationsstufen und einer Kontrolle in jeweils dreifachen Replikaten kalkuliert.

Tabelle 10: Materialverbrauch der Substanzscreening-Methoden

Name	Menge 1 Platte	Menge 4 Platten	Erklärung
Quarter Reservoir Divided by Length	2 St.	3 St.	0,5-1 St. Zellreservoir* 0,25-1 St. CTG-Reservoir*
Zellkulturplatte 96-Well	1 St.	4 St.	
P50 Tips	78 St.	258 St.	~18 St. Verdünnungsreihe** 60 Stück Substanztransfer
P250 Tips	23 St.	74 St.	8 St. Zellverteilung ~18 St. Verdünnungsreihe** 6 St. CTG-Verteilung
P1000 Tips	8 St.	32 St.	8. St. Zellmischen
CellTiter-Glo® Reagenz	6,5 ml	25 ml	6 ml für Lumineszenzmessung 0-0,5 ml Sicherheitsabstand***

*Es wird nur eine Hälfte des Quarter Reservoirs für 1 Zellkulturplatte beim Aussäen und für 2 Platten bei der CTG-Verteilung verwendet.

**Variable Menge je nach gewünschtem Betrag und Anzahl an Zielkonzentrationen benötigt. Es wurde mit zwei Substanzen pro Platte in jeweils neun Konzentrationsstufen kalkuliert für die jeweils 9 Stück P50-Tips und 9 Stück P250-Tips benötigt werden. Die Verdünnungsreihe kann für bis zu vier Platten weiterverwendet werden, sodass die benötigte Menge pro Platte auf ein Viertel sinkt.

***Der Sicherheitsabstand gilt für bis zu zwei Platten, da sich diese dasselbe Reservoir teilen.

Zusammenfassend liefert die hier etablierte semi-automatische Substanzscreeningmethode Ergebnisse mit hoher Reliabilität und entlastet den personellen Aufwand erheblich. Außerdem bleibt die Methode kostengünstig und schafft Planungssicherheit. Die Biomek 4000 Automated Workstation ist zudem für zahlreiche weitere Laborbereiche einsetzbar.

3.2 *In vitro* Behandlung mit Einzelsubstanzen

Nach erfolgreicher Etablierung der semi-automatischen Substanzscreening-Methode wurden die konventionellen Chemotherapeutika Etoposid und Doxorubicin, die ALK-Inhibitoren Ceritinib und Lorlatinib, der MEK-Inhibitor Trametinib sowie die telomerase-interagierenden Substanzen 6-thio-dG, Imetelstat, Costunolide und BIBR-1532 für *in vitro* Dosis-Wirkungs-Experimente ausgewählt. Die Versuche erfolgten an einem Kollektiv von Neuroblastomzelllinien mit unterschiedlichen genetischen Alterationen (Tbl. 11). Hierbei bestehen vorwiegend Unterschiede im *ALK*-Status und in den Mechanismen einer Telomererhaltung.

Tabelle 11: Genetisches Profil der verwendeten Neuroblastomzelllinien

Zelllinie	<i>ALK</i> -Status	<i>RAS-MAPK</i> -Status	Tel.-Maintenance	<i>TERT</i> -Expr.
BE(2)-C	-	<i>NF1</i> del. (hemi.) <i>HRAS</i> del. (hemi.)	<i>MYCN</i> amp.	10,30144
CHLA-90	F1245V (het.) D1529E (het.)	<i>ALK</i> F1245V (het.)	ALT	-
CLB-GA	R1275Q	<i>ALK</i> R1275Q	<i>TERT</i> -Rearrangement	13,66712
GI-MEN	-	<i>HRAS</i> del. (hemi)	<i>TERT</i> -Rearrangement	13,87544
IMR-32	-	-	<i>MYCN</i> -Amplifikation	10,95466
KELLY	F1174L (het.) D1529E (het.)	<i>ALK</i> F1174L (het.)	<i>MYCN</i> -Amplifikation	11,37079
LS	-	-	<i>MYCN</i> -Amplifikation	10,49235
SH-SY5Y	F1174L	<i>ALK</i> F1174L	-	12,38011
SK-NFI	D1529E (het.)	<i>NF1</i> del. (hemi.)	ALT	8,80794
TR-14	Amplifikation	<i>ALK</i> -Amplifikation	<i>MYCN</i> -Amplifikation	8,918758

Abkürzungen: ALT=Alternative Lengthening of Telomeres, amp.=Amplifikation, del.=Deletion, hemi.=hemizygot, het.=heterozygot, *TERT*-Expr.=*TERT*-Expression, Tel.-Maintenance=Telomererhaltungsmechanismen, WT=Wildtyp.

ALK-Status: Die Mutationen F1174L, F1245V, R1275Q und *ALK*-Amplifikationen sind Gain-of-function-Mutationen, während D1529E keinen Effekt auf die *ALK*-Funktion ausübt (OncoKB⁷³).

RAS-MAPK-Status: *NF1*-Deletionen sind Gain-of-function-Mutationen (OncoKB⁷³).

Die *TERT*-Expression ist angegeben als log₂-Intensität.

Die Daten zum Mutationsstatus stammen aus laborinternen Genomsequenzierungen und zur *TERT*-Expression aus Genexpressions-Microarray-Analysen¹⁹.

3.2.1. Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin

Zur Grundlage der Substanzsynergismus-Analysen erfolgte zunächst eine *in vitro* Einzelbehandlung mit Doxorubicin und Etoposid. Die Inkubation mit beiden konventionellen Zytostatika resultierte in einem sigmoidalen konzentrationsabhängigen Abfall des Zellwachstums (Abb. 17). Die mediane GI₅₀-Konzentration nach 96-stündiger Substanzinkubation war 0,33 µM unter Etoposid- und 0,028 µM unter Doxorubicinbehandlung. Die Zelllinien IMR-32, LS, CLB-GA und SH-SY5Y zeigten ein gutes Ansprechen auf die genotoxischen Substanzen mit steil abfallenden Viabilitätskurven sowie einer nahezu vollständigen Wachstumsinhibition unter hohen Konzentrationen. Bei diesen Zelllinien betrug die GI₅₀-Konzentration zwischen 0,13 und 0,27 µM für Etoposid und zwischen 0,007 und 0,023 µM für Doxorubicin. Im Gegensatz dazu zeigten die Zelllinien BE(2)-C, TR-14 und GI-MEN deutlich höhere GI₅₀-Werte von 0,38 bis 2,81 µM für Etoposid und 0,13 bis 0,28 µM für Doxorubicin. Die Inhibitionskurven zeigten für alle drei Zelllinien einen langsameren Abfall und eine fehlende Angleichung an eine Viabilität von 0 %. Die Zelllinie KELLY wies ebenfalls einen hohen Etoposid GI₅₀-Wert von 1,02 µM, jedoch einen im Zelllinien-Vergleich niedrigeren Doxorubicin GI₅₀-Wert von 0,034 µM auf. Insgesamt befanden sich diese Ergebnisse innerhalb der Größenordnung von bereits publizierten Werten⁷⁴.

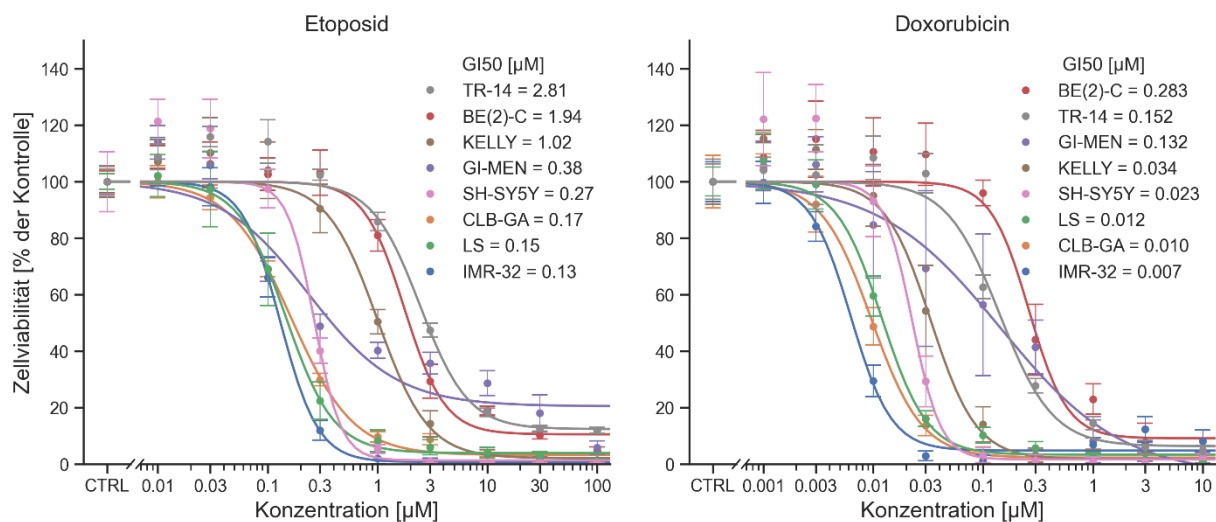


Abbildung 17: Wachstumsinhibition durch Etoposid und Doxorubicin

Darstellung der relativen Zellviabilität aus Ergebnissen der Substanzscreeningmethode nach 96-stündiger Substanzinkubation mit Etoposid (links) und Doxorubicin (rechts) und DMSO als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichung ergeben sich aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten.

Es bestand eine signifikante Korrelation mit starker Ausprägung nach Cohen zwischen einem Ansprechen auf eine Etoposidbehandlung und einem Ansprechen auf Doxorubicin (Rangkorrelation nach Spearman; $r=0,93$; $p=0,00086$; $n=8$) (Abb. 18A).

Die Zelllinien IMR-32, LS und CLB-GA wiesen das stärkste Ansprechen auf eine Behandlung mit den getesteten genotoxischen Substanzen auf. Diese Zelllinien wurden ursprünglich aus Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, somit vor Therapiebeginn mit konventionellen Chemotherapeutika, etabliert. Im Gegensatz dazu stammen die Zelllinien BE(2)-C, GI-MEN, KELLY, SH-SY5Y und TR-14 aus Tumorrezidiven nach einer erfolgten Therapie.^{75,76} Der hier beobachtete Unterschied im Ansprechen zwischen Zelllinien aus unbehandelten und rezidierten Tumoren war für beide Substanzen signifikant bei einer medianen GI_{50} von $0,15 \mu\text{M}$ der unbehandelten und $1,02 \mu\text{M}$ der vorththerapierten Zellen für Etoposid (Mann-Whitney-U-Test; $U=0$; $p=0,018$; $n_1=3$; $n_2=5$) sowie $0,01 \mu\text{M}$ und $0,13 \mu\text{M}$ für Doxorubicin (Mann-Whitney-U-Test; $U=0$; $p=0,018$; $n_1=3$; $n_2=5$) (Abb. 18B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Tumorrezidive Resistenzen gegen konventionelle Chemotherapeutika aufweisen können.

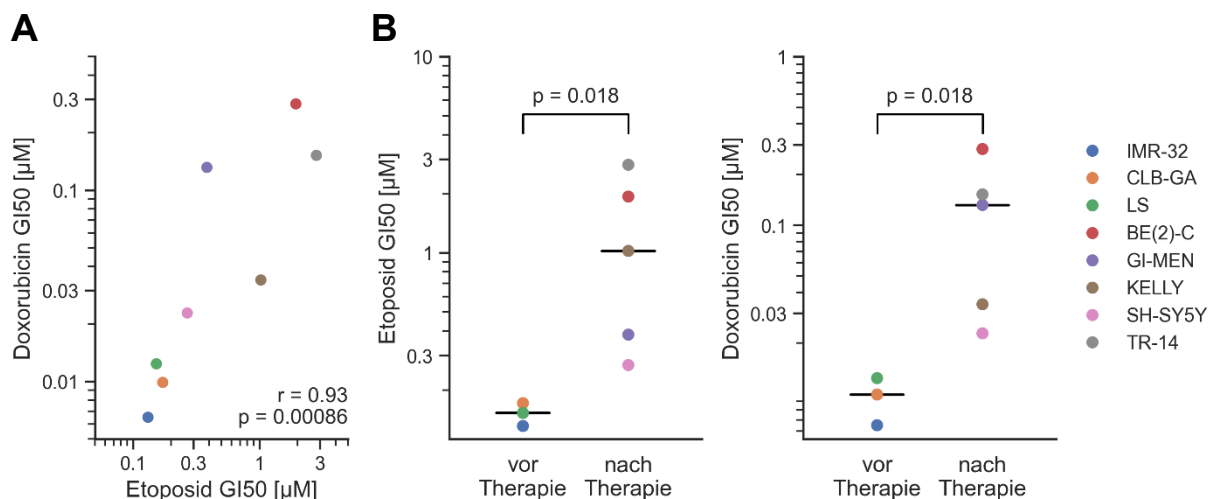


Abbildung 18: Vergleich der GI_{50} -Werte von Etoposid und Doxorubicin

Darstellung der experimentell bestimmten GI_{50} -Werte der einzelnen farblich markierten Zelllinien auf eine 96-stündige Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin.

(A) Korrelation der GI_{50} -Werte zwischen einer Etoposid- und Doxorubicin-Behandlung (Korrelation nach Spearman).

(B) Vergleich der GI_{50} -Werte von Etoposid (links) und Doxorubicin (rechts) zwischen Zelllinien, die vor und nach einer Chemotherapie etabliert wurden (Mann-Whitney-U-Test).

3.2.2. Behandlung mit den ALK-Inhibitoren Ceritinib und Lorlatinib

Die Behandlung mit dem ALK-Inhibitor Ceritinib resultierte erwartungsgemäß in einem stärkeren zytotoxischen Effekt in allen Zelllinien mit *ALK*-Veränderungen im Vergleich zu *ALK*-Wildtyp Zelllinien (Abb. 19). Unter höheren Substanzkonzentrationen erreichten alle Zelllinien eine nahezu vollständige Wachstumsinhibition. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den medianen GI_{50} -Konzentrationen in Zelllinien mit einer *ALK*-Alteration gegenüber *ALK*-Wildtyp Zelllinien (0,19 μ M vs. 0,61 μ M; Mann-Whitney-U-Test; $U=0$; $p=0,014$, $n_1=4$; $n_2=4$). Die *ALK*-amplifizierte Zelllinie TR-14 wies mit einem GI_{50} von 0,26 μ M ein schwächeres therapeutisches Ansprechen als die *ALK*-mutierten Zelllinien CLB-GA, KELLY und SH-SY5Y, jedoch eine niedrigere halbinhibitorische Konzentration im Vergleich zu den *ALK*-unveränderten Zelllinien auf. Dies deutet darauf hin, dass *ALK*-Amplifikationen im Vergleich zu punktuellen Mutationen mit einer verminderten Sensitivität korrelieren könnten.

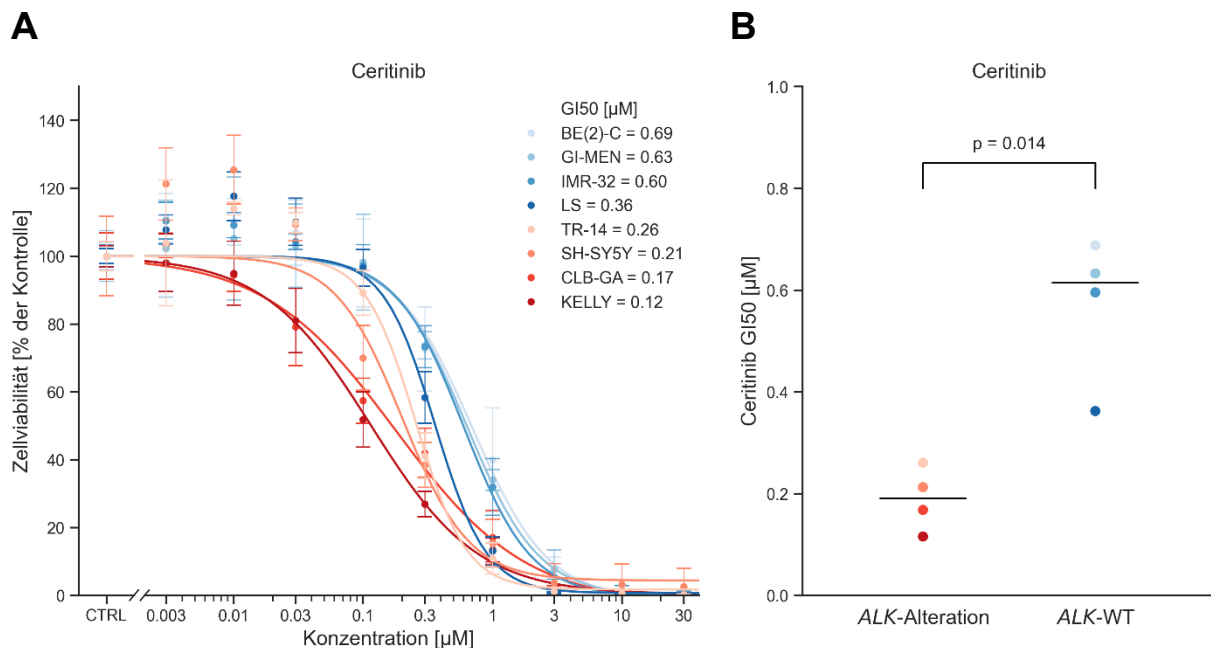


Abbildung 19: Wachstumsinhibition durch Ceritinib

(A) Relative Zellviabilität aus Ergebnissen der Substanzscreeningmethode nach 96-stündiger Substanzinkubation mit Ceritinib und DMSO als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichung ergeben sich aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Zelllinien mit *ALK*-Mutation sind mit rot und *ALK*-Wildtyp-Zelllinien mit blau gekennzeichnet.

(B) Vergleich der berechneten GI_{50} -Werte einer Ceritinib-Behandlung zwischen Zelllinien mit *ALK*-Alteration (*ALK*-Mutation, *ALK*-Amplifikation) und *ALK*-Wildtyp. Der Median ist durch schwarze Linien verdeutlicht. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Eine Substanzinkubation mit Lorlatinib (PF-06463922) aus der dritten Generation der ALK-Inhibitoren zeigte im Gegensatz zu der Behandlung mit Ceritinib eine therapeutisch unzureichende Inhibition der Zellviabilität (Abb. 20). In den *ALK*-mutierten Zelllinien CLB-GA, KELLY und SH-SY5Y und der *ALK*-amplifizierten Zelllinie TR-14 nahm die Viabilität im Vergleich zu den *ALK*-Wildtyp Zelllinien LS und IMR-32 unter niedrigeren Substanzkonzentrationen stärker ab. Die Inhibitionskurven von CLB-GA und KELLY verliefen zwar sigmoidal, allerdings wurde die Zellviabilität selbst unter hohen Konzentrationen (10 μ M) auf nur ca. 30 % reduziert. Damit glich sich die zunächst schneller abfallende Viabilität mit deutlich niedrigeren GI_{50} -Werten den Viabilitäten von SH-SY5Y, TR-14 und den *ALK*-Wildtyp Zelllinien unter höheren Konzentrationen an. Wie schon unter der Behandlung mit Ceritinib beobachtet, zeigte die *ALK*-amplifizierte Zelllinie TR-14 die höchste GI_{50} -Konzentration unter den *ALK*-veränderten Zelllinien.

Für Lorlatinib wurde eine hochselektive Hemmung *ALK*-mutierter Zelllinien vorbeschrieben⁴⁴. Hierbei wurde nach einem gering verlängerten Beobachtungszeitraum von fünf Tagen mit Lorlatinib eine zu den Werten von CLB-GA und KELLY vergleichbare mediane halbinhibitorische Konzentration von 0,021 μ M bei zwei *ALK*-mutierten Zelllinien ermittelt. Entsprechend zu unseren Ergebnissen zeigten die höheren Konzentrationsstufen unter den *ALK*-mutierten Zelllinien bei anteiligen Viabilitäten von ca. 25 % ebenfalls keine vollständige Inhibition. Auch zeigten die *ALK*-Wildtyp Zelllinien bis zur höchsten beobachteten Konzentration von 0,06 μ M keine Wachstumsinhibition unter der Lorlatinib-Behandlung.

Aufgrund der hohen Variabilität innerhalb der GI_{50} -Werte der *ALK*-mutierten Zelllinien und der unzureichenden Wachstumsinhibition unter hohen Konzentrationen wurde entschieden, dass sich Lorlatinib nicht für die Synergismus-Analyse nach der Chou-Talalay Methode eignen würden. Somit wurden die Versuche nicht am vollständigen Zelllinienkollektiv weiterverfolgt.

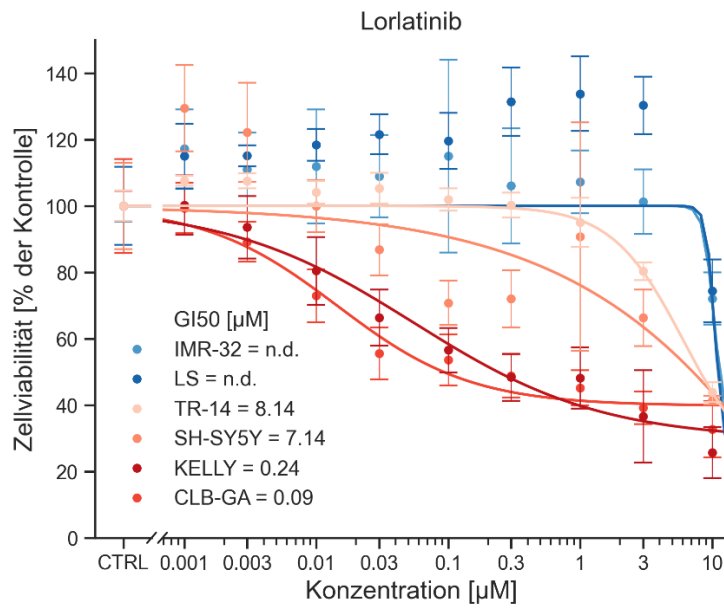


Abbildung 20: Wachstumsinhibition durch Lorlatinib

Darstellung der relativen Zellviabilität aus Ergebnissen der Substanzscreeningmethode nach 96-stündiger Behandlung mit Lorlatinib und DMSO als Kontrolle. GI₅₀-Werte, die aufgrund des fehlenden Erreichens einer halbinhibitorischen Konzentration nicht bestimmt werden konnten, sind mit „n.d.“ (not determined) gekennzeichnet. Zelllinien mit *ALK*-Mutation sind mit rot und *ALK*-Wildtyp-Zelllinien mit blau gekennzeichnet.

3.2.3. Behandlung mit telomerase-interagierenden Substanzen

Das Enzym Telomerase könnte ein potenzielles molekulares Ziel einer Therapie von Hochrisiko-Neuroblastomen mit Telomeraseaktivität darstellen. Zur präziseren Evaluation inhibitorischer Effekte von telomerase-interagierenden Substanzen *in vitro* wurden laborinterne, zuvor manuell durchgeführte Versuche, mit den direkten Telomeraseinhibitoren Imetelstat, Costunolide und BIBR-1532 und dem Nukleosidanalogen 6-thio-dG mit Hilfe der etablierten Screeningmethode wiederholt (Abb. 21). Die Versuche wurden an den Zelllinien CLB-GA und GI-MEN mit *TERT*-Rearrangements, BE(2)-C und IMR-32 mit *MYCN*-Amplifikation sowie an den ALT-positiven Zelllinien SK-N-FI und CHLA-90 und humanen BJ-Fibroblasten als telomerase-negative Kontrolle durchgeführt.

Insgesamt zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität in allen Zelllinien unter einer Behandlung mit Costunolide, BIBR-1532 und 6-thio-dG. Eine Substanzinkubation mit Imetelstat resultierte bei fehlendem Ansprechen über ein weites Konzentrationsspektrum erst unter hohen Konzentrationen im Bereich von 100 μM in einem steilen Abfall der Zellviabilität in zwei untersuchten Zelllinien.

Wir hypothesierten bereits im Vorfeld, dass sich die beschriebenen experimentellen Bedingungen einer *in vitro* Substanztestung mit einem Beobachtungszeitraum von 96 Stunden nicht für Imetelstat eignen würden. Dies begründeten wir durch den verzögerten Wirkeintritt einer Telomerverkürzung⁷⁷. Eine Behandlung der Zelllinien KELLY und CLB-GA wies bis Konzentrationen von 30 μM keine Wirkung auf. Ab der nächsthöheren Konzentrationsstufe von 100 μM zeigten sich relative Viabilitäten unter 10 %. Aufgrund des erwarteten Fehlens einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde die Substanz nicht am gesamten Zelllinienkollektiv untersucht.

Die Substanzinkubation mit Costunolide resultierte in einem eingeschränkten Zellwachstum bei niedrigeren Konzentrationen in Zelllinien mit *TERT*-Rearrangement oder *MYCN*-Amplifikation (Median=6,28 μM) im Vergleich zu ALT-positiven Zelllinien (Median=13,73 μM). Dieser Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test; $U=0$; $p=0,067$, $n_1=4$; $n_2=2$). Ferner stellte eine niedrige GI_{50} von 4,97 μM bei telomerase-negativen BJ-Fibroblasten einen kausalen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Telomeraseaktivität und einem Ansprechen auf Costunolide in einem Wirkungszeitraum von 96 Stunden in Frage.

Für den Telomeraseinhibitor BIBR-1532 konnte kein Unterschied zwischen telomerase-positiven (Median=60,8 μM) und -negativen Neuroblastom-Zelllinien (Median=67,6 μM) festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test; $U=4,0$; $p=0,6$, $n_1=4$; $n_2=2$). Obwohl die ALT-positive Zelllinie CHLA-90 und die humanen BJ-Fibroblasten die beiden höchsten GI_{50} -Werte unter BIBR-1532-Behandlung aufwiesen, zeigte die ebenfalls ALT-positive Zelllinie SK-N-FI

mit 28,5 μM die niedrigste halbinhibitorische Konzentration unter allen untersuchten Zelllinien. Auch bei dem direkten Telomeraseinhibitor BIBR-1532 könnte die relativ kurze Exposition die nicht nachzuweisende Wirkung bei telomerase-positiven Zelllinien erklären.

Unter einer Behandlung mit 6-thio-dG zeigten Zelllinien mit erhöhter Telomeraseaktivität mit einem medianen GI_{50} von 1,73 μM ein tendenziell besseres Ansprechen als ALT-positive Zelllinien mit 14,53 μM . Dieser Unterschied erreichte möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl keine Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test; $U=1$; $p=0,12$; $n_1=4$; $n_2=2$). Dabei wiesen die BJ-Fibroblasten erwartungsgemäß eine hohe halbinhibitorische Konzentration außerhalb der höchsten Konzentrationsstufe von 100 μM auf. Die *TERT*-positive Zelllinie GI-MEN wies einen ähnlich hohen GI_{50} -Wert wie die ALT-positiven Zelllinien CHLA-90 und SK-N-FI auf.

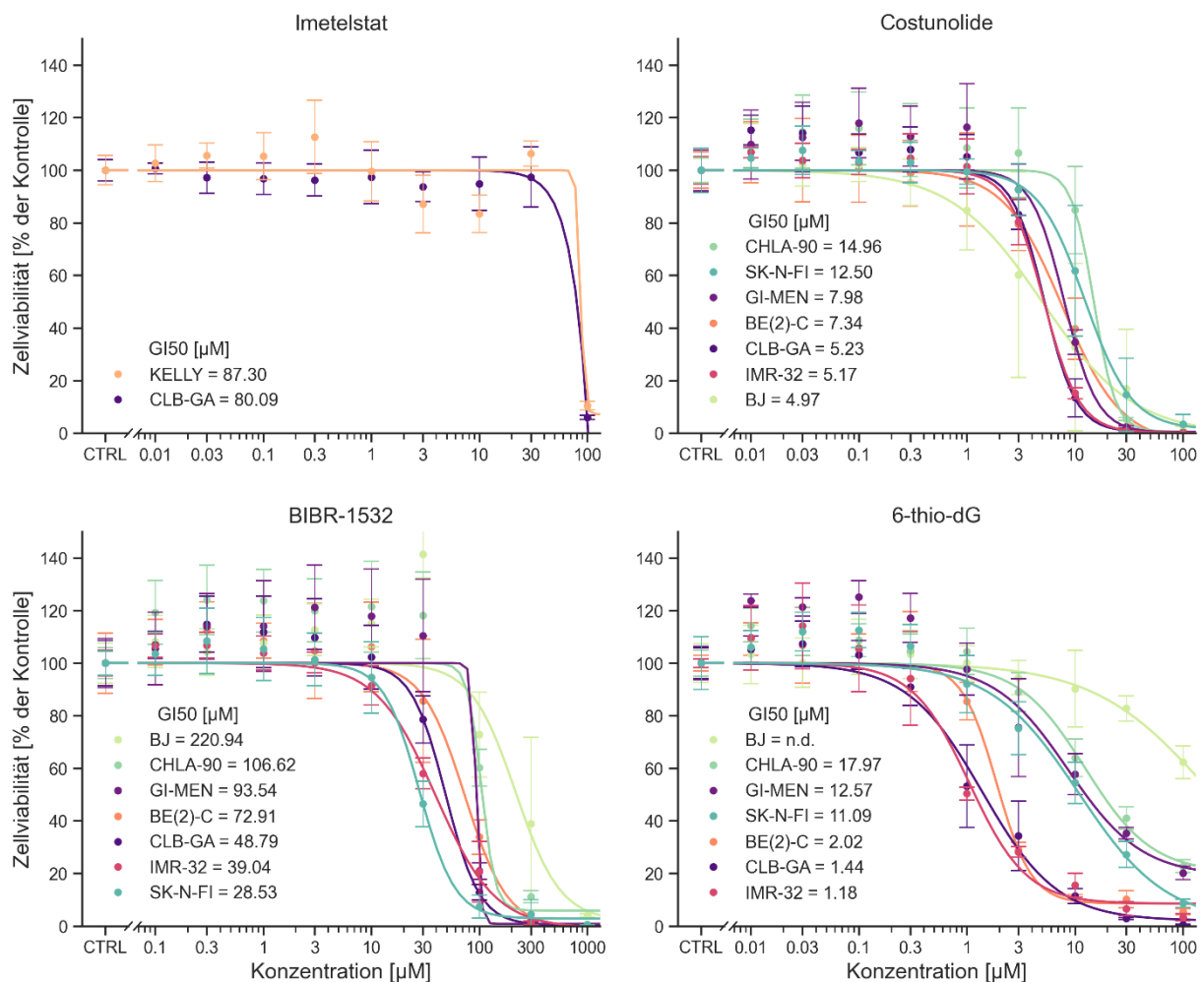


Abbildung 21: Wachstumsinhibition durch telomerase-interagierende Substanzen

Darstellung der relativen Zellviabilität aus Ergebnissen der Substanzscreeningmethode nach 96-stündiger Substanzinkubation mit verschiedenen telomerase-interagierenden Substanzen. Für 6-thio-dG, BIBR-1532 und Costunolide wurde DMSO und für Imetelstat H_2O als Kontrolle verwendet. Mittelwerte und Standardabweichung ergeben sich, außer für Imetelstat, aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Telomerase-aktivierende Mechanismen sind farblich kodiert dargestellt (*TERT*-Rearrangement lila, *MYCN*-Amplifikation in rot/orange, telomerase-negativ bei ALT in blau und bei Fibroblasten in grün).

Für die Substanzen Costunolide und BIBR-1532 wurde eine Wirksamkeit in einem Zeitraum von 24 beziehungsweise 72 Stunden beschrieben^{52,78}. Für Imetelstat wurde eine Wirksamkeit innerhalb von 12 Tagen beschrieben⁷⁷. Die therapeutischen Mechanismen der direkten Telomeraseinhibitoren scheinen in unseren Experimenten aufgrund der erst unter höchsten Konzentrationen steil abfallenden Dosis-Effekt-Kurven und fehlender Korrelation des Therapieansprechens mit der Telomeraseaktivität nicht durch eine Hemmung dieser Aktivität, sondern eher durch Off-target Effekte begründet zu sein.

Als Grundlage für die Synergismusanalyse wurde 6-thio-dG an einem größeren *TERT*-positiven Zelllinienkollektiv parallel zu der kombinatorischen Behandlung in einer zweiten Versuchsreihe analysiert (Abb. 22). Die GI_{50} -Werte identischer Zelllinien korrelierten in hohem Maße mit den Ergebnissen aus dem zuvor beschriebenen Experiment (Korrelation nach Pearson; $r=0,997$; $p=0,003$). Die Zelllinien wiesen halbinhibitorische Konzentrationen in einem schmalen Konzentrationsspektrum zwischen 1,24 bis 4,45 μM auf. Als einziger Ausreißer fiel erneut die Zelllinie GI-MEN auf ($GI_{50}=13,8 \mu\text{M}$, $4.5 \cdot \text{IQR}$). Die Zelllinie mit dem stärksten therapeutischen Ansprechen auf 6-thio-dG war mit einem GI_{50} -Wert von 1,24 μM SH-SY5Y, die unter den untersuchten Zelllinien die höchste *TERT*-Expression aufwies (Tbl. 11). Insgesamt zeigte sich jedoch kein inverser Zusammenhang zwischen der *TERT*-Expression der Zelllinien und den GI_{50} -Werten von 6-thio-dG (Korrelation nach Spearman; $r=0,4$; $p=0,32$).

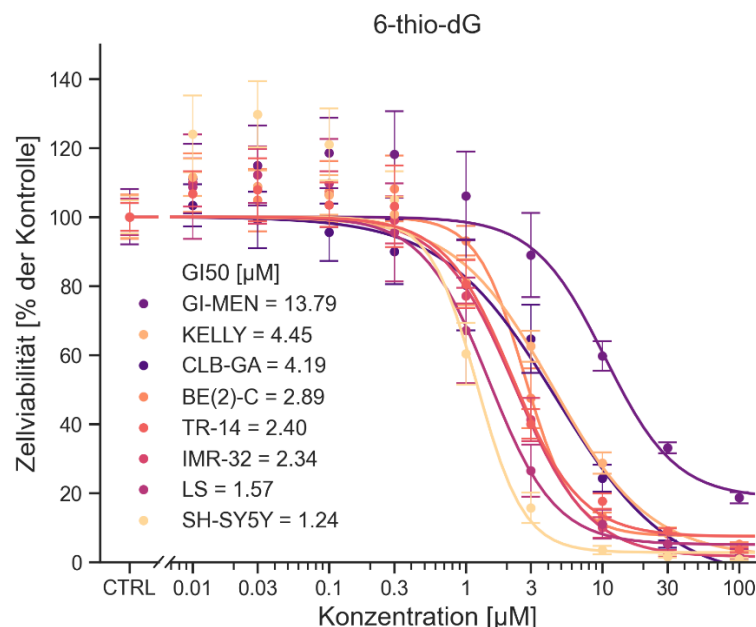


Abbildung 22: Wachstumsinhibition durch 6-thio-dG an einem größeren Zelllinienkollektiv

Darstellung der relativen Zellviabilität aus Ergebnissen der Substanzscreeningmethode nach 96-stündiger Substanzinkubation mit 6-thio-dG und DMSO als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichung ergeben sich aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Telomerase-aktivierende Mechanismen sind farblich kodiert dargestellt (*TERT*-Rearrangement lila, *MYCN*-Amp. rot/orange)

Zur weiterführenden Analyse wurden die Ergebnisse der beiden unabhängigen 6-thio-dG-Versuchsreihen (Abb. 21 und 22) zusammengeführt und GI_{50} -Werte identischer Zelllinien gemittelt (Abb. 23). In dieser größeren Kohorte zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den medianen GI_{50} -Werten von telomerase-positiven ($2,44 \mu\text{M}$) und ALT-positiven ($14,53 \mu\text{M}$) Zelllinien (Mann-Whitney-U-Test; $U=1$; $p=0,044$; $n_1=8$; $n_2=2$). Ein Ausschluss von GI-MEN aus dem Vergleich der GI_{50} -Werte zwischen *TERT*-positiven und -negativen Zelllinien resultierte in einer Steigerung der Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test; $U=1$; $p=0,028$, $n_1=7$; $n_2=2$). Ein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit von 6-thio-dG zwischen *MYCN*-amplifizierten und Zelllinien mit *TERT*-Rearrangement wurde nicht nachgewiesen (Mann-Whitney-U-Test; $p=0,19$; $n_1=3$; $n_2=2$).

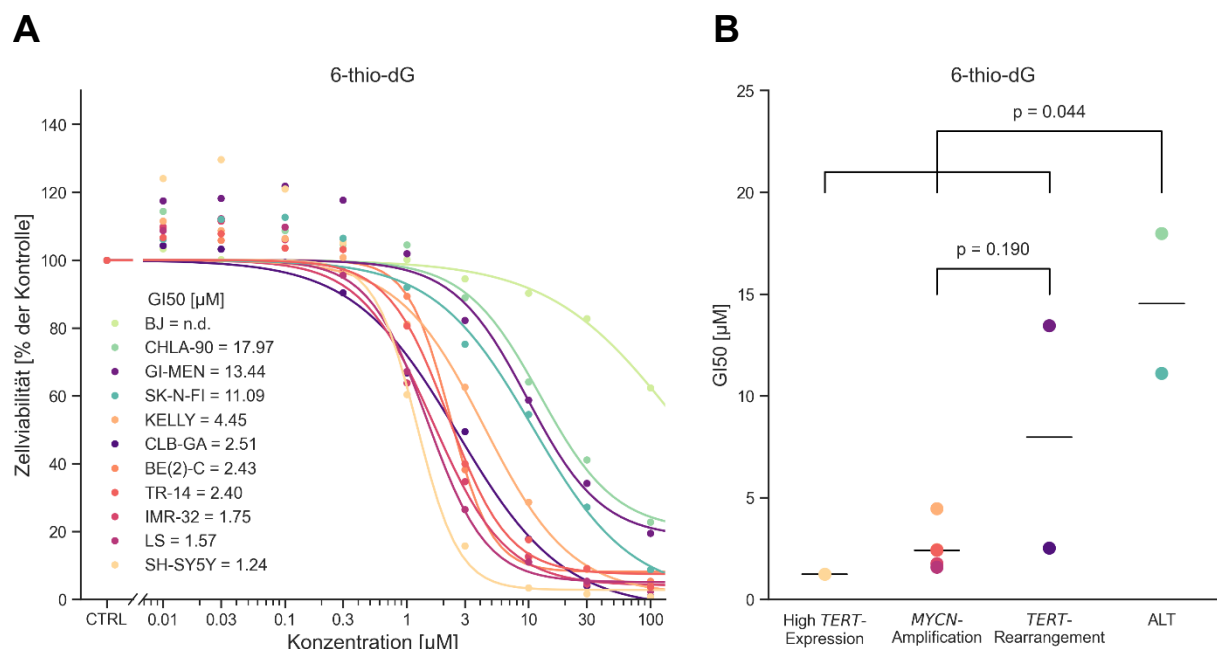


Abbildung 23: Zusammenfassende Wachstumsinhibition durch 6-thio-dG

Kombinierte Darstellung der experimentell bestimmten GI_{50} -Werte aus zwei verschiedenen Versuchsreihen.

(A) Relative Zellviabilität aus Ergebnissen der Substanzscreeningmethode nach 96-stündiger Substanzinkubation mit 6-thio-dG und DMSO als Kontrolle.

(B) Vergleich der GI_{50} -Werte zwischen Zelllinien mit hoher *TERT*-Expression (High *TERT*-Expression), *MYCN*-Amplifikation, *TERT*-Rearrangement und Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) (Mann-Whitney-U-Test).

Diese Versuche deuten darauf hin, dass das Nukleosidanalogen 6-thio-dG im Vergleich zu den untersuchten direkten Telomeraseinhibitoren eine höhere Spezifität und Effektivität in der Inhibition des Wachstums *TERT*-positiver Neuroblastomzelllinien in einem viertägigen Behandlungszeitraum aufweist. Inwiefern ein womöglich verzögert einsetzender antitumoraler Effekt direkter Telomeraseinhibitoren zu den Ergebnissen beigetragen hat, lässt sich in dieser Arbeit nicht beantworten.

3.2.4. Behandlung mit dem MEK-Inhibitor Trametinib

Die Behandlung mit dem MEK-Inhibitor Trametinib lieferte ähnlich wie die Behandlung mit dem ALK-Inhibitor Lorlatinib uneindeutige Ergebnisse (Abb. 24). Die Konzentrationskurve zeigte bei den Zelllinien LS, KELLY, SH-SY5Y und CLB-GA entgegen der Erwartung keinen invers sigmoidalen Verlauf, sondern eine schrittweise Reduktion der Viabilität über das gesamte Spektrum der logarithmischen Konzentrationsstufen. Valide GI_{50} -Werte ließen sich mit diesen Ergebnissen nicht berechnen. Ferner wiesen die *RAS*-*MAPK*-Wildtyp Zelllinien LS und IMR-32 zum einen den niedrigsten (0,01 μ M), als auch den höchsten GI_{50} -Wert (13,98 μ M) auf. Die vier mutierten Zelllinien KELLY, SH-SY5Y, TR-14, CLB-GA zeigten einen medianen GI_{50} -Wert von 7,2 μ M (2,83 - 11,48 μ M). Einen signifikanten Unterschied im therapeutischen Ansprechen durch eine gezielten *RAS*-*MAPK*-Inhibition zwischen *RAS*-*MAPK*-mutierten und Wildtyp-Zelllinien ließ sich nicht bestätigen (Mann-Whitney-U-Test; $U=4$; $p=0,6$; $n_1=4$; $n_2=2$).

Für Trametinib wurde eine hochselektive Hemmung *RAS*-*MAPK*-mutierter Neuroblastomzelllinien vorbeschrieben²². Hierbei wurden nach einem Inkubationszeitraum von 72 Stunden signifikante Unterschiede zwischen *RAS*/*RAF*-, *NF-1*-, *ALK*-mutierten und *RAS*-*MAPK*-Wildtyp Zelllinien nachgewiesen. Diese Beobachtung ließ sich an unserem kleineren Zelllinienkollektiv nicht bestätigen. Vergleichbar zu unseren Ergebnissen war das Fehlen einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung. Nach diesen vorläufigen Ergebnissen wurden die Versuche nicht weiter am vollständigen Zelllinienkollektiv durchgeführt.

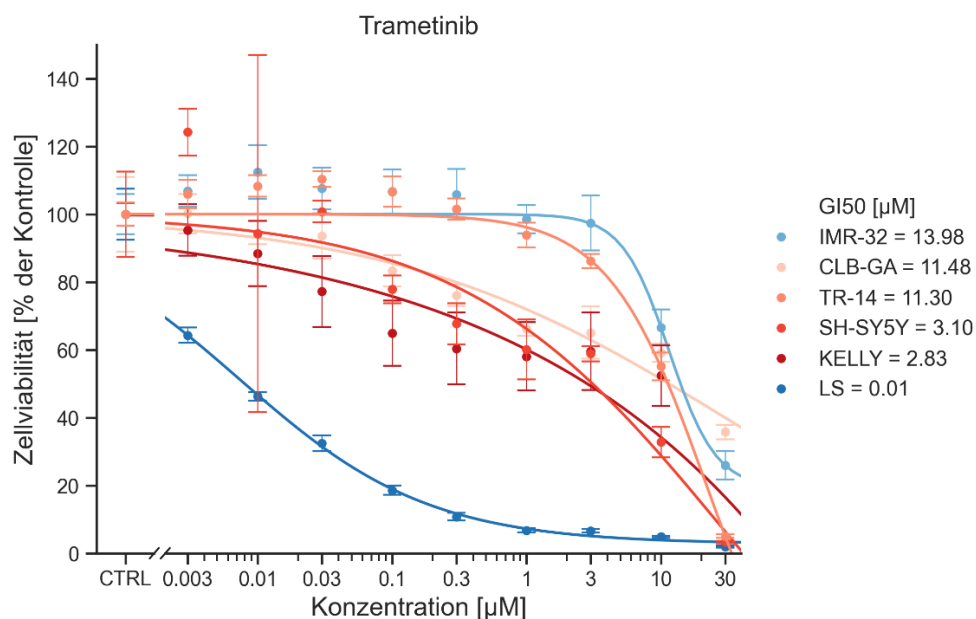


Abbildung 24: Wachstumsinhibition durch Trametinib

Darstellung der relativen Zellviabilität aus Ergebnissen der Substanzscreeningmethode nach 96-stündiger Behandlung mit Trametinib und DMSO als Kontrolle. Zelllinien mit *RAS*-*MAPK*-Mutation sind mit rot und *RAS*-*MAPK*-Wildtyp-Zelllinien mit blau gekennzeichnet.

3.3 *In vitro* Kombinationsbehandlung mit 6-thio-dG

3.3.1. Synergismus und Zytotoxizität

Aus ersten Ergebnissen der Einzelsubstanzbehandlungen wurden die Substanzen Etoposid, Doxorubicin und Ceritinib als Komponenten für eine Kombinationsbehandlung mit 6-thio-dG ausgewählt. Zur Evaluation von potenziellen synergistischen Effekten erfolgte die Viabilitätsanalyse in Kombination parallel zu den weiteren Einzelsubstanztestungen. Die Kombinationen wurden an den gleichen Zelllinien in aufsteigenden Konzentrationen getestet. Dabei wurden mehrere Verhältnisse im Sinne des Multiple-Ray Designs⁵⁸ manuell ausgewählt, die in ihrer Größenordnung an das Verhältnis aus beiden GI_{50} -Werten der kombinierten Substanzen angeglichen waren. Als Kontrolle und als Lösungsmittel der Substanzen wurde DMSO verwendet. Zur Objektivierung der kombinatorischen Effekte im Vergleich zu den Einzelsubstanzen wurde der Combination Index (CI) nach der Chou-Talalay Methode berechnet (Abb. 25B). Die Einteilung der CI-Werte erfolgte in starke Synergie ($CI < 0,3$), Synergie ($CI = 0,3-0,7$), schwache Synergie ($CI = 0,7-0,9$) und keine Synergie ($CI > 0,9$).⁶³

Die Zellviabilität nahm unter allen Substanzkombinationen mit steigenden Konzentrationen ab (Abb. 25A). Bei geringen Substanzkonzentrationen war die Zellviabilität nahezu unbeeinträchtigt. Auf den mittlerem Konzentrationsstufen reichten die relativen Viabilitäten von 12,1 bis 48,5 % für 6-thio-dG + Etoposid, von 3,3 bis 49,6 % für 6-thio-dG + Doxorubicin und 15,9 bis 68,4 % für die Kombination aus 6-thio-dG + Ceritinib. Auf der höchsten Konzentrationsstufe konnten in fast allen Zelllinien relative Viabilitäten von unter 10 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gewählten Konzentrationsstufen das gesamte Inhibitionsspektrum abdeckten.

In den Kombinationen aus 6-thio-dG + Etoposid sowie 6-thio-dG + Doxorubicin zeigten sich in allen acht Zelllinien synergistische Effekte. Die höheren Konzentrationsstufen wiesen synergistische bis stark synergistische Effekte auf. Der Mittelwert der Combination Index Werte war 0,39 (95%-KI=0,23-0,55) für 6-thio-dG + Etoposid und 0,35 (95%-KI=0,21-0,50) für 6-thio-dG + Doxorubicin. Besonders starke Synergien und nahezu 0 % vitale Zellen wurden in den Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y nach Behandlung mit 6-thio-dG + Etoposid sowie in der Zelllinie CLB-GA nach Behandlung mit 6-thio-dG + Doxorubicin beobachtet.

Weniger stark ausgeprägte Effekte mit fehlender Signifikanz ließen sich in der Kombination aus 6-thio-dG + Ceritinib beobachten, die einen mittleren Combination Index von 0,87 (95%-KI=0,53-1,21) aufwies. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *ALK*-mutierten ($CI = 0,98$; 95%-KI=0,12-1,83) und *ALK*-Wildtyp Zelllinien ($CI = 0,76$; 95%-KI=0,35-1,17) festgestellt werden.

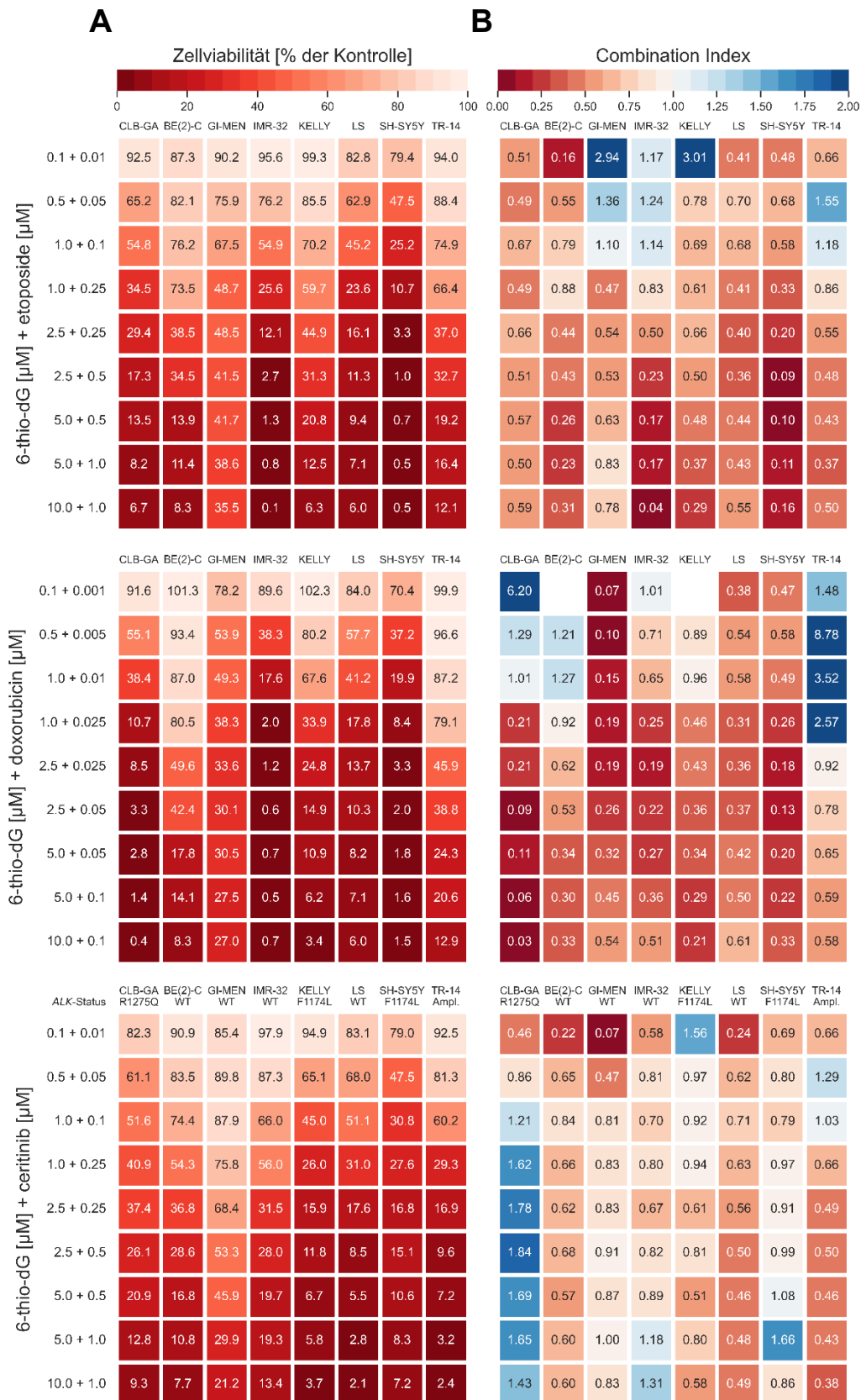


Abbildung 25: Synergismusanalyse der Substanzkombinationen

Darstellung der Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen von 6-thio-dG + Etoposid, 6-thio-dG + Doxorubicin und 6-thio-dG + Certinib. Übersetzte Abbildung aus Vorabveröffentlichung⁷⁹.

(A) Darstellung der relativen Zellviabilität der einzelnen Konzentrationsstufen normalisiert auf das Signal der Kontrollsubstanz (DMSO) von 100 % (weiß) zu 0 % (dunkelrot) relativer Viabilität.

(B) Combination Index (CI) der Zelllinien nach Kombinationsbehandlung. Rote Färbungen verdeutlichen synergistische, blaue antagonistische und weiße additive Werte. Fehlende CI-Zahlenwerte resultieren aus höheren Viabilitätssignalen unter Substanzinkubation im Vergleich zum Kontrollsignal.

3.3.2. Mechanismen der Zellwachstumsinhibition

Zur Evaluation der möglichen zugrundeliegenden Mechanismen der Wachstumsinhibition unter Kombinationsbehandlung wurden repräsentativ eine Zelllinie mit *MYCN*-Amplifikation (BE(2)-C), eine Zelllinie mit *TERT*-Rearrangement (CLB-GA) sowie eine Zelllinie mit hoher *TERT*-Expression (SH-SY5Y) ausgewählt. Die Zelllinien wurden in jeweils drei verschiedenen Konzentrationsstufen einer zweitägigen Behandlung der Substanzkombinationen unterzogen. DMSO wurde als Kontrollsubstanz verwendet. Zunächst wurden Western-Blot Experimente mit den drei Substanzkombinationen 6-thio-dG + Etoposid, 6-thio-dG + Doxorubicin sowie 6-thio-dG + Ceritinib durchgeführt.

Außerdem zeigten die Voruntersuchungen eine besonders effektive Interaktion zwischen 6-thio-dG und Etoposid, was auf eine synergistische Induktion von Apoptose und/oder Hemmung von Zellwachstum hinweisen könnte. Wir hypothesisierten, dass dies durch die komplementären Wirkmechanismen von Telomerasehemmung (6-thio-dG) und DNA-Schädigung (Etoposid) erklärt werden könnte. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde die Kombination aus 6-thio-dG + Etoposid für ergänzende Immunoblot- und Durchflusszytometrie-Experimente ausgewählt.

Apoptose und Nekrose

Eine Zunahme von cleaved caspase-7 als Marker für Apoptose⁸⁰ konnte in den Kombinationen von 6-thio-dG + Etoposid und 6-thio-dG + Doxorubicin in allen drei Zelllinien gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 26A). Diese Zunahme war zumeist konzentrationsabhängig. Ausgeprägte Signale wurden bereits in den niedrigeren Konzentrationsstufen in CLB-GA und SH-SY5Y beobachtet. In einem zusätzlichen Experiment zeigte sich ebenfalls ein Anstieg von cleaved PARP als weiterer Marker für DNA-Schäden⁸⁰ nach einer Kombinationsbehandlung aus 6-thio-dG + Etoposid (Abb. 26B). Im Kontrast dazu nahm in der Kombination mit dem ALK-Inhibitor Ceritinib das cleaved caspase-7-Signal nur in der *ALK*-Wildtyp Zelllinie BE(2)-C, jedoch nicht in den *ALK*-mutierten Zelllinien CLB-GA und SH-SY5Y zu.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunoblot-Experimente zeigte sich in einer durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation mit 6-thio-dG + Etoposid eine signifikante Zunahme des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen in allen drei Zelllinien (Abb. 27). Begleitend dazu wurde eine Abnahme der vitalen Zellen beobachtet. Diese Veränderungen konnten in den Zelllinien CLB-GA und SH-SY5Y bereits bei der niedrigen Konzentrationsstufe beobachtet werden. In der Zelllinie BE(2)-C zeigte sich ein signifikanter Anstieg der

apoptotischen Zellen erst unter den höheren Substanzkonzentrationen, entsprechend zu den Ergebnissen des Immunoblots zu cleaved caspase-7.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine therapeutische Wirkung der Kombinationen 6-thio-dG + Etoposid und 6-thio-dG + Doxorubicin insbesondere durch eine Induktion von Apoptose begründet sein könnte. Diese Effekte konnten in der Kombination von 6-thio-dG mit dem ALK-Inhibitor Ceritinib nicht bestätigt werden.

Zellzyklusarrest

Als Marker für Zellzyklusarrest wurde p21 sowie PCNA und pCDK1 als Marker für Zellproliferation ausgewählt^{81,82}. In den Western-Blot-Experimenten zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Intensität von PCNA-Signalen in allen getesteten Zelllinien nach der Behandlung mit 6-thio-dG + Etoposid, 6-thio-dG + Doxorubicin, oder 6-thio-dG + Ceritinib (Abb. 26A). In den Kombinationen mit Etoposid und Doxorubicin wurde in BE(2)-C eine konzentrationsabhängige Zunahme der p21-Signalintensität beobachtet, während in SH-SY5Y konzentrationsunabhängig starke Signale im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurden. Ergänzend dazu wurde in der Etoposid-Kombination eine Abnahme von phosphoryliertem CDK1 in CLB-GA und SH-SY5Y beobachtet (Abb. 26B). Eine Zunahme von p21 ließ sich in der Kombination aus 6-thio-dG und Ceritinib nicht nachvollziehen.

In einer durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus zeigte sich in der Zelllinie BE(2)-C ein G2/M-Arrest bei Inkubation mit 6-thio-dG + Etoposid (Abb. 28). In CLB-GA nahmen anteilmäßig sowohl die in der S- und G2/M-Phase befindenden Zellen zu, während der Anteil der G0/1-Phase signifikant abnahm. In der Zelllinie SH-SY5Y konnte diese Effekte jedoch nicht beobachtet werden.

Dies weist darauf hin, dass in den Kombinationen mit Topoisomeraseinhibitoren eine beeinträchtigte Proliferation mit einem Zellzyklus-Arrest einhergehen kann, jedoch die Effekte je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausfallen. Insgesamt könnten diese Ergebnisse auf einen Arrest des Zellzyklus in G2 hindeuten, der für Etoposid-behandelte Zellen vorbeschrieben ist⁸³.

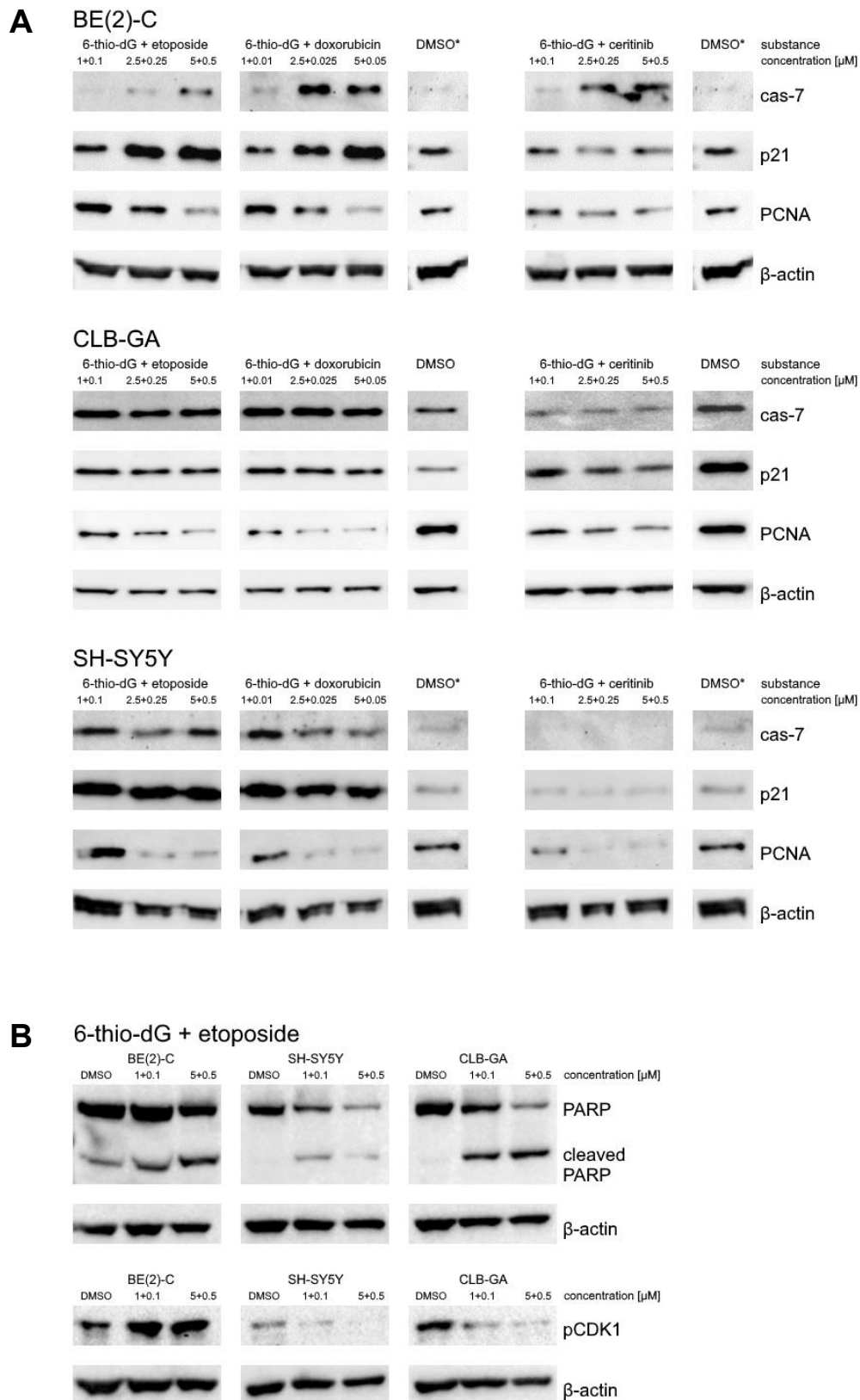


Abbildung 26: Western-Blot-Analyse nach der Behandlung mit 6-thio-dG-Kombinationen

(A) Signale von cleaved caspase-7 (cas-7), p21 und PCNA sowie β-Aktin als Kontrolle in den Neuroblastomzelllinien BE(2)-C, CLB-GA und SH-SY5Y nach 48 Stunden Kombinationsbehandlung mit 6-thio-dG + Etoposid, 6-thio-dG + Doxorubicin und 6-thio-dG + Ceritinib. (*) Identische DMSO-Marker einer Membran, zur Übersicht doppelt dargestellt.

(B) Signale von phosphoryliertem CDK-1, PARP und cleaved PARP sowie β-Aktin als Kontrolle nach 48 Stunden Kombinationsbehandlung mit 6-thio-dG + Etoposid. Abbildung aus Vorabveröffentlichung⁷⁹.

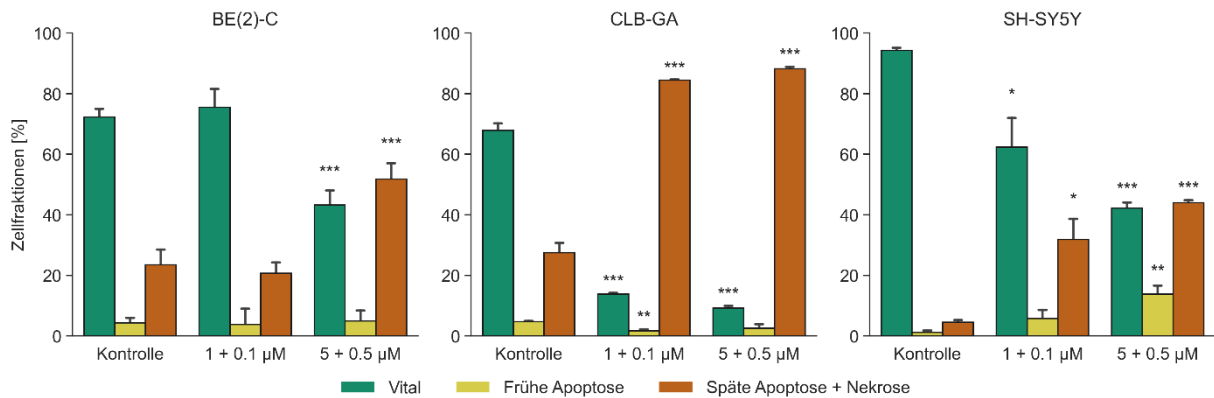


Abbildung 27: Apoptoseanalyse nach der Behandlung mit 6-thio-dG + Etoposid

Mittelwerte mit Standardabweichung der Signale einer Annexin/PI-Durchflusszytometrie-Signale nach einer 48-stündigen Kombinationsbehandlung mit 6-thio-dG + Etoposid in den Zelllinien BE(2)-C, CLB-GA und SH-SY5Y. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Signale eingeteilt in vitale (Annexin⁻/PI⁻), früh-apoptotische (Annexin⁺/PI⁻) und spät-apoptotische + nekrotische (Annexin⁺/PI⁺) Zellen und jeweils normiert auf die Werte einer Behandlungsgruppe. Signifikante p-Werte korrespondierender Kontrollgruppen sind veranschaulicht dargestellt: (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Übersetzte Abbildung aus Vorabveröffentlichung⁷⁹.

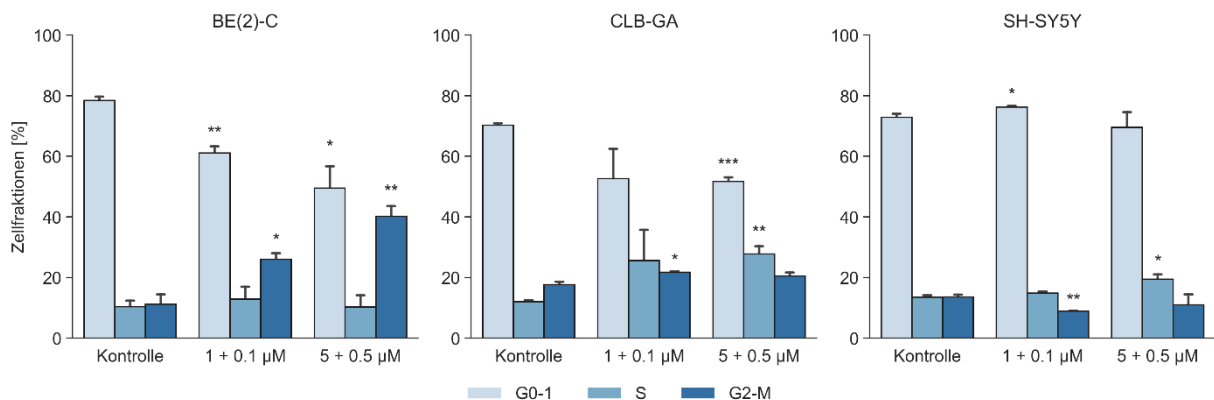


Abbildung 28: Zellzyklusanalyse nach der Behandlung mit 6-thio-dG + Etoposid

Mittelwerte mit Standardabweichung der Durchflusszytometrie-Signale nach einer 48-stündigen Kombinationsbehandlung mit 6-thio-dG + Etoposid in den Zelllinien BE(2)-C, CLB-GA und SH-SY5Y. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Signale nach Zellzyklus eingeteilt in G0/G1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase und jeweils normiert auf die Werte einer Behandlungsgruppe. Signifikante p-Werte korrespondierender Kontrollgruppen sind veranschaulicht dargestellt: (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Übersetzte Abbildung aus Vorabveröffentlichung⁷⁹.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die telomerase-interagierende Substanz 6-thio-dG effektiv das Wachstum von *TERT*-positiven Neuroblastomzelllinien hemmt. Darüber hinaus konnten synergistische bis stark synergistische Effekte einer Kombination aus 6-thio-dG und Topoisomeraseinhibitoren nachgewiesen werden. Dies stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz für Patienten mit *TERT*-positiven Hoch-Risiko-Neuroblastomen dar. Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten synergistischen Effekte von 6-thio-dG in Kombination mit dem ALK-Inhibitor Ceritinib beobachtet werden.

Es existieren zahlreiche Substanzen, die sich als potenzielle Kandidaten für Tumorthapien anbieten und präklinisch getestet werden könnten. Durch Kombinationen von Substanzen, verschiedene Konzentrationsstufen sowie die Berücksichtigung unterschiedlicher Zelllinien wird der Umfang der Experimente jedoch exponentiell erhöht. Daher ist es wichtig, den zeitlichen und materiellen Aufwand zu minimieren. Die Biomek 4000 Automated Workstation stellt ein kostengünstiges und vielseitig einsetzbares Einsteigermodell für die Laborautomatisierung dar. In dieser Arbeit wurde eine innovative automatisierte Substanzscreeningmethode etabliert und optimiert. In Validierungsversuchen konnte die Methode im Vergleich zu manuell durchgeführten Experimenten signifikant höhere Ergebnisqualitäten liefern. Ferner erlaubt die Automatisierung eine Reduktion des personellen Aufwands und schafft Planungssicherheit mit präziser Verbrauchs- und Zeitkalkulation. Eine weitere Steigerung des Versuchsdurchsatzes ist maßgeblich durch die fehlende Unterstützung von 96-Kanal Pipettierköpfen limitiert. Zusätzlich erlaubt der 8-Kanal-Pipettierkopf des Biomek 4000 weder eine einzelne Spitzenaufnahme noch ein individuelles Pipettieren der verschiedenen Kanäle. Andere Robotermodelle können mit einem 96-Kanal- und 8-Kanal-Pipettierkopf ausgestattet werden, welcher ein individuelles Pipettieren der einzelnen Kanäle ermöglicht. Mit diesen Erweiterungen könnte ein Aussäen der Zellen anstatt des spaltenweisen Pipettierens in einem Schritt erfolgen sowie eine automatische Aufnahme der erforderlichen Spitzen für die Verteilung des CTG-Reagenzes und der Einsatz von 384-Well-Platten ermöglicht werden.

Die konventionellen Zytostatika Etoposid und Doxorubicin sind Erstlinienmedikamente in der Therapie von Neuroblastomen der mittleren und hohen Risikogruppe²⁴. Ihr therapeutischer Effekt beruht auf der Auslösung von DNA-Doppelstrangbrüchen und dem folgenden Einsetzen einer DNA-Damage Response^{37,38}. Dieser Effekt ist seit Jahrzehnten ein wichtiger Bestandteil in der medikamentösen Therapie zahlreicher Tumorentitäten. Jedoch kann ein fehlendes therapeutisches Ansprechen von Tumorrezidiven durch erworbene Resistenzen begründet sein³⁹. So zeigte die *in vitro* Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin in dieser Arbeit, dass Neuroblastomzelllinien, die aus bereits vorthapierten Tumoren etabliert worden waren, ein

signifikant schwächeres Therapieansprechen aufwiesen als jene aus unbehandelten Tumoren. Ferner deutete die starke Korrelation zwischen dem therapeutischen Ansprechen beider Substanzen auf mögliche überlappende Resistenzen hin. Weitere Probleme der konventionellen Chemotherapie ergeben sich aus einem weitreichenden Nebenwirkungsprofil^{32,39}. Aus diesen Gründen besteht ein erheblicher Bedarf an innovativen Therapieansätzen, die einer Resistenzbildung entgegenwirken und darüber hinaus mildere Toxizitäten aufweisen.

Als klassisches Beispiel für erfolgreiche zielgerichtete Therapien kann der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib in der CML-Therapie genannt werden⁸⁴. Vergleichbare Therapieansätze haben bisher keinen Einsatz in der Standardtherapie von Neuroblastomen gefunden, jedoch werden ALK-Inhibitoren gegenwärtig in der Erstlinientherapie geprüft⁴². Die Vielzahl an verschiedenen Treibermutationen sowie ihre zumeist geringe Prävalenz erschweren die Etablierung zielgerichteter Therapiemöglichkeiten im Neuroblastom⁸⁵.

Der ALK-Inhibitor Ceritinib fand bereits therapeutischen Einsatz in einer Phase-1-Studie mit pädiatrischen Tumoren⁴². Die *in vitro* Substanztestungen dieser Arbeit bestätigten eine signifikant stärkere Wachstumsinhibition von Neuroblastom-Zelllinien mit *ALK*-Alterationen im Vergleich zu *ALK*-Wildtyp Zelllinien. In der Gruppe mit *ALK*-Alterationen zeigte die amplifizierte Zelllinie TR-14 die höchsten GI₅₀-Werte, was auf eine verminderte therapeutische Sensitivität von *ALK*-Amplifikationen im Vergleich zu Punktmutationen hindeuten könnte. Für den ALK-Inhibitor Lorlatinib konnte zwar ein tendenziell stärkeres Ansprechen unter *ALK*-alterierten Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch konnte auch unter hohen Substanzkonzentrationen keine vollständige Wachstumsinhibition erzielt werden. Diese Beobachtungen waren vereinbar mit bereits publizierten Ergebnissen, in denen ein schmaleres Konzentrationsspektrum von Lorlatinib untersucht wurde⁴⁴. In der *in vitro* Behandlung mit dem RAS-MAPK-Inhibitor Trametinib zeigten sich ebenfalls nur flach abfallende Inhibitionskurven, sodass die Substanz nicht für weitere Kombinationsbehandlungen ausgewählt wurde. Während das Fehlen einer steil abfallenden sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve vergleichbar zu publizierten Ergebnissen war²², konnte kein signifikanter Unterschied zwischen RAS-MAPK-mutierten und Wildtyp-Zelllinien nachgewiesen werden, was möglicherweise auch auf ein kleineres Zelllinienkollektiv zurückzuführen war. Nichtsdestotrotz lieferten diese Untersuchungen mit den zielgerichteten Substanzen, neben den bereits durchgeführten Validierungsversuchen, erneut den Nachweis einer hohen Reliabilität und Validität der hier etablierten semi-automatischen Substanzscreening-Methode.

Eine neuartige Therapiestrategie für Hoch-Risiko-Neuroblastome könnte in der gezielten Hemmung der Telomererhaltung bestehen. In der Mehrzahl dieser Tumoren liegt eine Expressionsinduktion des Telomerase-Gens *TERT* mit folgender Steigerung der

Enzymaktivität, entweder indirekt durch *MYCN*-Amplifikationen oder direkt durch *TERT*-Rearrangements, vor¹⁹. Durch eine gesteigerte Telomeraseaktivität erhalten Tumorzellen einen stammzellähnlichen, selbsterneuernden Status. Dagegen besitzen gesunde somatische Zellen in der Regel keine Telomeraseaktivität. Auch sind ruhende Stammzellen nicht zwangsläufig auf eine Aktivität der Telomerase angewiesen⁸⁶. Ferner konnte eine vollständige Regeneration der Telomeraseaktivität in vitalen Stammzellen nach einer gezielten Inhibition nachgewiesen werden⁷⁷. Zum einen könnte eine Hemmung der Telomererhaltung die Proliferation von Tumorzellen durch fortschreitende Telomerverkürzung begrenzen, zugleich kann somit angenommen werden, dass sich aktive Stammzellen nach einer Therapie mit Telomeraseinhibitoren regenerieren würden. Eine zielgerichtete Therapie gegen Telomerase könnte somit in vielen Tumorentitäten mit erhöhter Telomeraseaktivität einen Vorteil gegenüber einer konventionellen Chemotherapie bieten.

Allgemein besteht bei Telomeraseinhibitoren die potentielle Problematik eines verzögerten Wirkungseintritts, da Apoptose und Seneszenz-Signalwege erst bei kritischer Telomerverkürzung aktiviert werden⁵⁴. Imetelstat ist die bisher einzige telomerase-interagierende Substanz, die in klinischen Studien untersucht wurde^{50,87}. In der Behandlung von therapierefraktären soliden Tumoren reichte die Telomeraseinhibition nicht aus, die Enzymaktivität effektiv und langanhaltend zu inhibieren, sodass der gewünschte Behandlungserfolg zumeist ausblieb und zusätzlich durch dosislimitierende Toxizitäten eingeschränkt wurde. Jedoch konnte 2024 ein signifikanter Behandlungserfolg bei Patienten mit transfusionspflichtigem myelodysplastischen Syndrom⁸⁸ zu einer Zulassung durch die FDA führen. Andere Inhibitoren, wie BIBR-1532 und Costunolide, besitzen neben der Telomerasehemmung noch weitere akut zytotoxische Wirkmechanismen^{52,53}. Hierbei beschränkt sich die Datenlage jedoch auf *in vitro* Versuche. Das Nukleosidanalogon 6-thio-dG zeigt im Vergleich zu den beschriebenen Telomeraseinhibitoren aufgrund des Wirkmechanismus mit direkter Zerstörung der Telomerstruktur einen deutlich verkürzten Wirkungseintritt⁵⁴. Auch in dieser Arbeit zeigte sich innerhalb von 96 Stunden eine signifikant stärkere Wirkung bei telomerase-positiven im Vergleich zu telomerase-negativen Zelllinien. Im Gegensatz dazu konnte unter den direkten Telomeraseinhibitoren kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Daher waren die therapeutischen Effekte der Telomeraseinhibitoren womöglich auf Off-Target-Effekte und nicht direkt auf die Hemmung der Enzymaktivität zurückzuführen. Vorteile einer Behandlung mit 6-thio-dG gegenüber direkten Telomeraseinhibitoren könnten daher ein schneller einsetzender antitumoraler Effekt und geringere Nebenwirkungen aufgrund einer verkürzten Behandlungszeit sein⁵⁴.

Eine Telomeraseinhibition scheint Tumorzellen für eine Kombinationstherapie mit konventionellen Chemotherapeutika zu sensibilisieren⁸⁹. Besondere Bedeutung könnte dabei einer simultanen Behandlung mit Topoisomeraseinhibitoren zukommen. So wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einer Telomerasehemmung und einer gesteigerten Wirkung von Doxorubicin und Etoposid festgestellt⁹⁰. Jedoch sorgte nicht eine Telomeraseinhibition allein, sondern erst die kritische Verkürzung der Telomere für eine Wirksamkeitssteigerung der genotoxischen Substanzen⁹¹. Umgekehrt zeigten Tumorzellen nach alleiniger Etoposidbehandlung eine erhöhte Telomeraseaktivität, welche als Aktivierung von kompensatorischen Mechanismen und damit der Bildung von Resistenzen gedeutet werden könnte⁹². Auf Grundlage dieser Daten vermuteten wir potenzielle synergistische Effekte durch eine Kombination von 6-thio-dG mit Etoposid oder Doxorubicin. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass diese Kombinationen vielversprechende anti-tumorale Effekte durch hochpotente Synergien *in vitro* aufwiesen. Auf molekularer Ebene resultierte die Kombinationsbehandlung in einer Apoptoseantwort, nachgewiesen durch eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen sowie einer Induktion von cleaved caspase-7 und cleaved PARP. Zusätzlich wurden Auswirkungen auf den Zellzyklus mit erhöhter Aktivität des Tumorsuppressors p21 und einer reduzierten Aktivierung von CDK1 mit einhergehender Verminderung von PCNA beobachtet. Ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase zeigte sich in BE-(2)-C und möglich schwach ausgeprägt in CLB-GA. Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass unter einer Kombinationsbehandlung von 6-thio-dG und genotoxischen Substanzen eine Inhibition des Zellwachstums eintritt, welches vorwiegend durch Apoptose, jedoch auch zelllinienabhängig durch einen Zellzyklusarrest begründet sein könnte. Eine Kombination von 6-thio-dG mit Ceritinib scheint dagegen wenig effektiv zu sein.

Die *in vitro* Screeninguntersuchungen dienen dem Zweck potenzielle Substanzkombinationen für weiterführende *in vivo* Experimente zu finden⁶³. Zur Steigerung der Aussagekraft wurden die Substanzen über ein breites Konzentrationsspektrum und in verschiedenen Verhältnissen analysiert. Dennoch sind im Allgemeinen *in vitro* Ergebnisse nicht zwangsläufig auf die biologischen Mechanismen *in vivo* zu übertragen⁶³. Zudem kann das ausgewählte statistische Modell zur Einteilung von kombinatorischen Effekten in Synergismus, Additivität und Antagonismus einen relevanten Einfluss darstellen und nicht selten widersprüchliche Ergebnisse zu anderen Modellen liefern⁵⁶. Zur Validierung der *in vitro* Ergebnisse wurde die hocheffektive Kombination aus 6-thio-dG + Etoposid innerhalb von Xenograft-Modellen an den Neuroblastomzelllinien BE(2)-C, CLB-GA und SH-SY5Y untersucht⁷⁹. Dabei sistierte das Tumorstadium in den Behandlungsgruppen mit CLB-GA und SH-SY5Y und es zeigten sich hohe Überlebensraten (CLB-GA=100%; SH-SY5Y=91%) im Beobachtungszeitraum mit signifikanten Unterschieden zu der Kontrollsubstanz und den Einzelsubstanzgruppen. Im Gegensatz dazu, und damit im Einklang zu den Ergebnissen der *in vitro* Experimente, konnte

in der *MYCN*-amplifizierten und *p53*-mutierten Zelllinie BE(2)-C kein signifikanter Vorteil in Bezug auf die Tumorreduktion oder das Überleben gegenüber der Behandlung mit den Einzelsubstanzen erzielt werden. Hierbei sollte beachtet werden, dass BE(2)-C eine immortalisierte Zelllinie aus einem aggressiven, rezidierten Tumor mit einer Vielzahl an genetischen Alterationen ist, weshalb diese Ergebnisse möglicherweise nicht uneingeschränkt auf die Therapie von primären Neuroblastomen übertragbar sind. Dennoch unterstreicht dies die bestehenden Herausforderungen in der Behandlung rezidivierter Tumoren. Die therapeutischen Effekte von Substanzkombinationen können durch Überschneidungen von toxischen Nebenwirkungen *in vivo* limitiert werden⁹³. In den beschriebenen Xenograft-Versuchen wurden jedoch keine Gewichtsunterschiede zwischen den Kontroll- und Behandlungsgruppen festgestellt, was auf eine gute Verträglichkeit der Therapie hindeuten könnte.

Zielgerichtete Substanzkombinationen werden in die Krebstherapie aufgrund von erwarteten oder nachgewiesenen synergistischen Effekten integriert, die aus der gemeinsamen Interaktion mit spezifischen molekularen Mechanismen resultieren. Synergistische Substanzkombinationen führen zu einem gesteigerten therapeutischen Ansprechen und einer Reduktion von toxischen Nebenwirkungen. Diese Arbeit liefert einen Ansatz für die Kombination von telomerase-interagierenden Substanzen und Topoisomeraseinhibitoren bei Patienten mit telomerasepositiven Neuroblastomen durch den Nachweis von stark synergistischen Effekten. In weiterführenden *in vivo* Versuchen konnte dieser Zusammenhang weiter validiert werden⁷⁹. Da Telomerase im Allgemeinen in vielen Tumorentitäten überexprimiert ist, könnte diese Therapieform über das Neuroblastom hinaus weitreichende Anwendungsmöglichkeiten finden. Doch auch wenn Kombinationen in präklinischen Modellen vielversprechende Ergebnisse aufweisen, können eine begrenzte Übertragbarkeit synergistischer Effekte, eine ungünstige Pharmakokinetik und patientenspezifische Unterschiede zu abweichenden Ergebnissen innerhalb klinischer Studien führen⁹⁴. Weiterführende prospektive klinische Studien sind notwendig, um die experimentell beobachteten Wirkmechanismen im Patienten zu belegen.

5 Literaturverzeichnis

- 1 National Center for Biotechnology Information. GenBank.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Zuletzt abgerufen am 28.09.2023).
- 2 Ries LA, Smith MA, Gurney JG, et al. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995. *National Cancer Institute* 1999.
- 3 Deutsches Kinderkrebsregister. Neuroblastome und Ganglioneuroblastome - Ausgewählte Kenngrößen. Deutschland (2006 - 2015), Kinder unter 15 Jahren.
www.kinderkrebsregister.de/dkk/ergebnisse/auswertungen-im-detail/periphere-nervenzelltumoren/neuroblastome-und-ganglioneuroblastome/.
- 4 Gurney JG, Ross JA, Wall DA, Bleyer WA, Severson RK, Robison LL. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *Journal of pediatric hematology/oncology* 1997; **19**: 428–32.
- 5 Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Development* 2013; **140**: 2247–51.
- 6 Tomolonis JA, Agarwal S, Shohet JM. Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. *Cell Tissue Res* 2018; **372**: 245–62.
- 7 DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, et al. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal of pediatric hematology/oncology* 1999; **21**: 181–89.
- 8 Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *JCO* 2009; **27**: 289–97.
- 9 Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, et al. ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2017; **3**: a001115.
- 10 Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci* 2011; **102**: 302–08.
- 11 Weiser D, Laudenslager M, Rappaport E, et al. Stratification of patients with neuroblastoma for targeted ALK inhibitor therapy. *JCO* 2011; **29**: 9514.
- 12 Rosswog C, Fassunke J, Ernst A, et al. Genomic ALK alterations in primary and relapsed neuroblastoma. *Br J Cancer* 2023; **128**: 1559–71.
- 13 Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008; **455**: 930–35.
- 14 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 1997; **33**: 787–91.
- 15 Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; **3**: a014415.

- 16 Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; **224**: 1121–24.
- 17 Rickman DS, Schulte JH, Eilers M. The Expanding World of N-MYC-Driven Tumors. *Cancer Discov* 2018; **8**: 150–63.
- 18 Mac SM, D'Cunha CA, Farnham PJ. Direct recruitment of N-myc to target gene promoters. *Mol Carcinog* 2000; **29**: 76–86.
- 19 Peifer M, Hertwig F, Roels F, et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* 2015; **526**: 700–04.
- 20 Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 319–30.
- 21 Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; **16**: 103–19.
- 22 Eleveld TF, Oldridge DA, Bernard V, et al. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet* 2015; **47**: 864–71.
- 23 Ackermann S, Cartolano M, Hero B, et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science* 2018; **362**: 1165–70.
- 24 Simon T, Hero B, Schulte JH, et al. 2017 GPOH Empfehlungen für Diagnostik und Therapie von Patienten mit neuroblastischen Tumoren. *Klin Padiatr* 2017; **229**: 147–67.
- 25 Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 289–97.
- 26 Park JR, Bagatell R, London WB, et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2013; **60**: 985–93.
- 27 Strother DR, London WB, Schmidt ML, et al. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. *JCO* 2012; **30**: 1842–48.
- 28 Twist CJ, Schmidt ML, Naranjo A, et al. Maintaining Outstanding Outcomes Using Response- and Biology-Based Therapy for Intermediate-Risk Neuroblastoma: A Report From the Children's Oncology Group Study ANBL0531. *JCO* 2019; **37**: 3243–55.
- 29 Brodeur GM, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; **11**: 704–13.
- 30 Hero B, Simon T, Spitz R, et al. Localized Infant Neuroblastomas Often Show Spontaneous Regression: Results of the Prospective Trials NB95-S and NB97. *JCO* 2008; **26**: 1504–10.
- 31 Smith V, Foster J. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel)* 2018; **5**.

- 32 Desai AV, Heneghan MB, Li Y, et al. Toxicities of busulfan/melphalan versus carboplatin/etoposide/melphalan for high-dose chemotherapy with stem cell rescue for high-risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* 2016; **51**: 1204–10.
- 33 Johnsen JI, Dyberg C, Fransson S, Wickström M. Molecular mechanisms and therapeutic targets in neuroblastoma. *Pharmacological Research* 2018; **131**: 164–76.
- 34 Ke X, Shen L. Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Frontiers in Laboratory Medicine* 2017; **1**: 69–75.
- 35 Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 38022–43.
- 36 McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res* 2007; **623**: 83–97.
- 37 Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Letters* 2007; **252**: 9–18.
- 38 Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011; **21**: 440–46.
- 39 Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 1997; **54 Suppl 4**: 1–7.
- 40 Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; **371**: 2167–77.
- 41 Mossé YP, Lim MS, Voss SD, et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *The Lancet Oncology* 2013; **14**: 472–80.
- 42 Fischer M, Moreno L, Ziegler DS, et al. Ceritinib in paediatric patients with anaplastic lymphoma kinase-positive malignancies: an open-label, multicentre, phase 1, dose-escalation and dose-expansion study. *The Lancet Oncology* 2021; **22**: 1764–76.
- 43 Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2014; **4**: 662–73.
- 44 Guan J, Tucker ER, Wan H, et al. The ALK inhibitor PF-06463922 is effective as a single agent in neuroblastoma driven by expression of ALK and MYCN. *Dis Model Mech* 2016; **9**: 941–52.
- 45 Miyazaki M, Otomo R, Matsushima-Hibiya Y, et al. The p53 activator overcomes resistance to ALK inhibitors by regulating p53-target selectivity in ALK-driven neuroblastomas. *Cell Death Discov* 2018; **4**: 56.
- 46 Wood AC, Krytska K, Ryles HT, et al. Dual ALK and CDK4/6 Inhibition Demonstrates Synergy against Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2017; **23**: 2856–68.
- 47 Guterres AN, Villanueva J. Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene* 2020; **39**: 5811–24.

- 48 Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, et al. In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res* 2005; **65**: 7866–73.
- 49 Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* 2016; **8**: 69.
- 50 Thompson PA, Drissi R, Muscal JA, et al. A phase I trial of imetelstat in children with refractory or recurrent solid tumors: a Children's Oncology Group Phase I Consortium Study (ADV1112). *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 6578–84.
- 51 Pascolo E, Wenz C, Lingner J, et al. Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15566–72.
- 52 Bashash D, Ghaffari SH, Zaker F, et al. Direct short-term cytotoxic effects of BIBR 1532 on acute promyelocytic leukemia cells through induction of p21 coupled with downregulation of c-Myc and hTERT transcription. *Cancer Investigation* 2012; **30**: 57–64.
- 53 Choi S-H, Im E, Kang HK, et al. Inhibitory effects of costunolide on the telomerase activity in human breast carcinoma cells. *Cancer Letters* 2005; **227**: 153–62.
- 54 Mender I, Gryaznov S, Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW. Induction of telomere dysfunction mediated by the telomerase substrate precursor 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Cancer Discov* 2015; **5**: 82–95.
- 55 Wright CJM, McCormack PL. Trametinib: first global approval. *Drugs* 2013; **73**: 1245–54.
- 56 Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from Across Disciplines. *Front Pharmacol* 2017; **8**: 158.
- 57 Greco WR, Faessel H, Levasseur L. The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers? *J Natl Cancer Inst* 1996; **88**: 699–700.
- 58 Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect* 2015; **3**: e00149.
- 59 Geary N. Understanding synergy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; **304**: E237-53.
- 60 BLISS CI. THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY¹. *Annals of Applied Biology* 1939; **26**: 585–615.
- 61 Loewe S. Die quantitativen Probleme der Pharmakologie. *Ergebnisse der Physiologie* 1928; **27**: 47–187.
- 62 Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; **22**: 27–55.
- 63 Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 621–81.

- 64 Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2001; **Appendix 3**: Appendix 3B.
- 65 Promega Corporation. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay: Technical Bulletin. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf> (Zuletzt abgerufen am 02.12.2024).
- 66 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–54.
- 67 Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE* 2015; **10**: e0146021.
- 68 Chou T, Martin N. CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide. A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. ComboSyn Inc, Paramus, (NJ), 2005.
- 69 Koivisto S. Effect of Liquid Properties in Pipetting Liquid Handling Note – No. 1. *Technical Note* 2009.
- 70 Henke HA, Dufey V, Hamels S. How to Handle Problematic Liquids with the epMotion® 96 and epMotion® 96xl. *White Paper* 2017.
- 71 Thermo Electron Corporation. Accutase™ Cell Detachment Solution. www.thermo.com.cn/resources/200802/productpdf_26369.pdf (Zuletzt abgerufen am 14.03.2022).
- 72 Lundholt BK, Scudder KM, Pagliaro L. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen* 2003; **8**: 566–70.
- 73 Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precision Oncology* 2017; **2017**.
- 74 Fulda S, Honer M, Menke-Moellers I, Berthold F. Antiproliferative potential of cytostatic drugs on neuroblastoma cells in vitro. *European Journal of Cancer* 1995; **31**: 616–21.
- 75 Carr J, Bell E, Pearson ADJ, et al. Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Res* 2006; **66**: 2138–45.
- 76 Masters JRW, Palsson B, eds. Cancer cell lines. Cancer cell lines part 1. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999.
- 77 Marian CO, Cho SK, McEllin BM, et al. The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 154–63.

- 78 Kanno S, Kitajima Y, Kakuta M, et al. Costunolide-induced apoptosis is caused by receptor-mediated pathway and inhibition of telomerase activity in NALM-6 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2008; **31**: 1024–28.
- 79 Fischer-Mertens J, Otte F, Roderwieser A, et al. Telomerase-targeting compounds Imetelstat and 6-thio-dG act synergistically with chemotherapy in high-risk neuroblastoma models. *Cell Oncol (Dordr)* 2022; **45**: 991–1003.
- 80 Inoue S, Browne G, Melino G, Cohen GM. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1053–61.
- 81 Enserink JM, Kolodner RD. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 2010; **5**: 11.
- 82 Shivji KK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 1992; **69**: 367–74.
- 83 Chiu C-C, Li C-H, Ung M-W, Fuh T-S, Chen W-L, Fang K. Etoposide (VP-16) elicits apoptosis following prolonged G2-M cell arrest in p53-mutated human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Letters* 2005; **223**: 249–58.
- 84 Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; **355**: 2408–17.
- 85 Greengard EG. Molecularly Targeted Therapy for Neuroblastoma. *Children (Basel)* 2018; **5**: 142.
- 86 Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 329–40.
- 87 Salloum R, Hummel TR, Kumar SS, et al. A molecular biology and phase II study of imetelstat (GRN163L) in children with recurrent or refractory central nervous system malignancies: a pediatric brain tumor consortium study. *Journal of neuro-oncology* 2016; **129**: 443–51.
- 88 Platzbecker U, Santini V, Fenaux P, et al. Imetelstat in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes who have relapsed or are refractory to erythropoiesis-stimulating agents (IMerge): a multinational, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2024; **403**: 249–60.
- 89 Cunningham AP, Love WK, Zhang RW, Andrews LG, Tollefsbol TO. Telomerase inhibition in cancer therapeutics: molecular-based approaches. *Curr Med Chem* 2006; **13**: 2875–88.
- 90 Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, et al. Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy. *Hum Gene Ther* 2005; **16**: 859–68.

- 91 Chen Z, Koeneman KS, Corey DR. Consequences of telomerase inhibition and combination treatments for the proliferation of cancer cells. *Cancer Res* 2003; **63**: 5917–25.
- 92 Sato N, Mizumoto K, Kusumoto M, et al. Up-regulation of telomerase activity in human pancreatic cancer cells after exposure to etoposide. *Br J Cancer* 2000; **82**: 1819–26.
- 93 Gianni L, Salvatorelli E, Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes. *Cardiovasc Toxicol* 2007; **7**: 67–71.
- 94 Palmer AC, Sorger PK. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. *Cell* 2017; **171**: 1678-1691.e13.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Risikostratifizierung von Neuroblastomen	10
Abbildung 2: Ereignis-freies Überleben von Neuroblastompatienten nach Risikogruppen	11
Abbildung 3: Aufbau der Zellausplattierungs-Methode	25
Abbildung 4: Excel-Datei für die Berechnung der zu pipettierenden Volumina	26
Abbildung 5: Berechnung der Dilutionskonzentration	28
Abbildung 6: Berechnung des Dilutionstransfervolumens mit konstantem Dilutionsvolumen	28
Abbildung 7: Berechnung des Diluentvolumens	28
Abbildung 8: Beispiel für pipettierte Volumina einer Substanz	29
Abbildung 9: Aufbau der Substanzverteilungs-Methode	30
Abbildung 10: Aufbau der Zellwachstumsanalyse-Methode	31
Abbildung 11: Biomek If-Else-Bedingung für volumenabhängigen Spitzenwechsel	34
Abbildung 12: Vergleich zwischen einer Zellverteilung mit dem MP1000- oder MP200-Tool	35
Abbildung 13: Einfluss benachbarter Viabilitätsunterschiede auf das CTG-Lumineszenzsignal	36
Abbildung 14: Berechnung des Dilutionsvolumens mit konstantem Dilutionstransfervolumen	37
Abbildung 15: Dilutionsvolumina bei unterschiedlicher Berechnung der Verdünnungsreihe	37
Abbildung 16: Ergebnisqualitäten der Substanzscreeningmethoden	40
Abbildung 17: Wachstumsinhibition durch Etoposid und Doxorubicin	43
Abbildung 18: Vergleich der GI_{50} -Werte von Etoposid und Doxorubicin	44
Abbildung 19: Wachstumsinhibition durch Ceritinib	45
Abbildung 20: Wachstumsinhibition durch Lorlatinib	47
Abbildung 21: Wachstumsinhibition durch telomerase-interagierende Substanzen	49
Abbildung 22: Wachstumsinhibition durch 6-thio-dG an einem größeren Zelllinienkollektiv	50
Abbildung 23: Zusammenfassende Wachstumsinhibition durch 6-thio-dG	51
Abbildung 24: Wachstumsinhibition durch Trametinib	52
Abbildung 25: Synergismusanalyse der Substanzkombinationen	54
Abbildung 26: Western-Blot-Analyse nach der Behandlung mit 6-thio-dG-Kombinationen	57
Abbildung 27: Apoptoseanalyse nach der Behandlung mit 6-thio-dG + Etoposid	58
Abbildung 28: Zellzyklusanalyse nach der Behandlung mit 6-thio-dG + Etoposid	58

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bedarfsmittel und Geräte	19
Tabelle 2: Verwendetes Material auf der Biomek 4000 Automated Workstation	20
Tabelle 3: Verwendete Substanzen	21
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	21
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Assays	22
Tabelle 6: Variablen für die Berechnung der zu pipettierenden Volumina	27
Tabelle 7: Pipettierempfehlungen nach physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeiten	33
Tabelle 8: Benutzerdefinierte Pipettiertechniken	33
Tabelle 9: Dauer der Substanzscreening-Methoden	41
Tabelle 10: Materialverbrauch der Substanzscreening-Methoden	41
Tabelle 11: Genetisches Profil der verwendeten Neuroblastomzelllinien	42

7 Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

- 1 Roderwieser A, Sand F, Walter E, et al. Telomerase Is a Prognostic Marker of Poor Outcome and a Therapeutic Target in Neuroblastoma. *JCO Precision Oncology* 2019: 1–20.
- 2 Fischer-Mertens J, Otte F, Roderwieser A, et al. Telomerase-targeting compounds Imetelstat and 6-thio-dG act synergistically with chemotherapy in high-risk neuroblastoma models. *Cell Oncol (Dordr)* 2022; 45: 991–1003.