

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Expression von NK-Zell-Rezeptorliganden und Zellyse durch
NK-Zellen nach Vorbehandlung von Neuroblastomzellen mit
Posaconazol oder ATO**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Grimm, Paul

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. U. Holzer

2. Berichterstatter: Professorin Dr. U. Naumann

Tag der Disputation: 09.01.2024

Für Schmetterlinge und Einhörner

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
I Einleitung.....	1
I.1 Neuroblastom.....	1
I.1.1 Allgemeines und Epidemiologie.....	1
I.1.2 Genetik.....	2
I.1.3 Klassifikation nach INSS und INRGSS.....	3
I.1.4 Therapiestrategien und Prognose.....	5
I.2 MYCN.....	7
I.2.1 Physiologische Funktion, Pathologie, Regulation.....	7
I.2.2 Therapeutisches Potenzial.....	8
I.3 Hedgehog-Signalweg.....	9
I.3.1 Entdeckung.....	9
I.3.2 Hedgehog-Signalkaskade.....	9
I.3.3 Physiologische Funktion.....	10
I.3.4 Relevanz im Tumor.....	10
I.3.5 Therapeutisches Potenzial.....	11
I.4 ATO.....	12
I.4.1 Grundlegendes.....	12
I.4.2 Toxizität.....	13
I.4.3 Historischer Überblick über therapeutische Nutzung.....	13
I.4.4 Antitumorogene Wirkmechanismen.....	15
I.5 Posaconazol.....	16
I.5.1 Allgemeines und klinischer Einsatz von Triazolantimykotika.....	16
I.5.2 Antitumorogene Wirkmechanismen.....	18
I.6 NK-Zellen.....	19
I.6.1 Aufbau des Immunsystems.....	19
I.6.2 Funktion der NK-Zellen.....	20
I.6.3 Regulation der Effektorfunktion.....	21
I.6.4 Therapeutisches Potenzial durch Beeinflussung der Rezeptor/Liganden-Achse.....	23
I.7 Fragestellung/Zielsetzung der Arbeit.....	23
II Material und Methoden.....	24
II.1 Verwendete Materialien.....	24
II.2 Methoden.....	30

II.2.1	Zelllinien und Zellkultivierung	30
II.2.2	Vorbehandlung der Neuroblastomzellen.....	32
II.2.3	qPCR.....	33
II.2.4	Ligandenexpression.....	36
II.2.5	Zelluläre Zytotoxizität.....	38
II.2.6	CD107a-Degranulationsassay	42
II.2.7	Statistische Analysen.....	43
III	Ergebnisse	45
III.1	N-myc-Expression	45
III.2	Expression von Oberflächenliganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren	47
III.2.1	Vorarbeiten.....	47
III.2.2	PD-L1 und PD-L2	48
III.2.3	Nectin-2 und PVR.....	48
III.2.4	NKG2DL.....	48
III.3	CD107a-Degranulationsassay.....	51
III.3.1	NK-92.....	52
III.3.2	Spender-NK-Zellen	52
III.4	Zelluläre Zytotoxizität	55
III.4.1	Durchflusszytometrie	55
III.4.2	RTCA	58
IV	Diskussion.....	64
IV.1	Beurteilung der Ergebnisse.....	64
IV.1.1	Effekt von ATO auf N-myc-Expression	64
IV.1.2	Effekt von ATO/Posaconazol auf Interaktion mit NK-Zellen.....	66
IV.1.3	Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse.....	74
IV.2	Zusammenhang Hedgehog, <i>MYCN</i> und Tumorwachstum.....	75
IV.3	Kritische Beurteilung des klinischen Einsatzes der Medikamente	78
IV.3.1	ATO.....	78
IV.3.2	Posaconazol.....	80
V	Zusammenfassung.....	82
VI	Literaturverzeichnis.....	84
VII	Erklärung zum Eigenanteil.....	92
VIII	Danksagung.....	93

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Stadieneinteilung nach INSS und INRGSS	5
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien	25
Tabelle 3: Antikörper.....	26
Tabelle 4: Primer	26
Tabelle 5: Bedarfsmittel und Geräte.....	29
Tabelle 6: Software.....	30

Abbildungen

Abbildung 1: Strukturformeln von Itraconazol und Posaconazol im Vergleich	17
Abbildung 2: Gatingstrategie für durchflusszytometrische Bestimmung der Ligandenexpression	38
Abbildung 3: N-myc-Herunterregulation durch ATO.....	46
Abbildung 4: Expression von NK-Liganden auf Neuroblastomzellen.....	50
Abbildung 5: Korrelation N-myc-Expression zu NKG2DL-Expression	51
Abbildung 6: Degranulationsassay in der Durchflusszytometrie	54
Abbildung 7: Degranulation von NK-Zellen in Abhängigkeit der Vorbehandlung der Targets	55
Abbildung 8: Einfluss der Effektor/Target-Ratios auf den spezifischen Kill	57
Abbildung 9: in-vitro-Kill	58
Abbildung 10: Zeitliche Phasen und Beispielverlauf eines RTCA-Experiments.....	60
Abbildung 11: RTCA-Kurven	62
Abbildung 12: Vergleich der Zytotoxizität im RTCA-Assay	63

Abkürzungsverzeichnis

95CI	95%-Konfidenzintervall
ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
AML	akute myeloische Leukämie
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APL	akute Promyelozytenleukämie
ATO	Arsentrioxid
ATRA	all-trans-Retinsäure
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
<i>BCMA</i>	B-Cell Maturation Antigen
BET	Bromodomain and extra-terminal domain
bHLHZ	basic-helix-loop-helix-zipper
bzw.	beziehungsweise
Caspase	Cystein-dependent Aspartate-specific Protease
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
CI	Zellindex
CML	chronische myeloische Leukämie
CPCS	Center for Pediatric Clinical Studies
CT	Computertomographie

CTLR	C-type lectin-like receptor
CYP	Cytochrom P450
C-myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
DAP10	DNAX-activating protein 10
Dhh	Desert hedgehog
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	DNAX accessory molecule
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ds-DNA	doppelsträngige DNA
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
et al.	et alli
E/T	Effektor/Target
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FSC	forward scatter
GD2	Disialogangliosid G2
gDNA	genomische DNA
GLI	glioma-associated oncogene (<i>Gen</i>)
Gli	glioma-associated oncogene (<i>Protein</i>)
Hh	Hedgehog(-Signalweg)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HK2	Hexokinase 2
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSR	homogeneously staining regions
IDRF	Image-Defined Risk Factor
Ihh	Indian hedgehog
IL	Interleukin
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IκK	Inhibitorische kappa B Kinase
ivK	in-vitro-Kill
JNK	c-Jung-N-terminale Kinase
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptors
LOH	Loss-of-Heterozygosity
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	Median Fluorescence Intensity
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHC-I	MHC-Klasse-I-Proteine
MHC-II	MHC-Klasse-II-Proteine
mIBG	meta-Iodbenzylguanidin
MICA/B	MHC class I chain-related protein A/B
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie

<i>MYCN</i>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog (<i>Gen</i>)
NaCl	Natriumchlorid
Nb	Neuroblastom
nCI	normalisierter Zellindex
nCI _{rel}	normalisierter relativer Zellindex
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NKG2D	natural killer group 2 member D protein
NKG2DL	NKG2D-Ligand
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
N-myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog (<i>Protein</i>)
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Cell Death 1
PD-L1/2	Programmed Cell Death 1 Ligand 1/2
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMA	phorbol-myristate-acetate
Posa	Posaconazol
<i>PTCH1</i>	Patched-1 (<i>Gen</i>)
Ptch-1	Patched-1 (<i>Protein</i>)

PVR	Poliovirus-Rezeptor
qPCR	quantitative PCR
RARA	Retinsäurerezeptor alpha
RCF	relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
rnE	relative normalisierte Expression
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTCA	Real-Time Cell Analysis
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Shh	Sonic hedgehog
<i>SMO</i>	Smoothened (<i>Gen</i>)
Smo	Smoothened (<i>Protein</i>)
sNKG2DL	soluble NKG2DL
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
spp.	spezies
SSC	side scatter
Sufu	Suppressor of fused
TIGIT	T-Zell-Immunrezeptor mit Ig- und ITIM-Domänen
u.a.	unter anderem
ULBP1-6	UL16-binding protein 1-6
VEGF	vascular endothelial growth factor

Einheiten und Präfixe:

%	Prozent
°C	Grad Celcius
c	centi-
d	Tag
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>Einheit</i>)
h	Stunde
K	Kelvin
l	Liter
m	Meter
m	milli-
M	mol/l
mol	Mol
min	Minute
n	nano-
Vol%	Volumenprozent
w/v	weight per volume (Gewichtsprozent)
μ	mikro-

I Einleitung

I.1 Neuroblastom

I.1.1 Allgemeines und Epidemiologie

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor mit hauptsächlichlicher Manifestation im frühen Kindesalter. Es entspringt aus neuroektodermalen Vorläuferzellen des sympathischen, peripheren Nervensystems. Im Kindesalter stellt es die häufigste extrakranielle solide Krebserkrankung dar und ist der in den ersten fünf Lebensjahren am häufigsten diagnostizierte embryonale Tumor [2]. Während die Mehrzahl der Erkrankungen im Säuglings- und Kleinkindalter auftritt, können auch ältere Kinder und Jugendliche beziehungsweise sehr selten Erwachsene betroffen sein. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland beträgt 15 Monate [3]. Dabei fällt mit zunehmendem Alter eine schlechtere Prognose auf, sodass dies neben weiteren biologischen und genetischen Faktoren als relevanter Risikofaktor betrachtet wird.

Bemerkenswerterweise stellt das Neuroblastom eine klinisch-prognostisch sehr heterogene Tumorentität dar, deren Spektrum von spontaner Regression metastasierter Tumore bei Säuglingen bis hin zu therapierefraktären und mehrfach rezidivierenden Fällen trotz intensiver multimodaler Therapie inklusive Stammzelltransplantation reicht [2].

Trotz seines frühen Auftretens entwickelt sich das Neuroblastom im Allgemeinen sporadisch, familiäre Fälle auf Basis von Keimbahnmutationen machen nur circa 1-2% aus [4].

Entsprechend seiner Ätiologie tritt der Tumor im Bereich der Neurone des sympathischen Nervensystems auf. Am häufigsten manifestiert sich der Primarius an den Nebennieren, gefolgt von Lokalisationen paravertebral entlang des Grenzstrangs im retroperitonealen Abdomen, Becken, Thorax und Hals [5]. Als maligner Tumor besitzt das Neuroblastom die Fähigkeit zur Metastasierung in andere Organe, was bei 50% aller Erstdiagnosen der Fall ist. Insbesondere das Knochenmark, Knochen, Lymphknoten und die Leber sind in absteigender Häufigkeit die hauptsächlichlichen Metastasierungsziele [6].

Zur initialen Diagnostik des Neuroblastoms gehören neben der klinischen Untersuchung die Konzentrationsbestimmung von Katecholaminmetaboliten im Urin und der Neurosenspezifischen Enolase (NSE) im Serum, Röntgenaufnahmen und sonographische

Untersuchungen der potenziell betroffenen Körperregionen sowie zusätzlich eine Schnittbildgebung mittels MRT oder CT. Für die sichere histopathologische Diagnosestellung und molekulargenetische Analyse ist eine Tumorbiopsie erforderlich, welche offen chirurgisch oder minimalinvasiv erfolgen kann. Zum Ausschluss einer Knochenmarkbeteiligung sind darüber hinaus mehrere Biopsien mit mikroskopischer und immunzytologischer Beurteilung notwendig. Hinzu kommt eine Ganzkörperszintigraphie mit ^{123}I -Iodmeta-Iodbenzylguanidin (^{123}I -mIBG) einschließlich SPECT oder SPECT/CT. Weitere bildgebende Untersuchungen wie PET/CT oder PET/MRT sind je nach Einschluss in klinische Studien außerdem möglich [6].

Der Einsatz von mIBG ist im diagnostischen als auch im therapeutischen Setting etabliert. Über Norepinephrin-Transporter akkumuliert das Molekül in Neuroblastomzellen und kann so entweder mittels passender Bildgebung die Tumorausdehnung veranschaulichen oder durch radioaktive Strahlung spezifisch die malignen Zellen schädigen [7].

Aus dem spätestens bei der chirurgischen Tumorexzision gewonnenen Tumorbiopsat wird neben der (immun-)histopathologischen auch eine molekulargenetische Beurteilung durchgeführt, welche für Prognose und Therapieentscheidung elementar ist. Im Folgenden soll näher auf die genetischen Besonderheiten des Neuroblastoms eingegangen werden.

I.1.2 Genetik

Die Neuroblastomzellen können diverse numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen aufweisen. Dabei sind insbesondere Genamplifikationen, Deletionen, Mutationen mit Loss-of-Heterozygosity (LOH) und Aneuploidien von Bedeutung. Amplifikationen können mikroskopisch als homogeneously staining regions (HSR) oder extrachromosomal als double minutes chromosomes in Erscheinung treten [2].

Die genetische Veränderung mit der größten klinischen Relevanz ist die Amplifikation von *MYCN*, einem Onkogen mit Sitz auf Chromosom 2. Die Frequenz der Amplifikation in Nb-Primärtumoren wird auf circa 18 - 38 % beziffert [2]. Bei Vorliegen dieser chromosomalen Aberration wird das Neuroblastom aufgrund der schlechteren klinischen Prognose in die Hochrisiko-Gruppe eingeordnet, die ein deutlich stärkeres und umfangreicheres

Therapieregime impliziert (siehe Abschnitt I.1.4). *MYCN*-Amplifikationen sind signifikant mit einem Lebensalter > 18 Monaten sowie mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert. Abschnitt I.2 dieser Arbeit geht detaillierter auf die physiologische Funktion und pathologische Bedeutung des Onkogens sowie seine Möglichkeit als therapeutisches Target ein.

Neben der *MYCN*-Amplifikation existieren weitere genetische Veränderungen in den Tumorzellen, die mit einer schlechteren klinischen Prognose vergesellschaftet sind. Dazu gehören 1p36-LOH, 11q-LOH, 1p-Deletion und 17q-gain. Letzteres ist die häufigste zytogenetische Aberration in Neuroblastomen [8]. Auch Diploidie und Tetraploidie sind Prädiktoren für ein schlechteres Outcome [2].

Auf der anderen Seite konnten Faktoren ausgemacht werden, die mit einer günstigen Prognose korrelieren. Dazu gehört zum Beispiel die Expression der Tyrosinkinase A (TrkA), wohingegen die Expression von Tyrosinkinase B (TrkB) oder Aurorakinase A für malignere Phänotypen stehen [2].

Insgesamt kann die molekulargenetische Analyse von Neuroblastomen bereits hilfreiche Aussagen bezüglich der Prognose des Tumors treffen und so die Eingruppierung in verschiedene Therapiearme unterstützen. Insbesondere die *MYCN*-Amplifikation ist dabei aktuell von höchster Relevanz. Die zukünftige Forschung wird zeigen, inwieweit sich die prognostischen Aussagen verfeinern lassen und inwiefern die tumorspezifischen genetischen Aberrationen auch im Sinne der personalisierten Medizin zielgerichtet als therapeutische Angriffspunkte eingesetzt werden können.

I.1.3 Klassifikation nach INSS und INRGSS

Das International Neuroblastoma Staging System (INSS) wurde 1988 eingeführt, um ein uniformes Staging-System für Neuroblastome zu erstellen. Die 1993 überarbeitete Version wird bis heute in vielen Ländern weltweit eingesetzt, um die Ausdehnung der Tumoren zu klassifizieren. Es ist eine Einordnung in sechs verschiedene Stadien möglich: 1, 2A, 2B, 3, 4 und 4S. Dabei spielen die makroskopische Tumorausdehnung, der Resektionsstatus sowie die Frage nach Lymphknotenbeteiligung und Fernmetastasierung eine Rolle. Die Stadien 1 bis 3 kennzeichnen Tumorerkrankungen ohne Fernmetastasierung.

Dabei führt die makroskopisch vollständige operative Tumorexzision mit mikroskopisch tumorzellfreien repräsentativen ipsilateralen Lymphknoten zur Einordnung in das mit einer sehr guten Prognose verbundenen Stadium 1. Im Falle eines makroskopischen Tumorrestes nach Operation erfolgt die Klassifikation in das Stadium 2A, wohingegen Stadium 2B die mikroskopische Infiltration von ipsilateralen Lymphknoten kennzeichnet. Überschreitet die Tumorausdehnung die Mittellinie ohne Möglichkeit einer operativen R0-Resektion, führt dies zur Einordnung in das Stadium 3 nach INSS. Das Stadium 4 umfasst schließlich die fernmetastasierten Neuroblastome, wobei im Falle einer Begrenzung der Metastasierung auf die Organe Haut, Leber und/oder Knochenmark in Säuglingen eine Klassifikation in das prognostisch deutlich günstigere Stadium 4S erfolgt [9].

Ein Problem des Stagings von Neuroblastomen nach INSS ergibt sich daraus, dass die Einordnung in die verschiedenen Stadien prinzipiell erst postoperativ erfolgen kann. So ist theoretisch je nach Resektionsausmaß die Klassifikation des gleichen Tumors in Stadium 1, 2A oder 3 möglich. Da jedoch nicht jeder Tumor direkt operiert werden muss, sei es durch Anwendung neoadjuvanter Therapien oder abwartendes Verhalten bei vermutlich spontan regredienten Tumoren, wurde 2009 von der International Neuroblastoma Risk Group – Task Force ein neues Staging-System (INRGSS) publiziert [10]. Die Stadien M und MS entsprechen dabei weitestgehend den INSS-Stadien 4 und 4S, wobei die Altersgrenze für die Einordnung in Stadium MS von 12 auf 18 Monate angehoben wurde. Die Sonderstellung der Stadien MS und 4S ergibt sich daraus, dass bei dieser Patientenkohorte die Prognose aufgrund regelhafter Spontanregression der Tumore deutlich besser ist. Nach INRGSS existieren für nicht-metastasierte Neuroblastome nur noch 2 Kategorien (L1 und L2) in Abhängigkeit des Vorliegens von sogenannten Image-Defined Risk Factors (IDRF). Diese sind in der Bildgebung darstellbare Merkmale des Tumors, welche zum Beispiel eine Ausdehnung um vitale Strukturen wie Aorta oder Trachea umfassen. Dadurch kann auch präoperativ eine Klassifikation der Neuroblastome vorgenommen werden, weshalb dieses System nicht zuletzt im Rahmen von klinischen Studien zur Anwendung kommt.

In Tabelle 1 ist die Stadieneinteilung nach INSS und INRGSS gegenübergestellt.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Stadieneinteilung nach INSS und INRGSS (nach [6])

INSS		INRGSS	
1	Lokalisierter Tumor nach kompletter Resektion mit oder ohne mikroskopische Reste, repräsentative ipsilaterale und kontralaterale Lymphknoten mikroskopisch frei von Tumor, dem Tumor anhängende Lymphknoten könnten infiltriert sein. Makroskopisch entfernte Mittellinientumoren ohne Lymphknoteninfiltration werden als Stadium 1 klassifiziert.	L1	Lokalisierter Tumor ohne Nachweis von IDRF und begrenzt auf eine Körperhöhle.
2A	Lokalisierter Tumor nach incompletter Entfernung, repräsentative nichtadhärente Lymphknoten mikroskopisch frei von Tumor.		
2B	Lokalisierter Tumor nach kompletter oder incompletter Resektion, Nachweis einer Infiltration von ipsilateralen, nichtadhärenten Lymphknoten, kontralaterale nichtadhärente Lymphknoten frei von Tumor.	L2	Lokalisierter Tumor mit Nachweis von einem oder mehreren IDRF.
3	Nicht-resektabler unilateraler Tumor mit Ausdehnung über die Mittellinie mit oder ohne Infiltration der regionalen Lymphknoten; oder lokalisierter Tumor mit Infiltration der kontralateralen nichtadhärenten Lymphknoten; oder Mittellinientumor mit bilateraler infiltrativer Ausdehnung oder Lymphknoteninfiltration.		
4	Metastasierung in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe, die nicht der Definition des Stadium 4S entspricht.	M	Nachweis von Fernmetastasen (außer Stadium MS).
4S	Lokalisierter Tumor Stadium 1, 2A oder 2B mit Metastasierung in Leber, Haut oder Knochenmark (maximal 10%, nicht detektierbar in der mIBG-Szintigraphie) bei Säuglingen < 1 Jahr bei Diagnosestellung.	MS	Metastatische Erkrankung bei Kindern im Alter < 18 Monate mit Metastasen begrenzt auf Haut, Leber und Knochenmark.

Sowohl INSS als auch INRGSS besitzen beide eine hohe prognostische Aussagekraft [10]. Daher erfolgt auf dieser Basis in Zusammenschau mit patientenbezogenen Merkmalen und der molekulargenetischen Diagnostik die Entscheidung über die notwendige Therapie. Dies soll im nächsten Abschnitt näher beleuchtet werden.

I.1.4 Therapiestrategien und Prognose

Generell ist die Therapie von Neuroblastomen Gegenstand zahlreicher klinischer Studien, sodass je nach Einschluss in spezielle Studien verschiedene Therapieregimes angewendet werden können. Die im Folgenden vorgestellten Therapiestrategien basieren auf der

aktuellen S1-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) [6].

Grundsätzlich wird eine Niedrig-, Mittel- und Hochrisikogruppe unterschieden. Zur Niedrigrisikogruppe werden alle Neuroblastome ohne *MYCN*-Amplifikation gezählt bei Vorliegen von INSS Stadium 1, 2 oder 3 (nur bei Alter <2 Jahre) oder INRGSS Stadium MS. Bei INSS 2 und 3 dürfen außerdem keine chromosomalen Aberrationen von 1p vorliegen. Dagegen führt ein positiver *MYCN*-Amplifikationsstatus automatisch zum Einchluss in die Hochrisikogruppe, welche außerdem auch alle Patienten älter als 18 Monaten (bei Diagnosestellung) im INRGSS-Stadium M umfasst.

Die Erstlinientherapie von Niedrigrisiko-Neuroblastomen besteht allein in der operativen Entfernung. Makroskopische Tumorreste können aufgrund der hohen Spontanregressionstendenz toleriert werden. Eine Chemotherapie ist nur bei Vorliegen von tumorassoziierten Symptomen erforderlich.

In der mittleren Risikogruppe ist neben der operativen Exzision eine Induktionstherapie (bestehend aus Carboplatin, Etoposid, Vindesin, Vincristin, Dacarbacin, Ifosfamid und Doxorubicin) sowie eine Cyclophosphamid-basierte Erhaltungstherapie vorgesehen. Fakultativ kann zusätzlich eine konsolidierende Strahlentherapie notwendig werden.

Die umfassendste und intensivste Therapie wird bei Patienten in der Hochrisikogruppe angewandt. An die operative Tumorentfernung und Induktionstherapie schließt sich eine myeloablative Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation an. Hinzu kommt eine Bestrahlung der Tumorregion und bei Vorliegen von mIBG-positivem Tumorgewebe eine Therapie mit ¹³¹I-mIBG. Im Anschluss an die Stammzelltransplantation ist eine Immuntherapie mit dem anti-GD2-Antikörper Dinutuximab empfohlen.

Während Patienten in der Niedrigrisikogruppe oft eine spontane Regression des Tumorgewebes aufweisen und dementsprechend mit einer langfristigen Überlebensrate von weit über 90% rechnen können, beträgt diese bei Patienten in der Hochrisikogruppe trotz der intensiven multimodalen Therapie bis heute nicht über 50% [6]. Auftretende Tumorrezidive weisen eine besonders schlechte Prognose auf und werden im Rahmen von

klinischen Studien behandelt, beispielsweise mit haploidenter Stammzelltransplantation. Gerade für diese Patientengruppe sind weitere wirksame Therapiemöglichkeiten vonnöten, um die teils düstere Prognose zukünftig zu verbessern.

I.2 MYCN

Wie oben beschrieben, ist der Amplifikationsstatus von *MYCN* zentral für die Frage nach Prognose und notwendiger Therapiestrategie und reicht bei vorhandener Amplifikation allein für die Einordnung in die Hochrisikogruppe. Daher soll nachfolgend näher auf die Rolle von *MYCN* in gesundem und maligne transformiertem Gewebe eingegangen werden.

I.2.1 Physiologische Funktion, Pathologie, Regulation

MYCN (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*) ist ein Protoonkogen mit Lokalisation auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 (2p24.3) [11]. Es kodiert für das Protein N-myc, welches wiederum einen Transkriptionsfaktor der basic-helix-loop-helix-zipper (bHLHZ) – Klasse darstellt, zu der unter anderem auch C-myc gehört. Sie regulieren die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene, zuständig für Proliferation, Wachstum, Apoptose, Migration, Zellmetabolismus und -differenzierung. Im Gegensatz zu C-myc ist N-myc vor allem für die physiologische Entwicklung insbesondere des Nervensystems während der Embryogenese verantwortlich und im gesunden adulten Organismus nicht mehr relevant exprimiert [12].

Eine aberrante Expression von N-myc ist mit der Entstehung und Progression von Tumoren assoziiert, wobei ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsgrad und einem maligneren Tumorphänotyp besteht. Dies gilt vor allem für das Neuroblastom, doch auch in anderen Neoplasien wie dem Medulloblastom oder dem Retinoblastom konnte diese Korrelation dargestellt werden [12]. Als Proof-of-Concept konnten 1997 Weiss et al. zeigen, dass eine N-myc-Überexpression im Mausmodell zur Entstehung von Neuroblastomen führt [13]. Weitere Arbeitsgruppen bestätigten diesen kausalen Zusammenhang,

beispielsweise Olsen et al., die 2017 durch forcierte N-myc-Expression in murinen primären Neuralleistenzellen die Entstehung von Neuroblastomen induzieren konnten, deren genetisches Profil mit dem von menschlichen Hochrisiko-Neuroblastomen zu einem großen Teil übereinstimmt [14].

Im Neuroblastom liegt der vermehrten Expression hauptsächlich eine Amplifikation des *MYCN*-Gens zugrunde. Dabei findet sich die amplifizierte Gensequenz nicht am eigentlichen Locus (2p24.3), sondern an anderer Stelle im Genom in Form von homogenously stained regions oder double minutes. Daneben kann die N-myc-Expression auch ohne Amplifikation seines Onkogens erhöht sein. Ein möglicher Mechanismus ist dabei die gesteigerte Aktivität von intrazellulären Signalwegen, die in der vermehrten Transkription von *MYCN* enden. Hierbei ist besonders der Hedgehog-Signalweg zu nennen, was in vielen Medulloblastomen eine tragende Rolle spielt. Der Hedgehog-Signalweg wird später noch ausführlicher dargestellt. Schließlich sind für die Beeinflussung des N-myc-Expressionsgrads auch posttranskriptionelle Mechanismen von Bedeutung, darunter eine gesteigerte Translation, höhere Proteininstabilität und eine verminderte proteasomale Degradation [15].

1.2.2 Therapeutisches Potenzial

Angesichts der zentralen Rolle von *MYCN*/N-myc erscheint eine zielgerichtete medikamentöse Therapie zur N-myc-Herunterregulation ein folgerichtiger Ansatz in der Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dies noch nicht Bestandteil der klinischen Versorgung, doch in den letzten Jahren widmeten sich viele Forschungsprojekte dieser Zielsetzung, darunter auch diese Arbeit.

Den *MYCN*-Amplifikationsstatus selbst zu verändern, erscheint nicht praktikabel. Dagegen ist die Regulation der Transkription von *MYCN* wie auch posttranskriptionelle Methoden von größerer Bedeutung. Eine vielversprechende Möglichkeit ist die Regulation des Hedgehog-Signalwegs, der im Falle einer Aktivierung zur erhöhten N-myc-Expression führt [16].

Zum besseren Verständnis soll im Folgenden der Hedgehog-Signalweg und seine pathogenetische Funktion im Tumor detaillierter beschrieben werden.

I.3 Hedgehog-Signalweg

I.3.1 Entdeckung

Der Hedgehog-Genlokus wurde 1980 zuerst in der Taufliege *Drosophila melanogaster* von Christiane Nüsslein-Vollhard und Eric Wieschaus entdeckt und als ein wichtiger Bestandteil in der ontogenetischen Segmentierung und Achsenbildung der Taufliege beschrieben [17]. Später bestätigte sich das Vorhandensein dreier homologer Varianten in Vertebraten, inklusive dem Menschen: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) und Desert hedgehog (Dhh). Am detailliertesten beschrieben und verstanden ist Shh, das wie die anderen beiden als Protein von Zellen sekretiert wird und im Sinne eines Morphogens parakrin auf benachbarte Zellen wirkt. Im Folgenden soll der intrazelluläre Signalweg in Säugetieren durch Einwirkung von Shh kurz skizziert werden.

I.3.2 Hedgehog-Signalkaskade

Aktuell wird als Hauptrezeptor für Shh das Transmembranprotein Patched-1 (Ptch1) angenommen. Dieses inhibiert im Ausgangszustand (ohne Einwirkung von Shh) Smoothened (Smo), ein Mitglied der G-Proteingekoppelten-Rezeptoren-Superfamilie. Durch Disinhibition von Smo bei Shh-Bindung an Ptch1 und damit korrelierender Smo-Akkumulation im primären Cilium werden die sogenannten „glioma-associated oncogenes“ Gli aktiviert, welche in den Nucleus transferieren und über Zinkfingerdomänen die Transkription der Effektorproteine regulieren. Gli1 und 2 wirken dabei hauptsächlich als aktivierende, Gli3 als inhibierende Transkriptionsfaktoren. Sowohl Gli2 als auch Gli3 besitzen Repressordomänen, die in Abwesenheit von Hh durch Proteolyse funktional werden und damit die Transkription der Effektorproteine inhibieren. Die Aktivierung von Smo verhindert die Trunkierung des Proteins, wodurch der aktivierende Status überwiegt. Als ein wichtiger Komplex in der Verschiebung des Gleichgewichts von Gli zur Repressorform wird suppressor of fused (Sufu) angesehen, der somit eine wichtige Rolle in der inhibitorischen Regulation des Hh-Signalwegs einnimmt [18, 19].

Neben dieser wichtigsten Signalkaskade wird auch die Existenz von nicht-kanonischen Signalwegen vermutet, die unabhängig von Smo funktionieren [20].

Die via Gli regulierten Zielgene codieren ihrerseits eine Vielzahl von Proteinen, welche als Sekretionsprodukte Signalfunktion besitzen wie vascular endothelial growth factor (VEGF) -A oder bone morphogenetic protein 4 (BMP4), aber auch intrazelluläre Auswirkungen auf die Regulation der Zellwachstum und -teilung, unter anderem Cyclin-D1 und N-myc.

Daneben erfolgt auch eine positive und negative Rückkopplung durch Transkription der im Hh-Signalweg beteiligten Gene für beispielsweise Ptch1 und Gli1 [20, 21].

I.3.3 Physiologische Funktion

Hedgehog nimmt in der physiologischen embryonalen Entwicklung als Morphogen eine elementare Rolle ein. Durch den Aufbau von räumlichen und zeitlichen Konzentrationsgradienten entstehen auch in Abhängigkeit von der Lokalisation der Rezeptorzelle verschiedene zelluläre Antworten [22]. Dies lässt Hh in unterschiedlichen Embryonalgeweben die Steuerung von Zelldifferenzierung und Musterbildung übernehmen. Beispielsweise ist Hh für die ordnungsgemäße zelluläre Organisation und Ausdifferenzierung im zentralen Nervensystem verantwortlich wie auch für die Bildung der Extremitätenstruktur. Die Bedeutung zeigt sich bei Ausfall der regelrechten Signalfunktion, was sich im Menschen unter anderem durch das Krankheitsbild einer Holoprosencephalie [23] oder auch des Pallister-Hall-Syndroms mit Polydaktylie [24] erkennbar macht.

So zeigt sich die unverzichtbare Funktion von Hedgehog insbesondere im sich entwickelnden embryonalen Organismus. Dagegen besetzt der Signalweg im adulten Gewebe eine untergeordnete Rolle. Nichtsdestotrotz erfüllt er auch hier lokal wichtige Funktionen wie die Regulation von Homöostase und Selbsterhaltung in Stamm- und Vorläuferzellen [25-27]. Des Weiteren wird er bei Bedarf aktiviert zur Regeneration und Reparatur von diversen Organen nach Gewebeschädigung, gezeigt beispielsweise in Lunge [28], Prostata [29] und Retina [30].

I.3.4 Relevanz im Tumor

Während im gesunden adulten Gewebe der Hedgehog-Signalweg in den Hintergrund tritt, besitzt er doch weiterhin ein hohes Potenzial als Initiator von unkontrollierter

Proliferation im Falle einer aberranten Aktivierung. So weisen eine Vielzahl unterschiedlicher Tumorarten eine erhöhte Hh-Aktivität auf, am eindrucklichsten ist dies im Medulloblastom und im Basalzellkarzinom der Fall [19]. Als illustratives Beispiel lässt sich das autosomal-dominante vererbare Gorlin-Goltz-Syndrom (auch Gorlin-Syndrom, Basalzellnävussyndrom) heranziehen, welches aufgrund einer Keimbahnmutation im *PTCH1*-Gen zu multiplen Basalzellkarzinomen im jungen Alter führt [31] und das Risiko zur Ausbildung auch anderer Neoplasien wie Medulloblastomen oder Meningeomen erhöht. Neben loss-of-function-Mutationen in den Genen für die Tumorsuppressorproteine *Ptch1* oder *Sufu* [32] sind auch aktivierende missense-Mutationen beziehungsweise Amplifikationen der Hh-assoziierten Protoonkogene (*SMO*, *GLI*) in diversen sporadischen Tumoren beschrieben [33-36].

Während das Basalzellkarzinom und das Medulloblastom die klassischen Beispiele für das onkogene Potenzial des Hedgehog-Signalwegs darstellen, ist dessen verstärkte Aktivierung in einer Reihe weiterer Tumoren belegt, darunter im Rhabdomyosarkom [37], Mammakarzinom [38], Pankreaskarzinom [39] und Prostatakarzinom [40].

Nicht zuletzt konnte auch im Neuroblastom in den vergangenen Jahren eine Korrelation mit aberranter Hedgehog-Signalaktivität dargelegt werden [41-44]. Dies ist im Besonderen von Relevanz, da ein Zielgen des Signalwegs das Onkogen *MYCN* darstellt [16, 45-47]. *MYCN* und sein Produkt N-myc ist im Neuroblastom wie oben beschrieben ein relevanter Marker für die Malignität des Tumors und damit die Prognose der Patienten. Somit drängt sich die Frage auf, ob diese Hh-Überexpression einen potenziellen therapeutischen Angriffspunkt darstellen könnte. In der Tat konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Hemmung des Signalwegs die Expression von N-myc reduziert und darüber hinaus auch zu einer reduzierten Proliferation beziehungsweise erhöhten Apoptoserate der Neuroblastomzellen *in vitro* und *in vivo* führt [43, 48-52].

I.3.5 Therapeutisches Potenzial

Ein natürlicher Inhibitor des Hedgehog-Signalwegs ist das Steroidalkaloid Cyclopamin, das seine Wirkung über Bindung an den Smoothened-Rezeptor vermittelt [53]. Seit seiner Entdeckung findet Cyclopamin bis heute in experimentellen Versuchsansätzen breite

Verwendung als Hh-Inhibitor. Darüber hinaus wurden Derivate entwickelt für den therapeutischen Einsatz im klinischen Setting als Krebsmedikamente.

So sind von FDA und EMA inzwischen die Hedgehog-Inhibitoren Vismodegib und Sonidegib (bei fortgeschrittenem Basalzellkarzinom) sowie Glasdegib (bei Akuter Myeloischer Leukämie) zugelassen. Als Wirkprinzip liegt allen dreien analog zu Cyclopamin die Hemmung von Smo zugrunde. Dies birgt jedoch das Problem des Nichtansprechens von Tumoren mit aktivierenden Mutationen downstream von Smo (primär oder sekundär durch Selektion unter Therapie) oder mit Aktivierung einer nicht-kanonischen Signaltransduktion unter Umgehung von Smo. Aus diesem Grund werden weitere Hh-Inhibitoren in der klinischen Praxis benötigt werden, welche an einer anderen Stelle der Signalkaskade ansetzen, bevorzugt downstream von Smo wie zum Beispiel durch direkte Hemmung der Gli-Transkriptionsfaktoren.

Zwei medikamentöse Kandidaten, die ursprünglich für andere Zwecke entwickelt wurden, Arsenitrioxid und Posaconazol, sollen im Folgenden vorgestellt werden.

I.4 ATO

I.4.1 Grundlegendes

Die anorganische chemische Verbindung Arsenitrioxid (ATO) ist das Anhydrid der arsenigen Säure und besitzt die Summenformel As_2O_3 . Der in Reinform als geruchloses weißes Pulver vorliegende Stoff ist die häufigste genutzte Verbindung des Elements Arsen. Letzteres kommt in der Umwelt ubiquitär vor, insbesondere in schwefelhaltigen Mineralien aber auch in geringen Konzentrationen in allen lebenden Organismen, inklusive dem Menschen [54].

Historische Nutzung fanden Arsenverbindungen als Pestizide, Trocknungsmittel, Lebensmittelzusatzstoffe, aber auch als Teil von chemischen Kampfstoffen [54]. Dies steht exemplarisch für die enorme Toxizität des Stoffes bereits in geringen Mengen. In Zusammenschau mit seiner Geruch- und Geschmacklosigkeit ist dies auch der Grund dafür, dass ATO historisch betrachtet bis in das 19. Jahrhundert nicht selten als Mordgift Verwendung fand [55].

I.4.2 Toxizität

Die akute Vergiftung bei oraler Aufnahme von Arsen trioxid macht sich durch Symptome des Gastrointestinaltrakts bemerkbar, wobei je nach Dosis weitere Organschäden wie Kardiomyopathie, Nierenversagen, Lungenödem, periphere Neuropathie und epileptische Anfälle hinzukommen [56]. Die letale Dosis wird in der Literatur auf circa 200 - 300 mg geschätzt, wobei schon bei deutlich geringeren Mengen lebensbedrohliche Komplikationen auftreten können [57].

Chronische Einwirkung von Arsen trioxid ist mit diversen kardiovaskulären, respiratorischen, metabolischen und hämatologischen Folgeschäden verbunden [56], wobei auch andere Organsysteme betroffen sein können [58]. Insbesondere die karzinogene Eigenschaft von Arsenverbindungen sei hier erwähnt. Der Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren von Haut, Lunge und Harnblase ist am besten belegt, darüber hinaus bestehen Korrelationen von langjähriger Arseneinwirkung mit Karzinomen in Leber, Prostata und Nieren [59]. Als pathogenetische Mechanismen werden die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie auch epigenetische Mechanismen wie Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters oder der Expression von microRNAs vermutet [60].

I.4.3 Historischer Überblick über therapeutische Nutzung

Angesichts der für den Menschen extrem toxischen Eigenschaften von ATO erstaunt die Tatsache, dass arsenhaltige Wirkstoffe in der Medizingeschichte schon vor langer Zeit auch in therapeutischer Absicht eingesetzt wurden. Über den griechischen Arzt und oftmals als Vater der modernen Medizin betitelten Hippokrates von Kos wird berichtet, Arsensulfide gegen Ulzerationen eingesetzt zu haben [61]. Auch in der traditionellen chinesischen Medizin fanden anorganische Arsenide Verwendung in der Behandlung diverser Krankheitsleiden, von Hautulzerationen über parasitäre Infestationen bis Epilepsien [62]. Im Laufe der Zeit trat die Bedeutung des Medikaments aufgrund des zunehmenden Bewusstseins über dessen Toxizität langsam in den Hintergrund.

Im 18. und 19. Jahrhundert stieg das Interesse an Arseniden in der westlichen Medizin wieder deutlich an, als eine Vielzahl verschiedener arsenhaltiger Medikamente in unterschiedlichen pharmazeutischen Formulierungen entwickelt wurden. Als Paradebeispiel dient die nach dem britischen Arzt Thomas Fowler benannte Fowlersche Lösung, welche aus Kaliumarsenit (1% w/v) bestand und neben dermatologischen Erkrankungen wie Psoriasis, Pemphigus, Ekzeme auch bei Anämie oder Asthma [61] sowie im Falle von verschiedenen hämatologischen und soliden Neoplasien eingesetzt wurde [55]. Insbesondere gegen die chronische myeloische Leukämie (CML) zeigte die Fowlersche Lösung Nutzen und wurde mit dieser Indikation von Ende des 19. Jahrhunderts an verschrieben [61].

Durch das Aufkommen der neuen zytostatischen Chemotherapeutika und breiteren Anwendung der Radiotherapie Mitte des 20. Jahrhunderts wurde Arsen aus dem Rüstzeug im Kampf gegen den Krebs zunächst wieder verdrängt. Gleichzeitig stiegen die wissenschaftlichen Erkenntnisse über die toxischen Auswirkungen von Arsen als Umweltkontaminant stetig an und damit das Bewusstsein über die Gefährlichkeit des Mittels auch bei chronischer Exposition gegenüber geringen Mengen.

Dann erlangte der chinesische Hämatologe Zhang im Laufe der 1970er jedoch Erkenntnisse darüber, dass Arsentrioxid bei einer Unterform der akuten myeloischen Leukämie, der akuten Promyelozytenleukämie (APL), auch in der Rezidivsituation wirksam ist [62]. Weltweite Studien gegen Ende des Jahrhunderts bestätigten im Anschluss die Effektivität von Arsentrioxid bei APL, wobei zudem aufgrund der niedrigen notwendigen Dosis keine Myelosuppression als unerwünschte Arzneimittelwirkung zu beobachten war [61]. Ab dem Jahr 2000 erfolgte die Zulassung von der FDA und nachfolgend der EMA für die Verwendung bei refraktärer oder rezidivierter APL nach frustraner Vorbehandlung mit einem Retinoid und Zytostatikum. 2018 schließlich wurde die Indikation von ATO auf die Erstlinienbehandlung der Niedrig- und Intermediärrisiko-APL ausgedehnt in der Kombination mit all-trans-Retinsäure (ATRA).

In den letzten Jahren mehrten sich *in vitro* und *in vivo* Hinweise darauf, dass ATO auch bei anderen Malignitäten ein potentes Mittel darstellen könnte, darunter insbesondere auch für pädiatrische Krebspatienten mit Leukämien, Medulloblastome, Ewing-Sarkome und Neuroblastome [63].

Im folgenden Abschnitt soll ein Überblick verschafft werden über die vermuteten Wirkungsmechanismen von ATO in der Behandlung von Tumorerkrankungen.

I.4.4 Antitumorogene Wirkmechanismen

Für die APL konnte gezeigt werden, dass ATO zu einer Degradation des pathologischen Fusionsproteins PML::RARA führt, sodass die blockierte zelluläre Ausdifferenzierung wieder ungehindert stattfinden kann [64]. Zusätzlich führen höhere Dosen von ATO zur Apoptose der Tumorzellen [65].

Inwieweit die Förderung der Ausdifferenzierung auch bei anderen Krankheitsbildern wie beispielsweise dem Neuroblastom relevant sein könnte, wird aktuell noch kontrovers diskutiert [66-69].

Eindeutiger und vielfach belegt ist hingegen die Hypothese, dass die Behandlung mit ATO in Neuroblastomzellen die Apoptose induzieren kann. Als relevante Zwischenstationen und Wirkmechanismen konnten dabei unter anderem ein Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [69-71], die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen anti- und proapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Bax [71-73], die Aktivierung von Caspasen (insbesondere Caspasen 3, 7 und 9) [71, 74], die Depolarisation des Mitochondrienmembranpotenzials [71] sowie schließlich ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration [75] identifiziert werden. Andere Arbeitsgruppen konnten an Nb-Zelllinien nachweisen, dass unter Einfluss von ATO ferroptotische Vorgänge angestoßen werden [76] beziehungsweise Hinweise darauf erlangen, dass der Zelltod auch unabhängig von p53 eintreten kann [77]. Dies wäre verschieden von der Wirkweise vieler anderer Chemotherapeutika, was ATO angesichts potenzieller Resistenzentwicklungen zu einem noch attraktiveren Kombinationspartner machen würde.

Am wichtigsten für die Entstehung dieser Arbeit war die im Laufe der letzten Jahre erlangte Erkenntnis, dass eine Behandlung mit ATO in verschiedenen Tumorentitäten inhibitorische Wirkung auf den oben beschriebenen Hedgehog-Signalweg zeigt. Im Gegensatz zu Cyclopamin und seinen Abkömmlingen ist der Angriffspunkt dabei nicht das Smo-Protein, sondern downstream auf der Ebene der Gli-Transkriptionsfaktoren

lokalisiert. Insbesondere eine Destabilisierung und Verringerung der Konzentration von Gli1 und Gli2 konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen im Zell- und Mausmodell gezeigt werden [78-81]. Im Einzelnen scheint dabei eine Hemmung der Gli2-Akkumulation im primären Cilium [78] sowie die direkte Bindung von ATO an Gli1 mit konsekutiver Aktivitätsminderung [79] von Bedeutung zu sein.

Infolge der Inhibition des Hedgehog-Signalwegs sinkt die Expression der (meist tumorigen wirkenden) Zielproteine ab, darunter nicht zuletzt auch das im Neuroblastom eine so prominente Rolle einnehmende N-myc [81-83].

Daneben konnten in verschiedenen Versuchen noch weitere Auswirkungen auf und Eingriffe in bestimmte intrazelluläre Signalwege beobachtet werden, darunter die Inhibition von NFκB durch IκK-Stabilisierung [84], die Hemmung der VEGF-Produktion [85] sowie die Aktivierung des JNK-Signalwegs [86]. Auch diese Mechanismen können im Einsatz gegen Tumorzellen ergänzende oder synergistische Effekte bewirken.

Klinisch wird ATO auch bereits im Rahmen des INFORM (**IN**dividualized Therapy **FO**r **R**elapsed **M**alignancies in Childhood) - Registers als „targeted therapy“ bei verschiedenen rezidierten Tumoren, zum Beispiel anaplastischen Ependymomen oder anderen Hirntumoren eingesetzt.

Im Kontext dieser Arbeit stand die Hh-Inhibition mit konsekutiver N-myc-Herunterregulation im Vordergrund. Ein weiteres potenzielles Medikament mit diesem Effekt ist das Antimykotikum Posaconazol, welches im folgenden Abschnitt vorgestellt werden soll.

I.5 Posaconazol

I.5.1 Allgemeines und klinischer Einsatz von Triazolantimykotika

Das Medikament Posaconazol ist ein antimykotisch wirksames Pharmakon und gehört zur Klasse der Triazole. Charakteristisch und allen Mitgliedern der Gruppe eigen ist die zyklische Triazolstruktur mit zwei Kohlenstoff- und drei Stickstoffatomen. Weitere Beispiele für Azolantimykotika sind Ketoconazol, Fluconazol, Voriconazol und

Itraconazol, wobei zu letzterem die größte Ähnlichkeit mit Posaconazol hinsichtlich Molekülstruktur und pharmakologischen Eigenschaften besteht [87]. In Abbildung 1 sind die Strukturformeln von Itraconazol und Posaconazol gegenübergestellt.

Der Wirkmechanismus aller Azolantimykotika basiert auf der Inhibition des fungalen Enzyms Lanosterol-14 α -Demethylase (CYP51), womit ein essentieller Schritt der Ergosterolbiosynthese blockiert wird. Aufgrund des Fehlens des für die Zellwandsynthese benötigten Ergosterols sowie der Akkumulation von methylierten Sterol-Präkursoren kommt es zur Hemmung des Pilzwachstums beziehungsweise dem fungalen Zelltod [1].

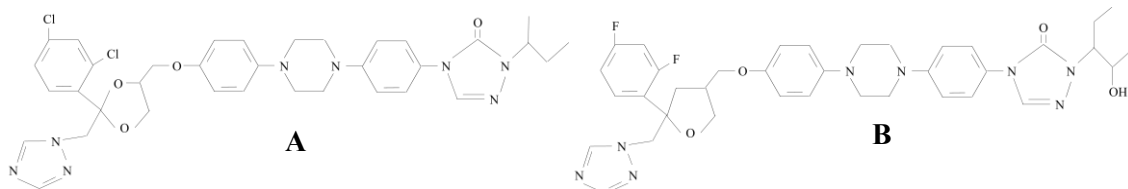


Abbildung 1: Strukturformeln von Itraconazol und Posaconazol im Vergleich.

A. Itraconazol. **B.** Posaconazol. Erstellt nach [1]

Zum klinischen Einsatz kommen die Azolantimykotika in der Prophylaxe und Therapie von invasiven Pilzinfektionen bei krankheitsbedingt oder iatrogen immunsupprimierten Patienten, zum Beispiel im Rahmen von HIV-Erkrankungen, angeborenen Immundefekten oder Chemotherapien bis hin zu hämatopoetischen Stammzelltransplantationen [87]. Die genannten Triazole sind Antimykotika mit Wirkungsspektrum besonders gegen *Candida* spp. und *Aspergillus* spp., wobei Posaconazol als Vertreter der zweiten Generation besonders potent und wirksam erscheint [1] sowie zusätzlich auch bei weiteren Pilzkrankungen wie der Mukormyose Effektivität zeigen konnte [88].

Posaconazol kann als medikamentöser Wirkstoff oral oder intravenös verabreicht werden und ist aktuell von der EMA wie auch der FDA bei Patienten ab 2 Jahren für die Behandlung und Vorbeugung von bestimmten invasiven und topischen Pilzinfektionen zugelassen.

I.5.2 Antitumorogene Wirkmechanismen

I.5.2.1 Itraconazol

Neben der antimykotischen Hauptwirkung, welche die Grundlage für die Zulassung und den klinischen Einsatz der Substanzen darstellt, konnten bei einigen Vertretern der Azolantimykotika auch ein Effekt gegen Tumorzellen gefunden werden. Zuerst entdeckt und am ausführlichsten belegt wurde dieser bei Itraconazol, weshalb zunächst hierauf eingegangen werden soll.

Der primäre antineoplastische Wirkung des Pharmakons scheint in der Reduktion der Hedgehog-Signalaktivität begründet zu liegen. Kim et al. identifizierten 2010 in einem Screening von diversen bereits für andere Indikationen zugelassenen Medikamenten das Antimykotikum Itraconazol als potenziellen Inhibitor des Hedgehog-Signalwegs und konnten diese Hypothese *in vitro* und im Mausmodell untermauern [89]. Der intrazelluläre Wirkort ist dabei Smo, dessen Aktivität nebst Akkumulation im primären Cilium gehemmt wird. Da hierbei der molekulare Angriffspunkt an Smo von anderen spezifischen Hh-Inhibitoren wie Vismodegib oder Sonidegib abweicht, bleibt die Wirksamkeit auch bei Tumoren mit spezifischen Resistenzen gegen diese Mittel erhalten [90].

Unabhängig von der spezifischen Inhibition des Hedgehog-Signalweges konnten darüber hinaus in verschiedenen Tumorzellentitäten weitere Mechanismen identifiziert werden, über die Itraconazol die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen eindämmen kann. Darunter fällt eine Inhibition von Angiogenese und epithelial-mesenchymaler Transition sowie die Induktion von Apoptose oder Autophagie über Wechselwirkungen mit verschiedenen intrazellulären Signalwegen [91-96].

I.5.2.2 Posaconazol

Aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils wurde überprüft, ob Posaconazol als Strukturanalogon von Itraconazol ebenfalls antineoplastische Eigenschaften zeigen könnte. Dies wiesen Chen et al. 2016 nach, indem sie im Mausmodell eine potente Hedgehog-Inhibition unter Posaconazol im Basalzellkarzinom-Allograft feststellten [97]. Der Effekt erklärte sich auf molekularer Ebene genau wie bei Itraconazol

durch eine Hemmung von Smo via Bindung an einer von Cyclopamin verschiedenen Stelle mit reduzierter Smo-Akkumulation im primären Cilium. Weiterhin konnte bei Kombination mit ATO ein additiver Effekt auf die Hemmung des Tumorwachstums beobachtet werden [97]. Auch im embryonalen Rhabdomyosarkom zeigte sich eine potente Hh-Inhibition mit Hemmung des Tumorwachstums [98].

Jüngst ergaben sich des Weiteren Hinweise auf eine potenzielle Anwendungsmöglichkeit im Glioblastom unabhängig von einer Hh-Inhibition. Posaconazol zeigte *in vitro* und im Mausmodell deutliche antitumorogene Aktivität über die Hemmung der Hexokinase 2 (HK2) [99] wie auch die Inhibition des Wnt/Catenin- β -Signalwegs [100] mit nachfolgender Autophagie, Apoptose und Tumorsuppression.

Analog zu ATO kann für Posaconazol angenommen werden, dass die pleiotropen Effekte eine mögliche Resistenzbildung der Tumorzellen erschweren.

I.6 NK-Zellen

I.6.1 Aufbau des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem dient der Abwehr von potenziell gefährlichen Fremdkörpern wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze, aber auch der Erkennung und Bekämpfung von körpereigenen entarteten Zellen. Es lässt sich grob in die nicht-adaptive (angeborene) und in die adaptive Immunität unterteilen, wobei beide Teile eng miteinander verwoben sind und ihrerseits wiederum sowohl aus zellulären wie auch aus humoralen Komponenten bestehen. Die Leukozyten als zellulärer Bestandteil besitzen auf ihrer Oberfläche bestimmte Antigenstrukturen, anhand derer man sie in das Cluster of Differentiation (CD) - System einordnen kann.

NK-Zellen agieren während der Immunantwort eher unspezifisch beziehungsweise nicht-adaptiv, weshalb sie trotz ihrer Entwicklung aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle zur angeborenen Immunität gezählt werden. Nach Differenzierung zu NK-Zellen im Knochenmark und insbesondere in den sekundären lymphatischen Organen

können sie dort und im peripheren Blut ihre Funktion ausüben. Im Blut machen sie einen Anteil von circa 10-15% an den zirkulierenden Lymphozyten aus [101].

I.6.2 Funktion der NK-Zellen

Die Funktion von NK-Zellen beläuft sich hauptsächlich auf die Erkennung und Elimination von virusinfizierten Zellen sowie von entarteten körpereigenen Zellen. Damit sind sie nicht nur ein integraler Bestandteil der antiviralen Abwehr sondern auch der Verhinderung und Bekämpfung von Tumorerkrankungen.

Im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten besitzen sie keine spezifischen Oberflächenrezeptoren gegen verschiedenste Antigene, sondern müssen zur Erkennung von Zielzellen auf andere Methoden zurückgreifen.

Zum Einen spielt dabei die Markierung der Zielstrukturen mit Antikörpern eine Rolle, was die NK-Zellen über Fc-Immunglobulinrezeptoren (CD16) detektieren und die Zytolyse einleiten. Dies wird auch als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bezeichnet. Im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen existiert dabei keine MHC-Restriktion: T-Zellen können mit ihrem T-Zellrezeptor nur an Antigene binden, wenn diese von dem Major Histocompatibility Complex (MHC) präsentiert werden. Neben MHC-Klasse-II-Proteinen (MHC-II), die unter anderem von Makrophagen und dendritischen Zellen zur Präsentation phagozytierter Peptide genutzt werden, sind die MHC-Klasse-I-Proteine (MHC-I) von zentraler Bedeutung. Sie kommen auf allen kernhaltigen Körperzellen vor und präsentieren Peptidstücke von selbst synthetisierten Proteinen. So registrieren zytotoxische T-Zellen im Falle einer Virusinfektion oder einer malignen Entartung die Produktion abnormaler intrazellulärer Proteine.

Die Tatsache, dass auch NK-Zellen krankhaft veränderte Zellen herausfiltern können, wird zum Anderen mit der sogenannten „Missing-self“-Hypothese erklärt. Sie basiert darauf, dass entartete oder infizierte Zellen im Sinne eines Immune Escapes oftmals die MHC-I-Expression verringern, um der T-Zell-Kontrolle zu entgehen. Auch im Neuroblastom kann eine MHC-I-Herunterregulation festgestellt werden, insbesondere bei *MYCN*-amplifizierten Tumoren [102]. Im Sinne der „Missing-self“-Hypothese werden diese Zellen mit verringerter oder vollständig fehlender MHC-I-Expression von

den NK-Zellen erkannt und eliminiert [103]. Hinzu kommen noch eine Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Korezeptoren, um Fehlentscheidungen in der Diskrimination zwischen gesunden und kranken Zellen zu minimieren. Sie werden in Abschnitt I.6.3 genauer beschrieben. Erst die Integration dieser unterschiedlichen Faktoren bestimmt die Effektorantwort der NK-Zelle.

Die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität wird schließlich über die exozytotische Ausschüttung von intrazellulär lokalisierten Perforinen und Granzymen vermittelt. Während die sekretierten Perforine spezifisch die Zellmembran der Zielzelle durchlässig machen, können die Granzyme diese im Folgenden leichter passieren und durch proteolytische Aktivität im Zellinneren den apoptotischen Zelltode induzieren.

I.6.3 Regulation der Effektorfunktion

Im Folgenden soll die Regulation der Zytotoxizität anhand der verschiedenen bekannten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren detaillierter beleuchtet werden. Ein Überwiegen der aktivierenden Stimulation ist sowohl die Folge von einer Herunterregulation inhibierender Liganden („Missing-self“) als auch einer stressinduzierten Hochregulation aktivierender Liganden („Induced-self“) [104].

I.6.3.1 Inhibierende Rezeptoren/Liganden

Wie oben schon erwähnt, spielt für die Autoimmuntoleranz die Erkennung von an der Zelloberfläche lokalisierten MHC-Klasse-I-Proteinen durch NK-Zellen eine elementare Rolle. Dies erfolgt durch Bindung an inhibitorisch wirkende Rezeptoren unter anderem der *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR)-Familie [104]. NK-Zellen ohne solche MHC-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren können keine Effektorfunktion ausüben, wodurch fehlgeleitete Autoreaktivität verhindert wird [105]. Interessanterweise ist der Rezeptor spezifisch für körpereigene HLA-Antigene, welche interindividuell eine große Varianz zeigen. Auf dieser Basis ergibt sich die therapeutische Nutzbarkeit eines Graft-versus-Tumor-Effekts bei haploidenten Stammzelltransplantationen [106].

Neben den HLA-spezifischen Rezeptoren existieren auch davon unabhängige Oberflächenstrukturen, die lösliche oder an Zellmembranen gebundene Liganden erkennen und ein inhibitorisches Signal für die NK-Zell-Aktivität generieren. Dazu zählt

unter anderem *Programmed Cell Death 1* (PD-1) als Rezeptor für den Liganden PD-L1 (CD274), wobei die Expression meist erst im pathologischen Kontext wie unter dem Einfluss des Tumormikromilieus relevant hochreguliert wird [104]. Somit kann die PD-1/PD-L1 – Achse die Tumorabwehr des Immunsystems bedeutend kompromittieren und kommt daher als potenzieller Angriffspunkt in der antineoplastischen Therapie in Frage.

I.6.3.2 Aktivierende Rezeptoren/Liganden

Neben CD16, dem Rezeptor für den Fc-Teil von gebundenen Antikörpern, existieren weitere aktivierende Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen.

Einen wichtigen aktivierenden Ko-Rezeptor stellt CD226 (DNAM-1) dar, als dessen Liganden zuvorderst CD155 (Poliovirus-Rezeptor, PVR) und CD112 (Nectin-2) von Bedeutung sind [107].

Darüber hinaus ist in diesem Zusammenhang *natural killer group 2 member D protein* (NKG2D) zu nennen. Der Rezeptor ist ein Homodimer der *C-type lectin-like receptor* (CTLR)-Familie und transduziert das aktivierende Signal über das DAP10-Adapterprotein [104]. Neben NK-Zellen ist er auch auf zytotoxischen T-Zellen zu finden [108]. Seine acht bekannten Liganden (NKG2DL) gehören zur *MHC class I chain-related protein*-Familie (MICA, MICB) und zur *UL16-binding protein*-Familie (ULBP1-6) und sind mit MHC-I verwandte Glykoproteine [108]. Sie kommen auf gesunden Körperzellen nur in sehr geringem Ausmaß vor, werden aber unter Einfluss von diversen Stressoren sowie auf virusinfizierten und tumorös entarteten Zellen hochreguliert [109].

Dass der Rezeptor für die Tumorkontrolle elementar ist, konnten Guerra et al. 2008 daran festmachen, dass NKG2D-defiziente Mäuse ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung diverser Neoplasien aufweisen [110].

Bemerkenswerterweise können von den (Neuroblastom-)Tumorzellen nach extrazellulär sekretierte, lösliche Spaltprodukte von MICA und auch anderen NKG2DL zu einer Blockade beziehungsweise Herunterregulation von NKG2D führen mit dementsprechend verminderter Effektorfunktion der NK-Zellen [108]. Eine weitere Möglichkeit des *immune escape* ist die verminderte Expression der aktivierenden Liganden, was im Neuroblastom mehrfach gezeigt werden konnte [111, 112].

I.6.4 Therapeutisches Potenzial durch Beeinflussung der Rezeptor/Liganden-Achse

In verschiedenen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit ATO zur verstärkten NKG2DL-Expression auf Zellen verschiedener Tumorarten führt mit nachfolgend verstärkter NK-Zytolyse [113, 114]. Im Neuroblastom konnten Brandetti et al. 2017 eine inverse Korrelation von N-myc und NKG2DL zeigen. Die medikamentöse Herunterregulation von N-myc resultierte in einer vermehrten Expression von aktivierenden Liganden an DNAM-1 und NKG2D [112]. In laborinternen, nicht-publizierten Versuchen konnten diese Beobachtungen bereits bestätigt werden, wobei die N-myc-Herunterregulation durch Inkubation sowohl mit ATO als auch mit Posaconazol erreicht wurde [115].

I.7 Fragestellung/Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, den Effekt von ATO beziehungsweise Posaconazol auf Neuroblastomzellen *in vitro* zu untersuchen, insbesondere hinsichtlich des Einflusses auf die NK-Zell-vermittelte Zytolyse.

Dazu wurden folgende Fragestellungen formuliert:

- 1) Wie wirkt sich die Behandlung von Neuroblastomzellen mit ATO/Posaconazol auf die Expression von N-myc aus?
- 2) Wie wirkt sich die Behandlung von Neuroblastomzellen mit ATO/Posaconazol auf die Expression von Liganden an aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren aus ?
- 3) Welche Korrelation besteht zwischen der Expression von N-myc und der Expression dieser Liganden in Neuroblastomzellen?
- 4) Zeigen NK-Zellen eine verstärkte Zytolyse von Neuroblastomzellen, wenn diese mit ATO/Posaconazol vorbehandelt wurden?
- 5) Wie wirkt sich der *MYCN*-Amplifikationsstatus der Neuroblastomzellen auf die Ergebnisse der Fragestellungen 1 - 4 aus?

II Material und Methoden

II.1 Verwendete Materialien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller; Ort	Sonstige Informationen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	CAS: 60-24-2
Arsentrioxid TRISENOX 1 mg/ml	Teva GmbH; Petach Tikwa, Israel	CAS: 1327-53-3
BioColl® Trennlösung 500ml	Bio&Sell; Feucht, DE	
Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,5 %	AppliChem GmbH; Darmstadt, DE	CAS: 67-68-5
Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	
EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit	Stemcell Technologies; Vancouver, Kanada	
Folsäure kristallin (Ph. Eur., USP) reinst, Pharmaqualität	AppliChem GmbH; Darmstadt, DE	CAS: 59-30-3
Formaldehydlösung 30 %, methanolarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	CAS: 50-00-0
Gibco™ MEM α, GlutaMAX™ Supplement, keine Nukleoside	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA	
Gibco™ MEM α , Nukleoside	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA	
Gibco™ RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA	
Humanserum	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	
Invitrogen™ UltraComp eBeads™ Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA	
KAPA SYBR® FAST	Roche; Basel, CH	SFBRKB
L-Glutamin - Lösung	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	CAS: 56-85-9
Molecular Probes™ Alexa Fluor™ 350 NHS Ester (Succinimidyl Ester)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA	

Molecular Probes™ Vybrant™ CFDA SE Cell Tracer Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA	
myo-Inositol <i>BioChemica</i>	AppliChem GmbH; Darmstadt, DE	CAS: 87-89-8
Natrium-EDTA - Lösung (0,25M)	Universitäts-Apotheke Tübingen, DE	autoklaviert, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt
Noxafil® Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung (300 mg)	Merck Sharp & Dohme; Kenilworth, USA	18 mg/ml
Posaconazole VETRANAL™, analytical standard	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	CAS: 171228-49-2 Reinheitsgrad: ≥ 98,0 %
Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin) (BD GolgiStop™)	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	
Recombinant Human IL-2	PeproTech; Cranbury, USA	aus E. coli
Recombinant Human Interleukin-15	CellGenix; Freiburg, DE	aus E. coli
RNeasy Mini Kit	QIAGEN; Venlo, Niederlande	
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN; Venlo, Niederlande	
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN; Venlo, Niederlande	
Sodium Pyruvate (100 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA	
Trypanblau - Lösung	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	CAS: 72-57-1
Trypsin-EDTA - Lösung	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	0.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA

Tabelle 3: Antikörper

Name	Hersteller; Ort	Spezifizierung
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ Iso-type Ctrl (FC) Antibody	BioLegend; San Diego, USA	Mouse IgG1, κ Clone MOPC-21 (RUO)
APC-R700 Mouse Anti-Human CD273	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse IgG1, κ Clone MIH18 (RUO)

APC-R700 Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse BALB/c IgG1, κ Clone X40 (RUO)
BB515 Mouse Anti-Human CD274	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse BALB/c IgG1, κ Clone MIH1 (RUO)
BB515 Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse BALB/c IgG1, κ Clone X40 (RUO)
Brilliant Violet 421™ anti-human CD56 (NCAM) Antibody	BioLegend; San Diego, USA	Mouse IgG1, κ Clone HCD56 (RUO)
BV421 Mouse Anti-Human PVR (CD155)	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse BALB/c IgG1, κ Clone SKII.4 (RUO)
BV421 Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse BALB/c IgG1, κ Clone X40 (RUO)
CD3 PerCP	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse BALB/c IgG1, κ Clone SK7 (CE_IVD)
Human MICA/B PE-conjugated Antibody	R&D Systems, Inc.; Minneapolis, USA	Mouse IgG _{2A} Clone #159207
Human ULBP-2/5/6 Alexa Fluor® 647-conjugated Antibody	R&D Systems, Inc.; Minneapolis, USA	Mouse IgG _{2A} Clone #165903
PE anti-human CD107a (LAMP-1) Antibody	BioLegend; San Diego, USA	Mouse IgG1, κ Clone H4A3 (RUO)
PE anti-human CD112 (Nectin-2) Antibody	BioLegend; San Diego, USA	Mouse IgG1, κ Clone TX31 (RUO)
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA	Mouse IgG1, κ Clone MOPC-21 (RUO)

Tabelle 4: Primer

Name	<i>forward</i> -Sequenz (5'-3')	<i>reverse</i> -Sequenz (3'-5')	Sonstige Informationen	Hersteller
<i>MYCN</i>	CGC AAA AGC CAC CTC TCA TTA	TCC AGC AGA TGC CAC ATA AGG	DNA Oligo, Desalted, 0,02 μM	metabion international AG; Planegg, DE
<i>BCMA</i>	CGA CTC TGA CCA TTG CTT TCC	AAG CAG CTG GCA GGC TCT T		

Tabelle 5: Bedarfsmittel und Geräte

Bedarfsmittel/Gerät	Name	Hersteller
6-Well-Platte	Falcon® 6-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate, Sterile	Corning, Inc.; Corning, USA
96-Well-Platten	CELLSTAR® 96 Well Cell Culture Plate sterile, U-bottom	Greiner AG; Kremsmünster, Österreich
	Microplate, 96 Well U-Shape, non-sterile	
96-Well-Platte für RTCA	E-Plate 96 VIEW for the xCELLigence SP/MP/eSight 1x6 Plates	OMNI Life Science GmbH & Co. KG; Bremen, DE
Autoklav	Systec VX-150	Systec GmbH; Linden, DE
Durchflusszytometer	LSRII	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA
Eiswürfelbereiter	404a	Scotsman Ice; Mailand, Italien
FACS Tubes	0,5 ml, 38 x 6,5 mm	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
	5 ml, 12 x 75 mm	Corning, Inc.; Corning, USA
Inkubator	CO ₂ -Inkubator HERAccl® 150	Thermo Electron LED GmbH; Langensfeld, DE
Kühl-/Gefrierschrank	LKexv 1800 MediLine (4°C)	Liebherr-Hausgeräte GmbH; Ochsenhausen, DE
	Liebherr ProfiLine (-20°C)	
	Froster Labex® (-20°C)	Philipp Kirsch GmbH; Willstätt-Sand, DE
	Forma Scientific -86°C Ultratiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Laborvakuumpumpe	Laboport	KNF; Sursee, CH
Mehrkanalpipetten	Discovery Comfort 12-Kanal-Pipette	Corning HTL SA; Warschau, Polen
	Transferpette® S - 12	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, DE
	MultiMate 8-Kanal-Pipette	Abimed GmbH; Langenfeld, DE
Messpipetten	0,1 – 2 µl	Corning HTL SA; Warschau, Polen
	0,5 – 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg, DE

	1 – 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg, DE
	2 – 20 µl	Corning HTL SA; Warschau, Polen
	10 – 100 µl	Gilson Inc.; Middleton, USA
	20 – 200 µl	Corning HTL SA; Warschau, Polen
	100 – 1000 µl	Corning HTL SA; Warschau, Polen
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf Tubes® 0,5 ml	Eppendorf SE; Hamburg, DE
	Eppendorf Tubes® 1,5 ml	
	Eppendorf Tubes® 2,0 ml	
	PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH; Hessesisch Oldendorf, DE
	Optical Flat 8-Cap Strips for 0.2 ml tube strips/plates	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA
	Low-Profile PCR Tubes 8-tube strip, white	
	Multiply®-Pro Gefäß 0,2ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Mikroskop	Olympus IX50 Inverted Mikroskop	Olympus; Shinjuku, Japan
Pasteurpipette	Pasteur Capillary Pipettes Long Size	Wilhelm Ulbrich GdB; Bamberg, DE
PCR-Gerät/-Modul	C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA
	CFX96 Reaction Module	
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2	Integra Biosciences AG; Wallisellen, CH
RTCA-Platte	E-Plate View 96	ACEA Biosciences Inc.; San Diego, USA
RTCA-System	xCELLigence RTCA SP	
Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS12	Heraeus; Hanau, DE
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Sprühflasche	Buerkle X10 Sprühflasche mit Handpumpe, 500 ml, Hub: 1,2 m	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Stabpipetten	CELLSTAR® 5 ml	

	CELLSTAR® 10 ml	Greiner AG; Kremsmünster, Österreich
	Stripette® 25 ml	Corning, Inc.; Corning, USA
	FALCON® 50 ml	
Stickstoff-Gefrierschrank	MVE HEco™Series 1500-190	PrincetonCryo Tech Inc.; Pipersville, USA
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer, Inc.; Waltham, USA
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Vortexmischer	Top-Mix 11118	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
	REAX 2000	Heidolph Instruments; Schwabach, DE
Wasserbad	Inkubations-/Inaktivierungsbad 1002	GFL Gesellschaft für Labor-technik mbH; Burgwedel, DE
Wischtücher	KIMTECH Science Labortücher – Weiß	Kimberly-Clark; Irving, USA
	KIMTECH Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark; Irving, USA
Zellkultur-Flaschen	FALCON® 12,5 cm ²	Corning, Inc.; Corning, USA
	CELLSTAR® 25 cm ²	Greiner AG; Kremsmünster, Österreich
	CELLSTAR® 75 cm ²	
	CELLSTAR® 175 cm ²	
Zentrifugen	Mini-Zentrifuge Spectrafuge 3-1810	neoLab Migge GmbH; Heidelberg, DE
	Sprout®	Biozym Scientific GmbH; Hessesisch Oldendorf, DE
	MIKRO 22R	Hettich AG; Bäch, CH
	ROTINA 420R	
	ROTIXA 50 RS	
Zentrifugenröhrchen	FALCON® Tubes 50 ml	Corning, Inc.; Corning, USA
	CELLSTAR® Tubes 15 ml	Greiner AG; Kremsmünster, Österreich

Tabelle 6: Software

Name	Version	Hersteller
CFX Maestro Software	2.2	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA
FACSDiva Software	-	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA
FlowJo	10.8.0	BD Biosciences; Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism	9.4.1	GraphPad Software, Inc.; San Diego, USA
Microsoft Office Excel	1808	Microsoft; Redmond, USA
NanoDrop Operating Software	1.6	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
RTCA Software	2.0.0.1301	ACEA Biosciences Inc.; San Diego, USA

II.2 Methoden

II.2.1 Zelllinien und Zellkultivierung

II.2.1.1 Neuroblastomzellen

Im Rahmen der Arbeit wurden die zwei Neuroblastomzelllinien LS und SK-N-SH verwendet, die sich unter anderem in der Kopienzahl des *MYCN*-Gens unterscheiden:

LS wurde 1989 aus dem abdominalen Stadium-III-Neuroblastom einer 16 Monate alten Patientin isoliert und weist eine 30-fache *MYCN*-Amplifizierung in homogeneously stained regions (HSR) der DNA auf. Die Expression des Onkogens ist den Erstbeschreibern nach um das 30-50-fache erhöht. Weitere Merkmale sind ein seltenes Auftreten von double-minute-Chromosomen sowie eine Trisomie des Chromosoms 17. [116]

SK-N-SH wurde im Jahre 1970 aus Knochenmarkmetastasen in einer 4-jährigen Patientin etabliert. Sie besteht aus zwei morphologisch verschiedenen Zelltypen, nämlich kleinen, stacheligen und großen, epitheloidartigen. [117] Sie zeigen im Vergleich zu LS eine

langsamerer Wachstumsverhalten [118], keine GD2-Expression [119] und insbesondere keine *MYCN*-Amplifizierung in den Gensequenzen [120].

Die einschichtig adhärent wachsenden Zellen wurden zur Dauerkultivierung in Polystyrol-Zellkulturflaschen inkubiert bei 37°C, 5 Vol% CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit. Im Folgenden werden diese Bedingungen unter dem Begriff „im Brutschrank“ verstanden. Als Medium diente RPMI-1640 mit folgenden Zusätzen: 10 % fetal bovine serum (FBS, 20 % für SK-N-SH), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 1 % Natriumpyruvat (in der Folge als „RPMI10%“ bezeichnet). Bei Erreichen einer Konfluenz von circa 80 - 90 % wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst und in geringerer Konzentration neu ausgesät. Dazu wurden die konfluenten Zellen nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen und in der Folge mit Trypsin-EDTA-Lösung für 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das führte zum Ablösen der Zellen, woraufhin die Trypsinfunktion durch Zugabe von Medium inaktiviert wurde. Nach mikroskopischer Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration neu eingestellt, wofür nach zehnminütiger Zentrifugation mit 350g (relative Zentrifugalkraft, RCF) der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert wurde. Im Anschluss erfolgte die Neuaussaat in die Zellkulturflasche (maximal dreimalige Wiederverwendung derselben Flasche), wobei für LS eine Konzentration von circa $1,5 * 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ und für SK-N-SH von circa $3,0 * 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ verwendet wurde. Der Prozess des AblöSENS und WiederaussäENS wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit ein- bis dreimal pro Woche durchgeführt.

II.2.1.2 NK-Zellen

Als Effektorzellpopulation diente die kommerziell erhältliche Zelllinie NK-92, welche ursprünglich aus PBMCs eines 50-jährigen Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom isoliert wurde [121]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Langzeitkultur als Nährmedium α MEM mit folgenden Zusätzen verwendet: 20 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und außerdem 17,66 μ l Folsäure, 72 μ l Inositol und 100 μ l β -Mercaptoethanol (jeweils pro 100 ml Gesamtmedium). NK-92 benötigt zum Überleben die Anwesenheit von IL-2, was durch regelmäßige (dreimal pro Woche) IL-2 Zugabe in einer Endkonzentration von 100 U/ml gewährleistet wurde. Ein- bis zweimal pro Woche wurde

die Kultur gesplittet und frisches Medium hinzugegeben, die Zellkonzentration befand sich dadurch ständig in dem Bereich von $0,3 - 1 * 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$.

II.2.2 Vorbehandlung der Neuroblastomzellen

II.2.2.1 Allgemeines

Am Anfang eines jeden Experiments stand die Vorbehandlung der Neuroblastomzellen mit ATO bzw. Posaconazol, um in den weiteren Schritten den Einfluss dieser Medikamente auf die Zellen mit den verschiedenen Methoden zu untersuchen. Bis auf die Versuche mit RTCA (s.u.) wurden die Vorbehandlungen in Zellkulturflaschen oder 6-Well-Platten an den proliferierenden, adhären Zellen durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Zellen aus der Dauerkultur bei Erreichen der Konfluenz mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt (s.o.). Anschließend wurden die Zellen in die verschiedenen Zellkulturflaschen/Well-Platten so in einer definierten Menge RPMI10% ausgesät, um am Ende der Behandlungszeit eine konfluente Zellschicht zu erreichen. Nach einer initialen Phase von 12-36 Stunden, in der die Zellen adhären und proliferieren konnten, wurde mit der Behandlung gestartet. Dafür erfolgte die Zugabe von ATO bzw. Posaconazol in die Zellkulturflaschen/Wells in den definierten Konzentrationen, wobei je nach Versuch 1-3 Gefäße jeweils die gleiche Behandlung erhielten (biologische Replikate). Anschließend wurden die Zellen wieder für die vorgesehene Behandlungsdauer inkubiert und danach entsprechend der oben beschriebenen Methode abgelöst. Damit standen die vorbehandelten Zellen nun für die unten beschriebenen Methoden zur Verfügung. Im nächsten Abschnitt werden zunächst die zwei Medikamente vorgestellt.

II.2.2.2 ATO

Zur Untersuchung der Wirkung der Substanz ATO wurde das Medikament *Trisenox* von Teva Pharmaceuticals eingesetzt. Die Stammlösung lag in einer Konzentration von 5 mM vor, welche je nach geforderter Zielkonzentration und verwendetem Gefäß vor Hinzugabe noch 1:10 mit NaCl verdünnt wurde. Dementsprechend wurde NaCl auch als

Substanz für die Negativkontrollen, also die “unbehandelten” Ansätze eingesetzt. Hierbei entsprach das NaCl-Volumen dem höchsten Volumen der zugegebenen ATO-Lösung.

II.2.2.3 Posaconazol

Die Versuche mit Posaconazol verwendeten zwei unterschiedliche Formen des Wirkstoffes. Die ersten Experimente im Rahmen der Laborarbeit wurden mit einer selbst hergestellten Posaconazol-Lösung durchgeführt. Hierfür wurde das in Pulverform vorliegende Posaconazol VETRANAL™ des Unternehmens Sigma-Aldrich in DMSO gelöst, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 2,5 mM vorlag. Bei Bedarf wurde die Lösung vor Verwendung nochmals mit DMSO 1:10 verdünnt. Als Negativkontrolle für diese Versuche wurde somit DMSO verwendet, wobei wiederum das Volumen dem höchsten Volumen der behandelten Ansätze entsprach.

Die Verwendung von DMSO in jenen Konzentrationen zog eine relevante Zytotoxizität nach sich. Dies schlug sich vor allem in den Versuchen nieder, die die impedanzbasierte Messung der Zellvitalität (RTCA) als Methode verwendeten. Da hier in Anwesenheit der benötigten Mengen an DMSO kein ausreichender Anstieg des Zellindex erreicht werden konnte, erfolgte der Wechsel auf *Noxafil*, ein Medikament des Unternehmens MSD Sharp & Dohme. Der Wirkstoff liegt hierbei in einer Konzentration von circa 25,7 mM vor, sodass vor Einsatz in den Experimenten noch eine Verdünnung von 1:10 oder 1:100 mit NaCl erfolgte. Dementsprechend wurde auch für die Negativkontrollen NaCl eingesetzt. Noxafil statt Posaconazol VETRANAL™ fand in den Versuchen mit RTCA und qPCR Anwendung.

Im Folgenden werden nun die einzelnen Methoden vorgestellt, mit denen im Anschluss an die medikamentöse Vorbehandlung die verschiedenen Auswirkungen auf die Neuroblastomzellen untersucht wurden.

II.2.3 qPCR

II.2.3.1 RNA-Isolation

Zur Quantifizierung der N-myc-Expression in den Neuroblastomzellen mittels Real-Time-PCR (qPCR) musste zunächst die RNA aus den Tumorzellen isoliert werden.

Hierfür verwendeten wir das *RNeasy Mini Kit* von QIAGEN, das nach Zelllyse und mehreren Wasch-Zentrifugations-Schritten als Endprodukt die intrazelluläre RNA in Suspension bereitstellt. Deren Konzentration konnte spezifisch durch spektralphotometrische Messung am NanoDrop bestimmt werden, sodass für den nächsten Schritt – die Umschreibung in cDNA – die Verwendung einer definierten Menge RNA sichergestellt war.

II.2.3.2 cDNA-Synthese

Mithilfe einer Reversen Transkriptase wurde nun die RNA in cDNA transkribiert, wobei dafür pro Ansatz 1000 ng RNA eingesetzt wurden. Bei einer angenommenen vollständigen Enzymreaktion führte dies zu einer cDNA-Endkonzentration von 50 ng/µl. Für die Synthese der cDNA verwendeten wir das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von QIAGEN, welches vor Enzymzugabe auch die Inkubation der RNA mit einem *gDNA Wipe-out Buffer* zur Eliminierung etwaiger noch vorhandener gDNA-Reste beinhaltet. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Reaktionsansatzes (Reverse Transkriptase, Puffer, Primer-Mix) zur RNA und eine Inkubation für 25 Minuten bei 42°C zur Optimierung der Enzymaktivität, gefolgt von 3 Minuten bei 95°C, was die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bedingte. Als Reaktionsprodukt lag nun cDNA vor, welche bis zur weiteren Verwendung auf Eis bzw. im Fall von längeren Intervallen bei -20°C gelagert wurde.

II.2.3.3 qPCR

Schließlich erfolgte im letzten Schritt die Vervielfältigung der cDNA mittels qPCR. Ein Reaktionsansatz bestand aus 2 µl (entspricht 100 ng) synthetisierter cDNA, 1 µl Wasser, je 1 µl (entspricht je 5 pmol) forward- und backward-Primer (*BCMA* oder *MYCN*) sowie 5 µl *KAPA SYBR FAST* – Kit. Letzteres enthielt alle weiteren notwendigen Zusätze für die qPCR: DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl₂ und den Farbstoff *SYBR Green I*.

Alle qPCRs wurden am selben Gerät (CFX96 von BioRad Laboratories) unter Verwendung des folgenden, arbeitsgruppenintern bereits erstellten und validierten Protokolls durchgeführt:

1. 95°C für 2 min
2. 40x Schritte 2.1 bis 2.3
 - 2.1. 95°C für 3 sec → Denaturierung
 - 2.2. 60°C für 30 sec → Annealing
 - 2.3. 72°C für 1 sec → Elongation
3. Schmelzkurve: inkrementelle Temperaturerhöhung von 65°C bis 95°C in Schritten von 0,5 K, Dauer jeweils 5 sec

Nach jedem Zyklus (Ende Schritt 2.3) erfasste das Gerät pro Reaktionsgefäß die Signalintensität des enthaltenen Farbstoffs *SYBR Green I*. Da dieser nur als Komplex mit doppelsträngiger DNA in relevantem Ausmaß fluoreszent aktiv ist, dient die Intensität als Korrelat für die Menge der jeweils vorhandenen ds-DNA pro Zeitpunkt und Reaktionsgefäß. Die transkribierte DNA-Menge (und damit auch die Signalintensität) ist nach einer gegebenen Anzahl von Reaktionszyklen umso größer, je höher die Menge der ursprünglichen cDNA-Menge zu Beginn war. Ein bestimmter Cut-off-Wert der Fluoreszenzintensität wird also umso früher erreicht, je mehr Kopien des zu transkribierenden Gens ursprünglich in Form von cDNA vorlagen. Die Anzahl an abgelaufenen Transkriptionszyklen bei Erreichen dieses Cut-off-Werts wird als Cq-Wert bezeichnet. Somit gilt: Je niedriger der Cq-Wert, desto mehr Kopien des zu transkribierenden Gens waren zu Beginn vorhanden. Dies ist das Prinzip der real-time quantitative PCR (qPCR).

Da eine absolute Bestimmung der initialen Kopienzahl hierbei jedoch nicht sicher möglich ist, erfolgte die Auswertung durch Vergleich mit einem Referenzgen, dessen Expression im Gegensatz zum Target-Gen *MYCN* nicht maßgeblich von der unabhängigen Variablen (Behandlung mit ATO/Posaconazol) beeinflusst wird. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür das *BCMA*-Gen verwendet, welches sich in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als am besten dafür geeignet erwiesen hatte.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *BioRad CFX Maestro*. Jeder Ansatz wurde in je drei technischen Replikaten durchgeführt (3x *BCMA*, 3x *MYCN*). Aus den durchschnittlichen Cq-Werten errechnete sich dann mittels der $\Delta\Delta Cq$ -Methode [122] die relative Expression (Fold Change) von N-Myc unter der entsprechenden Vorbehandlung im Vergleich zur Negativkontrolle:

$$E_{rel}(V1) = \frac{2^{Cq(BCMA;V1) - Cq(MYCN;V1)}}{2^{Cq(BCMA;K) - Cq(MYCN;K)}}$$

V1:	Vorbehandlung	K:	Kontrolle
E _{rel} :	relative MYCN-Genexpression (Fold Change)		
Cq(X;X):	Durchschnitt der Cq-Werte der technischen Triplikate		

Die graphische Darstellung erfolgte ebenfalls mit *BioRad CFX Maestro*. Da die qPCR von LS nach Vorbehandlung mit ATO auch im Sinne von biologischen Replikaten mehrmals durchgeführt wurde, konnten hier weiterführende statistische Maßzahlen und Signifikanzniveaus berechnet werden.

II.2.4 Ligandenexpression

II.2.4.1 Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung der Expression von NK-Zell-aktivierenden und -inhibierenden Oberflächenliganden wurde das Prinzip der Durchflusszytometrie verwendet. Hierbei können einzelne Zellen zum einen nach nativen Strukturmerkmalen wie Größe (*forward scatter, FSC*) und Granularität (*side scatter, SSC*) differenziert werden. Des Weiteren erfolgt eine spezifische Erkennung von Oberflächenstrukturen durch Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und Detektion der emittierten Signale nach entsprechender Stimulation mit Lasern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Liganden CD112, CD155, CD273, CD274, MICA, MICB, ULBP2, ULBP5 und ULBP6 auf den beiden Neuroblastomzelllinien bestimmt. Nach Ende der Vorbehandlung in Triplikaten, Ablösen der Zellen (s.o.), Zentrifugation und Aufnahme in FACS-Puffer (Eigenherstellung aus PBS mit 20 FBS und 2 mM EDTA) erfolgte die Inkubation für 20 Minuten bei 4°C, wobei jeweils 0,5 – 1 * 10⁶ Zellen in 96-Well-Platten markiert wurden.

Die Antikörper waren jeweils an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, was später die gleichzeitige Messung der Expression der verschiedenen Liganden ermöglichte. Für MICA und MICB sowie für ULBP 2, 5 und 6 wurde jeweils ein Kombinationsantikörper verwendet (anti-MICA/B bzw. anti-ULBP-2/5/6), da in Vorversuchen der Arbeitsgruppe eine gleichsinnige Regulation der Liganden gezeigt worden war [115].

Um den Einfluss der unspezifischen Antikörperbindung an die Zellen auszuklammern, wurden zusätzlich die jeweiligen Isotypen der Antikörper eingesetzt und die letztendlich resultierende MFI (s.u.) dieser Isotypen von den MFI der spezifischen Antikörper abgezogen.

Die genauen Antikörper und gekoppelten Fluoreszenzen sind in der Tabelle *Materialien* aufgeführt.

Nach erfolgter Inkubation schloss sich noch eine Lebend/Tot-Färbung an, um nur vitale Zellen in die Auswertung miteinzubeziehen. Als Farbstoff wurde *AF350 NHS-Ester* verwendet, der die geschädigten Membranen avitaler Zellen permeieren und an die Amin-Gruppen der intrazellulären Proteine binden kann. Die Färbung erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Farbstoffkonzentration von 10 μM . Anschließend erfolgten nochmals drei Zentrifugations- und Waschschrte mit FACS-Puffer, bevor die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen wurden und für die Messung bereit waren. Falls diese nicht direkt im Anschluss geschah, wurde die Suspension für maximal 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Für alle in dieser Arbeit aufgenommenen durchflusszytometrischen Messungen wurde dasselbe FACS-Gerät benutzt (LSR II von BD Biosciences). Die Auswertung erfolgte mit der Software *FlowJo* von BD Biosciences. Durch sukzessive Selektion der richtigen Events in den verschiedenen Kanälen, das sogenannte Gating, konnten tote Zellen, sonstiger Debris und Zelldoubletten (zusammenhängende Zellen) von der Fluoreszenzanalyse ausgeklammert werden. Im ersten Schritt wurde im FSC-SSC-Kanal die Zellpopulation gated, im zweiten Schritt im FSC(A)-FSC(H)-Kanal bzw. SSC(A)-SSC(H)-Kanal das Einzelzellgating durchgeführt, bevor als Drittes die AF350-positiven, toten Zellen exkludiert wurden. Von den verbliebenen Events wurde nun die Mean Fluorescence Intensity (MFI) in den jeweiligen, zu den verwendeten Farbstoffen gehörenden Kanälen bestimmt. In Abbildung 2 ist eine exemplarische Gatingstrategie dargestellt. Mittels *GraphPad Prism* erfolgte schließlich die graphische Darstellung und statistische Auswertung.

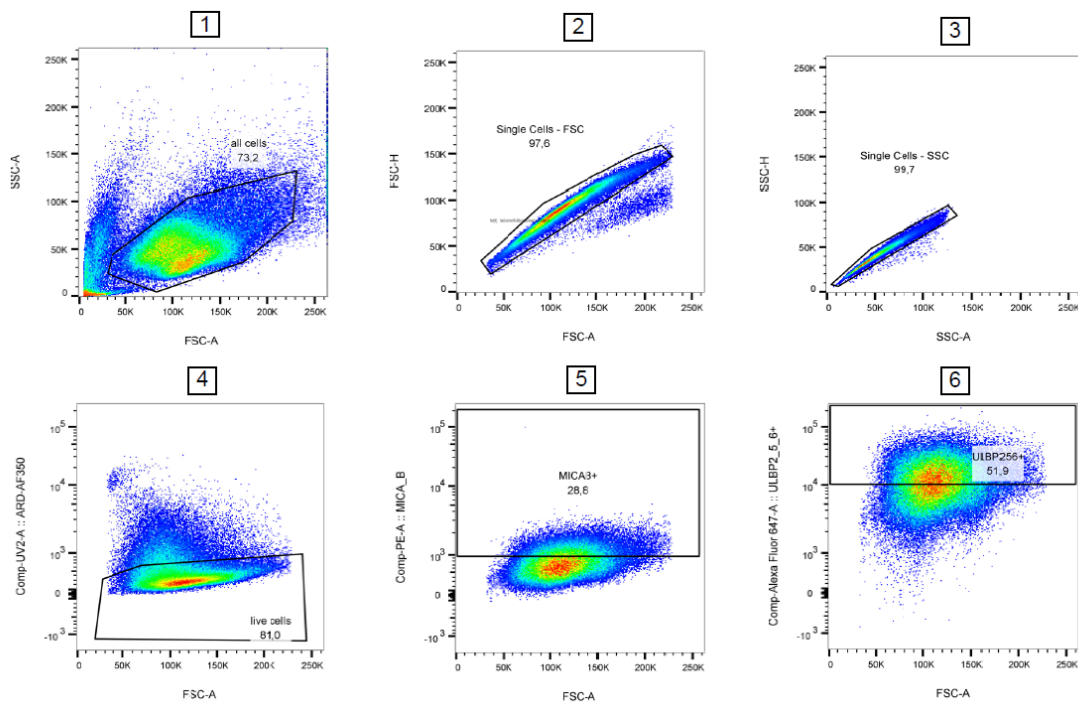


Abbildung 2: Gatingstrategie für durchflusszytometrische Bestimmung der Ligandenexpression (hier MICA/B und ULBP-2/5/6)

1: alle Events dargestellt, Gate auf allen Zellen; **2:** nur Events aus Gate 1 dargestellt, Gate auf Einzelzellen (im FSC-Kanal); **3:** nur Events aus Gate 2 dargestellt, Gate auf Einzelzellen (im SSC-Kanal); **4:** nur Events aus Gate 3 dargestellt, Gate auf lebenden Zellen (AF350-negativ); **5:** nur Events aus Gate 4 dargestellt, Gate auf MICA/B-positiven Zellen; **6:** nur Events aus Gate 4 dargestellt, Gate auf ULBP-2/5/6-positiven Zellen

Hinweis: Das Gating auf MICA/B bzw. ULBP-2/5/6 war für die Auswertung letztlich nicht relevant, hierzu wurde der MFI der jeweiligen Fluoreszenz (aller Events aus Gate 4) verwendet.

II.2.5 Zelluläre Zytotoxizität

Auch für die Bestimmung der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber den Neuroblastomzellen fand zunächst die durchflusszytometrische Methode Anwendung.

Dafür erfolgte bereits vor der Behandlung mit ATO bzw. Posaconazol eine Markierung der (zu lysierenden) Target-Zellen mit dem intrazellulären Marker CFSE. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Brutschrank mit CFSE-Konzentrationen von 2,5-7,5 μ M (je nach Zellteilungsrate und anschließender Behandlungsdauer) wurde die Reaktion mit RPMI10% abgestoppt und die Zellen nach Zentrifugation für die medikamentöse Behandlung ausgesät. Nach Anwachsen und entsprechender Inkubation von

LS/SK-N-SH mit ATO bzw. Posaconazol wurden die Zellen wieder abgelöst und in RPMI10% in definierten Verhältnissen mit den Effektor-Zellen zusammenpipettiert. Als letztere dienten die Zellen der NK-92-Linie. Die Zellzahl-Ratios waren hauptsächlich 3:1, 10:1 und 30:1 (jeweils Effektor:Target). Nach fünfstündiger Inkubation von NK-92 und Neuroblastomzellen in RPMI10% auf 96-Well-Platten wurden die Suspension mittels mehreren Zentrifugations- und Waschschritten mit FACS-Puffer für die Messung am Durchflusszytometer vorbereitet. Davor erfolgte noch eine Lebend/Tot-Färbung mit *AF350 NHS-Ester*, analog zur Färbung im Rahmen der Ligandenexpressionbestimmung (siehe Abschnitt II.2.4.1).

Auch die Auswertung und Gatingstrategie folgte zunächst der oben beschriebenen Methodik mit dem Ziel, nur die Events herauszufiltern, die einzelne Zellen abbilden. Dann wurden die CFSE-positiven Zellen gated, welche den vor Durchführung des Zytotoxizitätsassays damit gefärbten Neuroblastomzellen entsprachen. Von diesen wurde nun anhand der Lebend/Tot-Färbung der Anteil von AF350 NHS-Ester-positiv an allen CFSE-positiven Zellen bestimmt, was dem Prozentsatz an toten Zellen in diesem Ansatz entspricht. Dies ist allerdings nicht mit dem Anteil an von den NK-Zellen getöteten Zellen gleichzusetzen, da auch im Ausgangszustand schon eine gewisse Anzahl an avitalen Targetzellen vorhanden sind, zumal der genaue Anteil nicht zuletzt insbesondere von der Art und Konzentration des verwendeten Medikaments abhing. Um dem Rechnung zu tragen, wurden für jede Form der Vorbehandlung nicht nur verschiedene Effektor-Target-Ratios (jeweils drei technische Triplikate), sondern auch Negativkontrollen in Gestalt von sogenannten Neuroblastomzell-Monos, also Targetzellen ohne Effektorzellen, verwendet (jeweils fünf technische Replikate). Mit folgender Formel wurde dann der spezifische Kill berechnet, also der von den NK-Zellen lysierte Anteil an initial vitalen Neuroblastomzellen:

$$sK = \frac{\%tot(K) - \%tot(M)}{100 - \%tot(M)} * 100\%$$

sK: spezifischer Kill in %
 %tot(K): Anteil an toten Nb-Zellen im Kill-Ansatz (mit Effektoren)
 %tot(M): Anteil an toten Nb-Zellen im Mono-Ansatz (ohne Effektoren)

II.2.5.1 RTCA

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Messung der zellulären Zytotoxizität mittels CFSE-Labeling wurde die NK-Zell-Lyse der Tumorzellen mittels einem *real-time-cell-analysis* (RTCA) - Assay quantifiziert. Das verwendete System *XCELLigence® RTCA SP* (Agilent Technologies) nutzt zur Bestimmung der Tumorzellviabilität die Impedanzänderung infolge der Zelladhärenz an den Boden einer mit Gold beschichteten 96-Well-Platte. Mit steigender Zellzahl vergrößert sich die Impedanz zwischen den an der Plattenunterseite befestigten Elektroden, wobei der Wert neben der Zellzahl auch von Adhäsionsfähigkeit, Vitalität und Morphologie der Zellen abhängt. Der Betrag der Impedanz wird dann in einen einheitslosen Zahlenwert, den Zellindex (CI), umgewandelt [123]. Dieser lässt sich somit zum Vergleich der Zellviabilität zwischen den verschiedenen Wells verwenden.

Diese Methode kommt also ohne artifizielle Zellmanipulation aus, wie sie bei konventionellen zytotoxischen Assays durch Insertion oder Anhaftens eines fluoreszenten oder radioaktiven Markers notwendig ist. Dadurch wird nicht in die physiologische Zellfunktion eingegriffen. Auf der anderen Seite ist als Einschränkung zu vermerken, dass der Zellindex nicht ausschließlich direkt proportional zu der Zellzahl ist, sondern sich auch aus anderen Faktoren wie Morphologie und Zell-Oberflächen-Interaktion zusammensetzt. In der Literatur ist die RTCA schon mehrfach in ihrer Anwendung beschrieben und validiert worden. [123, 124]

Für die Experimente dieser Arbeit wurde zunächst als Hintergrundmessung zellfreies RPMI10% in jedes Well vorgelegt und einmalig die Impedanz bestimmt. Dann erfolgte die Zugabe von je 10.000 LS-Zellen bzw. 30.000 SK-N-SH-Zellen pro Well, und – nach Equilibration für circa 30 min bei Raumtemperatur zur Sicherstellung eines gleichmäßigen Absinkens der Zellen – das Zurückstellen in die sich im Brutschrank befindende Messstation und die Fortführung der Messung (in 15min-Schritten). Die Tumorzellen adhärten und proliferierten während eines Zeitraums von circa 24h, sodass ein Zellindex von $1 > CI > 2$ erreicht war. Im Anschluss wurde ATO/Posaconazol – in verschiedenen Konzentrationen und mit Negativkontrolle (NaCl/DMSO) – zugegeben, wobei jeder Ansatz in Triplets (Behandlung) bzw. Quintetts/Quartetts (Kontrolle) erfolgte. Nach der jeweiligen Behandlungsdauer wurde das Medium ausgetauscht und nach Waschen mit PBS durch frisches ersetzt. Damit etwaige durch den Mediumwechsel verursachte

Zellindexänderungen kontrollierbar waren und nicht fälschlicherweise als effektorzellvermittelte Zytotoxizität interpretiert wurden, wurde die Platte daraufhin wieder in die Station zurückgestellt und für circa 30 - 60 min inkubiert. Teilweise zeigten sich hier eine Reduktion des Zellindex um bis zu 50 %, wohl bedingt durch die mechanische Manipulation im Rahmen des Mediumwechsels. Nach Erreichen eines erneut stabilen Zellindex wurden die NK-Zellen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Messung sofort in 5min-Schritten weitergeführt. Die Zelllyse führte dann zu einem Absinken des Zellindex in den NK-Zellhaltigen Wells bei weiterer Zunahme in den Negativkontrollen ohne Effektorzellen als Zeichen der fortlaufenden Tumorzellproliferation. In Abbildung 10 (Abschnitt III.4.2) ist zur Verdeutlichung ein graphischer Verlauf eines exemplarischen Versuchs dargestellt.

Die Darstellung und erste Auswertung erfolgte mit der *RTCA Software* von ACEA Biosciences Inc. nach folgendem Schema: Zunächst wurde aus dem Zellindex ein normalisierter Zellindex nCI generiert, wofür die Software jeden Messwert eines Wells zu jedem Zeitpunkt durch den Messwert desselben Wells zu einem bestimmen Normalisierungszeitpunkt t_N dividiert. An t_N gilt somit für alle Wells: $nCI = 1$. Als Normalisierungszeitpunkt wurde der letzte Messschritt vor NK-Zellzugabe verwendet. Damit werden konfundierende Variablen wie z.B. durch Pipettierungenauigkeiten verursachte leicht verschiedene Zellzahlen zu Beginn ausgeglichen und der Betrag des Zellindex innerhalb eines bestimmten Ansatzes nach Effektorzugabe vergleichbarer gemacht. Daraufhin wurden die Zahlenwerte nach Excel exportiert und hier für jeden Ansatz mit Effektorzellen der relative Zellindex nCI_{rel} berechnet. Dafür wurden die normalisierten Zellindizes eines jeden Wells mit Effektoren durch den Durchschnitt der normalisierten Zellindizes des entsprechenden Kontrollansatzes ohne Effektoren zum entsprechenden Zeitpunkt dividiert. Somit ergibt sich für alle Zeitpunkte nach Effektorzugabe und alle Wells mit Effektoren das prozentuale Verhältnis von eigenem nCI zum nCI des gleichen Ansatzes (die Vorbehandlung betreffend) ohne NK-Zelllyse. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine Quantifizierung der Zelllyse in Abhängigkeit der verschiedenen Vorbehandlungen.

Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte schließlich wieder mit *GraphPad Prism*.

II.2.6 CD107a-Degranulationsassay

Diese letzte angewendete Methode hatte das Ziel, direkt die Stimulation und Aktivierung der NK-Zellen in Anwesenheit der vorbehandelten Neuroblastomzellen zu quantifizieren. Dafür wurden sowohl Zellen der NK-92-Linie eingesetzt als auch frisch isolierte NK-Zellen von gesunden Freiwilligen. Daher soll zunächst die Isolationsmethode genauer beschrieben werden.

II.2.6.1 NK-Zell-Isolation

Zunächst wurde circa 120 ml Vollblut von gesunden Spendern abgenommen, um daraus im nächsten Schritt die PBMCs zu isolieren. Dafür wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll als Trennlösung durchgeführt: Nach dem Zentrifugationsschritt (500g, 25 Minuten, ohne Bremsung) lagen die PBMCs in einer Schichtung zwischen Erythrozyten und Serum vor, die abpipettiert und für die folgenden Schritte weiterverwendet wurde. Als nächstes erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (160g, 15 Minuten, ohne Bremsung) nach Resuspension in MACS-Puffer (10% FCS), um anschließend die Thrombozyten im Überstand zu entfernen. Aus den verbliebenen PBMCs wurden dann mithilfe des *Human NK Cell Enrichment Kits* der Firma STEMCELL die NK-Zellen isoliert. Eine durchflusszytometrische Messung (Färbung von CD56 und CD3) bestätigte in der Folge die Reinheit der CD56⁺-Population bei Abwesenheit von CD3⁺-T-Zellen. Angestrebt wurde eine CD56⁺-Frequenz >90%.

Die NK-Zellen wurden nun für bis zu 5 Tage in einer Konzentration von 3 Mio/ml weiterkultiviert, wobei als Medium RPMI10% mit zusätzlich 10% Humanserum (HuS), 100 U/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-15 verwendet wurde.

II.2.6.2 Degranulationsassay

Für den Degranulationsassay wurden nun einerseits die isolierten NK-Zellen und andererseits Zellen der NK-92-Linie verwendet. Dafür erfolgte die Koinkubation der Effektorzellen mit den vorbehandelten Neuroblastomzellen auf 96-Well-Platten im Verhältnis 1:1, sofern nicht anders angegeben. Als Negativkontrolle diente ein Well mit Effektor ohne Targetzellen, als Positivkontrolle ein Well mit Effektorzellen und den die Degranulation stimulierenden Substanzen PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (2 µg/ml). Neben den NK- und Neuroblastomzellen wurden zudem der gegen CD107a gerichtete und mit PE

gekoppelte Antikörper (bzw. dessen Isotyp) hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank erfolgte die Zugabe von BD GolgiStop™ (0,13 µl pro 200 µl - Well), gefolgt von weiteren 2 Stunden Inkubation. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, gefolgt von der Lebend/Tot-Färbung und Waschschritten mit FACS-Puffer. Diese Schritte wurden analog zum im Abschnitt 4a beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Um die Effektorzellen in der Durchflusszytometrie von den Neuroblastomzellen differenzieren zu können, wurden die NK-92 vor der Koinkubation markiert mit CFSE, analog zur Markierung der Targetzellen in den ivK-Assays (siehe Abschnitt II.2.5). Für die isolierten NK-Zellen hingegen wurde eine Antikörperfärbung gegen CD56 und CD3 angewandt, um zusätzlich noch die restlichen T-Zellen und andere nicht-NK-PBMCs aus der Auswertung ausschließen zu können. Hierfür wurde mit dem Programm *FlowJo* mittels sukzessivem Gating (s.o.) die vitale CD3⁺CD56⁺-Zellpopulation selektiert und hiervon die CD107a⁺-Population sowie die MFI (CD107a) bestimmt. Der Anteil an CD107a⁺-Zellen sowie die Fluoreszenzintensität und damit die Dichte der auf die Zelloberfläche translozierten CD107a-Proteine wurde als Korrelat für die Ausprägung der erfolgten Degranulation verwendet.

Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte wiederum mit *GraphPad Prism*.

II.2.7 Statistische Analysen

Die Auswertung und statistische Analyse der qPCR erfolgte direkt mit der Software *CFX Maestro* und wurde im Anschluss zusätzlich mittels manueller Anwendung der $\Delta\Delta C_q$ -Methode bestätigt.

Für alle anderen statistischen Tests wurde *GraphPad Prism* verwendet. Für den Vergleich zweier unabhängiger Parameter kam ein ungepaarter zweiseitiger t-Test zur Anwendung, im Falle mehrerer Variablen erfolgte der Einsatz einer ungepaarten einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA). Als Ergebnisse wurden dabei die Resultate des *Dunnnett's multiple comparisons test* verwendet.

In der Auswertung des RTCA-Assays wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Zum einen erfolgte der direkte Vergleich der relativen normalisierten Zellindizes nCI_{rel} nach einer bestimmten Zeitspanne, nämlich 60 Minuten nach Zugabe der Effektorzellen.

Zum anderen wurden mittels *GraphPad Prism* mathematische Funktionen an die Kurven (Veränderung des nCI_{rel} über die Zeit nach Effektorzugabe) modelliert, um die verschiedenen Ansätze nicht nur zu einem bestimmten Zeitpunkt, sondern über den gesamten Kurvenverlauf vergleichen zu können. Dazu wurde die Funktion der nichtlinearen Regression verwendet und ein einphasiger Zerfall an die Kurve im Intervall [35 min ; 300 min] nach Effektorzugabe modelliert. Die ersten 30 Minuten wurden nicht miteinbezogen, da sich hier der Zellindex als Nachwirkung des Pipettiervorgangs noch recht volatil darstellte. Als Surrogatparameter für die Stärke der Zytolyse wurde dann schließlich das Plateau der modellierten Funktionen miteinander verglichen. Dabei wurden wieder die oben beschriebenen statistischen Tests eingesetzt.

Generell gilt bezüglich der Kodierung der erreichten p-Wertmaße:

* $\triangleq p < 0,05$, ** $\triangleq p < 0,01$, *** $\triangleq p < 0,001$ und **** $\triangleq p < 0,0001$

III Ergebnisse

III.1 N-myc-Expression

Zunächst sollte der Effekt einer Inkubation der Neuroblastomzellen mit ATO beziehungsweise Posaconazol auf die Expression des Onkoproteins N-myc herausgearbeitet werden. Verwendet wurden wie auch für die weiteren Versuche die beiden Zelllinien LS und SK-N-SH. Für die verschiedenen notwendigen Behandlungsdauern und -konzentrationen wurde sich an den Ergebnissen der in Abschnitt III.2.1 beschriebenen Vorversuchen zur durchflusszytometrischen Ligandenexpressionsanalyse orientiert. Damit wurden die Zellen mit ATO für 12h behandelt in Konzentrationen von 1 μM , 3 μM und 5 μM . Posaconazol hingegen wurde für einen Zeitraum von 24h hinzugegeben in 3 μM , 10 μM und 30 μM . Im Anschluss erfolgte jeweils die Bestimmung der relativen Onkoproteinmenge mittels qPCR.

Nach Vorbehandlung mit ATO konnte für Zellen der LS-Reihe eine deutliche, dosisabhängige Verminderung der N-myc-Expression dargestellt werden. Im Ansatz mit 5 μM ATO war die Expression auf weniger als ein Zehntel im Vergleich zur NaCl-Kontrolle reduziert: Die relative normalisierte Expression (rnE) betrug 0,088 mit einem 95 %-Konfidenzintervall (95CI) von 0,053 bis 0,146 und einem p-Wert $<0,0001$. Auch unter einer Dosis von 3 μM ATO zeigte sich noch eine signifikante Herunterregulation mit einer rnE von 0,228 (95CI = [0,048; 1,086], $p=0,0167$). Im Gegensatz dazu ergab sich für 1 μM ATO eine verstärkte N-myc-Expression, welche jedoch betragsmäßig deutlich geringer ausfiel als die Veränderungen unter den höheren Konzentrationen (rnE = 1,787, 95CI = [1,585; 2,01], $p=0,0066$). In Abbildung 3 ist die Auswirkung der Dosis auf die Expression dargestellt.

Diese Ergebnisse entstanden aus einem umfangreichen Versuchsansatz, bei dem für jede ATO-Dosis drei verschiedene LS-Zellkulturen unabhängig voneinander im Sinne von biologischen Replikaten behandelt wurden. Schließlich wurde nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese aus jedem solchen Replikat die qPCR synchron in dreifacher Ausfertigung als technische Replikate durchgeführt. Da die folgend beschriebenen Ergebnisse auf Experimenten ohne biologische Replikate basieren, konnte dort keine weiterführende statistische Auswertung angewendet werden. Trotzdem wurden auch diese Versuche mit technischen Triplikaten durchgeführt.

Nachdem für LS die ausgeprägte und signifikante N-myc-Herunterregulation gezeigt worden war, folgte als nächstes die Überprüfung mit den Zellen der SK-N-SH-Reihe. Darin liegt das *MYCN*-Onkogen im Kontrast zu den LS nicht stark amplifiziert vor. Die Messung der N-myc-Expression nach Inkubation mit ATO ergab ebenfalls eine Herunterregulation des Genprodukts mit steigenden ATO-Dosierungen. Allerdings war diese von geringerer Ausprägung als in den LS. So ergab sich für die Maximaldosis 5 μM eine relative normalisierte Expression von 0,181, was in etwa einer halb so starken Expressionsminderung im Vergleich zu LS entspricht. Für 3 μM beziehungsweise 1 μM ATO betrug die relative normalisierte Expression 0,417 beziehungsweise 0,541. In Abbildung 3 sind auch die Ergebnisse für SK-N-SH dargestellt.

Die qPCR-basierten Experimente zur N-myc-Expressionsanalyse nach Posaconazolbehandlung waren aufgrund wiederholt global erhöhter Cq-Werte nicht auswertbar. Daher kann im Rahmen dieser Arbeit hierzu keine Aussage getroffen werden.

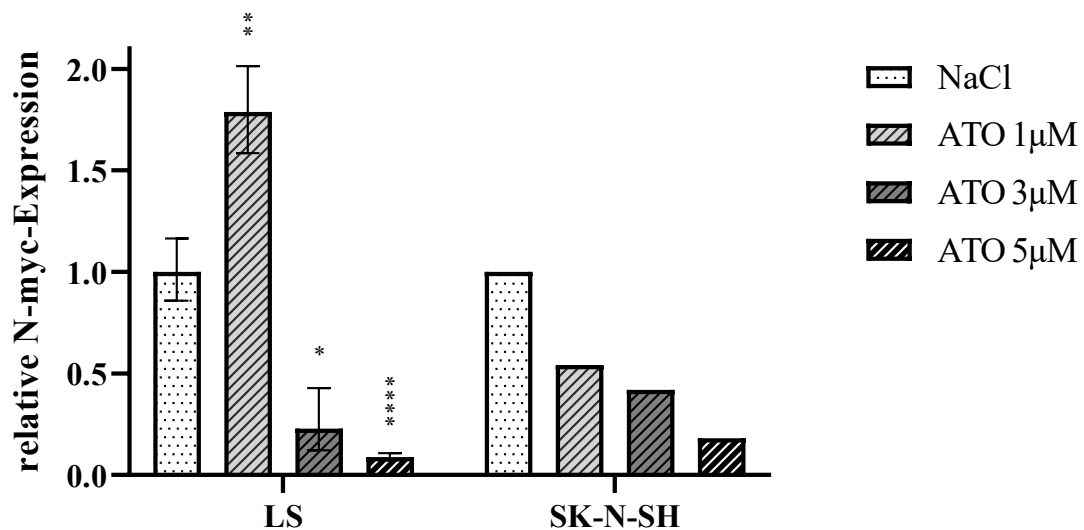


Abbildung 3: N-myc-Herunterregulation durch ATO. Die qPCR-ermittelte Expression von N-myc nach Vorbehandlung mit ATO (12h) ist in Verhältnis gesetzt zur N-myc-Expression der mit NaCl behandelten Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen \pm Standardabweichung. Im Gegensatz zu dem Versuch mit SK-N-SH wurde die PCR mit LS nicht nur mit 3 technischen Replikaten, sondern auch 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Daher wurde nur für LS eine statistische Testung mittels einfaktorieller Varianzanalyse durchgeführt. Es gilt * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$

III.2 Expression von Oberflächenliganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren

Wie in der Einleitung erwähnt, konnte in Untersuchungen bereits eine inverse Korrelation nachgewiesen werden zwischen der Expression von N-myc und der Expression bestimmter Antigenstrukturen auf der Tumorzelloberfläche, die als Liganden an aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wirken. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Liganden auf den Neuroblastomzelllinien LS und SK-N-SH untersucht hinsichtlich Hoch- oder Herabregulation nach Behandlung mit ATO beziehungsweise Posaconazol.

III.2.1 Vorarbeiten

Zunächst mussten als Grundlage für die folgenden Experimente die optimale Dosis und Behandlungszeit bestimmt werden. Dafür wurden die LS-Zellen, welche entsprechend der Arbeitshypothese aufgrund ihrer *MYCN*-Amplifikation einen Effekt zeigen sollten, verschiedenen Konzentrationen von ATO und Posaconazol für jeweils 12 h, 24 h, 36 h und 48 h ausgesetzt. Im Anschluss erfolgte nach spezifischer Färbung von MICA/B und ULBP-2/5/6 die durchflusszytometrische Messung der NKG2DL-Expression. Hier konnte die stärkste Hochregulation nach einer ATO-Behandlungsdauer von 12 h sowie nach einer Posaconazol-Behandlungsdauer von 24-36 h festgestellt werden (Ergebnisse nicht abgebildet).

Bei ATO fiel zudem mit zunehmender Zeitdauer der zytotoxische Effekt des Medikaments ins Gewicht, da nach Inkubationszeiten von mehr als 24 h unter hohen ATO-Konzentrationen (5 μ M) nicht mehr ausreichend Zellen zur durchflusszytometrischen Expressionsanalyse vorhanden waren.

Somit fiel die Entscheidung, für die folgenden Versuche eine Behandlungsdauer für ATO von 12 h und für Posaconazol für 24 h zu wählen. Dies betraf nicht nur die Experimente zur Ligandenexpression, sondern aufgrund der angenommenen Korrelation zu N-myc einerseits und der Erkennung durch NK-Zellen andererseits auch die qPCR-Versuche (s.o.) sowie die Versuche mit nachfolgender Lyse durch NK-Zellen.

Hinsichtlich der verwendeten Konzentrationen orientierten wir uns an Erfahrungswerten aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe sowie an realistischen Plasmaspiegeln, die nach Einnahme der Medikamente erzielt werden können. Letztendlich wurde der Großteil der

Versuche mit ATO-Konzentrationen von 1 μM , 3 μM und 5 μM durchgeführt. Posaconazol wurde in den Konzentrationen 3 μM , 10 μM und 30 μM angewendet.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse zum Einfluss auf die verschiedenen Ligandenfamilien vorgestellt.

III.2.2 PD-L1 und PD-L2

Die Expression der inhibitorisch auf die NK-Zellen wirkenden PD-L1 (CD274) und PD-L2 (CD273) zeigte sich durch Inkubation mit ATO oder Posaconazol nicht beeinflusst. Bereits im Ausgangszustand ließen sich die Liganden auf LS praktisch nicht nachweisen, die Fluoreszenzmessung der spezifischen Antikörper zeigte im Vergleich zu den jeweiligen Isotypen auch nach Vorbehandlung kein stärkeres Signal. Dies ist in Abbildung 4B dargestellt.

III.2.3 Nectin-2 und PVR

Nectin-2 (CD112) und PVR (CD155) agieren beide als Liganden an dem aktivierenden Rezeptor DNAM-1 auf NK-Zellen. Auch für sie konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Effekt infolge der Medikamentenbehandlung festgestellt werden, im Gegensatz zu PD-L1 und PD-L2 ließen sie sich aber im FACS grundsätzlich deutlich auf der Zelloberfläche von LS nachweisen. In einem Versuchsansatz ließ sich eine leichte Tendenz zur verstärkten Expression von PVR nach 12-stündiger ATO-Behandlung feststellen (siehe Abbildung 4A), letztendlich war dies jedoch in der Gesamtschau der Versuche nicht signifikant, ebenso wenig unter Posaconazol.

Nectin-2 hingegen zeigte im gleichen Ansatz hingegen einen leichten Trend zur Herunterregulation mit steigender ATO-Konzentration und geringer Signifikanz für 5 μM ($p=0,0226$), zu sehen in Abbildung 4A.

III.2.4 NKG2DL

Zur Gruppe der auf den aktivierenden NKG2D-Rezeptor wirkenden Liganden gehören *MHC class I related genes* (MIC) sowie *UL16 binding proteins* (ULBP). In der

vorliegenden Arbeit fanden für die Untersuchung der Oberflächenexpression zwei Kombinationsantikörper Anwendung, zum einen anti-MICA/B und zum anderen anti-ULBP-2/5/6.

Damit zeigte sich auf LS nach 12-stündiger Inkubation mit ATO eine signifikant gesteigerte Expression sowohl von MICA/B als auch von ULBP-2/5/6 im Vergleich zur NaCl-Kontrolle. Mit zunehmender Konzentration des Medikaments stieg auch die Expression beider Marker weiter an. Bei 5 μM ATO ergibt sich schließlich im Vergleich zur NaCl-Kontrolle jeweils eine Hochsignifikanz von $p < 0,0001$ für MICA/B und ULBP-2/5/6. Auch schon unter den geringen Konzentrationen von 1 μM und 3 μM zeigte sich jedoch eine signifikante Hochregulation geringerer Ausprägung. Im Gegensatz dazu ließen sich für SK-N-SH keine Veränderungen der Oberflächenexpression der NKG2D-Liganden nach ATO-Behandlung notieren.

Im nächsten Schritt wurde der gleiche Versuch mit Posaconazol statt ATO wiederholt. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h zeigt sich für MICA/B auf LS ebenfalls eine signifikante Steigerung der Ligandendichte mit zunehmender Posaconazoldosis. Nach Vorbehandlung mit 30 μM Posaconazol konnte eine deutlich gesteigerte Expression von MICA/B auf LS im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ gezeigt werden. Der Fold Change in Bezug auf die MFI war mit $(174/45 =) 3,9$ sogar noch stärker ausgeprägt als nach Vorbehandlung mit 5 μM ATO $(295/153 = 1,9)$. Auf SK-N-SH dagegen hatte die Inkubation mit Posaconazol für 24 h in verschiedenen Konzentrationen ebenfalls keinen Einfluss hinsichtlich der MICA/B-Ausprägung.

Im Gegensatz zum Ansatz mit ATO, in dem mit LS zusätzlich eine hochsignifikante und stark ausgeprägte Vermehrung des ULBP-2/5/6-Signals auffiel mit einem Fold Change von $(9654/255 =) 37,9$ bei 5 μM , konnte dies für Posaconazol nicht bestätigt werden. Stattdessen zeigte sich hier eine hochsignifikante Verminderung der Expression, wobei diese bei Konzentrationen von 3 μM und 10 μM stärker ausfiel als bei 30 μM . Dies galt sowohl für die Zellreihe LS als auch für SK-N-SH. Bei beiden Zellarten war die Signalabschwächung unter 3 μM und 10 μM Posaconazol signifikant auf einem Niveau von $p < 0,0001$.

Der Einfluss der Medikamente auf die NKG2DL-Oberflächendichte beider Zellreihen ist in Abbildung 4C-F dargestellt.

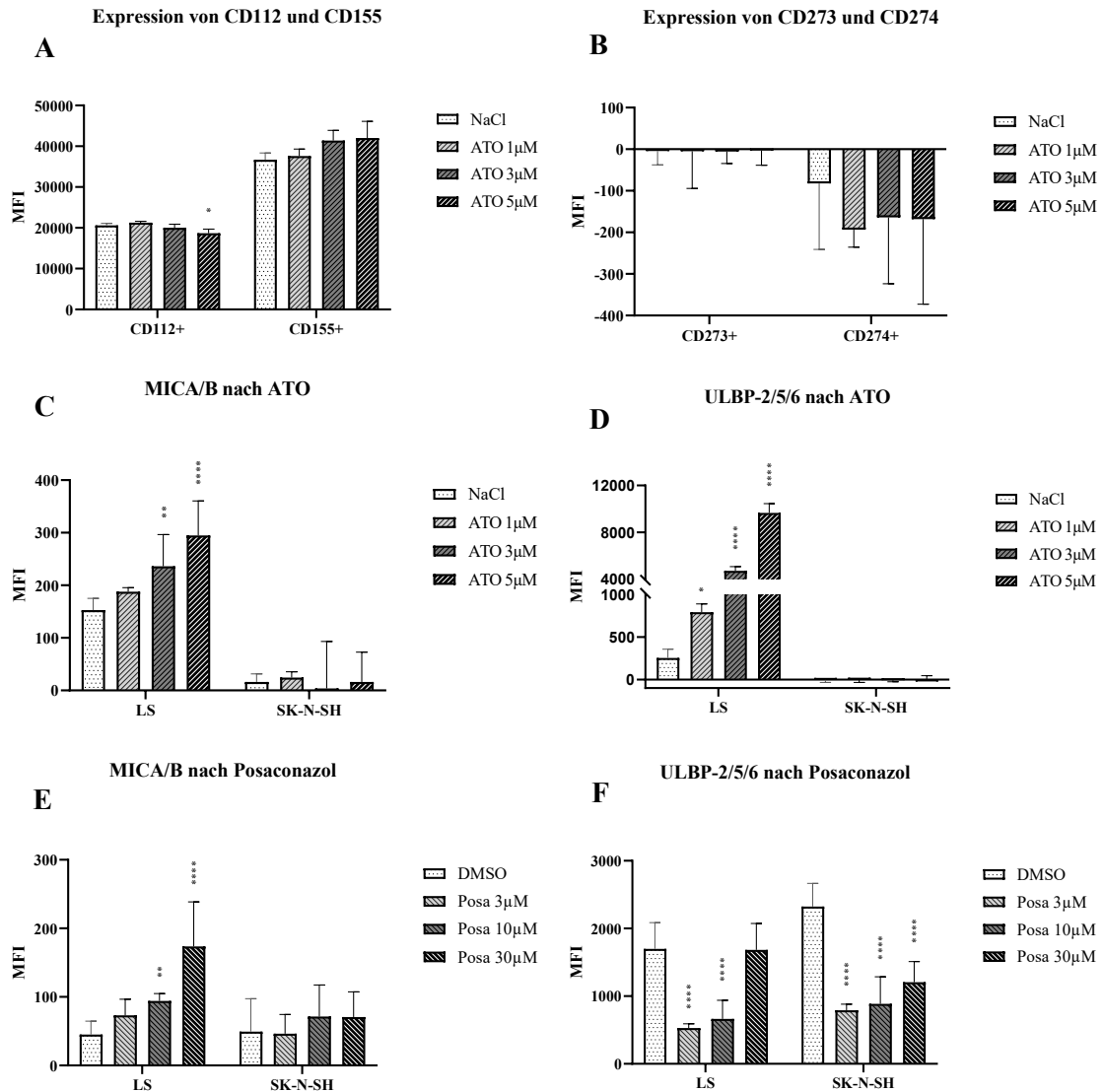


Abbildung 4: Expression von NK-Liganden auf Neuroblastomzellen. A-B. Expression von CD112, CD155, CD273 und CD274 auf LS nach Vorbehandlung mit ATO (12h). **C-F.** Expression von MICA/B und ULBP-2/5/6 auf LS und SK-N-SH nach Vorbehandlung mit ATO (12h) bzw. Posaconazol (24h). Alle Ergebnisse sind Resultate von Experimenten mit biologischen Triplikaten. Fehlerbalken entsprechen +Standardabweichung. Es gilt * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

Für die *MYCN*-amplifizierte Zellreihe LS konnte somit gezeigt werden, dass nach einer 12-stündigen Inkubation mit ATO zwei dosisabhängige Effekte eintreten. Zum einen nimmt die intrazelluläre N-myc-Expression ab, zum anderen steigt die Oberflächenexpression von MICA/B und ULBP-2/5/6. Diese inverse Korrelation wird in Abbildung 5

deutlich. Der Zusammenhang ist dabei nicht streng linear, sondern eher logarithmischer Natur, wie auch aus den Regressionskurven in der Abbildung ersichtlich wird.

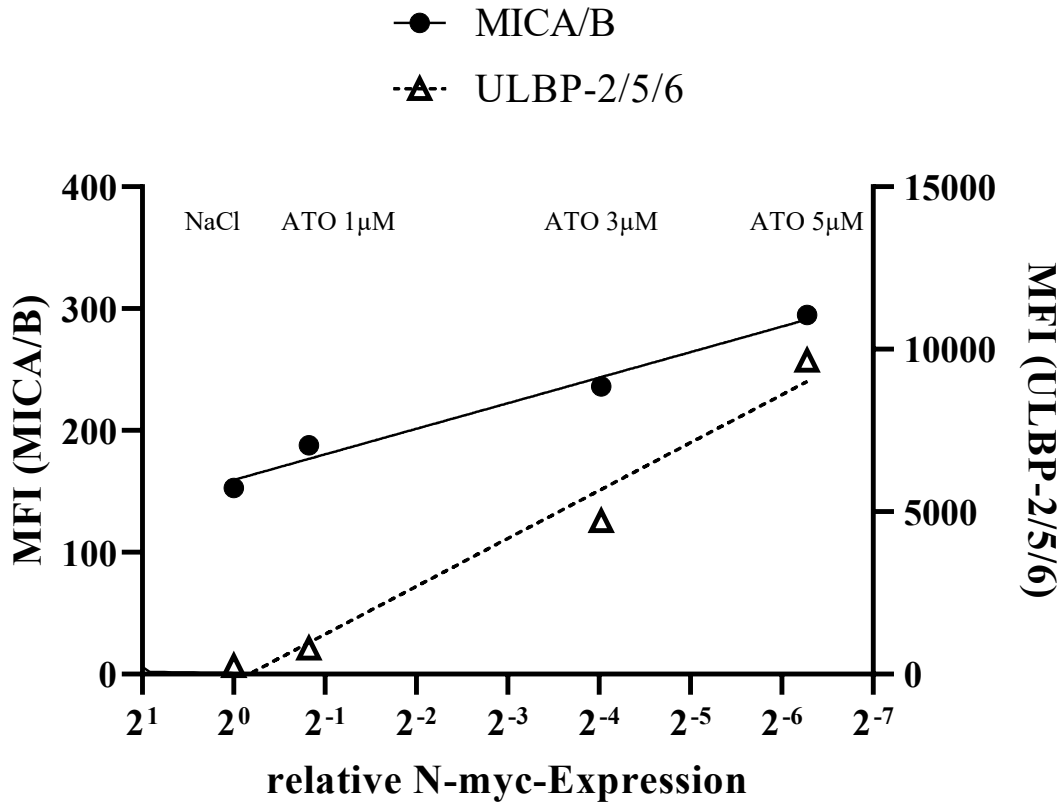


Abbildung 5: Korrelation N-myc-Expression zu NKG2DL-Expression. Das Diagramm stellt die Beziehung zwischen der intrazellulären N-myc-Expression und der Oberflächenexpression von MICA/B und ULBP-2//6 auf LS in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit ATO (12h) dar. Als Datengrundlage dienten die oben beschriebenen Versuche (Abb. 3 und Abb. 4C-D). Die Regressionskurve wurde mit *GraphPad Prism* erstellt und entspricht einer *semilog line (Nonlinear Regression)*.

III.3 CD107a-Degranulationsassay

Nachdem der positive Einfluss der beiden untersuchten Medikamente auf die Expression aktivierender Oberflächenliganden bestätigt worden war, sollte im nächsten Schritt die verstärkte Aktivierung der zytotoxischen NK-Zellen bestimmt werden. Als Surrogatmarker diente hierbei das Protein CD107a, welches im Rahmen der Degranulation aktivierter NK-Zellen vom Zellinneren an die Plasmamembran translokiert. Somit ist die Menge an

CD107a auf der Zelloberfläche ein Maß für die Aktivierung der NK-Zellen. Nach Vorbehandlung der Neuroblastomzellen und anschließender Koinkubation mit den Effektor-(NK-)Zellen wurde die CD107a-Menge auf der NK-Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen.

III.3.1 NK-92

Zunächst wurden dafür Zellen der Linie NK-92 eingesetzt. Diese wiesen in der durchflusszytometrischen Messung jedoch keine klare Trennung nach CD107a-positiver und CD107a-negativer Population auf. In Abbildung 6A ist dargestellt, wie die Gesamtpopulation nach Zugabe der Targetzellen im Verhältnis 10:1 (Effektor:Target) in Bezug auf die CD107a⁺-Intensität kaum verändert erscheint. Trotzdem ließ sich wie auch bei den unten beschriebenen Ansätzen mit frisch isolierten NK-Zellen ein deutlicher Effekt nach Zugabe der Positivkontrolle Ionomycin und PMA ausmachen. Da jedoch den NK-92 die dichotome Populationsstruktur fehlte, wurde zur Auswertung die MFI verwendet statt des relativen Anteils an CD107a-positiven Zellen. Damit zeigte sich eine geringe Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit den mit ATO vorbehandelten LS-Zellen im Vergleich zur Inkubation mit den nicht vorbehandelten LS-Zellen, vereinbar mit einer stärkeren Aktivierung. Diese war umso ausgeprägter, je stärker die ATO-Konzentration zur Vorbehandlung der Neuroblastomzellen war. Nach Inkubation mit den mit 5 µM vorbehandelten LS wiesen die NK-Zellen eine MFI (CD107a) von 1206 auf, wohingegen die NK-Zellen nach Inkubation mit den mit NaCl vorbehandelten LS nur eine MFI (CD107a) von 1114 ergaben. Diese verstärkte Aktivierung der NK-92 nach Vorbehandlung der LS mit 5 µM ATO war mit $p=0,0081$ signifikant. Auch der Ansatz mit 3 µM ATO ergab gegenüber der NaCl-Kontrolle eine verstärktes Fluoreszenzsignal von jedoch geringerer Ausprägung und Signifikanz. Abbildung 7A zeigt die MFIs der verschiedenen Ansätze.

III.3.2 Spender-NK-Zellen

Da dieser Versuch sich mit der Funktion und Struktur der NK-Zellen befasste, erfolgte der Entschluss, die Experimente mit frisch isolierten NK-Zellen aus gesunden Probanden zu wiederholen. Damit einher ging die Annahme, mit diesen frischen Zellen die Realität

im menschlichen Körper besser abbilden zu können ohne den artifiziellen Charakter einer Zellkultur.

Bei der durchflusszytometrischen Messung zeigten sich dann auch zwei verschiedene Populationen, eine CD107a-positive und eine CD107a-negative (siehe Abbildung 6BII). Im Ausgangszustand, d.h. in der Negativkontrolle ohne Targetzellen, betrug der Anteil an CD107a⁺-Zellen 8,7%. In der Positivkontrolle, also nach Zugabe von Ionomycin und PMA, konnte dieser Anteil auf 89,1% gesteigert werden. Bei Inkubation mit LS (nur NaCl als Vorbehandlung) im Verhältnis 1:1 ergab sich eine CD107a⁺-Population von 52,9% und damit eine deutliche Steigerung gegenüber der Negativkontrolle, vereinbar mit einer Degranulation der NK-Zellen in Anwesenheit der Neuroblastomzellen. Wurden die LS mit ATO für 12 h vorbehandelt, konnte diese Degranulation gesteigert werden: Bei 3 µM ATO betrug der Anteil von CD107a⁺-Zellen 57,0%, bei 5 µM ATO 59,2%. Diese Ergebnisse waren bei Anwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse signifikant mit $p=0,0012$ (3 µM) beziehungsweise $p<0,0001$ (5 µM). Die Vorbehandlung der LS mit 30 µM Posaconazol führte ebenfalls zu gering erhöhten Anteilen der CD107a⁺-Population im Vergleich zum Ausgangswert, was mit $p=0,0842$ jedoch keine Signifikanz erreichte. Abbildung 6C zeigt die Auswirkung der Vorbehandlung auf das CD107a-Signal in Form von Histogrammen.

Aufgrund des begrenzten Spendermaterials wurden für SK-N-SH nur die Vorbehandlungen NaCl (Kontrolle) und 5 µM ATO miteinander verglichen. Dabei wiesen die NK-Zellen im Gegensatz zum Ansatz mit den LS keine stärkere Degranulation nach ATO auf, sondern sogar eine Verringerung der CD107a⁺-Population von 39,9% (NaCl) auf 36,9% (ATO), $p=0,0023$. Die Ergebnisse der Experimente mit isolierten Spender-NK-Zellen sind in Abbildung 7B dargestellt.

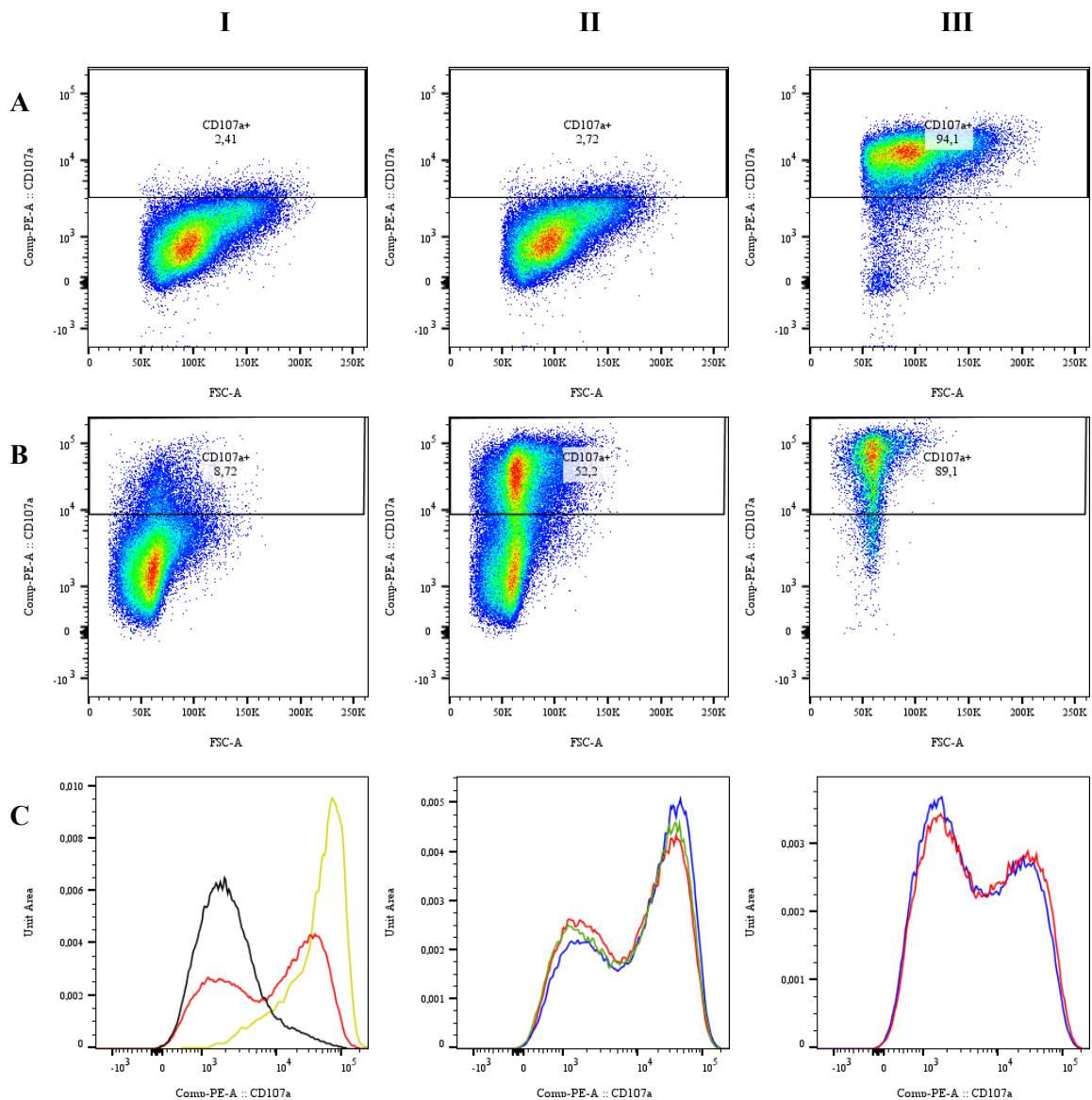


Abbildung 6: Degranulationsassay in der Durchflusszytometrie. Nach Koinkubation der NK-Zellen mit vorbehandelten LS wurde die CD107a-Expression auf den NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. **A.** NK-92 als Effektorzellen. **B.** Spender-NK-Zellen als Effektorzellen. **A/B.** Jeder Punkt im Dotplot entspricht einer Zelle, deren CD107a-Expression mit dem y-Wert dieses Punkts korreliert. Die x-Achse ist ein Maß für die Größe der Zelle. **A/BI:** Negativkontrolle: NK-Zellen ohne Inkubation mit LS. **A/BIII:** NK-Zellen nach Koinkubation mit LS. **A/BIII:** Positivkontrolle: NK-Zellen mit Zugabe von Ionomycin und PMA.

C. Darstellung des Versuchs mit Spender-NK-Zellen (aus **B**) als Histogramme. x-Achse: Fluoreszenzintensität des anti-CD107a-AK. **CI-II:** LS als Targetzellen. **CIII:** SK-N-SH als Targetzellen. Legende der Kurvenfarben: schwarz: Negativkontrolle. gelb: Positivkontrolle. rot: Koinkubation mit LS/SK-N-SH (Vorbehandlung mit NaCl). blau: Koinkubation mit LS/SK-N-SH (Vorbehandlung mit 5 μ M ATO, 12h). grün: Koinkubation mit LS (Vorbehandlung mit 30 μ M Posaconazol, 24h).

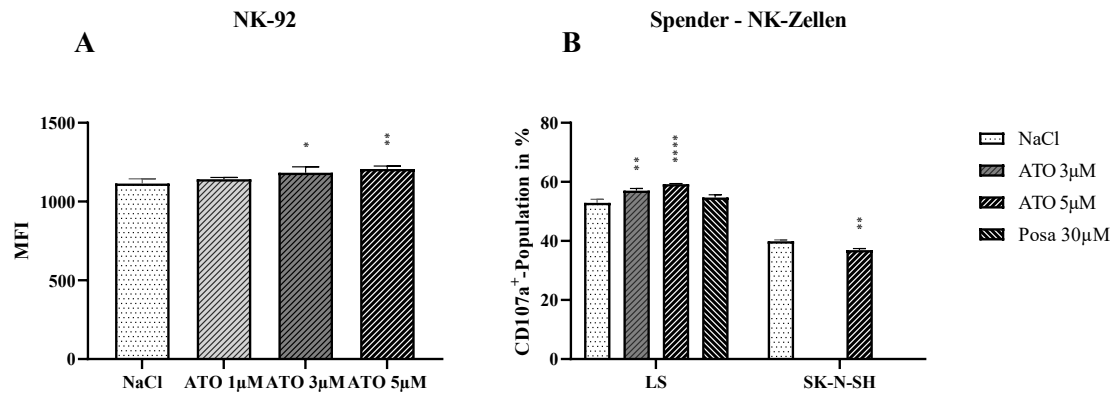


Abbildung 7: Degranulation von NK-Zellen in Abhängigkeit der Vorbehandlung der Targets. Abgebildet ist die CD107a-Expression auf NK-Zellen als Korrelat der Degranulation nach Koinkubation mit vorbehandelten Neuroblastomzellen. **A.** Degranulation von NK-92 nach Koinkubation mit LS. Diese wurden mit ATO (12h) vorbehandelt. Die y-Achse repräsentiert die MFI (CD107a) und nicht die CD107a⁺-Population, da nicht wie in **B** zwei getrennte Populationen existieren (siehe Text). **B.** Degranulation von isolierten Spender-NK-Zellen nach Koinkubation mit LS bzw. SK-N-SH. Diese wurden mit ATO (12h) bzw. Posaconazol (24h) vorbehandelt. Die Ergebnisse sind Resultate von Experimenten mit 3 biologischen Replikaten. Fehlerbalken entsprechen +Standardabweichung. Es gilt *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

III.4 Zelluläre Zytotoxizität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die NK-Zellen mit einer verstärkten Aktivierung auf die Vorbehandlung der LS-Neuroblastomzellen reagierten, sollte im letzten Schritt untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch in einer stärkeren Zytotoxizität der Effektorzellen niederschlägt. Dafür wurden zwei verschiedene Messmethoden verwendet, um das Ausmaß des in-vitro-Kills (ivK) zu quantifizieren.

III.4.1 Durchflusszytometrie

Zu Beginn erfolgte die Bestimmung des Anteils toter Neuroblastomzellen nach Inkubation mit den NK-92 mittels Durchflusszytometrie, einer Methode, die laborintern für die Auswertung von in-vitro-Kills (ivK) nicht-adhärenter Tumorzellen etabliert war. Um initial das optimale Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen zu bestimmen, wurde ein ivK ohne Vorbehandlung der LS-Neuroblastomzellen in verschiedenen Effektor/Target-

Ratios durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Ratio von 10:1 (10 Effektorzellen auf 1 Targetzelle) den stärksten zytotoxischen Effekt erzeugte mit hier circa 14 % spezifischem Kill. In Abbildung 8A ist der spezifische Kill in Abhängigkeit verschiedener Ratios dargestellt.

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern eine Vorbehandlung der Neuroblastomzellen mit ATO sich in einer verstärkten zellulären Zytotoxizität äußert. Dafür wurden LS und SK-N-SH vor Durchführung des ivK für 24 h mit 1 μ M ATO beziehungsweise NaCl (Kontrolle) inkubiert. Der ivK selbst wurde dann erneut mit verschiedenen Effektor/Target-Ratios durchgeführt, im Einzelnen 1:1, 3:1, 10:1 und 30:1. Die Ergebnisse können der Abbildung 9A/B entnommen werden. Beispielhaft sind in Abbildung 8B zudem die verschiedenen Erscheinungsbilder in der durchflusszytometrischen Darstellung bei den unterschiedlichen Ratios abgebildet. Insgesamt bestätigt sich zunächst das Ergebnis des Vorversuchs, wonach mit höheren Verhältnissen von Effektorzellen zu Targetzellen ein stärkerer spezifischer Kill erreicht wird. Insbesondere war dieser bei 30:1 für LS nochmals deutlich höher als bei 10:1 mit etwa 43 % gegenüber 24 %. Für SK-N-SH dagegen konnte mit einer weiteren Steigerung der Effektor/Target-Ratio kein stärkerer Kill als bei 10:1 verzeichnet werden.

Die Vorbehandlung mit 1 μ M ATO ergab bei beiden Neuroblastomzellreihen keinen signifikanten Effekt auf das Ausmaß der Zytotoxizität. Allerdings war für alle Effektor/Target-Ratios außer 30:1 der spezifische Kill von LS nach ATO-Vorbehandlung tendenziell etwas höher, ohne jedoch die Kriterien eines statistisch signifikanten Zusammenhangs zu erfüllen. Beispielhaft betrug der Mittelwert des spezifischen Kills bei einer Effektor/Target-Ratio von 3:1 ohne Vorbehandlung 19,5 % gegenüber 20,9 % nach Vorbehandlung mit 1 μ M ATO mit $p=0,1483 > 0,05$. Zusammenfassend ließ sich somit in diesem Versuchansatz keine signifikante Änderung der zellulären Zytotoxizität in Abhängigkeit einer 24-stündigen Vorbehandlung mit 1 μ M ATO feststellen.

Auch die Vorbehandlung von LS mit 20 μ M Posaconazol für 36 h ergab keine signifikante Änderung des spezifischen Kills durch NK-92.

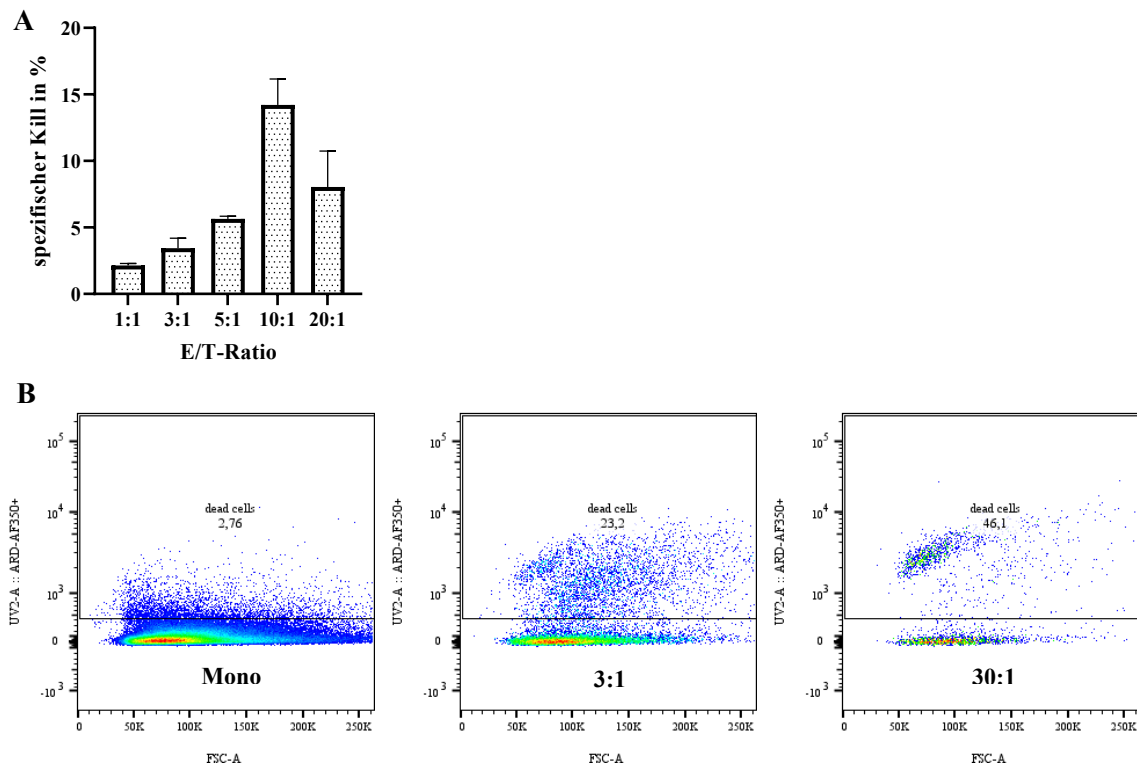


Abbildung 8: Einfluss der Effektor/Target-Ratios auf den spezifischen Kill. **A.** spezifischer Kill von LS (ohne Vorbehandlung) durch NK-92 in Abhängigkeit der E/T-Ratio. Die Ergebnisse sind Resultate eines Experiments mit 3 biologischen Replikaten. Fehlerbalken entsprechen +Standardabweichung. **B.** Repräsentative Dot Plots mit Darstellung des Anteils toter LS-Zellen nach Inkubation mit NK-92 in verschiedenen E/T-Ratios (Mono ohne NK-Zellen, 3:1, 30:1). Die y-Achse repräsentiert die Fluoreszenzintensität des Markers für tote Zellen. Der über der horizontalen Linie liegende Teil der Zellen wird somit als tot gewertet. **A** und **B** sind voneinander unabhängige Experimente.

Um die realen in-vivo-Gegebenheiten des Zusammenspiels zwischen Tumor und Immunzellen passender abzubilden, wurde der Kill nochmals mit adhärenen Neuroblastomzellen wiederholt. Die Koinkubation von Effektoren und Targets im Verhältnis 10:1 erfolgte also im adhärenen Proliferationsstatus letzterer anstatt in einer Suspensionslösung. Mit diesem Ansatz konnte eine statistisch signifikante Steigerung des spezifischen Kills mit steigender Dosis der Vorbehandlung mit ATO dargestellt werden, siehe Abbildung 9C. Jedoch bewegten sich die Prozentsätze des spezifischen Kills nur im Bereich von etwa 1-4%, zudem war die Steigerung der gemessenen Zytotoxizität von geringem absolutem Ausmaß. So betrug der Kill in der Kontrolle (NaCl-Vorbehandlung) 0,9%, gegenüber 3,6% nach Vorbehandlung mit 5 μ M ATO. Dies war mit $p=0,0067$ signifikant.

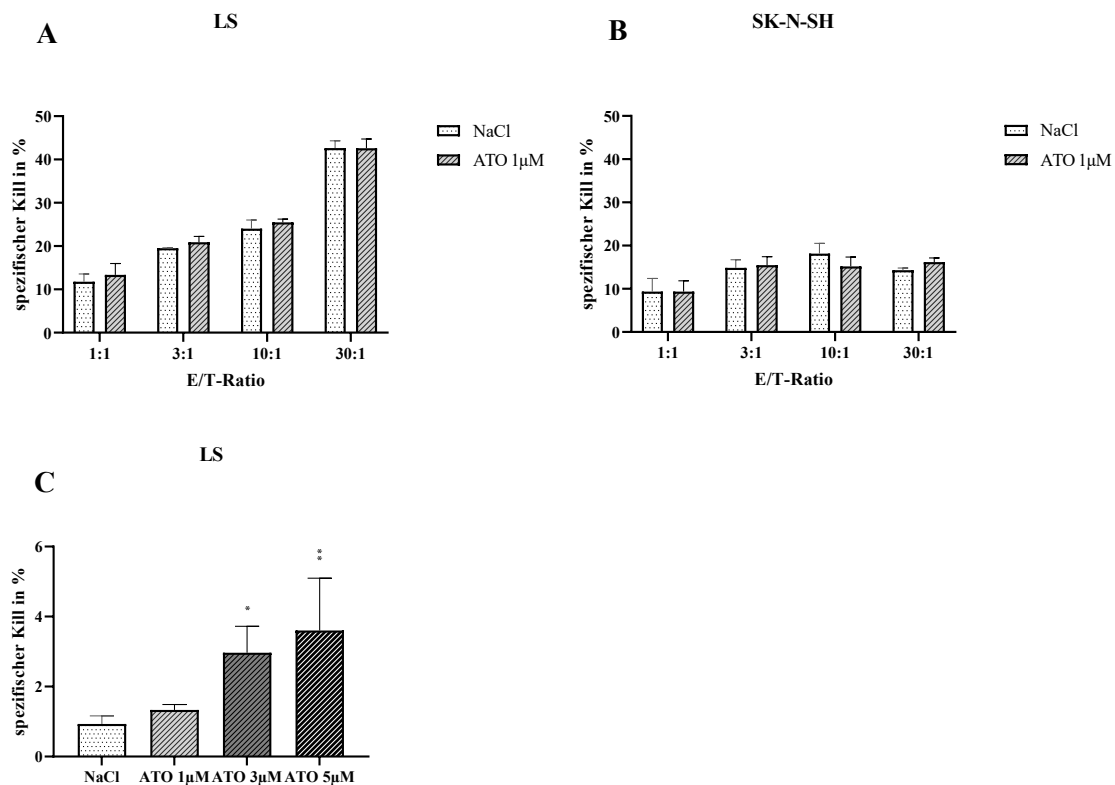


Abbildung 9: in-vitro-Kill. **A.** spezifischer Kill von LS (nach Vorbehandlung mit 1 μ M ATO für 24h) durch NK-92 in verschiedenen E/T-Ratios. **B.** spezifischer Kill von SK-N-SH (nach Vorbehandlung mit 1 μ M ATO für 24h) durch NK-92 in verschiedenen E/T-Ratios. **C.** spezifischer Kill von LS (nach Vorbehandlung mit ATO für 12h) durch NK-92. Im Gegensatz zu **A** fand dieser Versuch an adhärenen Targetzellen statt. Die E/T-Ratio ist dabei nicht exakt zu bestimmen. Zu beachten ist die abweichende Skalierung der y-Achse bei **C**. Alle Ergebnisse sind Resultate von Experimenten mit 3 biologischen Replikaten. Fehlerbalken entsprechen +Standardabweichung. Es gilt * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

III.4.2 RTCA

Letztendlich schien diese angewandte Methode der Durchflusszytometrie nicht vollends geeignet, die tatsächliche zelluläre Zytotoxizität gegenüber den adhärenen Tumorzellen valide zu detektieren. Daher wurde zusätzlich noch eine andere Methode eingesetzt, um die Vulnerabilität der Neuroblastomzellen gegenüber den NK-Zellen mit und ohne Vorbehandlung zu messen. Dafür wurde das System *XCELLigence® RTCA SP* von Agilent Technologies verwendet, welches die adhärenen Eigenschaften der Tumorzellen ausnutzt, um von der Impedanzänderung des Wellbodens auf die Masse an vitalen Zellen zu schließen.

Sowohl die Behandlung mit ATO beziehungsweise Posaconazol als auch der Kill durch NK-92 erfolgte in den Wells, ohne dazwischen oder im Anschluss die Zellen ablösen zu müssen. Zunächst konnte wie erwartet festgestellt werden, dass der Zellindex (als Korrelat der Anzahl noch lebender Zellen) stärker über die Zeit abfällt, je mehr NK-Zellen pro Well hinzugegeben werden. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt. Um die Menge an zugegebenen Effektoren unter den verschiedenen Ansätzen trotz unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Zellreihen vergleichbar zu machen, erfolgt die Angabe im Folgenden nicht als absolute NK-Zellzahl, sondern als Effektor/Target-Ratios.

Für alle hier beschriebenen Versuche betrug die Effektor/Target-Ratio 3:1, wobei sich die Menge der Targetzellen auf den Zeitpunkt der Zellaussaat bezieht, also vor Proliferation und Vorbehandlung. Bis zum Pipettieren des Kills fand folglich noch eine Vermehrung der Targetzellen statt, womit effektiv von einer niedrigeren Ratio zum Zeitpunkt des Kills auszugehen ist. Diese ist jedoch mit dieser Methode nicht exakt zu bestimmen. Als Zeitrahmen für die Auswertung aller im Folgenden beschriebenen Versuche wurden die ersten 300 Minuten des Kills festgelegt, da im Anschluss der Zellindex teilweise wieder zu steigen begann (sichtbar in Abbildung 10), vereinbar mit einer erneuten Proliferation der Neuroblastomzellen.

Die graphische Darstellung des relativen Zellindex nCI_{rel} über die Zeit zeigt für LS eine deutlich schnellere und stärkere Abnahme im Sinne einer ausgeprägteren NK-vermittelten Zytotoxizität, wenn die Neuroblastomzellen mit ATO vorbehandelt wurden. Der Effekt steigt dabei mit zunehmender ATO-Konzentration an. In der Abbildung 11A ist dieser Zusammenhang abgebildet. Zur Quantifizierung dieses Effekts wurden mittels nicht-linearer Regression Funktionen modelliert und deren Plateaus zum Vergleich der verschiedenen Ansätze herangezogen. Je niedriger das Endplateau, desto ausgeprägter der zytotoxische Effekt. Die modellierten Kurven für LS nach Vorbehandlung mit ATO sind ebenfalls in Abbildung 11A dargestellt. Das Plateau und damit die Anzahl der verbleibenden vitalen Zellen nach Inkubation mit NK-92 ist nach 3 μ M und 5 μ M ATO hoch signifikant ($p < 0,0001$) geringer als in der Kontrolle, wobei mit steigender Dosis das Ausmaß des Effekts steigt. Bei 5 μ M ATO ergibt sich eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität

gegenüber der NaCl-Kontrolle bei Reduktion des Plateaus von 70,6% auf 48,1% (siehe Abbildung 12A).

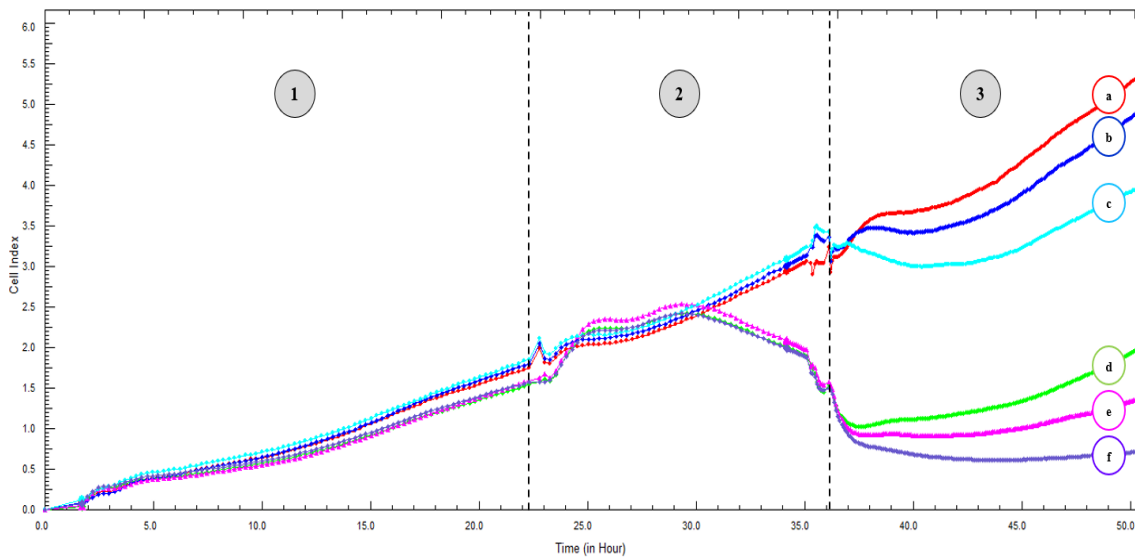


Abbildung 10: Zeitliche Phasen und Beispielverlauf eines RTCA-Experiments. Ausschnitt eines Screenshots der Benutzeroberfläche der *RTCA Software*, Phasenkennungen (Zahlen) und Graphenkennungen (Buchstaben) selbst eingefügt. Der Zellindex wird über die Zeit aufgetragen. Abgebildet ist der Übersicht wegen nur ein Teil der Graphen des Experiments. Sie stellen jeweils den Mittelwert von 3-5 Replikaten mit derselben Behandlung dar. In **Phase 1** proliferieren die ausgesäten Zellen. Die Graphen verlaufen annähernd gleich, da noch die gleichen Umgebungsbedingungen für alle Ansätze gelten. **Phase 2** kennzeichnet die Behandlung mit dem Medikament, hier ATO. Die Kurven **d-f** bilden die mit 5 μM ATO behandelten Zellen ab. Deutlich sichtbar ist der Rückgang des Zellindex nach circa 6h. Die Kontrollansätze (**a-c**), welche mit NaCl inkubiert werden, proliferieren dagegen weiter. Am Ende von Phase 2 wird das Medikament entfernt und neues Medium hinzugegeben. **Phase 3** stellt schließlich den Kill dar. Zu Beginn werden die NK-Zellen hinzugegeben. Die Kurven **a** und **d** sind jeweils die Kontrollen ohne Effektorzellen. Die Graphen **c** und **f** stellen Ansätze mit einer dreifach so hohen NK-Zellzahl dar wie die Ansätze **b** und **e**, sodass letztere nicht so stark abfallen beziehungsweise früher wieder ansteigen. Zur Auswertung werden die Kill-Ansätze in den ersten 5h der Phase 3 mit den jeweiligen Kontrollen ohne Effektoren ins Verhältnis gesetzt. Hier b/a und c/a sowie e/d und f/d . Siehe auch Abschnitt Methoden.

Auch bei den SK-N-SH imponiert ein stärkerer nCI_{rel} -Abfall nach ATO-Vorbehandlung, wobei die Effekte der Vorbehandlung mit 3 μM und 5 μM von geringerer statistischer Signifikanz sind ($p=0,0011$ bzw. $p=0,0004$). Die Differenz zwischen den Plateaus von 5 μM und der Kontrolle ist dabei von vergleichbarem Ausmaß wie bei den LS. In Abbildung 11B ist der Verlauf des nCI_{rel} in Abhängigkeit der verschiedenen Vorbehandlungsdosen beziehungsweise die modellierten Kurven abgebildet.

Schließlich wurde der Versuch nochmals durchgeführt mit Posaconazol statt ATO als Medikament zur Vorbehandlung der Neuroblastomzellen. Dafür wurde das Medikament

Noxafil von MSD Sharp & Dohme eingesetzt, da unter dem Lösungsmittel DMSO des für die meisten anderen Experimente eingesetzten Posaconazol VETRANAL™ ein starker Rückgang des Zellindex zu verzeichnen war. Der Wirkstoff wurde wieder in den Konzentrationen 3 μ M, 10 μ M und 30 μ M verwendet. Auffallend war ein deutlich schnellerer Abfall des Zellindex nach Zugabe der Effektorzellen im Vergleich zum oben beschriebenen Versuch. Dies ist damit erklärbar, dass für dieses Experiment eine neue Charge NK-92 aufgetaut worden war mit dementsprechend möglicherweise anders ausgeprägten zytotoxischen Eigenschaften.

Ein Vergleich der Plateaus der modellierten Funktionen als inverses Korrelat der NK-vermittelten Zytotoxizität ergab für LS gering signifikante Erhöhungen des Kills nach Vorbehandlung mit 10 μ M und 30 μ M Posaconazol, ebenfalls wieder in strikter Dosis-Wirkungs-Korrelation. Das Plateau konnte durch die Präinkubation mit 30 μ M Posaconazol von 15,8 % auf 9,5 % gesenkt werden ($p=0,0298$). Auch die SK-N-SH zeigten sich nach Einfluss von Posaconazol mit steigender Dosierung vermehrt vulnerabel gegenüber der NK-Zytolyse mit einer Senkung des Plateaus von 36,4 % auf 24,9 % ($p<0,0001$). Die Kurvenverläufe und der Vergleich der Plateaus nach Vorbehandlung der beiden Zellreihen ist in den Abbildungen 11C-D und 12C-D dargestellt.

Der schnellere Abfall des Zellindex nach 24-stündiger Vorinkubation der LS mit dem Medikament zeigt sich dabei insbesondere in den ersten beiden Stunden des Kills. So kann bei Betrachtung des Zeitpunkts 60 min nach NK-Zellzugabe für LS konstatiert werden, dass die Vorbehandlung mit Posaconazol zu einem hochsignifikant stärkeren Abfall des Zellindex führt ($p<0,0001$). Während in dem mit NaCl behandelten Kontrollansatz der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu den Wells ohne Effektorzugabe noch 55,7 % beträgt, sinkt er zunehmend mit steigender Konzentration der Posaconazol-Dosis: Bei 3 μ M ergibt sich ein Wert von 41,9 %, bei 10 μ M von 36,4 %, bei 30 μ M von 34,2 %. Dagegen ist nach 60 min bei den SK-N-SH kein signifikanter Unterschied der Zytotoxizität in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit Posaconazol festzustellen. Dieses Resultat wird in Abbildung 12E illustriert.

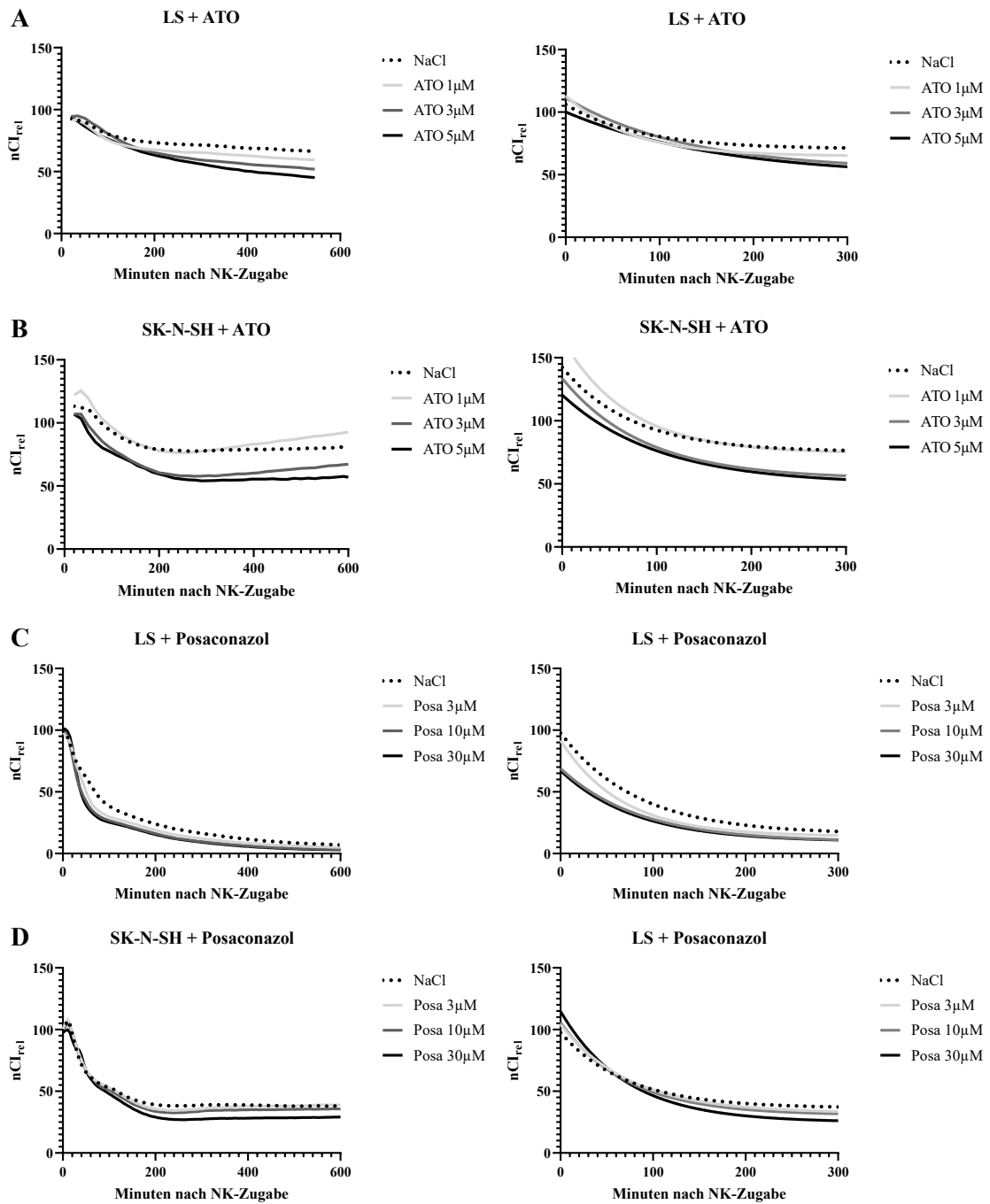


Abbildung 11: RTCA-Kurven. Abgebildet sind die Ergebnisse vier verschiedener RTCA-Experimente zur Quantifizierung der NK-vermittelten Zytolyse von Neuroblastomzellen in Abhängigkeit einer Vorbehandlung mit ATO oder Posaconazol. Die x-Achse kennzeichnet jeweils die verstrichene Zeit in Minuten nach Zugabe der NK-92-Zellen zu den Targetzellen. Die y-Achse entspricht dem auf den Zeitpunkt $t=0$ min normalisierten relativen Zellindex nCl_{rel} (näheres siehe Methoden). Dieser entspricht 100 % minus den spezifischen Kill. Die linke Spalte ist die tatsächliche Kurve im Verlauf der ersten 600 Minuten des Kills. Jeder Punkt ist der Mittelwert von 3-5 Replikaten. Die rechte Spalte stellt die anhand des Verlaufs in den ersten 300 Minuten modellierte Kurve dar. **A.** Kill von LS nach Vorbehandlung mit ATO (12h). **B.** Kill von SK-N-SH nach Vorbehandlung mit ATO (12h). **C.** Kill von LS nach Vorbehandlung mit Posaconazol (24h). **D.** Kill von SK-N-SH nach Vorbehandlung mit Posaconazol (24h).

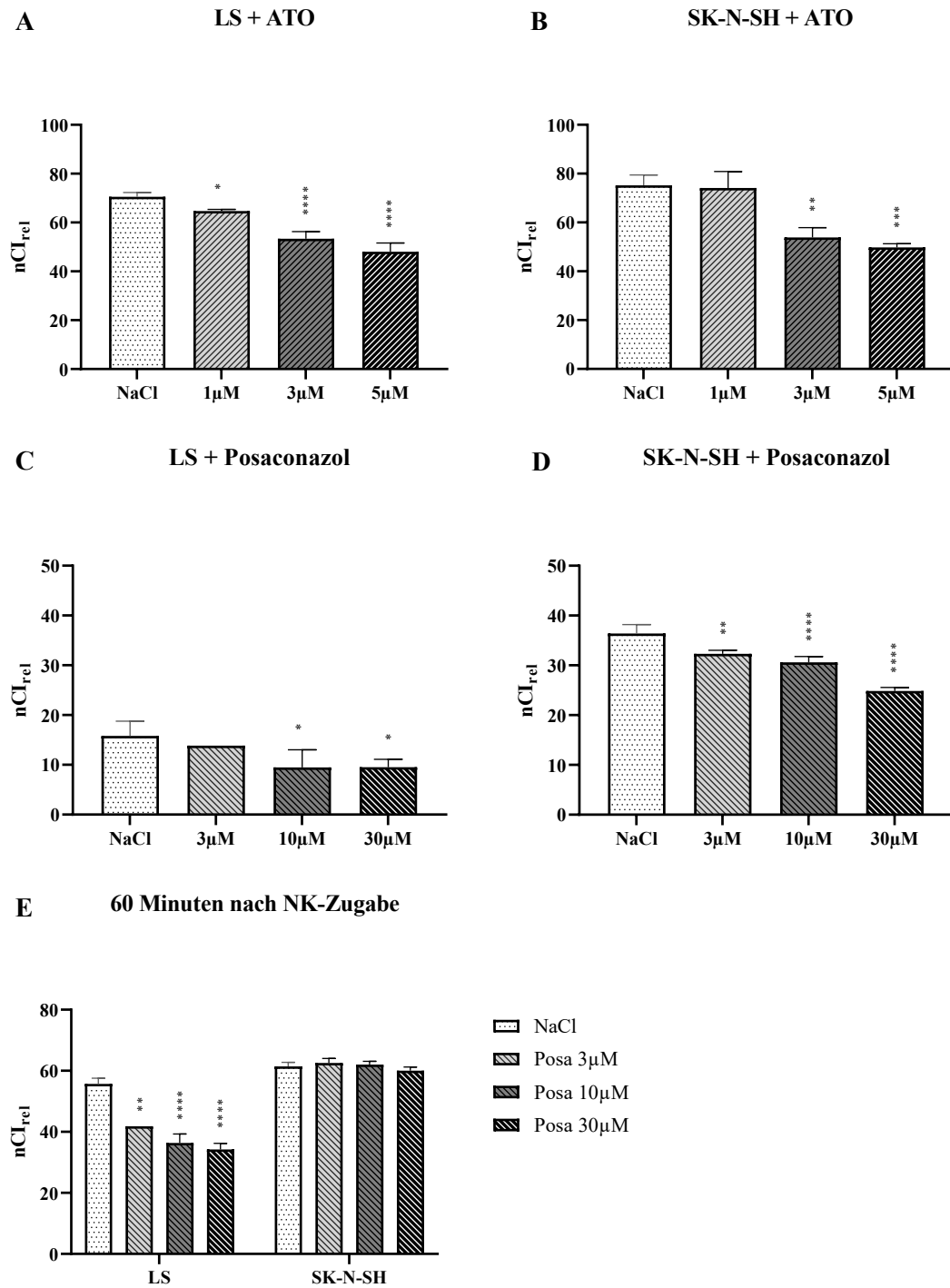


Abbildung 12: Vergleich der Zytotoxizität im RTCA-Assay. A-D. Statistischer Vergleich der Plateaus der in Abbildung 11 dargestellten modellierten Kurven in Abhängigkeit der Vorbehandlung von LS bzw. SK-N-SH mit ATO (12h) bzw. Posaconazol (24h). **E.** Statistischer Vergleich des normalisierten relativen Zellindex nCl_{rel} 60 Minuten nach Zugabe der NK-Zellen in Abhängigkeit der Vorbehandlung von LS bzw. SK-N-SH mit Posaconazol (24h).

Fehlerbalken entsprechen +Standardabweichung. Es gilt *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001

IV Diskussion

Das Neuroblastom ist eine klinisch heterogen verlaufende Tumorerkrankung im Kindesalter. Das Spektrum reicht von spontan regredienten Verläufen bei Säuglingen über hochmaligne Tumoren, die sich trotz aggressiven Therapieschemata mit operativer Entfernung, Radiatio, GD2-Immuntherapie und Chemotherapie bis hin zur Stammzelltransplantation refraktär zeigen oder rezidivieren. Angesichts dessen ist der Bedarf nach neuen Therapieoptionen weiterhin hoch, um die Prognose von Hochrisiko-Neuroblastomen nachhaltig verbessern zu können.

In dieser Arbeit wurde auf Zellkulturebene untersucht, inwiefern durch Behandlung mit Arsentrioxid (ATO) beziehungsweise Posaconazol eine Herunterregulation von N-myc erreicht werden kann sowie die Neuroblastomzellen dadurch vulnerabler gegenüber einer Zytolyse durch NK-Zellen werden.

IV.1 Beurteilung der Ergebnisse

IV.1.1 Effekt von ATO auf N-myc-Expression

IV.1.1.1 ATO führt zu N-myc-Herunterregulation

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die Inkubation von Neuroblastomzellen mit ATO zu einer signifikanten Reduktion der *MYCN*-Genexpression führt [115]. Dies wurde in dieser Arbeit bestätigt, indem mittels qPCR die Menge an N-myc-mRNA nach zwölfstündiger Behandlung mit ATO quantifiziert wurde. Es fiel eine deutliche dosisabhängige Abnahme der mRNA-Menge auf, vereinbar mit einer Herunterregulation der Genexpression. Unter der Höchstdosis von 5 μ M ATO fiel sie auf weniger als ein Zehntel des Ausgangsniveaus ab (siehe Abbildung 3). Die Analyse fand direkt im Anschluss nach der Behandlung mit dem Medikament statt, sodass über die Dauerhaftigkeit/Nachhaltigkeit der Herunterregulation keine Aussage getroffen werden kann.

Die genannte Beobachtung gilt für die Zellreihe LS, welche charakteristischerweise eine *MYCN*-Amplifikation aufweist. Dagegen war in der nicht-*MYCN*-amplifizierten Zellreihe SK-N-SH zwar ebenfalls eine reduzierte Expression des Onkogens unter ATO

detektierbar, jedoch hatte die Reduktion ein deutlich geringeres Ausmaß. Dies könnte damit zu erklären sein, dass aufgrund des fehlenden Amplifikationsstatus im Ausgangszustand bereits deutlich weniger N-myc vorliegt, welches durch medikamentöse Behandlung mit ATO supprimiert werden könnte. Dass trotzdem eine Herunterregulation erfolgt, kann einerseits damit zusammenhängen, dass teilweise in der Literatur auch für SK-N-SH zwar keine Amplifikation, jedoch ein *MYCN*-gain beschrieben ist [125]. Zum anderen ist auch bei singulärer *MYCN*-Kopienzahl eine relevante Genexpression möglich. So ist zwar mehrfach eine klare Korrelation zwischen *MYCN*-Amplifikation und verstärkter Genexpression nachgewiesen worden [126-129], doch können auch in nicht-*MYCN*-amplifizierten Zellen erhöhte mRNA-Level gemessen werden [128].

IV.1.1.2 Limitationen

Im Rahmen dieser Arbeit fand keine Bestimmung der absoluten zellulären N-myc-Expression in der Ausgangssituation statt, was die Beurteilbarkeit der Bedeutung des Amplifikationsstatus in der Reaktion auf die Behandlung mit ATO etwas herabsetzt. Dies trifft folgerichtig auch auf die weiteren Versuche zu, in denen die beiden Zelllinien als Vertreter von *MYCN*-amplifizierten beziehungsweise nicht-amplifizierten Tumoren eingesetzt wurden. Dennoch kann von einer positiven Korrelation zwischen Amplifikation und Genexpression ausgegangen, wie zuvor wiederholt von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde [126-129].

In Bezug auf die beschriebene N-myc-Herunterregulation ist anzumerken, dass hier nur die Menge an mRNA bestimmt wurde, nicht aber die Masse an vorliegendem Protein, welches letztlich die Effektorfunktionen vermittelt. Ein direkter Schluss von mRNA- auf Proteinmenge ist nicht ohne Weiteres möglich, da diverse posttranskriptionelle Mechanismen wie Regulationen von Translation oder proteosomale Degradation die Effektoraktivität von N-myc zusätzlich beeinflussen können.

Trotz allem zeigt dieser Versuch zusammengefasst und in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, dass die Behandlung insbesondere von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen mit ATO zu einer deutlichen Herunterregulation der Onkogenexpression führt.

Die Auswirkungen von Posaconazol auf den N-myc-Expressionsstatus konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Allerdings hatten bereits Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eine Suppression von N-myc in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen belegen können [115].

IV.1.2 Effekt von ATO/Posaconazol auf Interaktion mit NK-Zellen

IV.1.2.1 Regulation von Liganden an NK-Zell-Rezeptoren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit ATO das Expressionsprofil von Liganden aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren zu einem die NK-Zellen stimulierenden Phänotyp hin verschiebt. Insbesondere die Liganden des NKG2D-Rezeptors wurden unter Einfluss von ATO hochreguliert. Deren Expression konnte auch durch Einwirkung von Posaconazol stimuliert werden.

IV.1.2.1.a PD-L1 und PD-L2

Sowohl PD-L1 (CD274) als auch PD-L2 (CD273) sind Liganden am Rezeptor PD-1, der unter anderem auf zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen lokalisiert ist und dort bei Stimulation inhibitorische Signale vermittelt. Die spezifische Hemmung dieser Achse ist bereits bei unterschiedlichen Malignitäten in der Therapie von fortgeschrittenen, metastasierten Tumoren etabliert, darunter beim Melanom und Bronchialkarzinom [130]. Einige Studien konnten in den letzten Jahren auch im Neuroblastom einen geringen Effekt auf das Tumorwachstum zeigen [131, 132].

Melaiu et al. gelang 2017 der Nachweis, dass die Inhibition der N-myc-Expression *in vitro* und *in vivo* zu einer signifikanten Reduktion der PD-L1-Expression führt [133]. Da in einer Analyse verschiedener Tumorproben jedoch keine Korrelation zwischen N-myc und PD-L1 bestand, ist nicht davon auszugehen, dass letzteres ein direktes Target des Transkriptionsfaktors darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich dagegen keine Hinweise darauf, dass eine Behandlung mit ATO die Expression von PD-L1 oder PD-L2 beeinflusst. Der Nachweis einer potenziellen Herunterregulation, die mit einer vermeintlich besseren antitumoralen Immunaktivität verbunden wäre, konnte allerdings schon deswegen nicht gelingen, da

bereits im Ausgangszustand keine messbare Expression auf den Neuroblastomzellen nachweisbar war (siehe Abbildung 4B). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Melaiu et al. überein, die auf verschiedenen *MYCN*-amplifizierten Zelllinien und Tumorproben nur eine geringe bis fehlende PD-L1-Expression messen konnten [133]. In zwei großen Querschnittstudien wurde die PD-L1-Expression in Neuroblastomproben auf circa 14-19% beziffert [134, 135]. Dabei konnten Majzner et al. eine Korrelation zwischen positiver PD-L1-Expression und schlechterem Gesamt-Überleben in der Patientenkohorte darstellen [135], wohingegen bei Saletta et al. ein negativer PD-L1-Status mit einem schlechteren Gesamt-Überleben korrelierte [134]. Allerdings konnte in letztgenannter Studie ein Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von PD-L1 und einer höheren Rezidivrate hergestellt werden.

Insgesamt bleibt die Evidenz zur Bedeutung von PD-L1 in Neuroblastomen somit widersprüchlich, doch kann eine hohe PD-L1-Expression wohl als negativer prognostischer Faktor angesehen werden.

IV.1.2.1.b PVR und Nectin-2

Im Gegensatz zu PD-L1 und PD-L2 zählen PVR (CD155) und Nectin-2 (CD112) zu den Liganden des aktivierenden Rezeptors DNAM-1 [107]. Dieser führt bei Stimulation zu einer Aktivierung der NK-Zelle mit nachfolgender Zytolyse der Zielzelle. Brandetti et al. konnten einen Zusammenhang zwischen einer N-myc-Hemmung und einer vermehrten Expression von PVR feststellen [112].

Hier ergaben sich keine eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf eine veränderte Expression der beiden Liganden infolge einer zwölfstündigen Behandlung mit ATO. Während für PVR keine signifikante Hochregulation nachzuweisen war, zeigte sich in Bezug auf Nectin-2 sogar eher eine tendenziell verminderte Expression auf den *MYCN*-amplifizierten LS-Zellen (siehe Abbildung 4A). Im Allgemeinen gelten Nectin-2 und PVR zwar als Liganden am aktivierenden Rezeptor DNAM-1, jedoch mehrten sich in den letzten Jahren Erkenntnisse über eine darüber hinaus bestehende immunsuppressive Funktion als Liganden an TIGIT [136]. Aus diesem Grund könnte eine Hochregulation dieser Liganden unter Umständen die Tumorbekämpfung abschwächen, sodass die fehlende

Beeinflussung durch ATO-Behandlung in den vorgestellten Experimenten nicht notwendigerweise negativ zu werten ist.

IV.1.2.1.c NKG2DL

Ein weiterer aktivierender Rezeptor an der Oberfläche von NK-Zellen ist NKG2D, zu dessen acht bekannten Liganden MICA, MICB und ULBP1-6 zählen.

In dieser Arbeit konnte in Übereinstimmung mit arbeitsgruppeninternen Vorversuchen [115] gezeigt werden, dass es unter Einfluss von ATO zu einer dosisabhängigen Hochregulation der NKG2DL-Expression auf der Oberfläche von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen kommt (siehe Abbildung 4C-D). Dies deckt sich mit Beobachtungen von Kim et al. [113] und Alex et al. [114], die in den vergangenen Jahren ebenfalls von einer ATO-abhängigen Verstärkung der NKG2DL-Expression auf diversen hämatologischen Zelllinien berichteten, allerdings noch nicht auf Neuroblastomzellen.

Angesichts der durch Brandetti et al. [112] beobachteten Hochregulation von NKG2DL durch N-myc-Hemmung und den in dieser Arbeit im Abschnitt III.1 vorgestellten eigenen Erkenntnissen über die Möglichkeit der N-myc-Hemmung via ATO-Behandlung kann davon ausgegangen werden, dass ATO in diesem Fall nicht nur als unspezifischer Stressor zu einer NKG2DL-Hochregulation führt, sondern dies spezifisch über die Hemmung der N-myc-Expression zu erklären ist. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass in den SK-N-SH-Zellen ohne *MYCN*-Amplifikation keine Beeinflussung der NKG2DL-Dichte durch ATO nachweisbar war.

Ein möglicher Mechanismus der N-myc-Inhibition ist die Hemmung des Hedgehog-Signalwegs durch ATO, da dessen Zielgene unter anderem auch *MYCN* umfassen. Neben vielen weiteren, in Abschnitt I.4.4 beschriebenen Effekten ist die spezifische Hh-Inhibition von ATO auf Ebene der Gli-Transkriptionsfaktoren bekannt [78-83].

Das Antimykotikum Posaconazol zeigte in verschiedenen präklinischen Versuchen der vergangenen Jahre ebenfalls die Fähigkeit zur Hh-Inhibition, im Gegensatz zu ATO aber auf der Ebene von Smo [97, 98]. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob auch eine Behandlung mit Posaconazol die Expression der aktivierenden NKG2D-Liganden fördern kann.

In der Tat konnte gezeigt werden, dass die 24-stündige Inkubation mit Posaconazol zu einer zunehmenden signifikanten Hochregulation von MICA/B mit steigender Dosierung führt (siehe Abbildung 4E). Analog zu ATO gilt dies nur für die *MYCN*-amplifizierte Zelllinie LS, in der nicht-amplifizierten Kontrolle dagegen konnte kein signifikanter Einfluss von Posaconazol auf die MICA/B-Expression herausgearbeitet werden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass diese Regulation von NKG2DL über die Hemmung der N-myc-Expression abläuft. Die *MYCN*-Genexpression in Abhängigkeit von Posaconazol wurde im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht direkt bestimmt, doch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ergaben eine deutliche Herunterregulation in zwei anderen, *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien, Kelly und LA-N-1 [115].

In jenem Kontext bestätigte sich auch die NKG2DL-Hochregulation unter Posaconazol-Behandlung. Im Gegensatz zu den hier präsentierten Ergebnissen galt dies jedoch auch für Mitglieder der ULBP-Gruppe. Währenddessen zeigten sich hier verminderte ULBP-Expressionslevel als Folge der Einwirkung von Posaconazol, unabhängig vom *MYCN*-Amplifikationsstatus der Zellen (siehe Abbildung 4F). Eventuell deutet diese Diskrepanz zum Verhalten von MICA/B auf einen andere Regulationsmechanismus für ULBP hin, der zusätzlich zu N-myc existiert und durch ATO und Posaconazol jeweils unterschiedlich beeinflusst wird. Die abweichenden Ergebnisse in den zuvor durchgeführten Experimenten lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass dort nicht die kumulative Expression von ULBP2/5/6 untersucht wurde, sondern von ULBP1, -2 und -3. Auch innerhalb der ULBP-Gruppe sind somit vermutlich divergierende Regulationsmechanismen wirksam. Zudem wurden in den Vorversuchen Primärantikörper ohne direkte Fluoreszenzkopplung verwendet [115].

In diesem Zusammenhang sind die 2019 getroffenen Beobachtungen von Veneziani et al. [137] interessant, die ebenfalls die Expression von NK-Zell-aktivierenden Liganden auf Neuroblastomzellen nach *MYCN*-Inhibition untersuchten. Bemerkenswerterweise zeigte sich dabei eine signifikante Herunterregulation sowohl von PVR und Nectin-2, als auch von ULBP-Vertretern. Konsequenterweise waren in der Folge dann die Neuroblastomzellen auch weniger anfällig gegenüber einer NK-Zytolyse. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die *MYCN*-Hemmung jedoch nicht über die Behandlung mit ATO oder Posaconazol erreicht, sondern mit dem BET-Bromodomäneninhibitor JQ1. Die Autoren jener Studie attributieren die auf den ersten Blick kontraintuitiv

erscheinenden Beobachtungen einer durch JQ1 parallel ausgelösten Reduktion von intrazellulären ROS sowie Hemmung von C-myc, welche beide gleichsinnig mit der Expression von aktivierenden NK-Zell-Liganden korrelieren.

Auch für ATO und Posaconazol ist jeweils eine Herunterregulation von C-myc beschrieben [98, 138], jedoch sind beide unter anderem auch mit einem Anstieg der intrazellulären ROS-Level vergesellschaftet [70, 92]. Zumindest bei ATO scheint die C-myc-Hemmung keinen nachteiligen Effekt auf die Expression der NKG2D-Liganden zu haben, bei Posaconazol könnte dies dahingegen eine mögliche Erklärung für die beobachtete ULBP-Herunterregulation sein.

IV.1.2.1.d Limitationen

Wie bereits angedeutet, bestand eine Limitation dieses Versuchsansatzes darin, nur jeweils einen Kombinationsantikörper für MICA/B und ULBP2/5/6 zu verwenden. Dadurch konnten keine feinsinnigeren, möglicherweise gegenläufigen Regulationen der einzelnen Liganden detektiert werden. Außerdem kann über ULBP1, -2 und -4 keine Aussage getroffen werden.

Darüber hinaus beschränken sich die dargestellten Ergebnisse auf die Behandlung mit 12 (ATO) beziehungsweise 24 (Posaconazol) Stunden. Diese wurden anhand eines orientierenden Vorversuchs festgelegt, bei dem nur die Expression von NKG2DL auf LS bestimmt wurde. Möglicherweise ließ sich beispielsweise bei den Liganden von DNAM-1 für andere Behandlungsdauern auch ein regulativer Einfluss von ATO oder Posaconazol auf die Expression beobachten.

Weiterhin muss bei der Induktion von der Beobachtung der unterschiedlichen Effekte in LS und SK-N-SH auf die Bedeutung von *MYCN* als abhängiger Faktor und wahrscheinlicher Zwischenschritt in der Regulation bedacht werden, dass die beiden Zelllinien als jeweils einziger Vertreter eines *MYCN*-amplifizierten und eines nicht-amplifizierten Zellmodells verwendet wurden, diese beiden sich aber auch in verschiedenen weiteren (genomischen) Merkmalen unterscheiden. Daher sind andere, von *MYCN* unabhängige Faktoren als potenzielle Ursachen für die beobachteten Unterschiede in der Bedeutung für die Regulation nicht ausgeschlossen.

Zuletzt sei angemerkt, dass die Expression der Liganden wie auch bei den Versuchen mit *MYCN* direkt im Anschluss an die Behandlung bestimmt wurde. Somit kann keine Aussage über die längerfristige Veränderung der Ligandendichte getroffen werden. Denkbar sind sowohl eine über einen längeren Zeitraum stabile Expression, als auch eine rasche Rückkehr zum Ausgangsniveau oder gar einen weiteren Anstieg, falls das zeitliche Maximum noch nicht erreicht gewesen wäre.

Nichtsdestotrotz konnte uneindeutig gezeigt werden, dass es unter ATO zu einer starken, dosisabhängigen Hochregulation der NKG2DL-Expression auf Neuroblastomzellen kommt. Ein Zusammenhang mit der Regulation von *MYCN* kann angenommen, da dieser Effekt nur auf *MYCN*-amplifizierten Zellen zu beobachten war. Für MICA/B gelten diese Aussagen auch bei einer Behandlung mit Posaconazol.

IV.1.2.2 NK-Zell-Aktivierung und Zytotoxizität

Nachdem sowohl für ATO als auch für Posaconazol ein Effekt auf das Ligandenexpressionsmuster nachgewiesen wurde, sollte geprüft werden, inwieweit sich dies in eine stärkere NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität übersetzen lässt. Als Maß wurde dafür einerseits die Degranulation der NK-Zellen und andererseits der spezifische Kill als Gradmesser der zytolytischen Funktion herangezogen.

IV.1.2.2.a ATO

Die Bestimmung der NK-Zell-Degranulation erfolgte mittels CD107a-Assay, wobei sowohl die Zelllinie NK-92 als auch frisch isolierte NK-Zellen von gesunden Spendern Verwendung fanden.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl NK-92 als auch Spender-NK-Zellen bei Inkubation mit Neuroblastomzellen als Ausdruck ihrer Aktivierung stärker degranulieren, wenn die Neuroblastomzellen mit ATO vorbehandelt wurden (siehe Abbildung 7). Der Effekt ist umso stärker, je höher die verwendete ATO-Dosis war. Dabei ist das Ergebnis bei Verwendung der Spender-NK-Zellen stärker zu gewichten, da sie in ihren physiologischen Eigenschaften den im Körper eines Tumorpatienten zirkulierenden Immunzellen deutlich näherstehen als die artifiziell extrakorporal am Leben erhaltene Zelllinie NK-92. Dieser Umstand wurde auch in den Versuchen deutlich, da bei letzterer im Gegensatz zu

den isolierten NK-Zellen keine dichotome CD107a-Populationsstruktur darstellbar war. Jenes Problem ist auch schon in der Literatur beschrieben [139].

Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die verstärkte Aktivierung der NK-Zellen letztlich auf eine durch ATO bedingte verminderte N-myc-Expression im Neuroblastom zurückzuführen ist. Grundlage für die Annahme ist die Beobachtung, dass die verstärkte Degranulation nur bei Inkubation mit *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen vorhanden war. Stattdessen war bei der nicht-amplifizierten Zelllinie SK-N-SH sogar eine signifikant geringere NK-Zell-Aktivierung bei ATO-Behandlung der Targetzellen feststellbar. Welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist, bleibt unklar.

Im weiteren Schritt sollte die Effektorfunktion der NK-Zellen in Abhängigkeit einer ATO-Vorbehandlung direkt quantifiziert werden. Mittels zwei verschiedener Methoden, Durchflusszytometrie und RTCA, wurde die Zytotoxizität gegenüber den Neuroblastomzellen bestimmt. Hier ergab sich in beiden Methoden eine Steigerung der NK-Zell-vermittelten Zytolyse, wenn die Neuroblastomzellen mit ATO vorbehandelt worden waren. Der Effekt zeigte sich umso größer, je höher die verwendete ATO-Dosis. Insbesondere der RTCA-Assay soll hier beachtet werden, da dort die Versuchsbedingungen deutlich genauer die physiologischen Gegebenheiten im Patienten und der Tumorumgebung widerspiegeln. Im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Bestimmung fand der Kill nämlich an adhärennten Neuroblastomzellen und in Echtzeit statt, zudem musste zur Auswertung keine erneute Aufbereitung und Färbung der Targetzellen erfolgen. Dieser Umstand könnte erklären, dass der spezifische Kill in der Durchflusszytometrie generell deutlich geringer ausfiel und zusätzlich die Differenz zwischen vorbehandelten Zellen und der Negativkontrolle kleiner war.

Entgegen den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Versuche war im RTCA-Assay die Verstärkung der Zytolyse nicht nur bei den *MYCN*-amplifizierten LS, sondern auch bei den nicht-*MYCN*-amplifizierten SK-N-SH zu beobachten (siehe Abbildung 12). Dies widerspricht den Erwartungen, da bei Zutreffen der Hypothese (Steigerung der Zytolyse durch Herunterregulation von N-myc) diese vor allem im Falle einer hohen N-myc-Ausgangskonzentration (bei den Zellen mit *MYCN*-Amplifikation) zum Tragen kommen sollte. Es kann zwar konstatiert werden, dass bei LS der Einfluss von ATO schon bei niedrigeren Dosen zu beobachten war, doch trotzdem passt die Zytotoxizitätssteigerung

gegenüber SK-N-SH nicht zu den oben beschriebenen Erkenntnissen bezüglich der fehlenden NKG2DL-Induktion unter ATO. Im Gegensatz dazu lässt sich die Tatsache damit in Übereinkunft bringen, dass auch bei SK-N-SH eine geringer ausgeprägte Herunterregulation von N-myc aufgefallen war. Insgesamt lässt dies vermuten, dass zusätzlich zur NKG2DL-Hochregulation noch andere Mechanismen wirksam sind, die die Zellen durch die ATO-Behandlung anfälliger gegenüber einer NK-Zell-Zytolyse werden lassen. Angesichts der pleiotropen Effekte von ATO auf Krebszellen erscheint diese Hypothese sehr naheliegend.

Auch Kim et al. [113] und Alex et al. [114] hatten zuvor bei verschiedenen Zelllinien die Beobachtung gemacht, dass ATO nicht nur zur verstärkten Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren führt, sondern im Weiteren auch die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität erhöht. Die letztgenannte Arbeitsgruppe konnte zudem auch in vivo bei ATO-behandelten Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie eine höhere CD107a-Expression auf NK-Zellen nachweisen als in der gesunden, ATO-naiven Kontrolle [114].

IV.1.2.2.b Posaconazol

Da eine Hochregulation von NKG2DL auch nach Behandlung mit Posaconazol beobachtet worden war, erfolgte zuletzt auch für dieses Medikament die Überprüfung hinsichtlich eines potenziellen Einflusses auf die Interaktion mit NK-Zellen.

Tatsächlich zeigte sich wie bei ATO eine signifikant gesteigerte Degranulation im Sinne einer vermehrten Aktivierung der NK-Zellen nach Kontakt mit den Neuroblastomzellen. Folgerichtig konnte dann auch eine gesteigerte Zytolyse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Somit wird klar, dass eine Behandlung mit Posaconazol nicht nur die Expression aktivierender Liganden steigert, sondern diese aus diesem Grund auch anfälliger gegenüber der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität werden. Dies ist unseres Wissens nach die erste Beschreibung eines solchen Zusammenhangs zwischen Posaconazol und Tumorzellen, hier gezeigt am Neuroblastommodell.

Mechanistisch liegt analog zu ATO die verminderte *MYCN*-Genexpression durch Hedgehog-Inhibition nahe, welches beides bereits bekannte Effekte von Posaconazol sind. Der Weg von einer *MYCN*-Herunterregulation zu der höheren NK-Zell-vermittelten

Zytolyse über Ligandeninduktion wurde auch schon von Brandetti et al. nachvollzogen [112].

Allerdings sind wie bei ATO wohl noch zusätzlich andere Effekte neben der NKG2DL-Expression für die erhöhte Vulnerabilität gegenüber Zytolyse verantwortlich, da diese unabhängig vom *MYCN*-Amplifikationsstatus vorzufinden war.

IV.1.2.2.c Limitationen

Die in den Abschnitten IV.1.1.2 und IV.1.2.1.d beschriebenen Limitationen der vorangegangenen Versuche sind im Großen und Ganzen auch für die Beurteilung der NK-Zell-Aktivierung und -Zytotoxizität gültig. Dazu zählen die Repräsentativität der beiden Zelllinien für den *MYCN*-Amplifikationsstatus, die Auswahl der Behandlungsdauer mit den Medikamenten sowie die Nachhaltigkeit der Veränderungen.

Hinzu kommt die Frage, welchen direkten Einfluss ATO oder Posaconazol auf die NK-Zell-Funktion und Viabilität haben könnten, da dies in diesem Ansatz nicht berücksichtigt wurde. Die Zugabe der NK-Zellen erfolgte erst nach Entfernen des Medikamentes. Gerade bei ATO scheint dieser Aspekt angesichts dessen potenter Toxizität relevant. Alex et al. waren bereits 2018 der Frage nachgegangen und konnten feststellen, dass ATO in Dosierungen ähnlicher Größenordnung und längerer Behandlungsdauer keinen zytotoxischen und keinen proliferationshemmenden Effekt gegenüber NK-Zellen aufwies. Allerdings fiel bei Therapie mit ATO eine verzögerte Rekonstitution der NK-Zell-Fraktion auf [114]. Dieser Aspekt sollte in Zukunft noch genauer untersucht werden, um die Frage nach dessen klinischer Relevanz zu klären.

IV.1.3 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse

Insgesamt konnten die diskutierten Ergebnisse Hinweise darauf geben, dass durch Behandlung mit ATO die Genexpression von *MYCN* in Neuroblastomzellen herunterreguliert wird, es gleichzeitig zur verstärkten Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren kommt, NK-Zellen daraus folgend verstärkt aktiviert werden und sich diese Aktivierung in eine höhere Zytotoxizität gegenüber den Neuroblastomzellen übersetzt.

Bis auf die *MYCN*-Herunterregulation, welche aus technischen Gründen nicht untersucht werden konnte, ließen sich alle diese Punkte auch unter einer Behandlung mit dem Antimykotikum Posaconazol beobachten.

Ferner zeigte sich, dass die Änderungen in der Expression von N-myc beziehungsweise der Oberflächenliganden entweder nur oder deutlich stärker im Falle einer vorliegenden *MYCN*-Amplifikation ausgeprägt waren.

Dies alles deutet letztlich darauf hin, dass sowohl ATO als auch Posaconazol zukünftig in der Therapie von Hochrisiko-Neuroblastomen ergänzend zu den herkömmlichen Radio- und Chemoregimes eingesetzt werden könnten.

IV.2 Zusammenhang Hedgehog, *MYCN* und Tumorwachstum

Der Hedgehog-Signalweg ist ein elementarer Bestandteil in der regelrechten Ausbildung des Nervensystems während der embryonalen Entwicklung. Im adulten Gewebe ist seine Aktivität im Normalfall unterdrückt, kann jedoch bei aberranter Expression die Tumorgenese begünstigen. Die Signalkaskade ist detailliert in Abschnitt I.3.2 dargestellt. Zwischen verschiedenen Tumorentitäten aber auch innerhalb der gleichen Tumorart unterscheidet sich die Relevanz einer übermäßigen Hedgehog-Aktivierung, was den Stellenwert der personalisierten Medizin in der heutigen Zeit betont.

Eine klassische Neoplasie mit überaktivem Hedgehog-Signalweg ist beispielsweise das Basalzellkarzinom, aber auch im Neuroblastom scheint der Signalweg eine essenzielle Rolle in der Tumorgenese und -erhaltung zu spielen. Mao et al. konnten 2009 zeigen, dass die Bestandteile der Signalkaskade – darunter Shh, *PTCH1*, *SMO* und *GLI2* – in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien und -Tumorproben überexprimiert sind. Dabei war die Expression notwendig für Überleben und Tumorigenität, da die spezifische Inhibition von Smo zur vermehrten Apoptose der Neuroblastomzellen führte [43]. Damit legte diese Arbeit den Grundstein für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Hh-Inhibition als möglichen Therapiebaustein im Neuroblastom. Weitere Forschungen bestätigten die verstärkte Expression in Neuroblastomen, sowohl in Zelllinien als auch in Tumorproben aus Patienten [42, 44].

Auf der anderen Seite fanden mehrere Arbeitsgruppen Hinweise darauf, dass der Hedgehog-Signalweg im Neuroblastom auch zum Teil für die Zelldifferenzierung verantwortlich sein könnte, was generell eher günstigere Implikationen hätte [44, 140]. Dazu passend beschrieben Koeniger et al. 2021 eine eindeutige Korrelation zwischen hoher Gli1-Expression und besserem Gesamtüberleben von Neuroblastompatienten ohne *MYCN*-Amplifikation [141]. Sie vermuteten, dass der Hedgehog-Signalweg im Neuroblastom via Gli1 tumorsuppressive Funktionen ausübe, sodass die iatrogene Aktivierung des Signalwegs eine vielversprechende therapeutische Option darstellen könnte. In der Tat war *in vitro* eine Repression des Tumorzellwachstums feststellbar bei medikamentöser Induktion der *GLII*-Expression. Einschränkend ist anzumerken, dass diese Zusammenhänge größtenteils auf nicht-*MYCN*-amplifizierte Zellen beschränkt war. [141].

Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu mehreren anderen Experimenten, in denen die medikamentöse Repression des Hedgehog-Signalwegs in Neuroblastomen *in vitro* und *in vivo* auf verschiedenen Ebenen (Smo, Gli) zu einer Proliferationshemmung und erhöhten Apoptose führte [43, 48-52]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit führten mit ATO und Posaconazol zwei bekannte Hedgehog-Inhibitoren im Zellmodell zu einem prognostisch günstigeren Phänotyp mit Stimulation der NK-Zytolyse.

Das Potenzial der Hemmung der Hedgehog-Signalkaskade lässt sich auch daraus erschließen, dass unter seine Zielgene *MYCN* fällt [45-47]. Dessen prominente Rolle im Neuroblastom wurde oben ausführlich erläutert. Die Stimulation über Hedgehog führt zu einer höheren intrazellulären Konzentration von N-myc, was sowohl über eine erhöhte Transkriptionsrate als auch über verschiedene posttranslationale Mechanismen zu erklären ist [16, 142, 143]. In Übereinstimmung damit konnte im Rahmen dieser Arbeit für den Hedgehog-Inhibitor ATO eine Herunterregulation von N-myc in Neuroblastomzellen nachgewiesen werden.

Trotz dieses mehrfach bestätigten kausalen Zusammenhangs bestehen diesbezüglich teilweise noch einige Unstimmigkeiten. Souzaki et al. fanden 2010 in Neuroblastomproben eine inverse Korrelation zwischen der Expression von Hh-Proteinen und N-myc [140]. Oue et al. konnten dagegen diesbezüglich keinen Zusammenhang feststellen und schlussfolgerten daraus, dass die Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs in sporadischen

Neuroblastomen eventuell keine relevante Rolle einnehmen [44]. Beide Arbeitsgruppen stellten zusätzlich wie oben schon beschrieben die Verbindung zwischen der Hedgehog-Aktivität und einem höheren Differenzierungsgrad her, was wiederum mit der fehlenden positiven Korrelation zwischen Hh und N-myc vereinbar ist.

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Wickström et al., die 2013 bei einer Inhibition der Hedgehog-Signalkaskade auf unterschiedlichen Ebenen die Herunterregulation der *MYCN*-Genexpression im Neuroblastom nachweisen konnten. Allerdings zeigte sich die Sensitivität gegenüber den Hh-Inhibitoren umso geringer, je höher die Ausgangslevel von N-myc-mRNA waren [52]. Dahingegen fielen in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten die antitumorigenen Effekte in der *MYCN*-amplifizierten Zelllinie stärker aus als in der nicht-amplifizierten Kontrolle. Eine mögliche Erklärung für die von Wickström et al. erbrachten Erkenntnisse könnte in einer protektiven Autophagie von N-myc-exprimierenden Zellen liegen, welche die Effekte der Hedgehog-Inhibition auf das Tumorwachstum unterminieren [144].

Wichtig ist auch die Erkenntnis, dass im Gegensatz zum Amplifikationsstatus die Expression von N-myc nicht notwendigerweise mit der Prognose korreliert. Stattdessen scheint insbesondere in nicht-amplifizierten Tumoren eine hohe Expression mit einem günstigeren klinischen Phänotyp vergesellschaftet zu sein [145]. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die medikamentöse Suppression der Genexpression vorrangig in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen zur Anwendung kommen sollte.

Insgesamt werden zukünftig weitere Untersuchungen nötig sein, die der Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs im Neuroblastom sowie seiner Verbindung zur N-myc-Expression nachgehen. Eine vielversprechende Studie stammt von Chaturvedi et al., die 2016 eine synergistische Wirkung von Vismodegib mit Topotecan im Neuroblastom *in vitro* und im Mausmodell nachweisen konnten. Dies weckt Hoffnungen, dass sich in der Zukunft die Hh-Inhibition als zusätzlicher Baustein in der Therapie von Neuroblastomen herausstellen könnte, sei es in Form bereits etablierter Medikamente wie ATO oder Posaconazol oder auch neuerer, spezifisch wirkender Substanzen.

Darüber hinaus ist der Einsatz von Medikamenten denkbar, die die Konzentration oder Aktivität des Proteins N-myc direkt vermindern. Aufgrund verschiedener Herausforderungen, darunter die Ähnlichkeit zu dem physiologisch relevanten C-myc, fehlendem

Verständnis über Wechselwirkungen mit anderen Proteinen sowie das Nichtvorhandensein einer zu blockierenden Bindungstasche des Transkriptionsfaktor konnte bisher noch kein praktikabler Inhibitor entwickelt werden [146]. Ein medikamentöser Ansatz auf Proteinebene lässt außerdem außer Acht, dass ein Teil der onkogenen Funktion nur über die *MYCN*-mRNA vermittelt wird [147]. In Anbetracht dessen könnte sich die Inhibition der Transkription wie zum Beispiel durch ATO oder Posaconazol als wirkungsvoller herausstellen. Eine anderes vielversprechendes, neu entwickeltes small-molecule namens MX25-1 wurde 2022 von Liu et al. beschrieben, das spezifisch zum Abbau der *MYCN*-mRNA führt und dessen antitumoralen Effekte bereits *in vitro* an Neuroblastomzellen nachgewiesen werden konnte [148].

IV.3 Kritische Beurteilung des klinischen Einsatzes der Medikamente

IV.3.1 ATO

Über die Jahre wurden die antineoplastischen Wirkmechanismen von Arsenverbindungen in vielen Bereichen der Onkologie *in vitro* beobachtet. Insbesondere die Hemmung des Hedgehog-Signalwegs hat daran Einfluss. Bemerkenswerterweise scheint die onkogene Wirkung von Arsenverbindungen bei chronischer Einwirkung mit Ausbildung von Tumoren der Haut, Lunge und Harnblase auch zumindest zum Teil auf einer Interferenz mit dem Hedgehog-Signalweg zu beruhen. Hier konnte allerdings eine Hochregulation der beteiligten Proteine beobachtet werden [149]. Li et al. erklären diesen paradoxen Umstand damit, dass die Wirkung von ATO vom Ausgangszustand der Hh-Expression abhängt: Bei niedriger Grundaktivität in gesundem Gewebe ist über die Hh-Hochregulation die Induktion von Tumoren möglich, wohingegen bei hoher Hh-Aktivität in Krebszellen die Hemmung des Signalwegs überwiegt [150]. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese auf Ebene der Gli-Transkriptionsfaktoren stattfindet und damit *downstream* von anderen klinisch zugelassenen Hh-Inhibitoren wie Vismodegib oder Sonidegib [79]. Somit ist ATO auch wirksam bei Mutationen auf Smo-Ebene, die Tumoren gegen die anderen Wirkstoffe resistent machen.

Ein weiterer Vorteil sind die pleiotropen Wirkungen von ATO, die weit über die Hemmung der Hedgehog-Aktivität hinaus geht. Insgesamt kommt es zur vermehrten

Apoptose der Tumorzellen. Zudem wurde die Hochregulation von Liganden aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren mit nachfolgend verstärkter Zytolyse gezeigt [113, 114]. In dieser Arbeit konnte dies auch für Neuroblastomzellen nachvollzogen werden mit dem Zwischenschritt einer *MYCN*-Herunterregulation in *MYCN*-amplifizierten Zellen. Insgesamt waren die Effekte in der *MYCN*-amplifizierten Zelllinie stärker ausgeprägt als in der nicht-amplifizierten Kontrolle. Auch Paffhausen et al. hatten 2007 zeigen können, dass die Sensitivität von Neuroblastomzellen gegenüber ATO in Abhängigkeit der *MYCN*-Expression zunimmt [151].

In Anbetracht dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, inwiefern ATO in der Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen zukünftig eingesetzt werden könnte. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen in den letzten Jahren nach, dass die Kombination von herkömmlichen Chemotherapeutika mit ATO zu einer synergistischen Wirkung auf Neuroblastomzellen *in vitro* führt [152-154]. Darüber hinaus ist ATO als Radiosensitizer bekannt, eine klinische Phase-II-Studie konnte 2016 jedoch kein signifikant besseres Outcome bei Kombination der MIBG-Therapie mit ATO feststellen [155]. Ein vielversprechendes Ergebnis dagegen wurde in einer 2021 von Li et al. publizierten, multizentrischen klinischen Studie gezeigt. Dort ergab sich eine signifikant höhere Ansprechrate in der Induktionschemotherapie von metastasierten Neuroblastomen bei Kombination der herkömmlichen Chemotherapeutika mit ATO [156]. Die Aussagekraft ist dadurch begrenzt, dass nur 22 Patienten eingeschlossen wurden.

In den beiden erwähnten klinischen Studien waren keine außergewöhnlich starken, durch ATO bedingte Toxizitäten zu beobachten, leichtere Organaffektionen waren schnell reversibel. Generell ist das Nebenwirkungsprofil durch den klinischen Einsatz in APL-Patienten gut bekannt, insbesondere Hepatotoxizität, Myelotoxizität und Veränderungen des Elektrolythaushalts sind hier zu nennen [157]. Dabei sind die Effekte im Neuroblastom in den gleichen Dosierungen zu erreichen, die auch für die APL zugelassen sind (0,15 mg/kg/d) [156]. Die dabei erreichten durchschnittlichen Plasmakonzentrationen bewegen sich größenordnungsmäßig im Bereich der in dieser Arbeit für die verschiedenen Experimente eingesetzten Dosierungen [158].

Letztlich sind zukünftig weitere klinische Studien erforderlich, die die Anwendung von ATO in der Therapie von Neuroblastomen untersuchen. Zur besseren Wirksamkeit und

Verträglichkeit könnten hierfür weitere pharmazeutische Modifikationen beitragen. Dazu zählen zum Einen die perorale Gabe statt der intravenösen Verabreichung [159], zum Anderen liposomale Umkapselungen oder andere Systeme zum Transport in das Tumorgewebe [55].

IV.3.2 Posaconazol

Wie oben beschrieben, besitzt ATO in den benötigten Dosierungen ein tolerierbares Nebenwirkungsprofil. Nichtsdestotrotz ist die Suche nach verträglicheren Alternativen nicht abgeschlossen. In den letzten Jahren fanden vermehrt zugelassene Vertreter der Triazol-Antimykotika Beachtung für ihre antineoplastischen Eigenschaften. Für Itraconazol konnte die Inhibition des Hedgehog-Signalwegs gezeigt werden sowie zusätzlich eine Reihe weiterer Eingriffe in zelluläre Regulationsmechanismen, darunter die Hemmung proliferationsfördernder Signalwege, ROS-Akkumulation, P-Glykoprotein-Inhibition und VEGF-Block [160]. All dies führt direkt oder indirekt zur Apoptose der Tumorzellen und Hemmung des Tumorwachstums. Die Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* konnte in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden. Mehrere klinische Studien sind aktuell noch in Durchführung (Übersicht in [160]). Eine 2016 veröffentlichte klinische Studie an Patienten mit refraktärem metastasiertem Basalzellkarzinom untersuchte die Kombination von Itraconazol und ATO. Es zeigte sich eine deutliche Suppression der Gli-Expressionslevel, im besten Fall war jedoch nur eine *stable disease* ohne Tumorreduktion zu erreichen [161]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Kombination mit zytotoxischen Chemotherapeutika.

Posaconazol ist ein Vertreter der zweiten Generation von Triazol-Antimykotika. Auch für diesen Wirkstoff konnte eine potente Inhibition des Hedgehog-Signalwegs sowie weitere pleiotrope Effekte im Tumor gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass wie unter ATO eine Hochregulation der NKG2DL auf Neuroblastomzellen mit nachfolgend verstärkter NK-Zell-Aktivierung und -Zytolyse erfolgt. Insgesamt waren die Effekte etwas weniger stark ausgeprägt als bei ATO. Eine mögliche Erklärung basiert darauf, dass die Hedgehog-Inhibition nicht auf Ebene von Gli, sondern durch Bindung an Smo stattfindet. Zwar ist durch die Bindung einer von Cyclopamin verschiedenen Stelle am Protein ebenso gewährleistet, dass Posaconazol auch bei Vismodegib-

/Sonidegib-resistenten Mutationen wirksam bleibt [97]. Allerdings konnten Wickström et al. 2013 darstellen, dass im Neuroblastom die direkte Inhibition von Gli effektiver ist als die Inhibition des *upstream* lokalisierten Proteins Smo [52]. Die somit mögliche stärkere Wirksamkeit von ATO gegenüber Tumorzellen muss bei der Frage des klinischen Einsatzes gegenüber der besseren Verträglichkeit von Posaconazol abgewogen werden, insbesondere wenn die Wirkstoffe mit anderen Chemotherapien kombiniert werden.

Im Vergleich zu Itraconazol bietet Posaconazol den Vorteil, dass weniger Arzneimittelwechselwirkungen bestehen [162] und es bei leichten Leber- oder Niereninsuffizienzen besser verträglich ist [97]. Als seit mehreren Jahren klinisch zugelassenes Medikament zur Prophylaxe und Therapie von invasiven Pilzkrankungen ist sein Sicherheits- und Interaktionsprofil zumindest in erwachsenen Patienten gut bekannt. Die Nebenwirkungen sind meist milde und betreffen meist das Gastrointestinalsystem, beispielsweise Übelkeit oder Diarrhoe. Zudem werden gehäuft Kopfschmerzen berichtet [87]. In Bezug auf die Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ist insbesondere die Hemmung von CYP3A4 zu nennen, die wie auch bei Itraconazol besteht.

Es werden sowohl orale als auch intravenöse Formulierungen eingesetzt [163]. Die in dieser Arbeit verwendeten Posaconazol-Dosierungen liegen indes teils deutlich über den in pädiatrischen Patienten gemessenen Serumspitzenkonzentrationen, welche sich hauptsächlich im Bereich von 1 – 4 µmol/l bewegen [164]. Es bleibt offen, inwiefern diese Konzentrationen weiter gesteigert werden können ohne Auftreten relevanter unerwünschter Arzneimittelwirkungen.

Weitere Ansätze könnten die Modifikation von Posaconazol zur Reduktion von Nebenwirkungen und Erhöhung der Wirkpotenz betreffen. Teske et al. konnten 2019 beispielsweise zeigen, dass die Entfernung der Triazolgruppe aus dem Molekül die Hemmung von CYP3A4 aufhebt bei weiterhin bestehender Hh-Inhibition. Durch weitere Modifikationen konnte die Potenz der Hh-Inhibition darüber hinaus um circa das 25-Fache gesteigert werden [165].

Zukünftige experimentelle und klinische Studien sollten sich genauer der Frage widmen, inwiefern Neuroblastompatienten von einem zusätzlichen Einsatz des Antimykotikums Posaconazol beziehungsweise eines Derivates profitieren können.

V Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor des frühen Kindesalters und stellt klinisch eine sehr heterogene Krebserkrankung dar, deren Verlauf von spontaner Regression bis zu therapierefraktären oder mehrfach rezidivierenden Fällen trotz intensiver multimodaler Therapie reicht. Die relevanteste chromosomale Aberration als Prädiktor für ein schlechtes Outcome ist die Amplifikation des *MYCN*-Genlokus. Die Hemmung der Expression dieses Onkogens ist somit ein vielversprechendes therapeutisches Ziel, welches zukünftig die schlechte Prognose von Hochrisiko-Neuroblastomen verbessern könnte.

NK-Zellen nehmen in der Surveillance und Bekämpfung von maligne entarteten Zellen eine zentrale Rolle ein. Bei Überwiegen der Stimulation von aktivierenden Rezeptoren gegenüber inhibitorischen Signalen kommt es zur Degranulation der NK-Zellen mit nachfolgender Zytolyse der Tumorzellen. Daher stellt die therapeutische Beeinflussung der NK-Rezeptor-Liganden-Achse ein potentes Konzept in der Behandlung von malignen Neoplasien wie dem Neuroblastom dar.

Arsentrioxid ist ein anorganischer Stoff, der historisch trotz seiner für den Menschen hochtoxischen Eigenschaften seit langer Zeit auch als Wirkstoff zur Heilung verschiedener Krankheiten eingesetzt wurde. Es findet derzeit in der Erstlinientherapie der APL Verwendung durch Aufhebung des Differenzierungsblocks der malignen Vorläuferzellen. Weitere Untersuchungen im Laufe der letzten Jahre ergaben, dass seine Wirkmechanismen breit gefächert sind und unter anderem auch die Inhibition des Hedgehog-Signalwegs umfassen. Dieser in der embryonalen Entwicklung elementare Signalweg führt im adulten Gewebe bei aberranter Stimulation zu einer Induktion und Aufrechterhaltung von Tumorerkrankungen. Auch im Neuroblastom ist der Signalweg vermehrt aktiv. Zu seinen Zielgenen gehört *MYCN*, sodass ein potenzieller zukünftiger therapeutischer Ansatz im Neuroblastom die Hemmung der *MYCN*-Expression via Hh-Inhibition darstellen könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit ATO die Expression von *MYCN* vermindert und die NK-Zell-vermittelte Zytolyse durch Hochregulation von aktivierenden Oberflächenliganden verstärkt. Dieser inverse Zusammenhang zwischen *MYCN* und zellulärer Zytotoxizität war auch im Neuroblastom bestätigt worden.

Auch für Posaconazol, ein antimykotischer Wirkstoff aus der Triazolgruppe mit deutlich besserer Verträglichkeit als ATO, konnten in den letzten Jahren pleiotrope

antineoplastische Effekte inklusive Hh-Inhibition nachgewiesen werden. Die Wirkung im Neuroblastom und etwaige positive Effekte auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität analog zu ATO waren bisher jedoch noch nicht detaillierter erforscht.

In dieser Arbeit wurde erstens die Wirkung von ATO auf Neuroblastomzellen hinsichtlich der Expression von N-myc untersucht. Dabei bestätigte sich der in Vorversuchen der Arbeitsgruppe gezeigte Effekt einer deutlichen Herunterregulation des Onkoproteins unter ATO-Einfluss. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass durch ATO nicht nur die Expression der aktivierenden NKG2D-Liganden steigt, sondern daraus auch eine signifikant gesteigerte NK-Zell-Aktivierung resultiert mit nachfolgend deutlich stärkerer Zytolyse der Tumorzellen. Der Effekt war dabei in *MYCN*-amplifizierten Zellen stärker ausgeprägt, sodass ein kausaler Zusammenhang mit der Herunterregulation des Onkoproteins naheliegt. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch eine Behandlung der Neuroblastomzellen mit Posaconazol zur verstärkten Expression aktivierender NKG2D-Liganden, NK-Zell-Degranulation und NK-Zell-vermittelten Zytolyse führt.

Insgesamt präsentieren sich somit sowohl ATO als auch das weniger toxische Posaconazol als potenzielle medikamentöse Kandidaten in der Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen zur Kombination mit den etablierten Therapeutika. Beide Wirkstoffe sind bereits für andere Indikationen zugelassen, sodass schon viel klinisches Wissen zu Sicherheitsprofil und pharmakologischen Eigenschaften besteht. Weitere experimentelle und klinische Versuche werden zukünftig notwendig sein, um die Wirksamkeit und Anwendbarkeit in der Therapie des Neuroblastoms genauer zu untersuchen.

VI Literaturverzeichnis

1. Torres, H.A., et al., *Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 775-85.
2. Aygun, N., *Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance*. Curr Pediatr Rev, 2018. **14**(2): p. 73-90.
3. Berthold, F., et al., *Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979-2015*. Paediatr Drugs, 2017. **19**(6): p. 577-593.
4. Mossé, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
5. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.
6. Gesellschaft_für_Pädiatrische_Onkologie_und_Hämatologie, *S1-Leitlinie Neuroblastom*, in *AWMF-Leitlinienregister*. 2019: 025/008. Version 8.0. Gültig bis 29.06.2024.
7. Olecki, E. and C.N. Grant, *MIBG in neuroblastoma diagnosis and treatment*. Semin Pediatr Surg, 2019. **28**(6): p. 150859.
8. Bown, N., et al., *17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome*. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. Med Pediatr Oncol, 2001. **36**(1): p. 14-9.
9. Brodeur, G.M., et al., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment*. J Clin Oncol, 1993. **11**(8): p. 1466-77.
10. Monclair, T., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 298-303.
11. Shibasaki, Y., *High resolution mapping of the MYCN proto-oncogene at human chromosome 2p24.3 by fluorescence in situ hybridisation*. Cytogenet Cell Genet, 1994. **66**(1): p. 75-6.
12. Beltran, H., *The N-myc Oncogene: Maximizing its Targets, Regulation, and Therapeutic Potential*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(6): p. 815-22.
13. Weiss, W.A., et al., *Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice*. Embo j, 1997. **16**(11): p. 2985-95.
14. Olsen, R.R., et al., *MYCN induces neuroblastoma in primary neural crest cells*. Oncogene, 2017. **36**(35): p. 5075-5082.
15. Kapeli, K. and P.J. Hurlin, *Differential regulation of N-Myc and c-Myc synthesis, degradation, and transcriptional activity by the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 2011. **286**(44): p. 38498-38508.
16. Chen, C., M.B. Breslin, and M.S. Lan, *INSM1 increases N-myc stability and oncogenesis via a positive-feedback loop in neuroblastoma*. Oncotarget, 2015. **6**(34): p. 36700-12.
17. Nüsslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
18. Briscoe, J. and P.P. Théron, *The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013. **14**(7): p. 416-429.
19. Teglund, S. and R. Toftgård, *Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(2): p. 181-208.
20. Fattahi, S., M. Pilehchian Langroudi, and H. Akhavan-Niaki, *Hedgehog signaling pathway: Epigenetic regulation and role in disease and cancer development*. J Cell Physiol, 2018. **233**(8): p. 5726-5735.

21. Varjosalo, M. and J. Taipale, *Hedgehog: functions and mechanisms*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2454-72.
22. Harfe, B.D., et al., *Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities*. Cell, 2004. **118**(4): p. 517-28.
23. Roessler, E., et al., *Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13424-9.
24. Kang, S., et al., *GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 266-8.
25. Lai, K., et al., *Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 21-7.
26. Machold, R., et al., *Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 937-50.
27. Bhardwaj, G., et al., *Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 172-80.
28. Watkins, D.N., et al., *Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer*. Nature, 2003. **422**(6929): p. 313-7.
29. Karhadkar, S.S., et al., *Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis*. Nature, 2004. **431**(7009): p. 707-12.
30. Moshiri, A. and T.A. Reh, *Persistent progenitors at the retinal margin of ptc^{+/-} mice*. J Neurosci, 2004. **24**(1): p. 229-37.
31. Hahn, H., et al., *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Cell, 1996. **85**(6): p. 841-51.
32. Lee, Y., et al., *Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis*. Oncogene, 2007. **26**(44): p. 6442-7.
33. Xie, J., et al., *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 90-2.
34. Roberts, W.M., et al., *Amplification of the gli gene in childhood sarcomas*. Cancer Res, 1989. **49**(19): p. 5407-13.
35. Kinzler, K.W., et al., *Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma*. Science, 1987. **236**(4797): p. 70-3.
36. Reifenberger, J., et al., *Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 1798-803.
37. Tostar, U., et al., *Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development*. J Pathol, 2006. **208**(1): p. 17-25.
38. Kubo, M., et al., *Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6071-4.
39. Thayer, S.P., et al., *Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 851-6.
40. Sheng, T., et al., *Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer*. Mol Cancer, 2004. **3**: p. 29.
41. Grimmer, M.R. and W.A. Weiss, *Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development*. Curr Opin Pediatr, 2006. **18**(6): p. 634-8.
42. Shahi, M.H., A. Lorente, and J.S. Castresana, *Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma*. Oncol Rep, 2008. **19**(3): p. 681-8.
43. Mao, L., et al., *A critical role of Sonic Hedgehog signaling in maintaining the tumorigenicity of neuroblastoma cells*. Cancer Sci, 2009. **100**(10): p. 1848-55.

44. Oue, T., et al., *Increased expression of the hedgehog signaling pathway in pediatric solid malignancies*. J Pediatr Surg, 2010. **45**(2): p. 387-92.
45. Kenney, A.M., M.D. Cole, and D.H. Rowitch, *Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors*. Development, 2003. **130**(1): p. 15-28.
46. Oliver, T.G., et al., *Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7331-6.
47. Hatton, B.A., et al., *N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8655-61.
48. Schiapparelli, P., et al., *Inhibition of the sonic hedgehog pathway by cyclopamine reduces the CD133+/CD15+ cell compartment and the in vitro tumorigenic capability of neuroblastoma cells*. Cancer Lett, 2011. **310**(2): p. 222-31.
49. Xu, L., et al., *Sonic Hedgehog pathway is essential for neuroblastoma cell proliferation and tumor growth*. Mol Cell Biochem, 2012. **364**(1-2): p. 235-41.
50. Yamanaka, H., et al., *Forskolin, a Hedgehog signal inhibitor, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pediatric tumor cell lines*. Mol Med Rep, 2010. **3**(1): p. 133-9.
51. Zhou, Y., et al., *Activation of Sonic hedgehog signaling pathway in S-type neuroblastoma cell lines*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010. **30**(3): p. 271-7.
52. Wickström, M., et al., *Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo*. Int J Cancer, 2013. **132**(7): p. 1516-24.
53. Incardona, J.P., et al., *The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction*. Development, 1998. **125**(18): p. 3553-62.
54. National Research Council Committee on, M. and P. Biological Effects of Environmental, in *Arsenic: Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants*. 1977, National Academies Press (US): Washington (DC).
55. Paul, N.P., et al., *Arsenic in medicine: past, present and future*. Biometals, 2022: p. 1-19.
56. Ratnaik, R.N., *Acute and chronic arsenic toxicity*. Postgrad Med J, 2003. **79**(933): p. 391-6.
57. Schoolmeester, W.L. and D.R. White, *Arsenic poisoning*. South Med J, 1980. **73**(2): p. 198-208.
58. Rahman, M.M., J.C. Ng, and R. Naidu, *Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans*. Environ Geochem Health, 2009. **31 Suppl 1**: p. 189-200.
59. Lin, M.H., et al., *Arsenic in Drinking Water and Incidences of Leukemia and Lymphoma: Implication for Its Dual Effects in Carcinogenicity*. Front Public Health, 2022. **10**: p. 863882.
60. Martinez, V.D., et al., *Arsenic exposure and the induction of human cancers*. J Toxicol, 2011. **2011**: p. 431287.
61. Waxman, S. and K.C. Anderson, *History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy*. Oncologist, 2001. **6 Suppl 2**: p. 3-10.
62. Au, W.Y., *A biography of arsenic and medicine in Hong Kong and China*. Hong Kong Med J, 2011. **17**(6): p. 507-13.
63. Abele, M., et al., *Arsenic trioxide in pediatric cancer - a case series and review of literature*. Pediatr Hematol Oncol, 2021. **38**(5): p. 471-485.
64. Jimenez, J.J., et al., *Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature*. Oncotarget, 2020. **11**(11): p. 992-1003.
65. Yilmaz, M., H. Kantarjian, and F. Ravandi, *Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms*. Blood Cancer J, 2021. **11**(6): p. 123.

66. Cheung, W.M., P.W. Chu, and Y.L. Kwong, *Effects of arsenic trioxide on the cellular proliferation, apoptosis and differentiation of human neuroblastoma cells*. *Cancer Lett*, 2007. **246**(1-2): p. 122-8.
67. Petit, A., et al., *Importance of ERK activation in As₂O₃-induced differentiation and promyelocytic leukemia nuclear bodies formation in neuroblastoma cells*. *Pharmacol Res*, 2013. **77**: p. 11-21.
68. Li, C., et al., *Arsenic trioxide induces the differentiation of retinoic acid-resistant neuroblastoma cells via upregulation of HoxC9*. *Adv Clin Exp Med*, 2022. **31**(8): p. 903-911.
69. Jung, H.S., et al., *Arsenic trioxide concentration determines the fate of Ewing's sarcoma family tumors and neuroblastoma cells in vitro*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(20): p. 4969-75.
70. Akao, Y., Y. Nakagawa, and K. Akiyama, *Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro*. *FEBS Lett*, 1999. **455**(1-2): p. 59-62.
71. Yen, C.M., et al., *Novel Combination of Arsenic Trioxide (As₂O₃) Plus Resveratrol in Inducing Programmed Cell Death of Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells*. *Cancer Genomics Proteomics*, 2018. **15**(6): p. 453-460.
72. Ora, I., et al., *Arsenic trioxide inhibits neuroblastoma growth in vivo and promotes apoptotic cell death in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **277**(1): p. 179-85.
73. Karlsson, J., et al., *Arsenic trioxide-induced neuroblastoma cell death is accompanied by proteolytic activation of nuclear Bax*. *Oncogene*, 2007. **26**(42): p. 6150-9.
74. Keim, A., et al., *Arsenite-induced apoptosis of human neuroblastoma cells requires p53 but occurs independently of c-Jun*. *Neuroscience*, 2012. **206**: p. 25-38.
75. Florea, A.M., F. Splettstoesser, and D. Büsselberg, *Arsenic trioxide (As₂O₃) induced calcium signals and cytotoxicity in two human cell lines: SY-5Y neuroblastoma and 293 embryonic kidney (HEK)*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007. **220**(3): p. 292-301.
76. Feng, C., et al., *Arsenic trioxide increases apoptosis of SK-N-BE (2) cells partially by inducing GPX4-mediated ferroptosis*. *Mol Biol Rep*, 2022. **49**(7): p. 6573-6580.
77. Karlsson, J., et al., *Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of Bax and does not require p53*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(9): p. 3179-88.
78. Kim, J., et al., *Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(30): p. 13432-7.
79. Beauchamp, E.M., et al., *Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(1): p. 148-60.
80. Kerl, K., et al., *Arsenic trioxide inhibits tumor cell growth in malignant rhabdoid tumors in vitro and in vivo by targeting overexpressed Gli1*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(4): p. 989-95.
81. Chang, K.J., et al., *Arsenic trioxide inhibits cancer stem-like cells via down-regulation of Gli1 in lung cancer*. *Am J Transl Res*, 2016. **8**(2): p. 1133-43.
82. Chang, K.J., et al., *Arsenic trioxide inhibits the growth of cancer stem cells derived from small cell lung cancer by downregulating stem cell-maintenance factors and inducing apoptosis via the Hedgehog signaling blockade*. *Transl Lung Cancer Res*, 2020. **9**(4): p. 1379-1396.
83. Ding, D., K.S. Lim, and C.G. Eberhart, *Arsenic trioxide inhibits Hedgehog, Notch and stem cell properties in glioblastoma neurospheres*. *Acta Neuropathol Commun*, 2014. **2**: p. 31.
84. Kapahi, P., et al., *Inhibition of NF-kappa B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of I kappa B kinase*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(46): p. 36062-6.

85. Roboz, G.J., et al., *Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis*. *Blood*, 2000. **96**(4): p. 1525-30.
86. Huang, C., et al., *Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway*. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3053-8.
87. Katragkou, A., et al., *Posaconazole: when and how? The clinician's view*. *Mycoses*, 2012. **55**(2): p. 110-22.
88. Cornely, O.A., J.J. Vehreschild, and M.J. Rüpung, *Current experience in treating invasive zygomycosis with posaconazole*. *Clin Microbiol Infect*, 2009. **15 Suppl 5**: p. 77-81.
89. Kim, J., et al., *Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(4): p. 388-99.
90. Kim, J., et al., *Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothed antagonists*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(1): p. 23-34.
91. Chong, C.R., et al., *Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole*. *ACS Chem Biol*, 2007. **2**(4): p. 263-70.
92. Wang, W., et al., *Itraconazole exerts anti-liver cancer potential through the Wnt, PI3K/AKT/mTOR, and ROS pathways*. *Biomed Pharmacother*, 2020. **131**: p. 110661.
93. Chen, M.B., et al., *Itraconazole-Induced Inhibition on Human Esophageal Cancer Cell Growth Requires AMPK Activation*. *Mol Cancer Ther*, 2018. **17**(6): p. 1229-1239.
94. Buczacki, S.J.A., et al., *Itraconazole targets cell cycle heterogeneity in colorectal cancer*. *J Exp Med*, 2018. **215**(7): p. 1891-1912.
95. Chen, K., et al., *Itraconazole inhibits invasion and migration of pancreatic cancer cells by suppressing TGF- β /SMAD2/3 signaling*. *Oncol Rep*, 2018. **39**(4): p. 1573-1582.
96. Lima, T.S., et al., *Itraconazole Reverts ABCB1-Mediated Docetaxel Resistance in Prostate Cancer*. *Front Pharmacol*, 2022. **13**: p. 869461.
97. Chen, B., et al., *Posaconazole, a Second-Generation Triazole Antifungal Drug, Inhibits the Hedgehog Signaling Pathway and Progression of Basal Cell Carcinoma*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(5): p. 866-76.
98. Sun, J., et al., *Repurposing of posaconazole as a hedgehog/SMO signaling inhibitor for embryonal rhabdomyosarcoma therapy*. *Am J Cancer Res*, 2021. **11**(9): p. 4528-4540.
99. Agnihotri, S., et al., *Ketoconazole and Posaconazole Selectively Target HK2-expressing Glioblastoma Cells*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(2): p. 844-855.
100. Wang, H., et al., *Posaconazole inhibits the stemness of cancer stem-like cells by inducing autophagy and suppressing the Wnt/ β -catenin/survivin signaling pathway in glioblastoma*. *Front Pharmacol*, 2022. **13**: p. 905082.
101. Freud, A.G. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 56-72.
102. Corrias, M.V., et al., *Lack of HLA-class I antigens in human neuroblastoma cells: analysis of its relationship to TAP and tapasin expression*. *Tissue Antigens*, 2001. **57**(2): p. 110-7.
103. Ljunggren, H.G. and K. Kärre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. *Immunol Today*, 1990. **11**(7): p. 237-44.
104. Quatrini, L., et al., *Human NK cells, their receptors and function*. *Eur J Immunol*, 2021. **51**(7): p. 1566-1579.
105. Elliott, J.M. and W.M. Yokoyama, *Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(8): p. 364-72.
106. Locatelli, F., et al., *NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia*. *Trends Immunol*, 2018. **39**(7): p. 577-590.

107. Bottino, C., et al., *Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 56.
108. Ullrich, E., et al., *New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(10): p. e26097.
109. Huergo-Zapico, L., et al., *Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 106.
110. Guerra, N., et al., *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 571-80.
111. Raffaghello, L., et al., *Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma*. *Neoplasia*, 2004. **6**(5): p. 558-68.
112. Brandetti, E., et al., *MYCN is an immunosuppressive oncogene dampening the expression of ligands for NK-cell-activating receptors in human high-risk neuroblastoma*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(6): p. e1316439.
113. Kim, J.Y., et al., *Induction of NKG2D ligands and subsequent enhancement of NK cell-mediated lysis of cancer cells by arsenic trioxide*. *J Immunother*, 2008. **31**(5): p. 475-86.
114. Alex, A.A., et al., *Arsenic Trioxide Enhances the NK Cell Cytotoxicity Against Acute Promyelocytic Leukemia While Simultaneously Inhibiting Its Bio-Genesis*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1357.
115. Palma, L.M., *Effect of Posaconazole and arsenic trioxide on neuroblastoma cells*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2020, Tübingen.
116. Rudolph, G., et al., *Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS*. *Hum Genet*, 1991. **86**(6): p. 562-6.
117. Biedler, J.L., L. Helson, and B.A. Spengler, *Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture*. *Cancer Res*, 1973. **33**(11): p. 2643-52.
118. Seeger, R.C., et al., *Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines*. *Cancer Res*, 1977. **37**(5): p. 1364-71.
119. Chen, R.L., C.P. Reynolds, and R.C. Seeger, *Neutrophils are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with an anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating*. *Cancer Immunol Immunother*, 2000. **48**(11): p. 603-12.
120. Bruchelt, G., et al., *[The role of interferons in neuroblastoma. 1: Antiproliferative effects]*. *Klin Padiatr*, 1990. **202**(4): p. 202-5.
121. Gong, J.H., G. Maki, and H.G. Klingemann, *Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells*. *Leukemia*, 1994. **8**(4): p. 652-8.
122. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
123. Solly, K., et al., *Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays*. *Assay Drug Dev Technol*, 2004. **2**(4): p. 363-72.
124. Oberg, H.H., et al., *Real-time cell analysis (RTCA) to measure killer cell activity against adherent tumor cells in vitro*. *Methods Enzymol*, 2020. **631**: p. 429-441.
125. Brandetti, E., et al., *Enhancement of Neuroblastoma NK-Cell-Mediated Lysis through NF- κ B p65 Subunit-Induced Expression of FAS and PVR, the Loss of Which Is Associated with Poor Patient Outcome*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(17).
126. Kohl, N.E., C.E. Gee, and F.W. Alt, *Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors*. *Science*, 1984. **226**(4680): p. 1335-7.
127. Schwab, M., et al., *Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(15): p. 4940-4.

128. Nisen, P.D., et al., *N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma*. J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(20): p. 1633-7.
129. Slavic, I., et al., *myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma*. Cancer Res, 1990. **50**(5): p. 1459-63.
130. Yi, M., et al., *Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions*. Mol Cancer, 2022. **21**(1): p. 28.
131. Davis, K.L., et al., *Nivolumab in children and young adults with relapsed or refractory solid tumours or lymphoma (ADVL1412): a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 trial*. Lancet Oncol, 2020. **21**(4): p. 541-550.
132. Georger, B., et al., *Pembrolizumab in paediatric patients with advanced melanoma or a PD-L1-positive, advanced, relapsed, or refractory solid tumour or lymphoma (KEYNOTE-051): interim analysis of an open-label, single-arm, phase 1-2 trial*. Lancet Oncol, 2020. **21**(1): p. 121-133.
133. Melaiu, O., et al., *PD-L1 Is a Therapeutic Target of the Bromodomain Inhibitor JQ1 and, Combined with HLA Class I, a Promising Prognostic Biomarker in Neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(15): p. 4462-4472.
134. Saletta, F., et al., *Programmed Death-Ligand 1 Expression in a Large Cohort of Pediatric Patients With Solid Tumor and Association With Clinicopathologic Features in Neuroblastoma*. JCO Precis Oncol, 2017. **1**: p. 1-12.
135. Majzner, R.G., et al., *Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues*. Cancer, 2017. **123**(19): p. 3807-3815.
136. Shibuya, A. and K. Shibuya, *DNAM-1 versus TIGIT: competitive roles in tumor immunity and inflammatory responses*. Int Immunol, 2021. **33**(12): p. 687-692.
137. Veneziani, I., et al., *The BET-bromodomain inhibitor JQ1 renders neuroblastoma cells more resistant to NK cell-mediated recognition and killing by downregulating ligands for NKG2D and DNAM-1 receptors*. Oncotarget, 2019. **10**(22): p. 2151-2160.
138. Vivas-Mejía, P.E., et al., *Downregulation of the c-MYC target gene, peroxiredoxin III, contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia*. Int J Cancer, 2009. **125**(2): p. 264-75.
139. Song, X., et al., *The potential markers of NK-92 associated to cytotoxicity against K562 cells*. Biologicals, 2020. **68**: p. 46-53.
140. Souzaki, R., et al., *Hedgehog signaling pathway in neuroblastoma differentiation*. J Pediatr Surg, 2010. **45**(12): p. 2299-304.
141. Koeniger, A., et al., *Activation of Cilia-Independent Hedgehog/GLI1 Signaling as a Novel Concept for Neuroblastoma Therapy*. Cancers (Basel), 2021. **13**(8).
142. Rao, G., et al., *Sonic hedgehog and insulin-like growth factor signaling synergize to induce medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice*. Oncogene, 2004. **23**(36): p. 6156-62.
143. Mill, P., et al., *Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc*. Dev Cell, 2005. **9**(2): p. 293-303.
144. Wang, J., et al., *Inhibition of autophagy potentiates the efficacy of Gli inhibitor GANT-61 in MYCN-amplified neuroblastoma cells*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 768.
145. Tang, X.X., et al., *The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2826-33.
146. Wolpaw, A.J., et al., *Drugging the "Undruggable" MYCN Oncogenic Transcription Factor: Overcoming Previous Obstacles to Impact Childhood Cancers*. Cancer Res, 2021. **81**(7): p. 1627-1632.
147. Powers, J.T., et al., *Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma*. Nature, 2016. **535**(7611): p. 246-51.

148. Liu, T., et al., *MYCN mRNA degradation and cancer suppression by a selective small-molecule inhibitor in MYCN-amplified neuroblastoma*. *Front Oncol*, 2022. **12**: p. 1058726.
149. Fei, D.L., et al., *Activation of Hedgehog signaling by the environmental toxicant arsenic may contribute to the etiology of arsenic-induced tumors*. *Cancer Res*, 2010. **70**(5): p. 1981-8.
150. Li, B., et al., *Arsenic Attenuates GLI Signaling, Increasing or Decreasing its Transcriptional Program in a Context-Dependent Manner*. *Mol Pharmacol*, 2016. **89**(2): p. 226-32.
151. Paffhausen, T., M. Schwab, and F. Westermann, *Targeted MYCN expression affects cytotoxic potential of chemotherapeutic drugs in neuroblastoma cells*. *Cancer Lett*, 2007. **250**(1): p. 17-24.
152. Qi, K., et al., *Pre-application of arsenic trioxide may potentiate cytotoxic effects of vinorelbine/docetaxel on neuroblastoma SK-N-SH cells*. *Biomed Pharmacother*, 2019. **113**: p. 108665.
153. Günes, D.A., et al., *Co-application of arsenic trioxide (As₂O₃) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and cytotoxicity*. *Neurotoxicology*, 2009. **30**(2): p. 194-202.
154. Kim, K.J., et al., *Antitumor effects of imatinib mesylate and synergistic cytotoxicity with an arsenic compound in neuroblastoma cell lines*. *Exp Ther Med*, 2011. **2**(3): p. 557-561.
155. Modak, S., et al., *Arsenic Trioxide as a Radiation Sensitizer for 131I-Metaiodobenzylguanidine Therapy: Results of a Phase II Study*. *J Nucl Med*, 2016. **57**(2): p. 231-7.
156. Li, C., et al., *Excellent Early Outcomes of Combined Chemotherapy With Arsenic Trioxide for Stage 4/M Neuroblastoma in Children: A Multicenter Nonrandomized Controlled Trial*. *Oncol Res*, 2021. **28**(7): p. 791-800.
157. Carpenter, R.L. and H. Ray, *Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer*. *Drug Saf*, 2019. **42**(2): p. 263-279.
158. Shen, Z.X., et al., *Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients*. *Blood*, 1997. **89**(9): p. 3354-60.
159. Zhu, H.H., et al., *The simpler, the better: oral arsenic for acute promyelocytic leukemia*. *Blood*, 2019. **134**(7): p. 597-605.
160. Li, C.L., et al., *Repurposed itraconazole for use in the treatment of malignancies as a promising therapeutic strategy*. *Biomed Pharmacother*, 2022. **154**: p. 113616.
161. Ally, M.S., et al., *Effects of Combined Treatment With Arsenic Trioxide and Itraconazole in Patients With Refractory Metastatic Basal Cell Carcinoma*. *JAMA Dermatol*, 2016. **152**(4): p. 452-6.
162. Lipp, H.P., *Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of the antifungal extended-spectrum triazole posaconazole: an overview*. *Br J Clin Pharmacol*, 2010. **70**(4): p. 471-80.
163. Chen, L., et al., *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Posaconazole*. *Drugs*, 2020. **80**(7): p. 671-695.
164. Bury, D., et al., *Clinical Pharmacokinetics of Triazoles in Pediatric Patients*. *Clin Pharmacokinet*, 2021. **60**(9): p. 1103-1147.
165. Teske, K.A., et al., *Development of posaconazole-based analogues as hedgehog signaling pathway inhibitors*. *Eur J Med Chem*, 2019. **163**: p. 320-332.

VII Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Ursula Holzer durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte durch Frau Prof. Ursula Holzer.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Sarah Bühler, Ute Krauß, Tamar Ioselani, Florian Heubach, Elke Malenke und Daniela Köndgen) eigenständig durch mich durchgeführt. Das Passagieren und der Erhalt der Zellkulturen wurde zum großen Teil von Frau Ute Krauß übernommen, ebenso die meisten Schritte der NK-Zell-Isolation.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Für einige Fragestellungen wurde eine Beratung durch das CPCS Tübingen in Anspruch genommen.

VIII Danksagung

Prof. Ursula Holzer danke ich zuvorderst für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit erstellen zu können, für die fachliche und menschliche Unterstützung während des Projekts, die permanente Erreichbarkeit, ihre stetige Motivation und auch Nachsicht gegenüber nicht-eingehaltenen Deadlines und vor allem für ihr Vertrauen in mich.

Ute Krauß und Sarah Bühler danke ich für die Einarbeitung in die Laborarbeit, die großartige Unterstützung im Labor, den wertvollen Input und die zahlreichen Tipps und Tricks.

Tamar Ioselani danke ich für die Einarbeitung in verschiedene Methoden, für das Teilen der Frustration bei schiefgelaufenen Versuchen sowie insbesondere für die Rettung, als ich einmal am FACS verzweifelt bin.

Auch allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe André danke ich für die überaus angenehme gemeinsame Zeit im Labor und das Überlassen von Zellen und Materialien.

Elke Malenke und Daniela Köndgen danke ich für die freundliche Einweisung an verschiedenen Geräten und die stets nette Zusammenarbeit.

Florian Heubach und der Arbeitsgruppe Lang danke ich für die Einweisung am XCELLigence und das Überlassen verschiedener Materialien.

Prof. Michaela Döring danke ich für die stetige Unterstützung und Beratung sowie für das Vorleben eines großartigen Arzt- und Menschenbildes.

Meinen Freunden Philip und Ulrich danke ich für den wertvollen Beitrag zu diesem Projekt und für die auch darüber hinaus jederzeit vorhandene Bereitschaft zur Unterstützung.

Mein Dank gilt ferner allen Lehrerinnen und Lehrern, die mich während meiner Schullaufbahn unterrichteten und sowohl fachlich als auch menschlich großen Einfluss genommen haben. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Altmann, Herrn Rehfeld, Herrn Dietrich, Frau Abourjeily und Frau Knoll herausheben.

Zu guter Letzt gebührt meinen Eltern mein tiefster Dank, dass sie mich jederzeit in allen Formen unterstützt haben und mir diese akademische Ausbildung ermöglicht haben.