

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Kinderchirurgie mit Poliklinik

**Wirkung von Sildenafil in kindlichen soliden
Tumoren am Beispiel vom Hepatoblastom und
kindlichem hepatozellulärem Karzinom**

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

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

**vorgelegt von
Schmidt, Yannick Michael
2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Warmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. E.-M. Grischke

Tag der Disputation: 08.10.2020

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis.....	12
1 Einführung	16
1.1 Kindliche Malignome	16
1.1.1 Das Hepatoblastom.....	17
1.1.2 Das pädiatrische hepatozelluläre Karzinom.....	26
1.2 Chemotherapeutika	29
1.2.1 Therapie allgemein.....	29
1.2.2 Doxorubicin	29
1.2.2 Cisplatin	31
1.3 Phosphodiesterasen.....	33
1.3.1 Einführung in die Phosphodiesterasen	33
1.3.2 Phosphodiesterase 5 (PDE5).....	34
1.3.3 Sildenafil Anwendungsbereiche	34
1.4 Fragestellung der Arbeit	36
2 Material und Methoden	37
2.1 Verwendete Zelllinien	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Zellroutine	38
2.2.2 Allgemeine Versuchsvorbereitungen und –durchführungen	40
2.2.3. Zellviabilitäts-Messung mittels MTT-Assay	42
2.2.4 Durchflusszytometrische Messungen	44
2.2.5 Migration mittels Transwell-Assay.....	48

2.2.6 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	50
2.2.7 Western Blot.....	53
3 Ergebnisse.....	58
3.1 Viabilitäts-Assays (MTT) in divergierenden Behandlungsschemata	58
3.1.1 MTT Doxorubicin.....	59
3.1.2 MTT Cisplatin	63
3.1.3 MTT Sildenafil	67
3.1.4 MTT Kombinationen Doxorubicin und Sildenafil	71
3.1.5 MTT Kombinationen Cisplatin und Sildenafil	77
3.2 Reaktive Sauerstoffspezies.....	82
3.2.1 ROS Sildenafil und/oder Doxorubicin.....	82
3.2.2 ROS Sildenafil und/oder Cisplatin.....	84
3.2.3 ROS Sildenafil und/oder Chemotherapie	85
3.3 Apoptose	87
3.3.1 Apoptose Sildenafil und/oder Doxorubicin	87
3.3.2 Apoptose Sildenafil und/oder Cisplatin	91
3.3.3 Apoptose Sildenafil und/oder Chemotherapie.....	93
3.4 RT-PCR.....	95
3.5 Western Blot.....	97
3.6 ALDEFLUOR® Assay	99
3.7 Migration.....	100
4 Diskussion	103
4.1 Viabilitätsminderung durch Sildenafil	103
4.2 Verstärkte Viabilitätsminderung durch additive Gabe von Sildenafil	104
4.3 Vermehrte ROS-Produktion durch (additive) Gabe von Sildenafil	105
4.4 Gesteigerte Apoptose durch additive Gabe von Sildenafil	106

4.5 Verminderung der Expression von beta-Catenin und CyclinD1 in RT-PCR und Western Blots durch Sildenafil	108
4.6 Reduktion des cancer stem cell - Anteils durch Sildenafil.....	109
4.7 Einflüsse von Sildenafil, Doxorubicin und Cisplatin auf die Migrationsfähigkeit der Zellen	110
4.8 Unterschiede der Effekte auf die verschiedenen Zell-Linien	110
4.9 Ausblicke	111
5 Zusammenfassung	113
Veröffentlichungen.....	115
Literaturverzeichnis.....	116
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	125
Danksagung.....	126
Curriculum Vitae	127

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium I; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin <i>et al.</i> ; [21].	19
Abb. 2: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium II; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin <i>et al.</i> ; [21].	19
Abb. 3: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium III; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin <i>et al.</i> ; [21].	20
Abb. 4: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium IV; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin <i>et al.</i> ; [21].	21
Abb. 5: Wnt/beta-Catenin-Signalweg; übernommen von Moon <i>et al.</i> , 2004 [34]	25
Abb. 6: Hydrolyse der 3' zyklischen Phosphatbindung; [88].	33
Abb. 7: Übersicht der Strukturformeln der im MTT-Assay verwendeten Reagenzien; [134].	42
Abb. 8: Übersicht über den schematischen Aufbau eines FACS™-Gerätes; [136].	45
Abb. 9: Übersicht über schematischen Ablauf eines Transwell-Assays.	50
Abb. 10: Aufbau des Blots zur Übertragung der Proteine auf die Membran;....	57
Abb. 11: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Doxorubicin (Dox) behandelte HepT1-Zellen.	59
Abb. 12: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Doxorubicin (Dox) behandelte HC-AFW1-Zellen.	61
Abb. 13: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Cisplatin (Cis) behandelte HepT1-Zellen.	63
Abb. 14: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Cisplatin (Cis) behandelte HC-AFW1-Zellen.	65
Abb. 15: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Sildenafil (Sil) behandelte HepT1-Zellen.	67
Abb. 16: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Sildenafil (Sil) behandelte HC-AFW1-Zellen.	69
Abb. 17: Viabilitäts-Assay (MTT) der HepT1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) behandelt wurde.	72

Abb. 18: Viabilitäts-Assay (MTT) der HC-AFW1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) behandelt wurde.....	75
Abb. 19: Viabilitäts-Assay (MTT) der HepT1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) behandelt wurde.....	78
Abb. 20: Viabilitäts-Assay (MTT) der HC-AFW1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) behandelt wurde.	80
Abb. 21: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der HepT1-Zelllinie unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) für 24 h.	82
Abb. 22: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der HepT1-Zelllinie unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) für 24 h.....	84
Abb. 23: Prozentualer Anteil der HepT1-Zelllinie, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) in frühe Apoptose übergehen.....	87
Abb. 24: Prozentualer Anteil der HC-AFW1-Zelllinie, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) in frühe Apoptose übergehen.....	89
Abb. 25: Prozentualer Anteil der HepT1-Zelllinie, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) in frühe Apoptose übergehen.....	91
Abb. 26: Prozentualer Anteil der HC-AFW1-Zellline, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) in frühe Apoptose übergehen.....	92
Abb. 27: Expression von beta-Catenin (β -Catenin) und Cyclin D1 auf Transkriptionsebene in HepT1-Zellen unter 8- oder 24-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) normiert zum Vorkommen in unbehandelter 0-Kontrolle (0 Kon).	95
Abb. 28: Messung der Proteinexpression von beta-Catenin/GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in HepT1-Zellen unter 24-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) mittels Western Blot.	97
Abb. 29: Messung des absoluten Anteils ALDEFLUOR [®] -positiv gefärbter Zellen unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) an der Zellpopulation.	99

Abb. 30: Beispiel-Fotografien der Migrations-Assays der HepT1-Zelllinie nach einer Migrationsdauer von 48 h (5x Vergrößerung).....	100
Abb. 31: Migration von HepT1-Zellen unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) und/oder Cisplatin (Cis) normiert zur Migration der unbehandelten 0-Kontrolle (0 Kon).....	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht: Todesfälle/-ursachen Kinder im Alter von 1-15 Jahren in Deutschland; 2013-2015; [1].....	16
Tabelle 2: Tabellarische Übersicht über die altersspezifische Inzidenz von Hepatoblastomen in den USA im Zeitraum von 2004-2008; [6].	17
Tabelle 3: Übersicht über die zusätzlichen Bezeichnungen; [21].	21
Tabelle 4: Übersicht über das Gesamtüberleben bei pHCC-Erkrankung; [39]. ..	27
Tabelle 5: Übersicht über die Stock-Konzentrationen der verwendeten Medikamente.	41
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zellkultur-Platten (Cell Culture Multiwell Plates Corning® CellBIND®, Corning, USA), die eingesetzte Zellzahl pro Well und das Endvolumen pro Well nach der Behandlung;.....	41
Tabelle 7: Übersicht über die möglichen Messergebnisse und die daraus resultierenden Aussagen über die Viabilität der Zellen.....	47
Tabelle 8: Zeiträume und Temperaturen eines Zyklus' der RT-PCR.....	51
Tabelle 9: Zeiträume und Temperaturen eines Zyklus' des verwendeten Programms des Thermocyclers.....	52
Tabelle 10: Übersicht über die in der RT-PCR verwendeten Primer.	52
Tabelle 11: Übersicht verwendeter Substanzen und Hersteller.....	53
Tabelle 12: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen.....	54
Tabelle 13: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Gele. Sämtliche Volumina sind in ml angegeben.....	55
Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen.	56
Tabelle 15: Quotient aus dem Effekt (Differenz der ROS-Produktion im Vergleich zur Nullkontrolle) der Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Doxorubicin (Dox) bzw. Cisplatin (Cis) durch den Effekt der solitären Chemotherapie der jeweiligen Konzentration in der Zelllinie HepT1.....	86
Tabelle 16: Quotient aus dem Effekt (Differenz der Apoptose-Rate der Tumorzellen im Vergleich zur Nullkontrolle) der Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Doxorubicin (Dox) bzw. Cisplatin (Cis) durch den Effekt der solitären Chemotherapie der jeweiligen Konzentration.	94

Tabelle 17: Vereinfachte Übersicht über die Ergebnisse dieser Arbeit.113

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
alphaFP	alpha-Fetoprotein
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APC	Annual Percent Change
APS	Ammoniumpersulfat
BAAA	BODIPY-Aminoacetylacetate
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma extra large
beta-hCG	humanes Choriongonadotropin
BSA	Bovine Serum Albumin
BSEB	Bile Salt Export Pump
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
Ca	Carcinoma
Ca ²⁺	Calcium Kationen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CH ₃ COOH	Essigsäure
CHIC	Children's Hepatic tumors International Collaboration
Cis	Cisplatin
CK	Casein Kinase
cm ²	Quadratcentimeter
CSC	cancer stem cells
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COG	Children's Oncology Group
CT	Computer-Tomographie
DCFH-DA	2'-7'Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure

Dox	Doxorubicin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	erektile Dysfunktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Event-Free-Survival
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FAP	familiäre adenomatöse Poliposis coli
FCS	Fetal Bovine Serum
FSC	forward-scattered
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSK	Glykogen Synthase Kinase
h	Stunde
HB	Hepatoblastom
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HR-HB	High-Risk-Hepatoblastome
HRP	horseradish Peroxidase
JPLT	Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor
L	links
LJ	Lebensjahr
LOH	loss of heterozygosity
m ²	Quadratmeter
MAPK	mitogen activated protein kinase
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium Kationen
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MTT Reagenz	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
n	Anzahl der Messwerte einer Messreihe
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	non small cell lung carcinoma
paH	pulmonale arterielle Hypertonie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
pHCC	pädiatisches hepatozelluläres Karzinom
PHITT	Pediatric Hepatic International Tumor Trial
PI	Propidiumiodid
PRETEXT	Pre Treatment Extent of Disease grouping system
R	rechts
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCLC	small cell lung carcinoma
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
Sil	Sildenafil
SIOPEL	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group
SR-HB	Standard-Risk-Hepatoblastome
SSC	side-scattered

SSW	Schwangerschaftswochen
TACE	transarterielle Chemoembolisation
Tbp	TATA-box binding protein
TBS	Tris-buffered saline
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkungen
V	Vena
Vv	Venae
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
7AAD	7-amino-actinomycin-D Viability Staining Solution

1 Einführung

1.1 Kindliche Malignome

Allgemein

Nach Herz-Kreislaufkrankungen stellen Malignome die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. So erlagen im Jahr 2015 25% aller Verstorbenen einem Krebsleiden. Trotz kontinuierlichem Anstieg des durchschnittlichen Erkrankungs- und Sterbealters, nehmen Krebserkrankungen mit 27% aller Todesfälle im Alter zwischen dem 1. und 15. Lebensjahr einen erheblichen Anteil als Todesursache im Kindesalter ein [1].

Tabelle 1: Übersicht: Todesfälle/-ursachen Kinder im Alter von 1-15 Jahren in Deutschland; 2013-2015; [1].

Malignombedingt entspricht dabei Tod durch bösartige Neubildungen und durch Leukämien.

	2013	2014	2015
insgesamt	1043	971	1037
malignombedingt	275 (26,4%)	267 (27,5%)	257 (24,8%)

Kindliche solide Lebertumoren

Kindliche Lebertumoren sind in benigne und maligne Tumorentitäten zu gliedern. Eine genauere Einteilung folgt der Gliederung der Entitäten nach Weinberg und Finegold von 1983. Den größten Anteil maligner Lebertumoren im Kindesalter stellten dabei die Hepatoblastome (HB) dar, gefolgt von kindlichen hepatozellulären Karzinomen (pHCC) als zweithäufigste maligne Neoplasie. [2]. Folglich beschäftigt sich diese Arbeit mit diesen zwei malignen Tumorentitäten, dem Hepatoblastom und dem kindlichen hepatozellulären Karzinom. Zusammen mit den Lebersarkomen machen diese Entitäten 1-2% aller solider Tumoren im Kindesalter aus [3].

1.1.1 Das Hepatoblastom

Epidemiologie

Hepatoblastome (HB) stellen die häufigste Art pädiatrischer maligner Lebertumoren dar und sind mit einem Anteil von 1% an allen bösartigen kindlichen Neoplasien im klinischen Alltag vertreten [3, 4]. Eine breit angelegte europäische Studie (1978-1997) ermittelte eine Inzidenz des HB von 1,2/1.000.000 bis zu einem Alter von 15 Jahren [5]. Das United States *Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) – Program* schlüsselt die entsprechenden Daten der Jahre 2004-2008 für US-amerikanische Kinder weiter auf (*Tabelle 2*) [6].

Bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter zwischen 18-20 Monaten werden 5% der HB nach dem 4. Lebensjahr (LJ) diagnostiziert [7, 8]. Weiterhin zu erwähnen ist eine 1,5-1,6-fach höhere Inzidenz des HB beim männlichen Geschlecht [5], sowie der signifikante Anstieg der Inzidenz von 4,3 %/Jahr (APC, Annual Percent Change), dem stärksten Anstieg aller kindlichen Krebsentitäten [9].

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht über die altersspezifische Inzidenz von Hepatoblastomen in den USA im Zeitraum von 2004-2008; [6].

Alter [Jahre]	0-14	0-19	<1	1-4	5-9	10-14	15-19
Inzidenz [Prozent]	2,6	2,4	11,0	5,3	0,7	0,8	1,7

Ätiologie

Das HB ist ein embryonaler Tumor der Leber, dessen Ätiologie weitestgehend ungeklärt ist und durch Störung der physiologischen Zelldifferenzierung während der Organogenese entsteht [10].

Eine erhöhte Inzidenz ist bei Vorliegen des Beckwith-Wiedemann-Syndroms (BWS) mit einem relativen Risiko (RR) von 2280 bei erkrankten Kindern unter 4 Jahren gegeben [11]. Ebenfalls assoziiert mit einem vermehrten Auftreten von HB ist die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) [12, 13], wobei das RR bei erkrankten Kindern unter 4 Jahren 847 beträgt [14].

Auch die Exposition der Eltern gegenüber schädlichen Stoffen, wie z.B. Metallen, Petroleum und Farben [15], sowie etwaiges Zigarettenrauchen der Eltern [16, 17]

erhöhen das Risiko des Kindes an einem HB zu erkranken. Des Weiteren korrelieren eine verfrühte Geburt (< 37. Schwangerschaftswoche (SSW)) und ein geringes Geburtsgewicht mit einer vermehrten Ausbildung eines HB in Kindern [18].

Stadien-Einteilung und Prognose

Die mittlerweile gängigste Methode zur Einteilung der HB ist das PRETEXT-System (Pre Treatment Extent of Disease grouping system). Im Rahmen der Studie SIOPEL 1 (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group) der International Childhood Liver Tumors Strategy Group entstand das System mit dem Ziel die Tumorausdehnung vor Beginn der Behandlung klassifizieren zu können.

Dabei findet eine Unterscheidung in die Stadien PRETEXT I-IV, sowie ggf. eine Beschreibung weiterer Tumoreigenschaften mittels zusätzlicher Kennung Anwendung. Die Leber ist hierzu in vier Sektoren unterteilt (siehe *Abb. 1-4* und *Tabelle 3*) [19-21]. Dieses System findet ebenfalls bei der Klassifizierung der Tumoren nach adjuvanter Chemotherapie, nach jeweils zwei Zyklen, dann unter dem Namen POST-TEXT Verwendung [22].

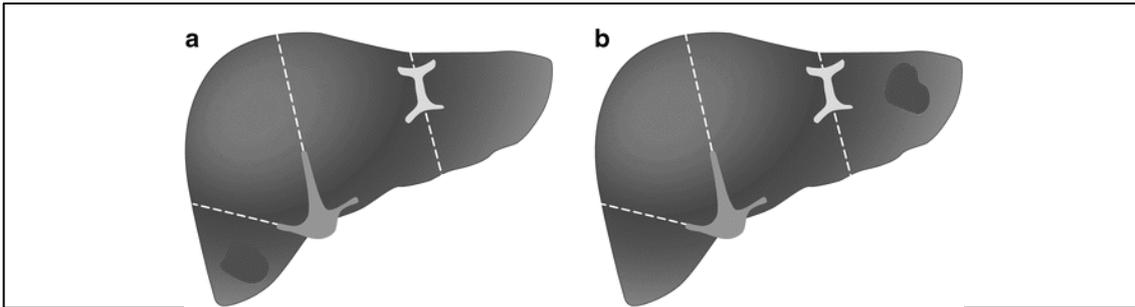


Abb. 1: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium I; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin *et al.*; [21].

Tumor (a) im rechts posterioren Sektor; (b) im links lateralen Sektor.

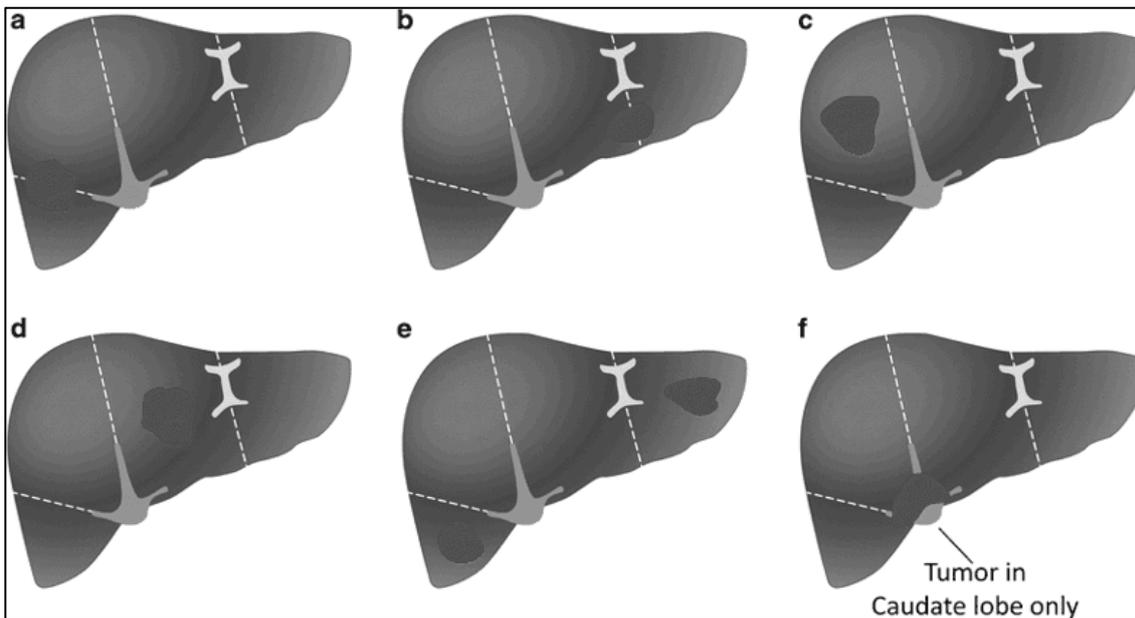


Abb. 2: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium II; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin *et al.*; [21].

Der Tumor betrifft einen der folgenden Bereiche oder deren Kombinationen: Tumor (a) im rechts anterioren und rechts posterioren Sektor; (b) im links medialen und links lateralen Sektor; (c) im rechts anterioren Sektor allein; (d) im links medialen Sektor allein; (e) im rechts posterioren und links lateralen Sektor; (f) im Lobus caudatus allein.

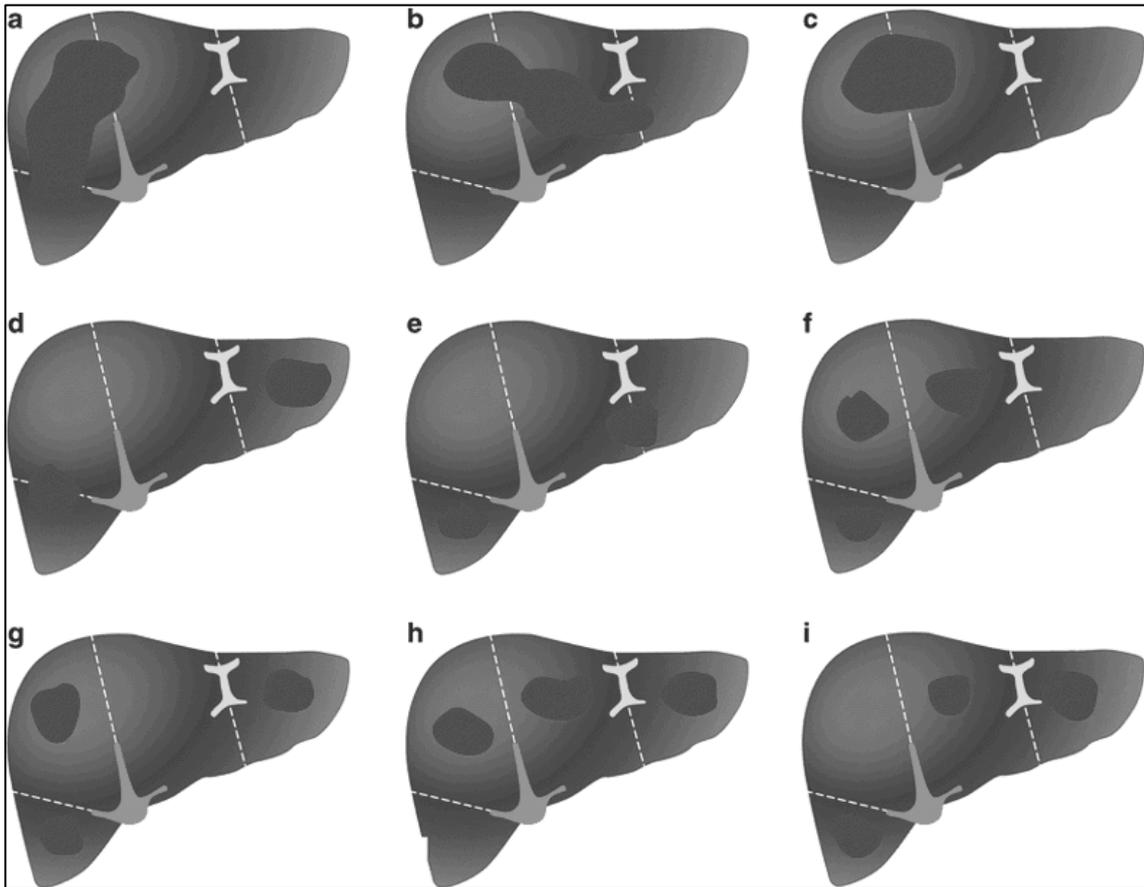


Abb. 3: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium III; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin *et al.*; [21].

Der Tumor betrifft einen der folgenden Kombinationen: Tumor **(a)** im links medialen, rechts anterioren und rechts posterioren Sektor; **(b)** im links lateralen, links medialen und rechts anterioren Sektor; **(c)** im rechts anterioren und links medialen Sektor; **(d)** im rechts anterioren, rechts posterioren und links lateralen Sektor; **(e)** rechts posterioren, links medial und links lateralen Sektor. **(f)** im links medialen, rechts anterioren und rechts posterioren Sektor (multifokal); **(g)** im rechts anterioren, rechts posterioren und links lateralen Sektor (multifokal); **(h)** im links lateralen, links medialen und rechts anterioren Sektor (multifokal); **(i)** im rechts posterioren, links medialen und links lateralem Sektor (multifokal).

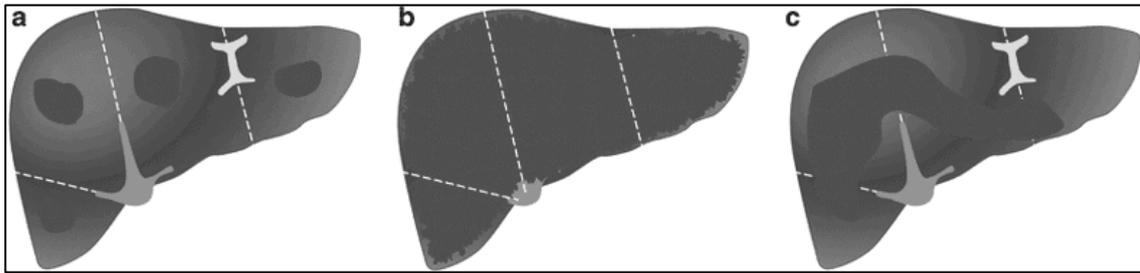


Abb. 4: Übersicht über das PRETEXT-System, Stadium IV; Grafik und Beschreibung übernommen von Towbin *et al.*; [21].

Tumor in einer der folgenden Kombinationen: Tumor (a) multifokal in allen Sektoren; (b) mit diffuser Infiltration; (c) groß und in allen vier Sektoren (sehr selten).

Tabelle 3: Übersicht über die zusätzlichen Bezeichnungen; [21].

V	Einbeziehung von Lebervenen/Vena cava inferior
P	Einbeziehung der Vena porta
E	Extrahepatische Einbeziehung zusammenhängend mit dem Lebertumor
F	Multifokalität
R	Ruptur
C	Einbeziehung des Lobus caudatus
N	Lymphknoten-Metastasen
M	Fernmetastasen

Das PRETEXT-System unterliegt andauernden Modifikationen durch die SIOPEL-Group, welche vor allem die genannten Zusatzkriterien betreffen (siehe Roebuck *et al.*, [23]). Diese Kriterien sind auf alle malignen kindlichen Lebertumoren, auch kindliche hepatozelluläre Karzinome (s.u.) anwendbar [21, 23].

Mit Hinblick auf die Pediatric Hepatic International Tumor Trial (PHITT) wurden die PRETEXT-Stadien und sämtliche Zusatzbezeichnungen zuletzt 2017 aktualisiert. Gesellschaften SIOPEL, Children's Oncology Group (COG) und der Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors (JPLT) angegliedert [21].

In den Folgestudien der SIOPEL werden die Tumoren der einzelnen Stadien in Standard-Risk-Hepatoblastome (SR-HB) und High-Risk-Hepatoblastome (HR-HB) zusammengefasst und entsprechend dieser Einteilung unterschiedlich

behandelt. Dabei zählen die Stadien PRETEXT I-III zu den SR-HB und PRETEXT IV oder das Vorhandensein von Metastasen, extrahepatischer Befall, Beteiligung der Venen oder ein Serum alpha-Fetoprotein-Spiegel (alphaFP) < 100 µg/l zu den HR-HB [24, 25].

Eine höhere PRETEXT-Klassifikation oder eine höhere Anzahl an sonstigen, oben genannten Zusatzkriterien geht mit einem verringerten Langzeitüberleben der Patienten einher. Außerdem ist bei paralleler Betrachtung der Daten sämtlicher SIOPEL-Studien eine deutliche Progredienz, sowohl im Therapie-Ansprechen der Tumoren, als auch im Langzeitüberleben zu beobachten. So sprechen 97% der HR-HB prinzipiell auf die Therapie an, 87% sind komplett resektabel. Das 3-Jahres-Überleben liegt bei diesen Patienten bei 82%.

Für diese und weitere Werte bezüglich des Therapie-Outcomes, Langzeitüberlebens und des EFS (Event-Free-Survival), aufgeschlüsselt nach PRETEXT-Stadium und Risiko-Klassifizierung, siehe Czauderna *et al.*, [26].

Um eine genauere Einteilung bezüglich des Therapie-Outcomes erzielen zu können, wurden 2017 von der neu geformten Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC) die Datensätze der Gesellschaften SIOPEL, JPLT, COG und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) erstmals zusammengefasst und ausgewertet. Anhand der Einteilung in die PRETEXT-Stadien (I/II,III,IV), des Alters (<3 Jahre, 3-7 Jahre, ≥8 Jahre), alphaFP-Konzentration (≤100 ng/ml, 101-1000 ng/ml), sowie der zusätzlichen Faktoren Fernmetastasierung, makrovaskuläre Einbeziehung sämtlicher Lebervenen bzw. der portalen Bifurkation, extrahepatische Tumoranteile, Multifokalität und Ruptur des Tumors erfolgte eine neue Risikostratifizierung. Der Auswertung folgte eine neue Einteilung in die vier Risikoklassen Very low, Low, Intermediate und High. Eine genaue Aufschlüsselung des zu Grunde liegenden Algorithmus' ist der Veröffentlichung von Meyers, Maibach, Hiyama, Häberle, Krailo und Rangaswami *et al.* zu entnehmen [27].

Symptome und Diagnostik

Erkrankte Kinder werden zumeist mit einer schmerzlosen, abdominal palpablen Masse vorstellig, während Schmerz oder andere klinische Manifestationen z.B.

in Form eines paraneoplastischen Syndroms [humanes Choriongonadotropin (beta-hCG) getriggerte Pubertas praecox] nur selten auftreten. In fortgeschrittenen Stadien können weitere unspezifische Symptome wie Erbrechen, Gewichtsverlust oder sonstige B-Symptomatik auftreten.

Wenn nicht durch eine der oben genannten genetischen Grunderkrankungen beeinträchtigt, weisen die Kinder im Regelfall eine physiologische Entwicklung und Leberfunktion auf [8]. Mittels Ultraschalluntersuchung kann eine Raumforderung in der Leber lokalisiert werden. Zur erweiterten Diagnostik bedarf es im Anschluss einer 3-Phasen-Computer-Tomographie (CT), bzw. einer Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), gegebenenfalls unter Kontrastmittelgabe [22]. In der Labordiagnostik ist eine normozytäre, normochrome Anämie und eine Thrombozytose zu finden. Die Analyse des alphaFP-Serumspiegels sollte stets erfolgen. Dabei ist alphaFP, ein sehr sensitiver, aber nicht spezifischer Tumormarker, welcher bei > 90% der HB-Erkrankungen erhöht ist. Des Weiteren sollte zum Ausschluss etwaiger Fernmetastasierung eine CT der Lunge angefertigt werden [10]. Eine mögliche familiäre Disposition ist vor allem mit Hinsicht auf die FAP abzuklären.

Als nahezu pathognomonisch gilt die Kombination aus Lebertumor zwischen dem 6. Lebensmonat und dem 3. Lebensjahr, Thrombozytose und erhöhtem alphaFP [10].

Histologie

Das HB entwickelt sich aus hepatischen Stammzellen und weist eine epitheliale Differenzierung, oft jedoch mit mesenchymaler Komponente auf. Zu unterscheiden sind das rein epitheliale HB, welches wiederum in einen höher differenzierten, rein fetalen und einen niedriggradiger differenzierten, embryonal-fetal gemischten Typ zu unterteilen ist und das gemischt epithelial-mesenchymale HB. Letzteres kann Osteoid-Inseln oder chondrale Anteile aufweisen [3]. Mit Hinblick auf die PHITT ist zur Risiko-Einteilung eine histologische Klassifizierung in Well Differentiated Foetal (WDF) und Not-well Differentiated Foetal (Non-WDF) entscheidend auch für die daraus folgende Therapie [28].

Genetik

Neben den oben genannten genetischen Syndromen konnten auf molekulargenetischer Ebene weitere potenziell ursächliche Gendefekte entschlüsselt werden. So konnten häufig veränderte Karyotypen und numerische Aberrationen, insbesondere Trisomien der Chromosomen 8, 20 oder des Chromosomenarms 2q in HB-Zellen beobachtet werden. Diese führen möglicherweise zu einer vermehrten Expression wichtiger Onkogene [29, 30]. Potenziell mitverantwortlich für die Onkogenese ist auch der Loss of heterozygosity (LOH) in bestimmten Regionen der Chromosomen 1 und 11 [10, 31], sowie veränderte Chromosomenstrukturen, vor allem in Form von Translokationen der Chromosomen 1 (1q12-1q21) und 4 (4p32) [10].

Während das p53-Gen nicht verändert ist [32], so ist der Wnt- bzw. der beta-Catenin-Signalweg von entscheidender Bedeutung bei der Entstehung von HB [33]. Mit Bezug auf diesen Signalweg konnten Wie, Y. *et al.* in 2/3 der untersuchten HB Missense-Mutationen bezüglich der Phosphorylierung von Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3beta) oder Deletionen in entsprechenden Desoxyribonukleinsäure(DNS)-Bereichen nachweisen [34]. Diese führen zu fehlender Phosphorylierung von beta-Catenin und damit zur Akkumulation im Zellkern, woraus eine vermehrte Translation der Zielgene des Signalwegs resultiert (*Abb. 5*) [35-37]. Auch epigenetische Veränderungen, beispielsweise die verstärkte Methylierung des p16-Gens, sind häufig in HB vorzufinden [38].

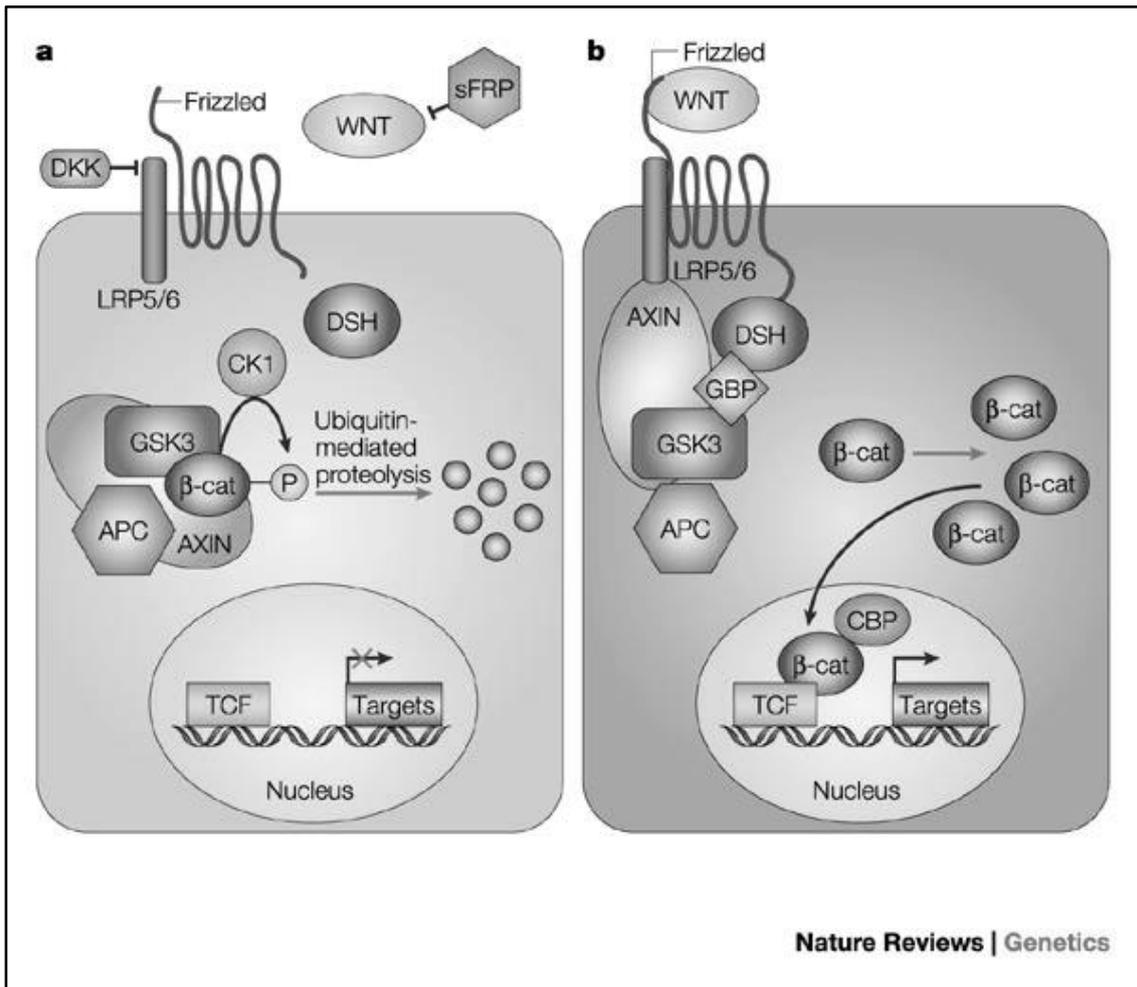


Abb. 5: Wnt/beta-Catenin-Signalweg; übernommen von Moon et al., 2004 [35]

(a) Signalweg ohne aktives Wnt: beta-Catenin wird von GSK3-beta und Casein Kinase (CK1) phosphoryliert und durch Proteolyse abgebaut

(b) Signalweg mit aktivem Wnt: Rezeptor-vermittelt führt Wnt zur Bildung eines Proteinkomplexes an der Membran zusammen mit Axin und dadurch wird der Abbau von beta-Catenin reduziert. Das akkumulierte beta-Catenin tritt in den Zellkern über und aktiviert dort über Bindung an Transkriptionsfaktoren die Transkription seiner Zielgene, übernommen aus Moon et al., 2004 [35].

1.1.2 Das pädiatrische hepatozelluläre Karzinom

Epidemiologie

Pädiatrische hepatozelluläre Karzinome (pHCC) sind mit einem Anteil von 0,5% an allen kindlichen malignen Neoplasien eine seltener auftretende Tumorentität im Kindesalter [8, 39]. Die Inzidenz des pHCC wird durch eine breit angelegte europäische Studie im Zeitraum von 1978-1997 für Kinder bis zu einem Alter von 15 Jahren mit 0,2/1.000.000 angegeben und im Jahre 2009 mit 0,5/1.000.000, wobei die Inzidenz innerhalb der letzten Jahre stabil auf diesem Niveau verblieb [5, 40]. In Hepatitis B (HBV) Hochprävalenzgebieten, wie China, Südostasien und Afrika liegt die Inzidenz jedoch deutlich höher [41-43]. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass, auf Grund der weltweit zunehmenden Vakzinierung gegenüber HBV, die Inzidenz des pHCC zukünftig niedriger sein wird [44]. Die Inzidenz des pHCC ist deutlich geringer als die des HCC des Adulten und nimmt mit steigendem Alter zu, wobei das männliche Geschlecht stets häufiger betroffen ist [39, 45].

Ätiologie

Die genaue Ätiologie ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht hinreichend bekannt und zumeist sind pHCC nicht auf eine einzelne bekannte zu Grunde liegende Pathologie zurückzuführen [46]. In der Regel handelt es sich um eine de novo Tumorgenese und die Mehrheit der pHCC ist nicht mit dem Vorhandensein einer Leberzirrhose assoziiert [45].

Einen bekannten Risiko-Faktor stellt eine, gegebenenfalls vertikal übertragene HBV-Infektion dar. Wenngleich davon ausgegangen wird, dass die Entwicklung eines HCC aus einer HBV-Infektion im Erwachsenenalter mehr als 10 Jahre benötigt, so ist die Inzidenz des pHCC in HBV-Hochprävalenzgebieten dennoch deutlich erhöht. Es ist folglich davon auszugehen, dass sich das pHCC und das HCC des Erwachsenen, obwohl sich beide aus den gleichen Hepatozyten entwickeln können, in den Mechanismen der jeweiligen Onkogenese unterscheiden [47-49].

Eine Assoziation mit anderen chronischen Lebererkrankungen wie metabolischen Erkrankungen oder Gallengangatresie ist dagegen nur selten

nachzuweisen [46]. Zu den seltenen Ursachen gehören Tyrosinämie, Glukose-6-Phosphatase-Mangel oder Defekte des ABCB11-Gens der BSEP (Bile Salt Export Pump) [50-52].

Stadieneinteilung und Prognose

Die Stadien-Einteilung der pHCC erfolgt nach dem in 1.1.1 erläuterten PRETEXT-System der SIOPEL in die Stadien I-IV und gegebenenfalls erfüllte Zusatzkriterien. Insgesamt hat das pHCC im Vergleich zum HB eine deutlich schlechtere Prognose [45]. Ein Überblick über das durchschnittliche Gesamtüberleben ist *Tabelle 4* zu entnehmen.

Dabei ist das Vorliegen einer HBV-Infektion mit einem vermehrten Vorkommen von Leberzirrhose und Tumorinvasion in die Portalvene und dadurch mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert [53]. Ebenfalls mit höherer Mortalität assoziiert sind weibliches Geschlecht und ein höheres Erkrankungsalter [54]. Im Gegensatz dazu sprechen das Vorliegen des fibrolamellären histologischen Subtyps, ein lokales Tumorstadium bei Diagnose und eine Operabilität des Tumors für eine bessere Prognose [40].

Für weitere Werte für das pHCC bezüglich des Therapie-Outcomes, des Langzeitüberlebens und des EFS, aufgeschlüsselt nach PRETEXT-Stadium und Zusatzkriterien, siehe Walther *et al.*, [55].

Tabelle 4: Übersicht über das Gesamtüberleben bei pHCC-Erkrankung; [40].

Zeitraum [Jahre]	5	10	20
Gesamtüberleben [%]	24	23	8

Symptome und Diagnostik

Sämtliche klinische Manifestationen und veränderte Laborwerte gleichen den in 1.1.1 beschriebenen Veränderungen bei Vorliegen eines HB, mit dem Unterschied, dass ein erhöhtes alphaFP beim pHCC seltener nachzuweisen ist und besonders fibrolamelläre pHCC niedrige alphaFP-Serumspiegel aufweisen [45]. Dementsprechend ähnelt der diagnostische Pfad stark dem des bei Verdacht auf ein HB angewandten, unter Berücksichtigung des ins Schulkindalter verschobenen durchschnittlichen Erkrankungsalters des pHCC und einem

geringeren Fokus auf den Nachweis möglicher familiärer Risikofaktoren [8, 10]. Bei Vorliegen der in 1.1.2 genannten Risiko-Faktoren sollte ein pHCC-Screening auf regelmäßiger Basis erfolgen [55].

Histologie

Das pHCC entwickelt sich aus bereits differenzierten Hepatozyten und zählt zu den epithelilalen Lebertumoren [3]. Zu unterscheiden ist zwischen zwei Subtypen: fibrolamelläre und non-fibrolamelläre pHCC [40]. Dabei ist das fibrolamelläre pHCC bei jungen Erwachsenen ohne Leberzirrhose zu finden [56].

Genetik

Die oben beschriebene Ätiologie, das junge Erkrankungsalter und das Therapieansprechen legen nahe, dass sich das pHCC deutlich vom HCC des Adults unterscheidet [48]. Viele verschiedene chromosomale Abnormitäten tragen zur Entstehung eines pHCC bei [47]. Einer Mutation des CyclinD1 wird dabei wenig Bedeutung in der Karzinogenese des pHCC zuteil, während eine Mutation des c-met und ein Loss of heterozygosity (LOH) auf dem Chromosomenarm 13q in der Karzinogenese des kindlichen HCC von größerer Bedeutung sind [49].

Verglichen mit der Tumorgenese des HB finden sich mehrere Gemeinsamkeiten zwischen beiden Tumorentitäten: Sowohl das HB als auch das pHCC können auf Grundlage eines gain of chromosome 1q 8q 17q oder eines loss of 4q entstehen. Des Weiteren kann bei beiden Entitäten eine Veränderung des Wnt- bzw. der beta-Catenin-Signalwegs (*Abb. 5*) durch die in 1.1.1 beschriebene stabilisierende Mutation des beta-Catenins beobachtet werden [47].

1.2 Chemotherapeutika

1.2.1 Therapie allgemein

Die Therapie des HB und pHCC besteht in der Regel aus einer Chemotherapie, chirurgischer Resektion, bzw. einer Kombination dieser Maßnahmen. Ein detailliertes Schema über die aktuellen Vorgaben ist dem Therapie-Algorithmus der PHITT zu entnehmen [28].

In der Gruppe der SR-HB zeigte sich, dass eine neoadjuvante Chemotherapie mit Cisplatin gleichwertige Ergebnisse zu einer neoadjuvanten Kombinationschemotherapie mit Cisplatin und Doxorubicin erbrachte [57]. Die bestmögliche Therapie der HR-HB beinhaltet hingegen weiterhin eine multiagent-Chemotherapie und wird neben sich entwickelnder Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika weiterhin durch Tumorrezidive, aber auch durch die Toxizität der Medikamente verkompliziert und begrenzt [58, 59].

Folglich bedarf es weiterer, neuer Ansätze zur Therapiereform.

1.2.2 Doxorubicin

Überblick

Das Anthracyclin-Antibiotikum Doxorubicin konnte erstmals in den 1960er Jahren aus *Streptomyces peucetius* gewonnen werden [60]. Es findet als weit verbreitetes Chemotherapeutikum in der Therapie eines breiten Spektrums verschiedener maligner Neoplasien seine Anwendung. So wird Doxorubicin unter anderem in der Therapie diverser Karzinome (z.B. Magen-, Ovarial-, Schilddrüsen-, Mamma-, Bronchial-Ca), Sarkome, Lymphome, hämatologischer Neoplasien und auch kindlicher solider Tumoren angewandt [61-63]. Appliziert wird das Pharmakon dabei intravenös oder im Rahmen einer transarteriellen Chemoembolisation (TACE) beispielsweise in der Therapie eines HCC. Angewandt werden kann Doxorubicin dabei alleine oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika [64]. So findet Doxorubicin im Rahmen einer (super)-PLADO Chemotherapie, dann in Verbindung mit Cisplatin, auch Anwendung in der Therapie der in dieser Arbeit erforschten Tumorentitäten, dem Hepatoblastom und dem pHCC [58, 65, 66].

Wirkmechanismen

Die einzelnen Wirkmechanismen von Doxorubicin sind nach heutigem Wissensstand nur zum Teil aufgeklärt und stets Gegenstand aktueller Forschung. Folgende drei Mechanismen haben sich jedoch, bezogen auf die anti-karzinogene Wirkung des Chemotherapeutikums als besonders wichtig erwiesen: (i) Doxorubicin wirkt durch Interkalation in die DNS der Tumorzelle und inhibiert damit die Translation der Nucleinsäuren [67, 68]. (ii) Es inhibiert die Topoisomerase-II- α und damit einen elementaren Schritt der Zellteilung und der DNS-Synthese [69, 70]. (iii) Durch Oxidierung des Pharmakons entstehen in den Zellen vermehrt radikale Sauerstoffspezies (ROS-Reactive Oxygen Species), welche wiederum zu Schäden an der Membran, der DNS und zu Lipid-Peroxidation führen [67].

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Unter der Behandlung mit Doxorubicin können verschiedene unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) auftreten. Neben der zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen kann Doxorubicin auch in nicht betroffenen Organen (z.B. Herz, Niere, Gehirn, Leber) sowohl Apoptose als auch Nekrose induzieren [68]. Das Risiko des Auftretens einer schweren Herzinsuffizienz, abhängig von der applizierten kumulativen Doxorubicin-Dosis, limitiert die maximal zu verwendende Dosis des Chemotherapeutikums [71]. Verschiedene retrospektive Analysen konnten dabei aufzeigen, dass ab einer kumulativen Dosis von 400-500 mg/m² bei 5% der mit Doxorubicin Therapierten eine zum Teil massive Herzinsuffizienz als Folge der Therapie auftrat [72, 73]. Um diese UAW zu eliminieren, bzw. zu reduzieren, sind die Entwicklung von Chemotherapeutika mit ähnlichem Wirkmechanismus und ein spezifischerer Transport des Wirkstoffes zu den Tumorzellen mittels Liposomen, Hydrogel oder Nano-Partikel-Systemen Ziel der heutigen Forschung [68]. Auch die mögliche additive Applikation von Sildenafil wird zur Reduktion der UAW von Doxorubicin in Betracht gezogen (siehe 1.3.3).

1.2.2 Cisplatin

Überblick

Das Zytostatikum Cisplatin ist der Gruppe der Platin-Komplex-Bildner zu zuordnen. Erstmals konnten Rosenberg *et al.* 1964 einen Zellwachstums-Arrest zufällig in *E. coli* in einer Versuchsreihe mit Platinsonden feststellen, und attestierten Cisplatin bald darauf großes Potenzial in der Tumor-Therapie [74, 75]. Cisplatin gehört heute zu den bekanntesten und meist genutzten Chemotherapeutika [76-78]. Anwendung findet es in der Therapie verschiedenster solider maligner Neoplasien, z.B. den Ovar-, Zervix-, Blasen-, (Kopf-/Hals-) Plattenepithel-Karzinomen, Keimzelltumoren, SCLC (small cell lung carcinoma) und NSCLC (non small cell lung carcinoma) [79-81].

Das Pharmakon wird intravenös appliziert. Da viele Malignome zwar initial gut auf eine Cisplatin-Therapie ansprechen, sich jedoch oftmals nach kurzer Zeit Resistenzen ausbilden, wird Cisplatin zumeist bereits initial mit anderen Chemotherapeutika kombiniert [82].

Auch Cisplatin wird in der Chemotherapie des Hepatoblastoms und des pHCC, oftmals in Kombination mit Doxorubicin [als (super)-PLADO Chemotherapie], erfolgreich verwendet [58, 65, 66].

Wirkmechanismen

Erst innerhalb der Zellen wird Cisplatin hydrolisiert und damit aktiviert. So kann es an Purin-Derivate in der DNS binden und verschieden geartete Schäden an dieser induzieren. Der größte Schaden wird dabei durch Cross-linking der DNS (intra- und interstrand) und damit einer Inhibition der DNS-Replikation erreicht [82, 83]. Weitere durch Cisplatin induzierte Mechanismen, welche zu Apoptose und sonstig geartetem Zelltod führende sind die drastisch gesteigerte Bildung von ROS, sowie eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels [82, 84-86]. Zusätzlich kann durch Cisplatin der Tumor-Suppressor p53 und die MAPK (mitogen activated protein kinase) aktiviert werden und Schaden in den Tumorzellen induzieren [87].

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Auch unter der Behandlung mit Cisplatin können verschiedene UAW auftreten. Neben Erbrechen als häufige UAW vieler Chemotherapie-Regime, kann Cisplatin auch in gesunden Zellen Apoptose auslösen. Dabei stehen besonders Nephro-, und Ototoxizität, periphere Neuropathien und in höheren Dosen auch hämatologische Toxizität im Vordergrund, die die maximal zu verwendende Dosis limitieren können [88, 89].

1.3 Phosphodiesterasen

1.3.1 Einführung in die Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) können durch Katalyse der Hydrolyse 3'-zyklischer Phosphatbindungen cAMP (cyclisches Adeninmonophosphat) und cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) abbauen und sind somit ein Hauptregulator für deren intrazelluläre Konzentration (*Abb. 6*).

Es sind 11 PDE-Familien mit insgesamt mehr als 100 verschiedenen mRNA (messenger Ribonukleinsäure) - Produkten bekannt, aus welchen wiederum jeweils unterschiedliche Proteine translatiert werden können. Dabei kann jeder Zelltyp verschiedene PDE exprimieren. Da die Konzentration der Second Messenger und Liganden durch die Regulation ihres Abbaus, die oftmals in größerem Maße beeinflusst wird als die Regulation ihrer Synthese, verändert wird, kann durch Beeinflussung der PDE ein pharmakologischer Effekt erzielt werden.

Koffein wurde als erster Inhibitor der PDE entdeckt. Etwas später folgte das Analogon Theophyllin, welches zu einer generalisierten Inhibition der Aktivität der meisten PDE-Familien in sämtlichen Geweben führt [90]. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der im Folgenden beschriebenen Beeinflussung der PDE 5.

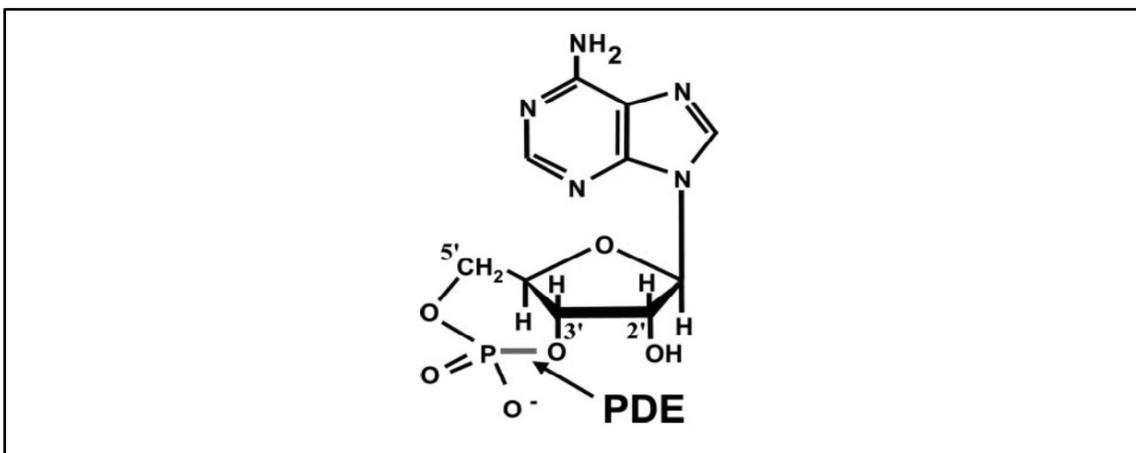


Abb. 6: Hydrolyse der 3' zyklischen Phosphatbindung; [90].

Ansatzpunkt der Spaltung der 3' zyklischen Phosphatbindung durch die PDE am Beispiel von cAMP. Übernommen von Bender et al., 2006 [90].

1.3.2 Phosphodiesterase 5 (PDE5)

PDE5 spalten, bedingt durch eine relative Spezifität der Bindungsstellen, vornehmlich cGMP (100-fach affiner als zu cAMP) [91]. Als gut erforscht gilt die Regulation des Tonus der glatten Cavernosal- bzw. Gefäßmuskulatur in der Lunge und im Penis [92]. Durch den daraus resultierenden Einsatz der PDE5-Inhibitoren bei erektiler Dysfunktion oder pulmonaler Hypertonie, sind diese die am weitesten verbreiteten Pharmaka zur Beeinflussung der Phosphodiesterasen. Des Weiteren partizipieren PDE bei der Regulation der Thrombozyten über NO (Stickstoffmonoxid)-cGMP-signaling. Große Effekte der Inhibitoren können jedoch nur unter additiver Einwirkung von NO oder ANP (atriales natriuretisches Peptid) erzielt werden [90, 93].

Der spezifische Inhibitor Sildenafil kann durch strukturelle Ähnlichkeit zu cGMP an dessen Stelle kompetitiv an die PDE5 binden und dadurch die Hydrolyse des cGMP inhibieren [94-96].

1.3.3 Sildenafil Anwendungsbereiche

Erektile Dysfunktion

Die Entdeckung von Sildenafil als Therapeutikum für die erektile Dysfunktion (ED) ist auf die zufällige Beobachtung während einer Studie zur Erforschung des damals neuen, potenziellen Antihypertонikums zurück zu führen. Zugelassen 1997 in den USA, ist Sildenafil heute ein wichtiger und weit verbreiteter Bestandteil der medikamentösen Therapie der ED. Durch Inhibition der Inaktivierung bzw. der Hydrolyse von cGMP als second messenger von NO (siehe 1.5.2) führt Sildenafil zu verstärkter Antwort auf sexuelle Reize durch Relaxation der glatten Muskeln der corpora cavernosa im Penis. Die hierbei verwendeten Dosierungen werden nur selten von UAW begleitet [92, 94, 97-100].

Pulmonale arterielle Hypertonie

Der PDE5-Inhibitor Sildenafil hat sich außerdem als wirksam in der Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie (paH) erwiesen [101]. Die Anwendung führt zu Verbesserung der pathologischen hämodynamischen Parameter und ist seit 2006 sowohl für den Einsatz im Kindesalter [102, 103], als auch für Erwachsene

zugelassen [104-106]. Sildenafil verstärkt, vermittelt durch cGMP, die pulmonale Vasodilatation durch NO [107, 108] und wirkt zudem antiproliferativ auf die glatte Gefäßmuskulatur der Lunge [109, 110].

Karzinome

PDE5 wird in vielen Karzinom-Entitäten überexprimiert [111]. Das *et al.* (2015) konnten anschaulich die bisherigen Ergebnisse der möglichen anti-kanzerogenen Wirkung von PDE5-Inhibitoren wie Sildenafil zusammenfassen [112]. Zu den Karzinomen, deren Therapie durch Zugabe von PDE5-Inhibitoren verbessert werden könnte, zählen Prostata- [113-117], Mamma- [118], Lungen- [119], Kolon- und andere gastrointestinale Karzinome [120, 121], (pädiatrische) ZNS-Tumoren [122], und B-Zell-Lymphome [123]. Die involvierten Mechanismen beinhalten die Verbesserung der Wirkung der Chemotherapie, z.B. die von Doxorubicin in Prostata-Karzinomen [114], durch Verminderung des Efflux der Medikamente durch ABC-Transporter [111, 124], vermehrte ROS-Bildung, Aktivierung von pro-apoptotischen und Autophagie bedingenden Proteine und Caspasen, sowie die Inhibition anti-apoptotischer Proteine [112].

Kardial

Im Tierversuch zeigte sich die Therapie mit Sildenafil als protektiv für Kardiomyozyten gegenüber Nekrose und Apoptose, z.B. nach Ischämie durch einen akuten Myokardinfarkt [125-127]. Besonders der protektive Effekt gegenüber durch Doxorubicin hervorgerufener Kardiomyopathie durch Apoptose und links-ventrikulärer Dysfunktion durch Inhibition der PDE5 ist mit Bezug auf diese Arbeit zu erwähnen [128-130]. Auch wenn der genaue Mechanismus dieser Protektion bisher nicht erschlossen ist, so scheint das cGMP-vermittelte Öffnen von mitoK_{ATP}-Kanälen [128], sowie eine Verminderung des oxidativen Stress' [129] von erheblicher Bedeutung zu sein.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Wie in 1.1.1 und 1.1.2 beschrieben, führte die Weiterentwicklung der Therapie des HB und des pHCC zwar zu deutlich verbesserten Ansprech- und Heilungsraten, das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben ist jedoch, in Abhängigkeit von Tumorentität und –stadium, weiterhin deutlich eingeschränkt. Ferner limitieren unerwünschte Arzneimittelwirkungen, v.a. die hohe Kardiotoxizität des Doxorubicins, die in der Tumorthherapie verwendeten Höchstdosen der Chemotherapeutika (siehe 1.2.1).

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, in *in vitro* Modellen die viabilitätsmindernden und apoptotischen Effekte der Chemotherapeutika auf Hepatoblastom- und pHCC-Tumorzellen durch zusätzliche Behandlung mit dem PDE5-Inhibitor Sildenafil zu verstärken. Durch eine derartige Kombinationsbehandlung soll eine Dosisreduktion der Chemotherapeutika, ohne Verminderung ggf. aber mit möglicher Steigerung der Effektivität der Therapie erzielt werden können. Die Effektivität der Kombination aus Sildenafil/Doxorubicin und Sildenafil/Cisplatin wird dabei stets in Relation zur Effektivität der entsprechenden solitären Chemotherapie gesetzt.

Des Weiteren sollen die zu Grunde liegenden Mechanismen dieser potenziellen Verbesserung der Therapie erforscht werden. Dazu zählen der Einfluss auf den Zellstoffwechsel, die Zellviabilität, die ROS-Bildung, den Anteil der cancer stem cells an der Tumorzellpopulation und die Migrationsfähigkeit der Zellen. Zudem soll geprüft werden, inwiefern die Wnt-Signaltransduktionskaskade (Wnt-Pathway), vor allem die Expression von beta-Catenin und Cyclin-D1, durch die Zugabe von Sildenafil beeinflusst wird.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit fanden zum einen Zellen der HepT1 Zelllinie (Hepatoblastom, HB) und zum anderen Zellen der HC-AFW1 Zelllinie (pädiatrisches hepatozelluläres Karzinom, pHCC) Verwendung.

HepT1

Die Zelllinie wurde 1996 aus Tumorzellen des multifokalen Hepatoblastoms (Tumor DZ25) eines 3-jährigen Mädchens, ohne vorangegangene Chemotherapie etabliert. Die vornehmlich embryonal differenzierten, epithelialen Tumorzellen wachsen dabei gruppiert. Genetisch weisen sie neben tetraploidem Karyotyp multiple strukturelle und numerische Aberrationen, eine Mutation des beta-Catenins, sowie einen loss of heterozygosity (LOH) auf 11p auf. Neben weiteren für Hepatoblastome nachgewiesenen Charakteristika, konnte für diese Zelllinie intratumorale Erythropoese nachgewiesen werden [131-133].

HC-AFW-1

Die Zelllinie wurde 2012 von Armeanu-Ebinger *et al.* aus Zellen des HCC eines 4-jährigen Jungen, ohne vorangegangene Leberzirrhose oder virale Hepatitis etabliert. Die Zellen sind epithelial, jedoch stark dedifferenziert und schnell wachsend (Verdopplungszeit 40 h). Auch in dieser Zelllinie können multiple genetische Mutationen, u.a. Mutationen des beta-Catenins nachgewiesen werden. Die veränderte Expression von Proteinen, beispielsweise der erhöhten alpha-Fetoprotein Expression, sind als weiteres Charakteristikum eines HCC messbar [134].

2.2 Methoden

2.2.1 Zellroutine

Kultivierung

Das zur Kultivierung beider Zelllinien (HepT1 und HC-AFW1) verwendete Medium setzt sich aus 88% Dulbecco's Modified Eagle Medium (w 3,7 g/l NaHCO₃, w 4,5 g/l D-Glucose, w/o Na-Pyruvate, Biochrom GmbH, Berlin) und den Zusätzen 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, Berlin), 1 % der Antibiotika Streptomycin/Penicillin (je 10.000 µg/ml, Biochrom GmbH, Berlin) und 1 % L-Glutamine (200 mM, Biochrom GmbH, Berlin) zusammen. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm² (U-shaped Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap, Corning®, Corning, USA) in einem Brutschrank (BBD 6220 CO₂ Incubator, Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 37° Celsius, 5% CO₂ und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert und aufbewahrt. Jegliche Sterilität bedürfender Arbeitsschritte wurden unter einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II (Sterilbank MSC Advantage™, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig), die jeweils vor Arbeitsbeginn und nach Arbeitsende mit Descosept AF (Dr.Schuhmacher GmbH, Malsfeld) desinfiziert und in regelmäßigen Abständen mit UV-Licht bestrahlt wurde, durchgeführt. Reagenzien, die in Kontakt mit den Zellen kamen, wurden mit Ausnahme von Antikörpern und Enzymen zuvor im Wasserbad (Typ 1003, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) bei 37 °C erwärmt. Die verwendeten Materialien waren stets steril verpackt oder autoklaviert.

Subkultivierung der Zellen

Täglich wurden die Zellen auf Konfluenz lichtmikroskopisch (Inversmikroskop, Fluovert FS, Leitz GmbH, Wetzlar) untersucht. Sobald eine Zellkulturflasche 80-90% konfluent bewachsen war, wurde diese passagiert, um den Zellen ausreichend Fläche zur Proliferation zu bieten. Dies bedeutete, die adhärennten Zellen von der Innenfläche des Flaschenbodens zu lösen und die in der Flasche verbleibende Zellzahl in einem bestimmten Verhältnis zu passagieren. Die restlichen Zellen wurden entweder im Experiment verwendet oder verworfen.

Das Subkultivieren war somit je nach verwendeter Zelllinie und benötigter Zellzahl alle zwei bis vier Tage notwendig.

Durchführung der Subkultivierung

Im ersten Schritt wurde das Medium unter Verwendung einer Pasteur-Pipette (Pasteur Capillary Pipettes, WU, Mainz) abgesaugt und die Zellen mit Phosphate Buffered Saline (PBS; w/o Ca²⁺, w/o Mg²⁺, Biochrom GmbH, Berlin) gewaschen. Die folgenden Volumina wurden alle unter Hinzunahme einer Pipettierhilfe (Pipetboy acu, Integra Bioscience Deutschland GmbH, Biebertal) und der zugehörigen serologischen Pipetten (Serological Pipet, BD Falcon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) pipettiert. Nach Absaugen des PBS wurde 1 ml Trypsin/EDTA (0,05%, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf die Zellen der verwendeten HepT1-Zelllinie, bzw. 1 ml Accutase® (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) auf die dem Trypsin gegenüber empfindlicheren Zellen der HC-AFW1-Zelllinie gegeben. EDTA dient hierbei der Lösung von Magnesium und Kalzium aus den Zell-Zell-Kontakten und von der Zelloberfläche, während Trypsin Peptidbindungen löst. War der Zellrasen vollständig abgelöst, wurde das Medium im benötigten Volumen hinzugegeben, um die Reaktion abzustoppen und die Zellen in Suspension zu bringen. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde ein Anteil der Zellen entnommen und entweder weiterverwendet, in eine neue Kulturflasche überführt oder verworfen. Im letzten Schritt wurde das Volumen in jeder Flasche auf 13 ml mit Medium aufgefüllt und somit in einem Verhältnis von 1:1,5 bis 1:13 verdünnt.

Bestimmung der Zellzahl

Zur genauen Quantifizierung der Zellen kamen Einweg-Neubauer-Zählkammern (C-Chip, Biochrom GmbH, Berlin) zum Einsatz. Die Zellen wurden wie in 2.2.1 beschrieben mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (für HepT1) bzw. Accutase® (für HC-AFW-1) aus der Zellkulturflasche gelöst. Der benötigte Anteil der Suspension wurde nun in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner centrifuge tube, konischer Boden, Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, A) überführt und wiederholt resuspendiert um die Zellen

bestmöglich zu vereinzeln. Anschließend wurden 10 µl Trypanblau (0,5 %, Biochrom GmbH, Berlin) und 10 µl Zellsuspension mit einer Eppendorf Pipette (Eppendorf Research®, Eppendorf AG, Hamburg) und der entsprechenden Pipettenspitze (100-1000 µl, Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, A; 10-200 µl Sarstedt AG & Co, Nümbrecht; 0,5-10 µl Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) durchmischt in die Zählkammer pipettiert und bei entsprechender Vergrößerung unter dem Mikroskop gezählt. Bei dieser Vitalfärbung erscheinen abgestorbene Zellen blau, während die vitalen Zellen keine Färbung besitzen. Dies erlaubte ein einfaches Auszählen der Zellen in den vier Eckquadraten (Kantenlänge 1 mm, Tiefe 0,1 mm) der Zählkammer. Die Anzahl der vitalen, ungefärbten Zellen je Milliliter berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = S \times V \times 10^4 / 4$$

Dabei ist:

- S = Summe der Zellzahl aller vier ausgezählten Eck-Quadrate
- V = Verdünnungsfaktor (bei Verhältnis wie oben beschrieben V=2)
- 10⁴ = Volumenfaktor in einem Eckquadrat
- 4 = Anzahl der Eckquadrate

2.2.2 Allgemeine Versuchsvorbereitungen und –durchführungen

In den folgenden Versuchen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, wie in 2.2.1 beschrieben gelöst, mittels Neubauer Zählkammer gezählt und in Zentrifugenröhrchen überführt, um bei 1500 U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einer Heraeus Multifuge 1S-R Zentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zentrifugiert zu werden. Um eine Suspension mit 1x10⁶ Zellen/ml herzustellen, wurde der Überstand abgesaugt und das verbleibende Zell-Pellet im entsprechenden Volumen frischen Mediums resuspendiert. Die Zellen wurden in entsprechender Konzentration (*Tabelle 6* in die einzelnen Wells pipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert, sodass die Zellen sich adhären, bevor sie am nächsten Tag behandelt wurden.

Die zur Behandlung mit Sildenafil und den Chemotherapeutika nötigen Konzentrationen (Stock-Konzentrationen sind *Tabelle 5* zu entnehmen) wurden in Reaktionsgefäßen (Safe Lock, 0,5 / 1,5 / 2 ml neoLab® Migge Laborbedarf, Heidelberg) angesetzt und zu den Zellen pipettiert, sodass sich am Ende dieses Schrittes das in *Tabelle 6* angegebene Volumen in jedem Well befand. Sildenafil citrate salt wurde von Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA) bezogen, in DMSO (Dimethylsulfoxid; PanReac AppliChem GmbH, Illinois Tool Works Inc., Glenview, USA) gelöst und aliquotiert. Die Chemotherapeutika wurden von der Apotheke der Universitäts-Kinderklinik Tübingen bezogen.

Tabelle 5: Übersicht über die Stock-Konzentrationen der verwendeten Medikamente.

Medikament	Stock-Konzentration
Sildenafil	10 mM
Doxorubicin	2 mg/ml
Cisplatin	1 mg/ml

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zellkultur-Platten (Cell Culture Multiwell Plates Corning® CellBIND®, Corning, USA), die eingesetzte Zellzahl pro Well und das Endvolumen pro Well nach der Behandlung;

Alle Werte gelten für beide Zelllinien. Abweichende Zellzahlen sind in den einzelnen Methodenbeschreibungen vermerkt.

	Zellzahl [Zellen/Well]	Endvolumen/Well
6-Well Zellkulturplatte	500.000	2ml
12-Well Zellkulturplatte	100.000	1ml
24-Well Zellkulturplatte	100.000	1ml
96-Well Zellkulturplatte	10.000	0,12 ml

2.2.3. Zellviabilitäts-Messung mittels MTT-Assay

Funktionsprinzipien und Reagenzien

Mit dieser Methode können vitale Zellen durch Umwandlung des wasserlöslichen MTT Reagenz [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid] zu wasserunlöslichem Formazan quantifiziert werden. Das Tetrazoliumsalz wird hierbei intrazellulär und NAD(P)H-abhängig durch Dehydrogenasen reduziert. Die benötigten Enzyme sind vor allem in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zu finden. Auch wenn ein Teil des MTT Reagenz von den mitochondrialen Dehydrogenasen umgewandelt wird, findet, nach aktuellem Stand der Wissenschaft, die Reduktion zu einem Großteil abhängig von der Glykolyse-Rate des ER statt [135]. Somit korreliert die Menge des gebildeten Formazans mit der Stoffwechselaktivität und damit mit der Viabilität der Zelle. Die vormals gelbliche Lösung ändert ihre Farbe durch die ausfallenden Formazan-Farbkristalle und erscheint violett-bläulich. *Abb. 7* zeigt die Strukturformeln der Substanzen.

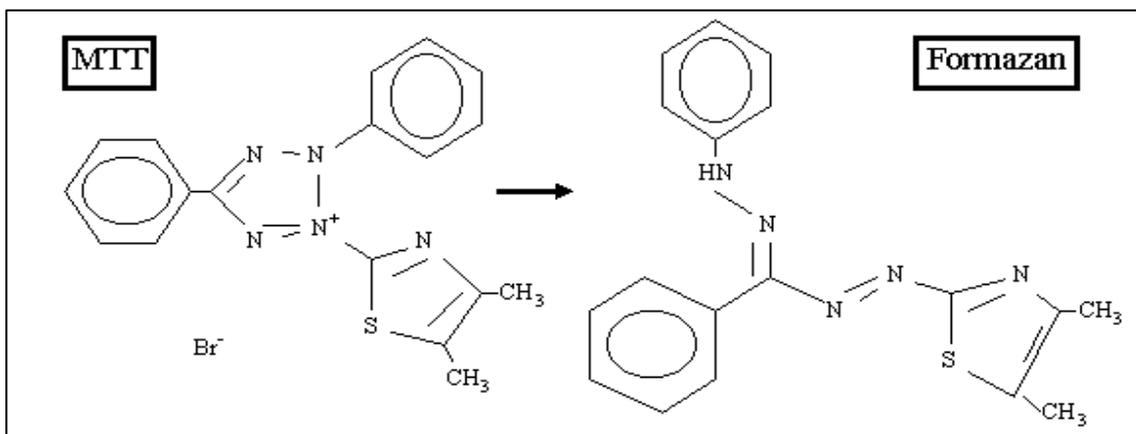


Abb. 7: Übersicht der Strukturformeln der der im MTT-Assay verwendeten Reagenzien; [136].

Zusammensetzung der Reagenzien

MTT-Reagenz

5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)

PBS, pH 7,2-7,4

Steril filtriert (Millex-GP Filtereinheiten, 33mm, 22µm; Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt)

Bei -20 °C gelagert

Lyse-Puffer (100 ml)

99,4 ml DMSO (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

10 g SDS (Pellets; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

0,6 ml CH₃COOH (99,7%; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Durchführung der MTT-Assays

Die entsprechende Anzahl Zellen wurde in eine 96-Well-Zellkultur-Platte (*Tabelle 6, 2.2.2*) pipettiert (Eppendorf Multipette Xstream, Eppendorf AG, Hamburg; Eppendorf Combitips advanced, Eppendorf AG, Hamburg), um sie am folgenden Tag behandeln zu können. Nach der Behandlungszeit von 24, 48 bzw. 72 Stunden, wurde in jede Vertiefung 25 µl MTT-Reagenz gegeben und die Zellen für weitere 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte das Abgießen der Flüssigkeit über Zellstoff und die Zugabe von jeweils 100 µl/Well des Lysepuffers. Auf einem Plattenschüttler (Titramx 100; Heidolph Instruments, Schwabach) wurde die Suspension durchmischt, im Anschluss mit einem Absorptions-Reader (Elx 800, BioTek Instrumets Inc., Winooski, VT, USA) gemessen und die Rohdaten mit der Gen5™ Datenanalyse-Software (BioTek Instrumets Inc., Winooski, VT, USA) verarbeitet und anschließend analysiert.

2.2.4 Durchflusszytometrische Messungen

Funktionsprinzip des Durchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie ist eine laser-basierte Methode zur schnellen und exakten Zell-Analyse. Sie ermöglicht mittels Umwandlung optischer in elektrische Signale die Bestimmung der Zellzahl, -größe und -granularität, sowie der intrazellulären und auf der Oberfläche exprimierten Proteine. Für den Nachweis intrazellulärer bzw. auf der Oberfläche exprimierter Proteine ist eine Markierung mit einem fluoreszierenden Antikörper notwendig [137]. *Abb. 8* zeigt den Aufbau eines FACS™-Gerätes (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit je zwei Lichtstreuungs- und Fluoreszenz-Detektoren. Die zu analysierende Einzelzellsuspension wird hierzu angesaugt (*Abb. 8, 1*) und fließt an einem Laserstrahl vorbei. Ein Detektoren-System registriert die entstehenden optischen Signale (*Abb. 8, 2*) und wandelt sie in elektrische Signale um (*Abb. 8, 4*). Das gestreute Licht wird unterteilt in „im flachen Winkel gebeugtes Licht“ (forward-scattered, FSC) und in „um 90° gebrochenes Licht“ (side-scattered, SSC), wobei FSC zur Bestimmung der Teilchengröße und SSC zur Bestimmung der Granularität dient. Im letzten Schritt ist außerdem eine Sortierung der Zellen nach den gemessenen Eigenschaften möglich (*Abb. 8, 3*) [138]. Sämtliche durchflusszytometrischen Versuche wurden mit einem BD FACS Canto II (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) durchgeführt und die Daten mit der zugehörigen Software BD FACSDIVA V8.0.1 verarbeitet.

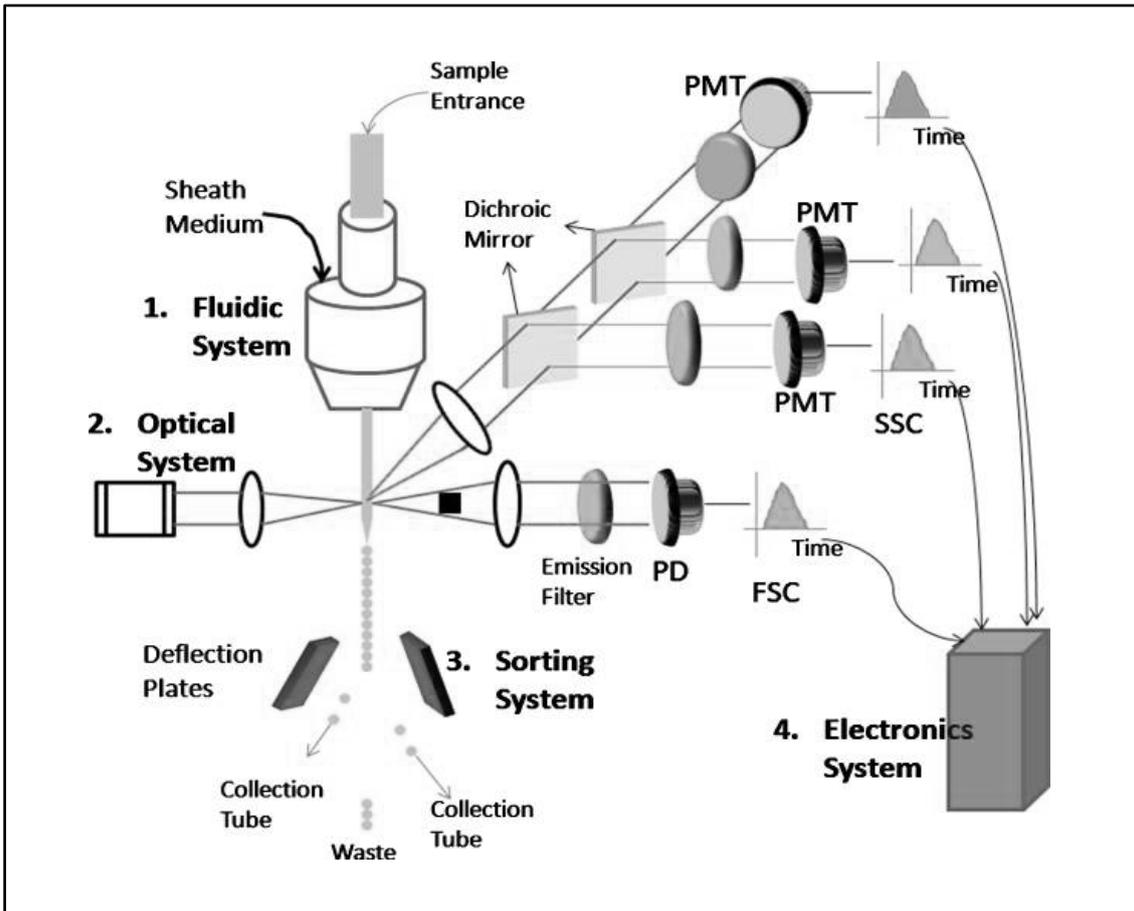


Abb. 8: Übersicht über den schematischen Aufbau eines FACS™-Gerätes; [138].

Reactive Oxygen Species (ROS)-Messung

Die durchflusszytometrische Messung der reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS)-Produktion der Tumorzellen kann mittels 2'-7'Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH-DA) erfolgen [139]. DCFH-DA diffundiert durch die Zellmembran und wird intrazellulär von Esterasen in impermeables H_2DCF gespalten, welches in der Zelle akkumuliert und schließlich in DCF umgewandelt wird. Im Gegensatz zu seinen Vorstufen ist dieses Endprodukt fluoreszent (Wellenlänge 530 nm) und kann somit über den FITC-Kanal am Durchflusszytometer detektiert werden [140]. Eine Zunahme der Fluoreszenz ist proportional zu der in den Zellen vorhandenen Menge Wasserstoffperoxid [141].

Durchführung der ROS-Messung

Die Zellen wurden in einer 12-Well- Zellkulturplatte ausgesät (*Tabelle 6, 2.2.2*) und am Folgetag mit den Chemotherapeutika und/oder Sildenafil in verschiedenen Konzentrationen für 24 h behandelt. Zur Messung der ROS-Produktion wurden 1 µl DCFH-DA Lösung (5nM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA; 10µM Stocklösung) je Well zugesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abgelöst (Trypsin bzw. Accutase), in Reagenzröhrchen (Polystyrene Round-Bottom Tube, 5ml, BD Falcon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) zusammen mit Medium überführt und zweimal mit Medium (2ml/Röhrchen) gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min., RT). Jedem Reagenzröhrchen wurden anschließend zuerst 5 µl des Viabilitätsmarkers 7AAD (7-amino-actinomycin-D Viability Staining Solution; eBioscience, San Diego, USA) zugegeben und nach 15 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln bei RT jeweils 100 µl Medium. Abschließend erfolgten die Messungen am FACS-Gerät bei der Wellenlänge 530 nm.

Apoptose-Messung

Die Markierung, bzw. die Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen am Durchflusszytometer erfolgte mittels Annexin V (FITC gelabelt) und Propidiumiodid (PI).

Annexin V bindet kalziumabhängig an das Phospholipid Phosphatidylserin, welches in vitalen Zellen jedoch für Annexin V unzugänglich in der inneren Lipidschicht der Zellmembran liegt. Schon in der frühen Phase der Apoptose wechselt Phosphatidylserin (PI) auf die äußere Schicht und kann nun gebunden werden. Somit können über den FITC-Kanal Zellen, die sich in dieser, oder einer folgenden Phase befinden als Annexin-positiv detektiert werden [142].

Damit der Farbstoff PI eine Zelle anfärben und somit für das Durchflusszytometer über den PE-Kanal detektierbar machen kann, muss die Zellmembran bereits beschädigt sein. PI-positive Zellen befinden sich deshalb bereits in einer späten Phase der Apoptose oder der Nekrose [143].

Tabelle 7: Übersicht über die möglichen Messergebnisse und die daraus resultierenden Aussagen über die Viabilität der Zellen.

	Annexin V	PI
Viable Zellen	-	-
Frühe Apoptose	+	-
Späte Apoptose	+	+
Nekrose	-	+

Durchführung der Apoptose Messung:

Die Zellen wurden in entsprechender Dichte in 12-Well Platten ausgesät (Tabelle 6, 2.2.2) und am Folgetag für 72 h mit den Chemotherapeutika und/oder Sildenafil in verschiedenen Konzentrationen behandelt.

Sämtliche Reagenzien stammten aus dem *Annexin V Apoptosis Detector Kit I* (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Im Anschluss wurden die Zellen, einschließlich ihres Überstandes und des zum Waschen verwendeten PBS, in Reagenzröhrchen überführt, zentrifugiert (1500 rpm, 5 min., RT) und mit Annexin-Binding-Buffer (1:10) erneut gewaschen. Jedem Röhrchen wurden je 3,5 µl/50 µl Annexin V und PI zugegeben und für 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Annexin-Binding-Buffer (1:10) konnte abschließend die durchflusszytometrische Messung über die Kanäle PE (PI) und FITC (Annexin V) erfolgen.

ALDEFLUOR®-Assay

Mittels ALDEFLUOR®-Assays lässt sich am Durchflusszytometer der Anteil Zellen mit hoher Expression des Enzyms Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH, genauer Isotyp ALDH1) bestimmen. Die Reaktion basiert auf der Umwandlung von BODIPY-Aminoacetylacetate (BAAA) in das als fluoreszierend (520-540 nm) wahrnehmbare BODIPY-Aminoacetate (BAA-) durch ALDH. Somit führt eine höhere intrazelluläre Expression von ALDH zu höherer Fluoreszenz. Eine erhöhte Expression von ALDH ist in Zellen mit Stammzell- oder Progenitorzeleigenschaften sowie, in Bezug auf Tumorzellen in cancer stem cells (CSC) zu finden. Sämtliche Aussagen basieren auf den Produkt-Angaben des Herstellers.

Durchführung der ALDEFLUOR® Messung:

Die Zellen wurden in 12-Well Platten ausgesät (*Tabelle 6, 2.2.2*) und am folgenden Tag für 48 h mit 50 µM Sildenafil behandelt.

Die verwendeten Reagenzien stammen alle aus dem *ALDEFLUOR® Kit* (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada). Nach dem Lösen, Waschen und Zählen der Zellen wurden diese in einem Verhältnis von 5×10^5 Zellen/ml in ALDEFLUOR® Assay Puffer in Lösung gebracht. Im Anschluss wurden für jeden Versuchsansatz jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein „test“- Reaktionsgefäß (1,5 ml) und 5 µl DEAB in ein „control“- Reaktionsgefäß überführt. Im folgenden Schritt wurden 5 µl aktiviertes ALDEFLUOR® Reagenz zu jedem „test“- Reaktionsgefäß zugefügt und dann 0,5 ml dieser Suspension in das jeweilige „control“- Reaktionsgefäß pipettiert. Die Ansätze wurden danach für 30 min. bei 37 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (250 x g, 5 min.). Der Überstand wurde entfernt und die Pellets in jeweils 0,5 ml ALDEFLUOR® Assay Puffer resuspendiert und auf Eis bis zur Messung gelagert. Die entstehende Fluoreszenz kann im grünen Kanal (520-540 nm; FITC) des Durchflusszytometers gemessen werden.

2.2.5 Migration mittels Transwell-Assay

Mittels eines Transwell-Assays wird die Fähigkeit der Zellen zur Migration *in vitro* und aus einer Behandlung resultierende Unterschiede dieser analysiert.

Für die Untersuchung der Migrationsfähigkeit wurden für jede zu testende Konzentration Zellen in eine 6-Well-Zellkulturplatte (*Tabelle 6, 2.2.2*) ausgesät. Am nächsten Tag folgte die erste Behandlung mit den Chemotherapeutika und/oder Sildenafil in verschiedenen Konzentrationen für eine Dauer von 24 h. Cell Culture Inserts mit einer Porengröße von 8,0 µm (BD Falcon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) wurden in eine 24-Well-Platten eingesetzt und 750 µl Medium in das Kompartiment unterhalb der Membran vorgelegt. Die Zellen wurden gewaschen, von den 6-Well-Platten gelöst, gezählt und in Medium ohne FCS resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde in das obere Kompartiment pipettiert und mit der entsprechenden Behandlung auf ein Volumen von 500 µl mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 gebracht und für 48 Stunden im

Brutschrank inkubiert (*Abb. 9, 1*). Durch das Konzentrationsgefälle wirkt FCS als Attraktor für die Zellen und bewirkt somit die Migration der Zellen durch die Membran.

Zur Auswertung der migrierten Zellen werden die Cell Inserts in Paraformaldehyd (4% in PBS 1x, PFA, Carl Roth, Karlsruhe) fixiert, mit PBS gewaschen (*Abb. 9, 2*) und mit Giemsa-Lösung (1:10 in sterilem und filtriertem H₂O, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) gefärbt. Anschließend wurden die nicht migrierten Zellen mit einem Wattestäbchen und durch erneutes Waschen mit PBS entfernt, die Membranen herausgetrennt und auf einen Objektträger (SuperFrost® Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen) gelegt. Zum besseren Fotografieren wurden die Membranen zunächst mit ProLong Antifade for Fixed Cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) benetzt und dann mit Deckgläsern (R. Langenbrinck, Emmendingen) fixiert (*Abb. 9, 3*).

Die Quantifizierung migrierter Zellen erfolgte lichtmikroskopisch über eine Kamera (EOS 1000D, Canon, Tokio Japan) und mit der Software Axio Vision Release 4.8 (Carl Zeiss Vision, Oberkochen) anhand von Aufnahmen aus jeweils drei verschiedenen Regionen des Präparats.

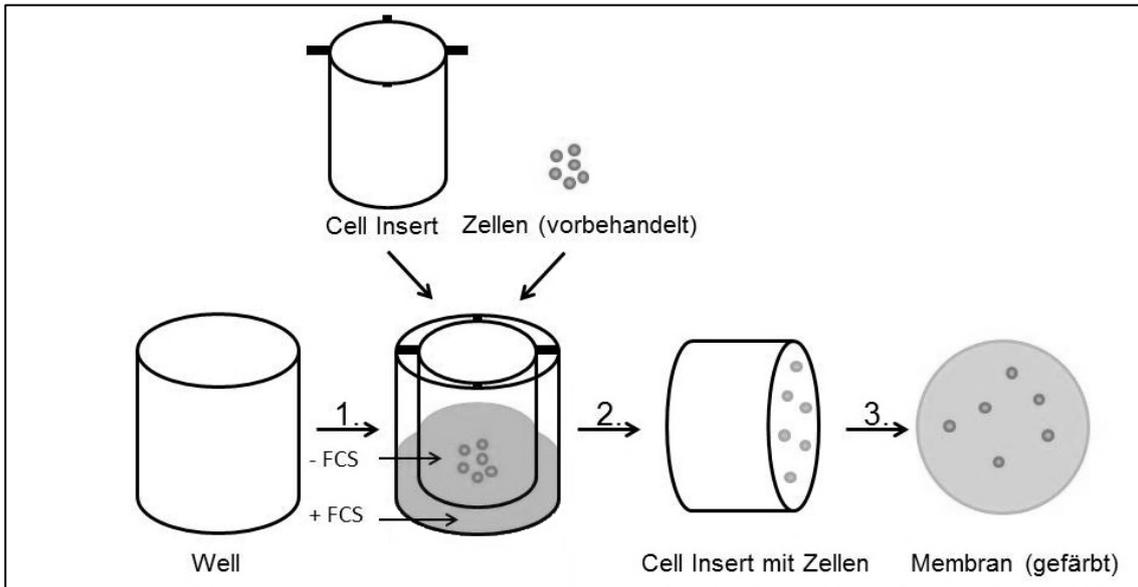


Abb. 9: Übersicht über schematischen Ablauf eines Transwell-Assays.

2.2.6 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Real-Time Kettenreaktion (RT-PCR) dient der Amplifizierung und Quantifizierung von DNS [144]. Benötigt werden dafür neben der Template DNS und einzelnen Nukleotiden auch spezifische Primer und DNS-Polymerase. Nach dem Umschreiben der isolierten RNA in cDNS (complementary DNA), durchlaufen die Proben einen festgelegten Temperaturzyklus (*Tabelle 8*). Dabei werden sie zuerst erhitzt, um den Doppelstrang in die Einzelstränge aufzutrennen. Im Anschluss wird die Temperatur gesenkt, damit das Annealing zwischen dem spezifischen Primern und der cDNS stattfinden kann und im folgenden Schritt wieder erhöht, um die DNS-Polymerase den Primer mit Nukleotiden komplementär zum angelagerten Strang verlängern zu lassen. Jeder dieser Zyklen führt somit zu einer Verdopplung der zu amplifizierenden Sequenz [145].

Tabelle 8: Zeiträume und Temperaturen eines Zyklus‘ der RT-PCR.

	Zeit (sek)	Temperatur (°C)
Hot start	300	95
Denaturierung	15	95
Annealing	30	54 (beta-Catenin) 58 (Cyclin D1)
Elongation	30	72

Isolation der RNA

In die Vertiefungen einer 12-Well Platte wurden die Zellen eingesetzt (*Tabelle 6, 2.2.2*) und am folgenden Tag für 8 h bzw. 24 h mit den Sildenafil in adäquater Konzentration behandelt. Die Isolation erfolgte mittels *RNeasy Plus Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Nach der entsprechenden Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, gelöst, zentrifugiert (1500 rpm, 5 min) erneut gewaschen und zentrifugiert und schließlich in jeweils 350 µL RLT/DTT Puffer resuspendiert und somit lysiert. Im nächsten Schritt wurde die in QIAshredder Säulen überführte Lösung zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 2 min). Bis zur weiteren Verwendung konnten die Proben bei -80 °C eingefroren werden. Im Anschluss wird die Reinheit der Proben durch Messung der Extinktion (260/280 nm) im Nanodrop Spektrophotometer bestimmt. Dabei wird ein Quotient der Messungen bei beiden Wellenlängen von 1,9 bis 2,1 angestrebt.

cDNS Synthese

Mittels des *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde die isolierte RNA in cDNS umgeschrieben. Der Ablauf des Versuchs richtet sich dabei nach den Angaben des Versuchsprotokolls des Herstellers. Für jeden Ansatz wurde 1 µg RNA verwendet.

Tabelle 9: Zeiträume und Temperaturen eines Zyklus' des verwendeten Programms des Thermocyclers.

	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1.	10	25
2.	120	37
3.	5	85
4.		4

Quantitative RT-PCR

Jeweils 50 ng der cDNS (entspricht 2 µl cDNS/H₂O) wurden in jeweils 18 µl Go Taq Mastermix (Promega Corporation, Fitchburg, USA) eingesetzt (Gesamtvolumen 20 µl). Aus der *Tabelle 10* sind die verwendeten Primer zu entnehmen. Aus *Tabelle 8* werden die genauen Temperaturen und Zeiträume für Denaturierung, Annealing und Verlängerung des neu synthetisierten Stranges ersichtlich. Dabei wurden jeweils 40 Zyklen durchgeführt. Die Expression der Zielgene wurde auf das konstant exprimierte Tbp (TATA-box binding protein) als housekeeping gene normiert. Aus beiden resultierenden Delta Ct-Werten wurde der Delta-Delta Ct-Wert bestimmt und anschließend die durch die Behandlung erzielten Unterschiede der Expression der Zielgene ermittelt.

Tabelle 10: Übersicht über die in der RT-PCR verwendeten Primer.

	Primersequenz (5'-3')
beta-Catenin	Fwd. CCG TCC ATG CGG AAG ATC Rev, ATG GCC AGC GGG AAG AC
Cyclin D1	Fwd. AAA ATG GCA GTG CGT TTAG Rev. TTT GAA GGC AGT CTG TCG TA
Tbp	Fwd. GCC CGA AAC GCC GAA TAT Rev. CCG TGG TTC GTG GCT CTC

2.2.7 Western Blot

Funktionsprinzipien des Western Blots

Der Western Blot ist eine molekularbiologische Technik zur Separierung und Detektion von Proteinen. Dies ermöglicht eine qualitative und semiquantitative Beurteilung der intrazellulären Proteine.

Um die Auftrennung und Detektion intrazellulärer Proteine zu ermöglichen werden die Zellen zunächst lysiert, die Sekundärstruktur der extrahierten Proteine durch Hitze zerstört und auch die Disulfidbrücken durch beta-Mercaptoethanol aufgebrochen. Die so denaturierten und gänzlich entfalteten Proteine werden anschließend mittels in dem sogenannten SDS-PAGE via Gel-Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel nach molekularem Gewicht aufgetrennt. Die entstandenen Banden werden durch ein Spannungsfeld vom Trenngel auf eine im Anschluss mit Milchpulver blockierte Membran z.B. aus Nitrozellulose oder Polyvinylenfluorid übertragen und dort mittels Primär- und Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht [146].

Substanzen und Zusammensetzungen

Tabelle 11: Übersicht verwendeter Substanzen und Hersteller

Substanz	Hersteller
Acrylamid Stammlösung	SERVA, Amstetten, A
APS - Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
BSA – Bovine Serum Albumin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Cell Lysis Buffer	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Protease Inhibitor Complete Mini Cocktail	F. Hoffmann La-Roche AG, Basel, CH
Protein Assay Dye Concentrate	Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA
Protein Auftragspuffer Roti-Load 1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Protein-Marker IV Prestained 10-170 kDa	PEQLAB GmbH, VWR Life Science Competence Center, Erlangen
RIPA-Buffer	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TEMED - Tetramethylethyldiamin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base (Trimza base)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Western Blot Detektionslösung	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Tabelle 12: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen (1l)	Zusammensetzung	
SDS-Laufpuffer (10x)	30,3 g	Tris Base
	144 g	Glycerin
	10 g	SDS
TBS (10x)	24,2 g	Tris Base
	80 g	Natriumchlorid
TBS-T (1x)	100 ml	TBS (10x)
	1 ml	Tween 20
Transferpuffer (10x)	24 g	Tris Base
	173 g	Glycin
Stripping Puffer	15 g	Glycin
	1 g	SDS
	10 ml	Tween 20

Durchführung des Western Blots

Proteingewinnung und Messung des Proteingehaltes

Nach Aussaat der Zellen in die Wells einer 6-Well Platte (*Tabelle 6, 2.2.2*) und der adäquaten Behandlung für den Zeitraum von 24h am Folgetag wurden die Zellen gelöst, in Reaktionsgefäße überführt und im Anschluss zweimal mit kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min., 4 °C). Im nächsten Schritt wurden die Zellmembranen mit RIPA-Puffer und entsprechenden Protease Inhibitoren über eine Inkubationszeit von 20 min. (gekühlt auf Eis) zerstört und

die restlichen Zellfragmente abzentrifugiert (14000 rpm, 20 min., 4 °C). Die Überstände wurden bei –80 ° C eingefroren.

Mit Hilfe des Bradford-Assays (Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA) konnte im Anschluss der Proteingehalt der eben gewonnen Überstände bestimmt werden. Dazu wurden 1 µl der jeweiligen Probe zu 800 µl Aqua Bidest und 200 µl der Assay-Lösung gegeben. Bei einer Wellenlänge von 595 nm erfolgte die photometrische Messung.

Probenvorbereitung

Die für die Gelelektrophorese benötigte Proteinmenge lag in unserem Versuchsaufbau bei 30 µg/µl. Die Zellextrakte wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und mit RIPA-Puffer auf 35 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben bei 95° C für 5 min. denaturiert.

Gelherstellung

Zur Vorbereitung auf die SDS-PAGE wurde zuerst das Gel, bestehend aus Trenngel (10%) und anschließend einem mit Taschen versehenem Sammelgel (4%), gegossen. Das Gel wurde im letzten Schritt mit Isopropanol überschichtet, um Sauerstoffeinschlüsse zu vermeiden und um eine gerade Fläche zu ermöglichen. Die Zusammensetzung der jeweiligen Gele ist *Tabelle 13* zu entnehmen.

Tabelle 13: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Gele. Sämtliche Volumina sind in ml angegeben.

	Trenngel 10% (20ml)	Sammelgel 4% (6ml)
H ₂ O	7,9	4,2
30% Acrylamid Mix	6,7	1,0
1,5 M Tris (pH8.8)	5,0	0,75
10% SDS	0,2	0,06
10% Ammoniumpersulfat	0,2	0,06
TEMED	0,008	0,006

Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (PAGE)

Nach der Polymerisation konnte das Gel aus dem Gießstand (Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA) in die Elektrophorese Apparatur (Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA) überführt, und diese mit SDS-Laufpuffer (*Tabelle 12*) befüllt werden. Die vorbereiteten und auf Eis aufgetauten Proben und der Protein-Marker wurden anschließend in die jeweiligen Taschen [30µl] pipettiert und bei konstanten 120V über 90 min. als Laufbedingungen angelegt.

Transfer der Proteine auf die Membran

Im Anschluss waren die nun aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Nitrocellulose Blotting Membranes Sartorius AG, Göttingen) zu übertragen. Die Abfolge, in der die Schichten der Apparatur ohne Lufteinschlüsse auf einander aufgebracht werden mussten ist *Abb. 10* zu entnehmen. Die Kassette wurde in eine Blotkammer gestellt, mit Transferpuffer bedeckt und mittels Eis gekühlt. Zur Übertragung wurden für einen Zeitraum von 80 min. konstante 300 mA angelegt. Anschließend erfolgte das blockieren der freien Proteinbindungsstellen mit Milchpulverlösung (10%) in TBS-T (*Tabelle 12*) für 1h bei RT auf der Membran.

Die Membran wurde für 2h bei RT in verdünnter 5% BSA (in Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T)) Primärantikörperlösung (*Tabelle 14*) inkubiert und nach 3 mal 10 min. waschen in TBS-T in verdünnter 5% Milchpulver (in TBS-T) Sekundärantikörperlösung (*Tabelle 14*) für 1h bei RT erneut inkubiert. Abschließend wurde die Membran wiederholt 3 mal 15 min. in TBS-T gewaschen.

Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen.

Primär-AK (incl. Hersteller)	Verdünnung (5% BSA)	Sekundär-AK (incl. Hersteller)	Verdünnung (5% MP)
Beta-Catenin (cell signalling, Cambridge, UK)	1:1000	Anti-Rbt (cell signaling, Cambridge, UK)	1:3000
GAPDH (cell signaling, Cambridge, UK)	1:1000	Anti-Rbt (cell signaling, Cambridge, UK)	1:3000

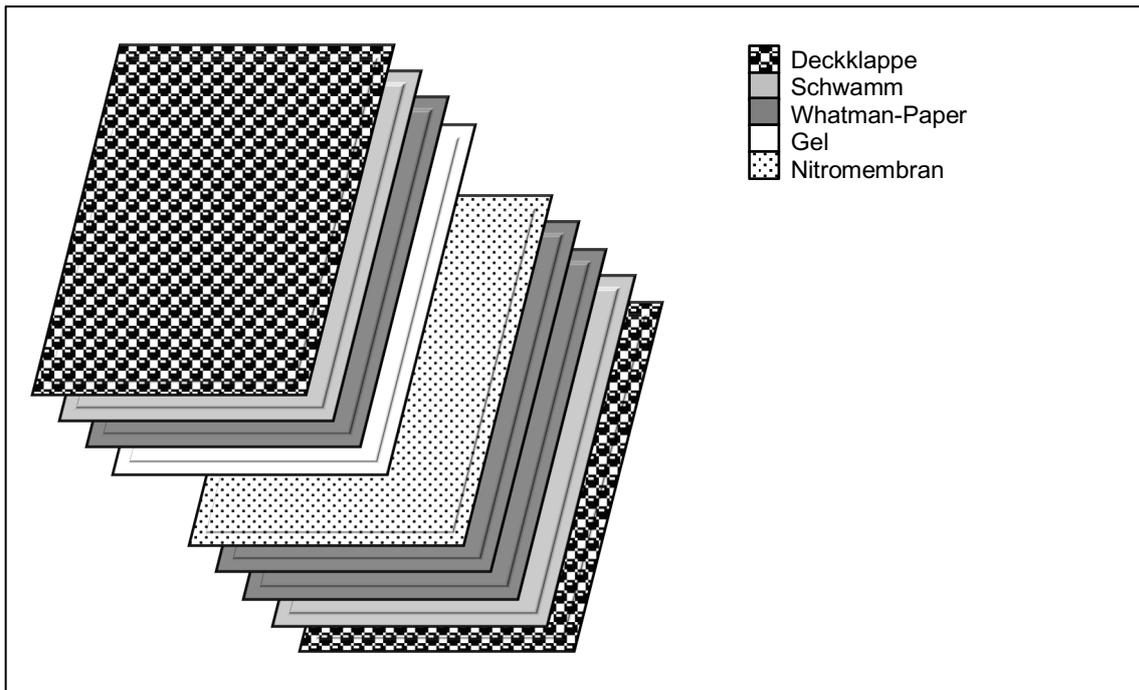


Abb. 10: Aufbau des Blots zur Übertragung der Proteine auf die Membran;
 Whatman-Paper: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, US.

Visualisierung

Die Färbung der Banden erfolgte mittels Detektion von horseradish Peroxidase durch WesternSure™ PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). Dabei wurde die zu applizierende Lösung nach den Vorgaben des Herstellers gemischt und im Anschluss 0,1 ml/cm² dieser Lösung auf die Membran pipettiert. Die Detektion erfolgte mithilfe von Chemilumineszenz Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). Die anschließende Auswertung erfolgte mit Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Viabilitäts-Assays (MTT) in divergierenden Behandlungsschemata

Die beiden verwendeten Chemotherapeutika Doxorubicin und Cisplatin finden wie in 1.2 beschrieben ihre onkologische Anwendung in der leitliniengerechten Therapie von Hepatoblastomen und kindlichen HCCs.

Um die konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der Viabilität durch die Behandlungen zu untersuchen wurden die in 2.2.3 beschriebenen MTT-Assays zu Beginn jeweils mit den Chemotherapeutika Cisplatin und Doxorubicin, und Sildenafil alleine für jeweils 24, 48 und 72 h behandelt.

Zum Vergleich und ebenfalls zur Ermittlung von Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden die Zellen für die gleichen Zeiträume im Folgenden mit den sich ergebenden Kombinationen aus Chemotherapeutika und Sildenafil inkubiert. Die hierbei verwendeten Konzentrationen wurden ausgewählt, da diese im ersten Teil dieser Versuche bereits unter solitärer Verwendung die Viabilität der Zellen minderten.

Für die Ermittlung der IC50-Werte wurden sigmoidale Regressionskurven erstellt (nicht gezeigt). Die Ergebnisse für beide Tumorentitäten werden bewusst getrennt behandelt und nicht verglichen, da dies für die mögliche klinische Anwendung ohne Bedeutung ist.

3.1.1 MTT Doxorubicin

HepT1

Im ersten Versuchsansatz wurde die Wirkung von Doxorubicin auf die Zellen der Hepatoblastom-Zelllinie HepT1 untersucht. Abb. 11 zeigt die entsprechenden Ergebnisse.

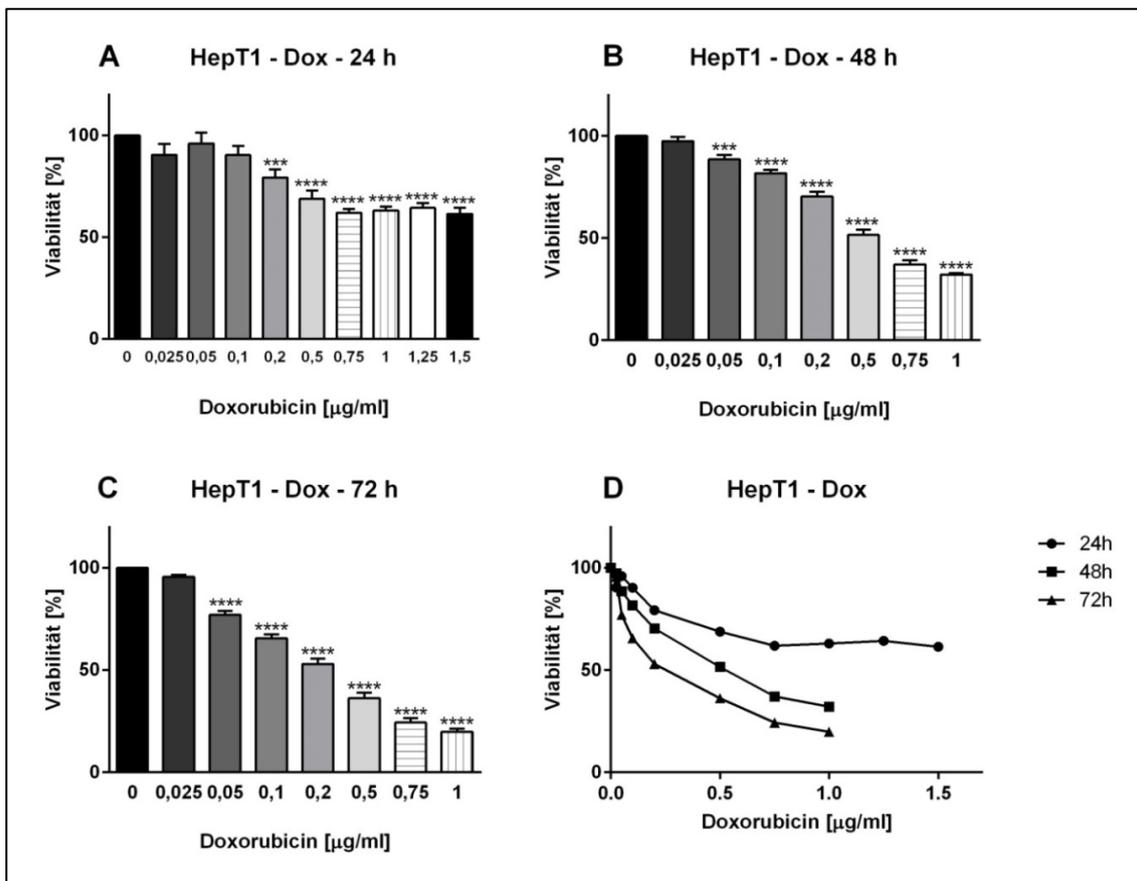


Abb. 11: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Doxorubicin (Dox) behandelter HepT1-Zellen.

MTT-Assay der (A) 24 h, (B) 48 h und (C) 72 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit aufsteigender Konzentration an Doxorubicin (n=3-6). (D) Übersicht über die 24, 48, 72 h-Behandlungen der HepT1-Zelllinie mit Doxorubicin. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Die Behandlung mit Doxorubicin führte bereits ab einer Konzentration von 0,2 µg/ml (24 h), bzw. ab einer Konzentration von 0,05 µg/ml unter 48- oder 72-stündiger Behandlung zu einer signifikanten Verminderung der Viabilität (*Abb. 11*).

Wie in *Abb. 11 A* gezeigt, führte eine Konzentration von 0,75 µg/ml Doxorubicin zu einer 38%igen Abnahme der Viabilität nach 24 h. Diese signifikante Abnahme blieb bei einer Erhöhung der Konzentration bis 1,5 µg/ml konstant.

Wurden die Zellen jedoch für jeweils 48 h oder 72 h mit Doxorubicin inkubiert, führte dies zu einer kontinuierlichen signifikanten Abnahme der Viabilität. Eine Abnahme der Viabilität um 50% wurde für Doxorubicin nach 48 h erstmals mit 0,75 µg/ml und nach 72 h erstmals mit 0,5 µg/ml erreicht (*Abb. 11, B, C*)

So zeigte sich eine signifikante inkubations- und konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität für alle drei Behandlungszeiten (*Abb. 11, D*).

HC-AFW1

Im nächsten Ansatz wurde untersucht welche Wirkung Doxorubicin auf die Zellen der pHCC-Zelllinie HC-AFW1 hat. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in den Graphen der *Abb. 12* aufgeführt.

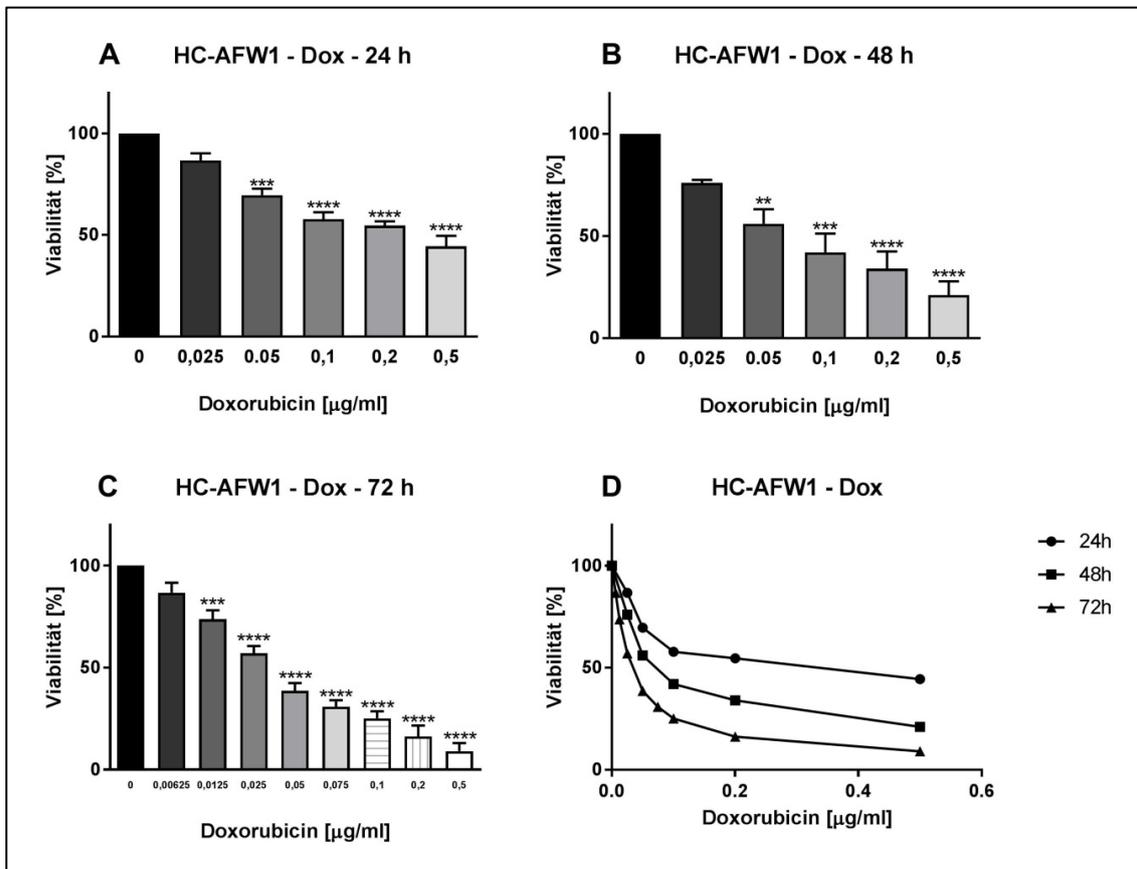


Abb. 12: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Doxorubicin (Dox) behandelter HC-AFW1-Zellen.

MTT-Assay der (A) 24 h, (B) 48 h und (C) 72 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit aufsteigender Konzentration an Doxorubicin (n=3-6). (D) Übersicht über die 24, 48, 72 h Behandlungen der HC-AFW1-Zelllinie mit Doxorubicin. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Unter der Doxorubicin-Behandlung war eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität ab 0,05 µg/ml nach 24 h und 48 h bzw. ab 0,0125 µg/ml nach 72 h in den HC-AFW1 Zellen zu beobachten. Eine 24-stündige Behandlung mit 0,5 µg/ml, eine 48-stündige Behandlung mit 0,1 µg/ml, und eine 72-stündige Behandlung mit 0,05 µg/ml Doxorubicin führten dabei jeweils zu einer Abnahme der Viabilität größer 50%. Mit weiterer Konzentrationssteigerung nimmt der Anteil vitaler HC-AFW1 Zellen ab. Die Effektstärke auf die Stoffwechselaktivität ist bei Konzentrationen ab 0,1 µg/ml geringer ausgeprägt. Wie in *Abb. 12 D* gezeigt, führte eine Behandlung mit Doxorubicin für alle verwendeten Zeiträume zu signifikanter, inkubations- und konzentrationsabhängiger Abnahme der Viabilität.

3.1.2 MTT Cisplatin

HepT1

Das zweite Chemotherapeutikum, dessen Effekt auf die Viabilität von HepT1-Zellen untersucht wurde ist Cisplatin. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in graphischer Form in *Abb. 13* wiedergegeben.

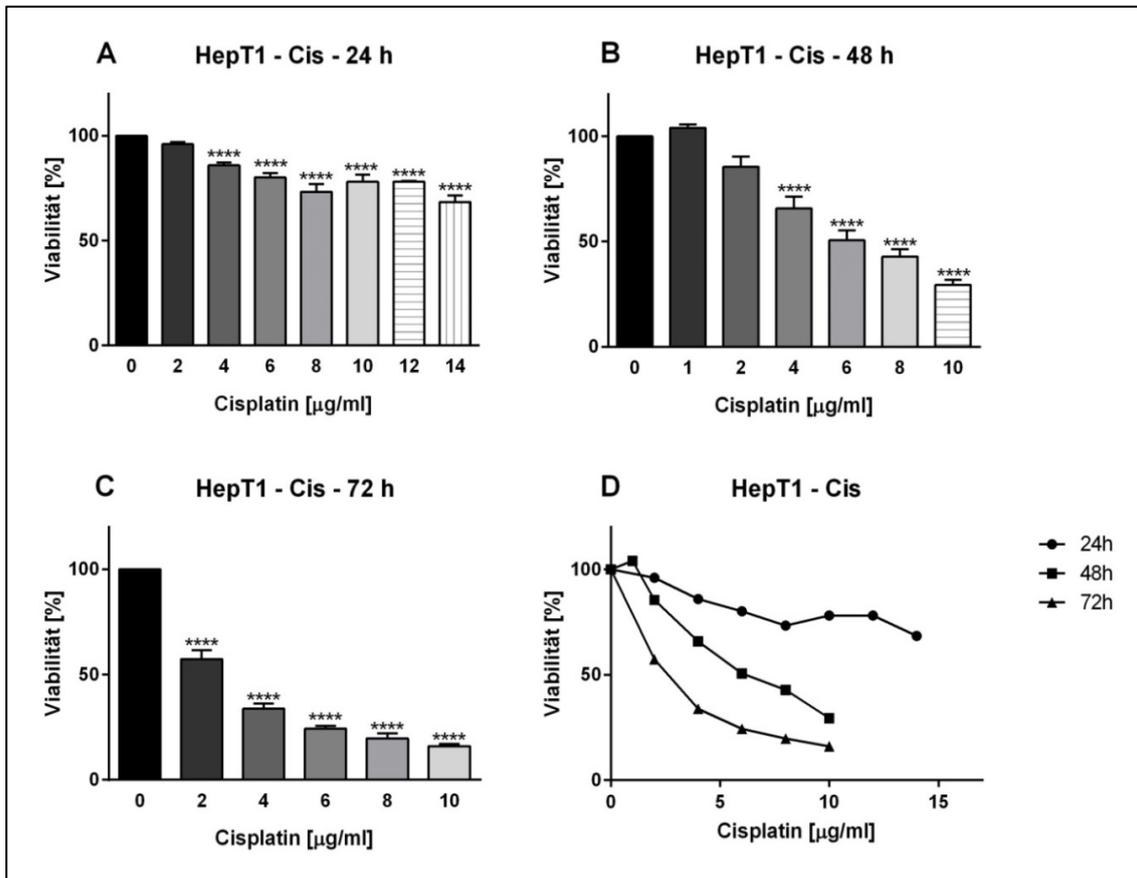


Abb. 13: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Cisplatin (Cis) behandelter HepT1-Zellen.

MTT-Assay der (A) 24 h, (B) 48 h und (C) 72 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit aufsteigender Konzentration an Doxorubicin (n=3-6). (D) Übersicht über die 24, 48, 72 h Behandlungen der HepT1-Zelllinie mit Cisplatin. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). **** ($p < 0,0001$).

Unter Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin konnte eine signifikante konzentrationsabhängige Verminderung der Zellviabilität in HepT1 Zellen ab einer Cisplatin-Konzentration von 4 µg/ml für die Behandlungszeiträume von 24 h und 48 h und von 2 µg/ml für eine Behandlung über 72 h beobachtet werden. Im 24-stündigen Versuchsansatz sankt die Viabilität signifikant und annähernd linear um 20% bis zu einer Konzentration von 6 µg/ml und blieb bei weiterer Erhöhung der Cisplatin-Konzentration nahezu konstant bis zur verwendeten Maximalkonzentration von 14 µg/ml (*Abb. 13, A*) Für die übrigen Versuchszeiten fiel der Anteil verbliebener vitaler HepT1 Zellen vermehrt um 71% (48 h), bzw. 84% (72 h) bei der jeweiligen Maximalkonzentration von 10 µg/ml (*Abb. 13, B, C*).

Auch in den Versuchen mit solitärer Cisplatin-Behandlung zeigte sich eine signifikante Abnahme in der Zellviabilität in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration und Behandlungszeit (*Abb. 13, D*).

HC-AFW1

Der gleiche Versuchsaufbau wurde verwendet um eine potenzielle Wirkung von Cisplatin auf die Viabilität der Zellen der HC-AFW1-Zelllinie zu erforschen. Aus *Abb. 14* sind die Ergebnisse dieser Wirkung zu entnehmen.

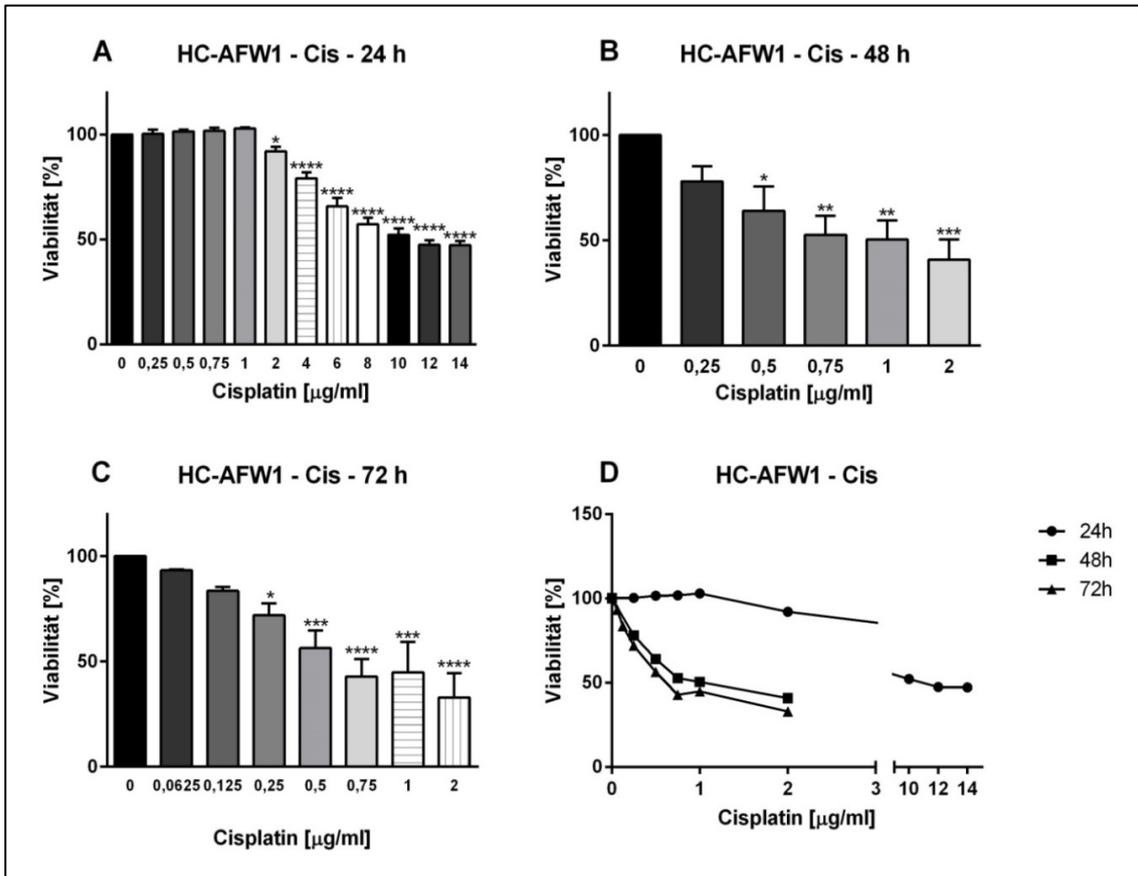


Abb. 14: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Cisplatin (Cis) behandelter HC-AFW1-Zellen. MTT-Assay der (A) 24 h, (B) 48 h und (C) 72 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit aufsteigender Konzentration an Doxorubicin (n=3-9). (D) Übersicht über die 24, 48, 72 h Behandlungen der HC-AFW1-Zelllinie mit Cisplatin. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Wie in *Abb. 14* gezeigt, sank die Viabilität signifikant ab einer Cisplatin-Konzentration von 2 µg/ml (24 h), 0,5 µg/ml (48 h), bzw. 0,25 µg/ml (72 h). Eine 50%ige Viabilitäts-Abnahme konnte nach 24 h mit einer Konzentration von 12 µg/ml, bei 48 mit einer Konzentration von 2 µg/ml und bei 72 h bei einer Doxorubicin-Konzentration von 0,75µg/ml in HC-AFW1 Zellen beobachtet werden.

Die Abnahme der Viabilität unter 48- und 72-stündiger Behandlung mit Cisplatin unterschied sich geringfügig. Bis zu einer Cisplatin-Konzentration von 0,75 µg/ml fiel die Viabilität stärker ab, während unter weiterer Erhöhung der Konzentration eine geringfügig größere Abnahme der Viabilität beobachtet werden konnte (*Abb. 14, B, C, D*).

So zeigte die Erhöhung der Behandlungszeit von 24 h auf 48 h eine vielfache Verstärkung der Viabilitäts-Abnahme. Unabhängig davon ist die Wirkung ebenfalls konzentrationsabhängig und steigt mit Erhöhung der verwendeten Cisplatin-Konzentration (*Abb. 14, D*).

3.1.3 MTT Sildenafil

HepT1

Da Sildenafil, wie in 1.3.3 beschrieben, bereits anti-karzinogene Effekte auf diverse andere Tumor-Zelllinien nachgewiesen werden konnten, sollte nun im Folgenden analysiert werden, ob diese Wirkung von Sildenafil auch bei Hepatoblastomzellen (HepT1) nachgewiesen werden könne. Die Versuchszeiten betragen ebenfalls 24, 48 und 72 h. *Abb. 15* zeigt die entsprechenden Ergebnisse.

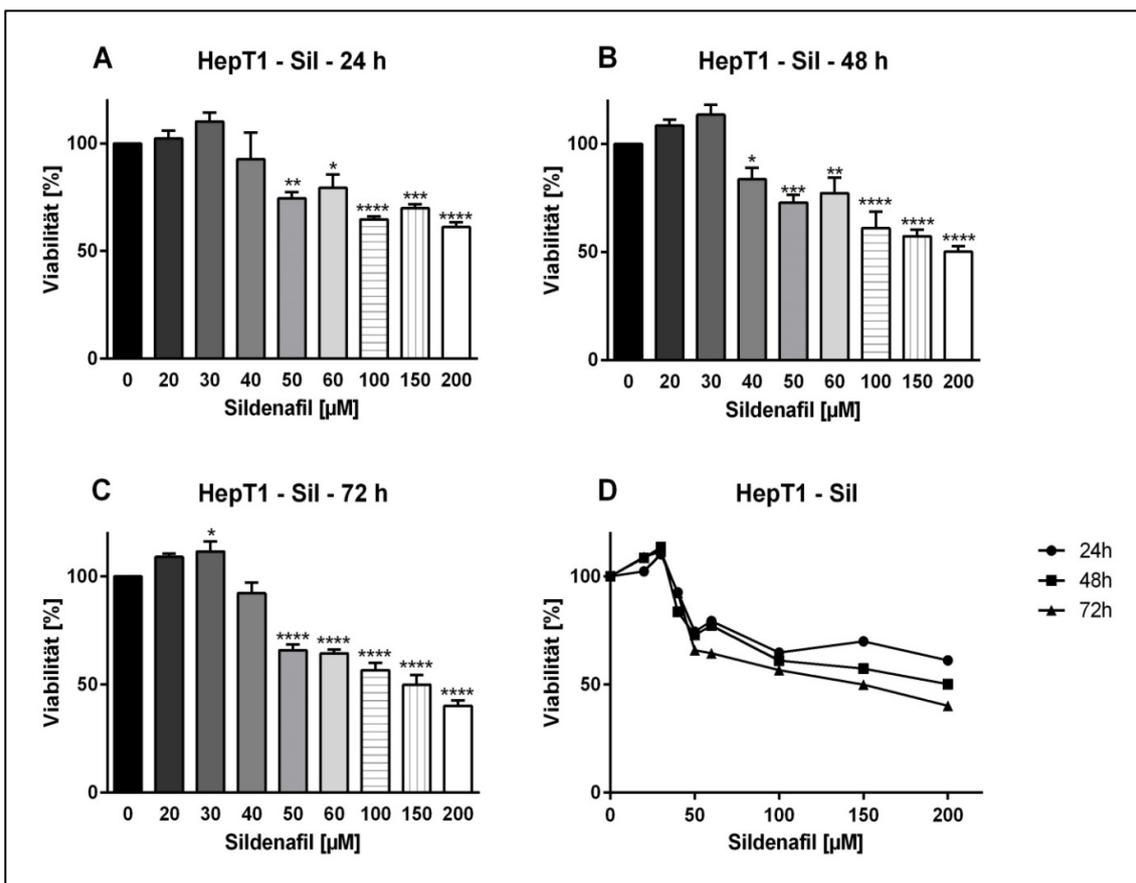


Abb. 15: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Sildenafil (Sil) behandelter HepT1-Zellen.

MTT-Assay der (A) 24 h, (B) 48 h und (C) 72 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit aufsteigender Konzentration an Doxorubicin (n=3-6). (D) Übersicht über die 24, 48, 72 h Behandlungen der HepT1-Zelllinie mit Sildenafil. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Unter Sildenafil-Behandlung nahm die Viabilität ab einer Behandlungskonzentration von 50 μM (für 24 h und 72 h), bzw. ab einer Sildenafil-Konzentration von 40 μM (48 h) signifikant ab.

Bis hin zur verwendeten Maximalkonzentration von 200 μM sank die Viabilität um 39% (24 h), 50% (48 h) bzw. 60% (72 h) (Abb. 15). Die durchgeführten Versuche mit entsprechenden Lösungsmittelkontrollen zeigten eine deutlich geringere Abnahme der Viabilität. Dabei war bei einer Lösungsmittelkontrolle für z.B. 60 μM eine Viabilitätsabnahme von nur maximal 12% (bei 72h) erkennbar.

Auch die alleinige Behandlung mit Sildenafil führte, in Abhängigkeit von Inkubationszeit und verwendeter Konzentration des Phosphodiesterase-5-Inhibitors zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität der Hepatoblastom-Zellen (Abb. 15, D).

HC-AFW1

Unter den gleichen Voraussetzungen wurde die Wirkung der Applikation des Phosphodiesterase-5-Inhibitors (Sildenafil) auf die pHCC-Zellen (HC-AFW1) getestet. Im Folgenden sind die Ergebnisse graphisch zusammengefasst (Abb. 16).

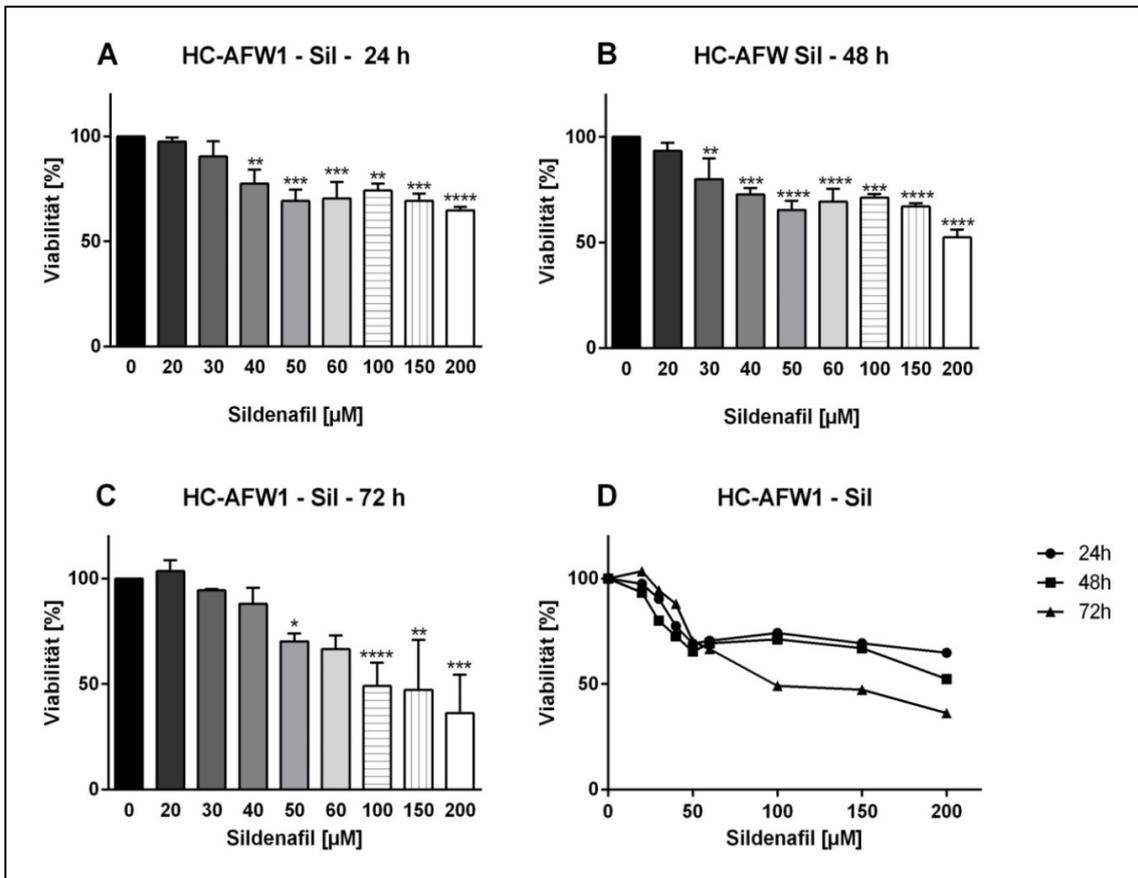


Abb. 16: Viabilitäts-Assays (MTT) mit Sildenafil (Sil) behandelter HC-AFW1-Zellen. MTT-Assay der (A) 24 h, (B) 48 h und (C) 72 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit aufsteigender Konzentration an Doxorubicin (n=3-6). (D) Übersicht über die 24, 48, 72 h Behandlungen der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

In *Abb. 16* konnte eine signifikante Abnahme der Viabilität nach 24 h Behandlung ab 40 μM , nach 48 h ab 30 μM und nach 72 h ab 50 μM Sildenafil beobachtet werden. Unter aufsteigenden Behandlungs-Konzentrationen bis 50 μM Sildenafil war diese Abnahme für alle drei Versuchsansätze verstärkt und unabhängig von der jeweiligen Inkubationszeit. Mit weiter ansteigender Konzentration konnte vor allem ein Unterschied zwischen dem 48- und dem 72-stündigen Ansatz beobachtet werden. So fiel die Viabilität unter der stärksten Behandlung mit 200 μM Sildenafil nach 24 h um 38%, nach 48 h um 44% und nach 72 h um 64% (*Abb. 16*).

So war ein inkubationszeit- und konzentrationszeit-abhängiger stoffwechsellindernder Effekt von Sildenafil auf die Tumorzelllinie HC-AFW1 festzustellen, wobei die anfängliche Konzentrationserhöhung die größte Wirkung hatte und die Inkubationszeit erst in höheren Konzentrationen ausschlaggebend war (*Abb. 16, D*).

3.1.4 MTT Kombinationen Doxorubicin und Sildenafil

Im nächsten Schritt erfolgte die Messung der Viabilitäts der Kombinations-Behandlungen aus Doxorubicin und Sildenafil für die Tumor-Zelllinien HepT1 und HC-AFW1. Dabei wurden die Auswirkungen von 24, 48 und 72-stündiger Behandlung der beiden Tumor-Zelllinien HepT1 und HC-AFW1 mit den Therapeutika alleine und den sich ergebenden Kombinations-Behandlungen auf die Viabilität der Zellen gemessen und verglichen. Basierend auf den Ergebnissen aus 3.1.1 und 3.1.3 wurde eine niedrigere und eine höhere Konzentration des Chemotherapeutikums gewählt und mit Sildenafil-Behandlungen mit Konzentrationen von 25 μM und 50 μM kombiniert. Dabei fiel die Wahl auf eine Sildenafil-Konzentration, die Viabilität der jeweiligen Zelllinie nicht signifikant veränderte (25 μM) und eine Sildenafil Konzentration, unter welcher die Viabilität signifikant um 30-40% sank (50 μM).

HepT1

Für die vergleichende Analyse der Auswirkungen von Doxorubicin und/oder Sildenafil auf die HepT1-Zelllinie sind die Ergebnisse aus den entsprechenden Versuchen in *Abb. 17* aufgeführt.

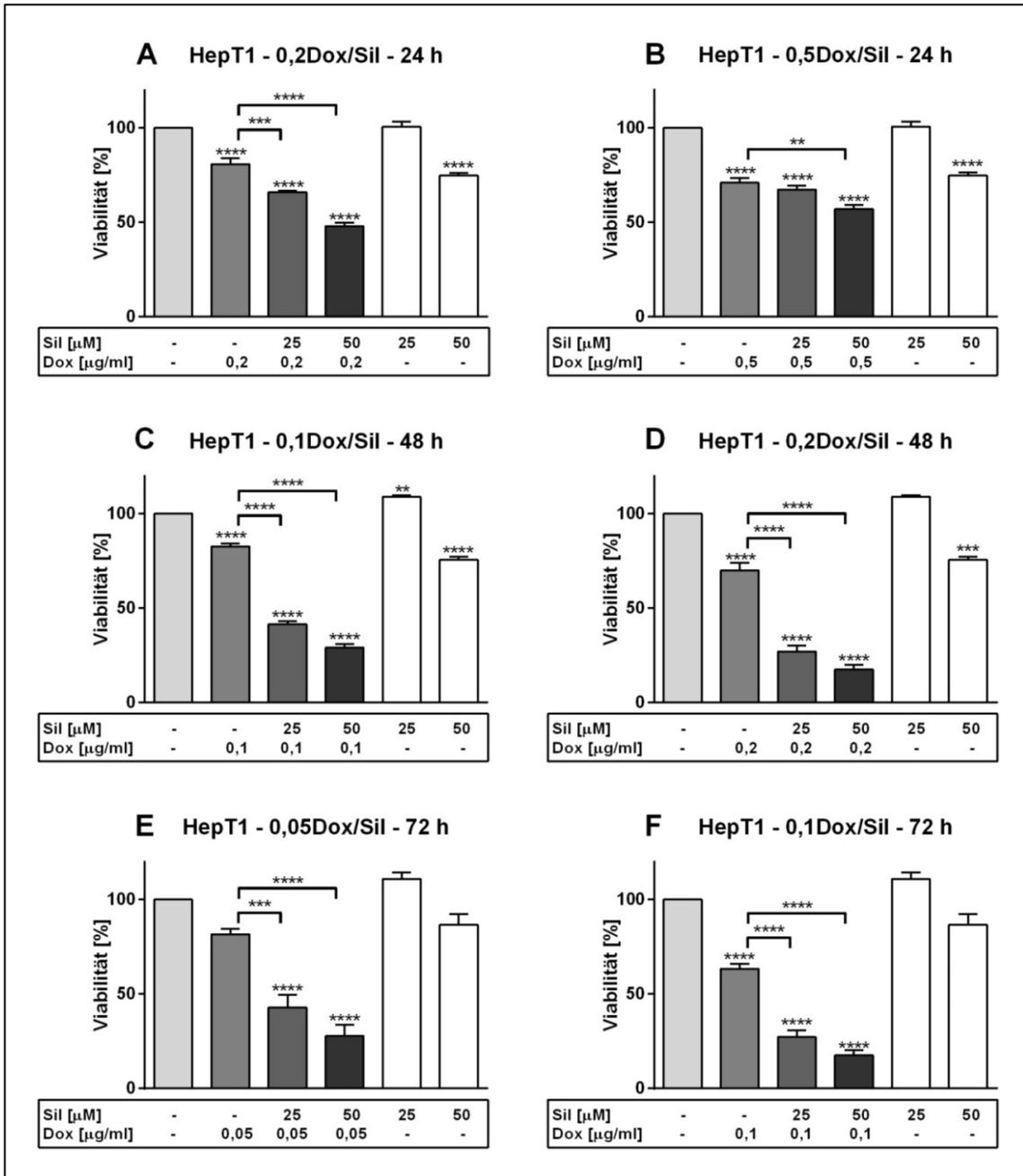


Abb. 17: Viabilitäts-Assay (MTT) der HepT1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) behandelt wurde.

MTT-Assay der 24 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (A) 0,2 μ g/ml bzw. (B) 0,5 μ g/ml Doxorubicin (n=3). MTT-Assay der 48 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (C) 0,1 μ g/ml bzw. (D) 0,2 μ g/ml Doxorubicin (n=3). MTT-Assay der 72 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (E) 0,05 μ g/ml bzw. (F) 0,1 μ g/ml Doxorubicin (n=3). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Doxorubicin-

Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Abb. 17 zeigt folgende Ergebnisse: (i) Sämtliche Kombinationstherapien mit einer Sildenafil-Konzentration von 50 μM und Doxorubicin-Konzentrationen wiesen eine signifikante Inhibition in der Zellviabilität auf, verglichen mit der solitären Doxorubicin-Behandlung, unabhängig von der Inkubationszeit oder der verwendeten Doxorubicin-Konzentration. Ausgenommen des 24-stündigen Ansatzes mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin war hierbei sogar stets ein Effekt zu beobachten der größer ist als ein rein additiver Effekt aus den einzelnen Einzelbehandlungen.

(ii) Sämtliche Kombinationstherapien mit einer Sildenafil-Konzentration von 25 μM und unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen wiesen einen signifikant höheren Abfall in der Zellviabilität auf, verglichen mit der solitären Doxorubicin-Behandlung, unabhängig von der Inkubationszeit oder der verwendeten Doxorubicin-Konzentration, mit der Ausnahme der 24-stündigen Behandlung unter Kombination mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin. (iii) Jegliche Kombinationstherapien mit niedriger (25 μM) oder höherer (50 μM) Sildenafil-Konzentration und mit niedriger oder höherer Doxorubicin-Konzentration führten, unabhängig von der Inkubationszeit zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität. (iv) Dieser Effekt nahm abhängig von der Inkubationszeit zu und war somit bei einer Behandlung von 72 h am stärksten ausgeprägt. (v) Die solitäre Behandlung mit 50 μM Sildenafil führte sowohl bei 24- als auch bei 48-stündiger Behandlung zu einer signifikanten Inhibition der Stoffwechselaktivität (*Abb. 17, A, B, C, D*). (vi) Die solitäre Behandlung mit Doxorubicin führt, mit der Ausnahme der 72-stündigen Behandlung mit einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$, zur signifikanten Abnahme der Viabilität (*Abb. 17*).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass die kombinierte Therapie aus dem Chemotherapeutikum Doxorubicin und dem Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil die Viabilität signifikant stärker senkt als die alleinige Chemotherapie und dieser Effekt größer sein kann als die Summe aus den Effekten der entsprechenden Einzeltherapien.

HC-AFW1

In der darauffolgenden Versuchsreihe wurde untersucht, welche Wirkung durch die Kombination von Doxorubicin und Sildenafil auf pHCC-Zellen HC-AFW1-Zelllinie erzielt werden könne. Hierbei glich der Versuchsaufbau dem der für die entsprechenden Untersuchungen an den HB-Zellen verwandten.

In Abb. 18 sind die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt.

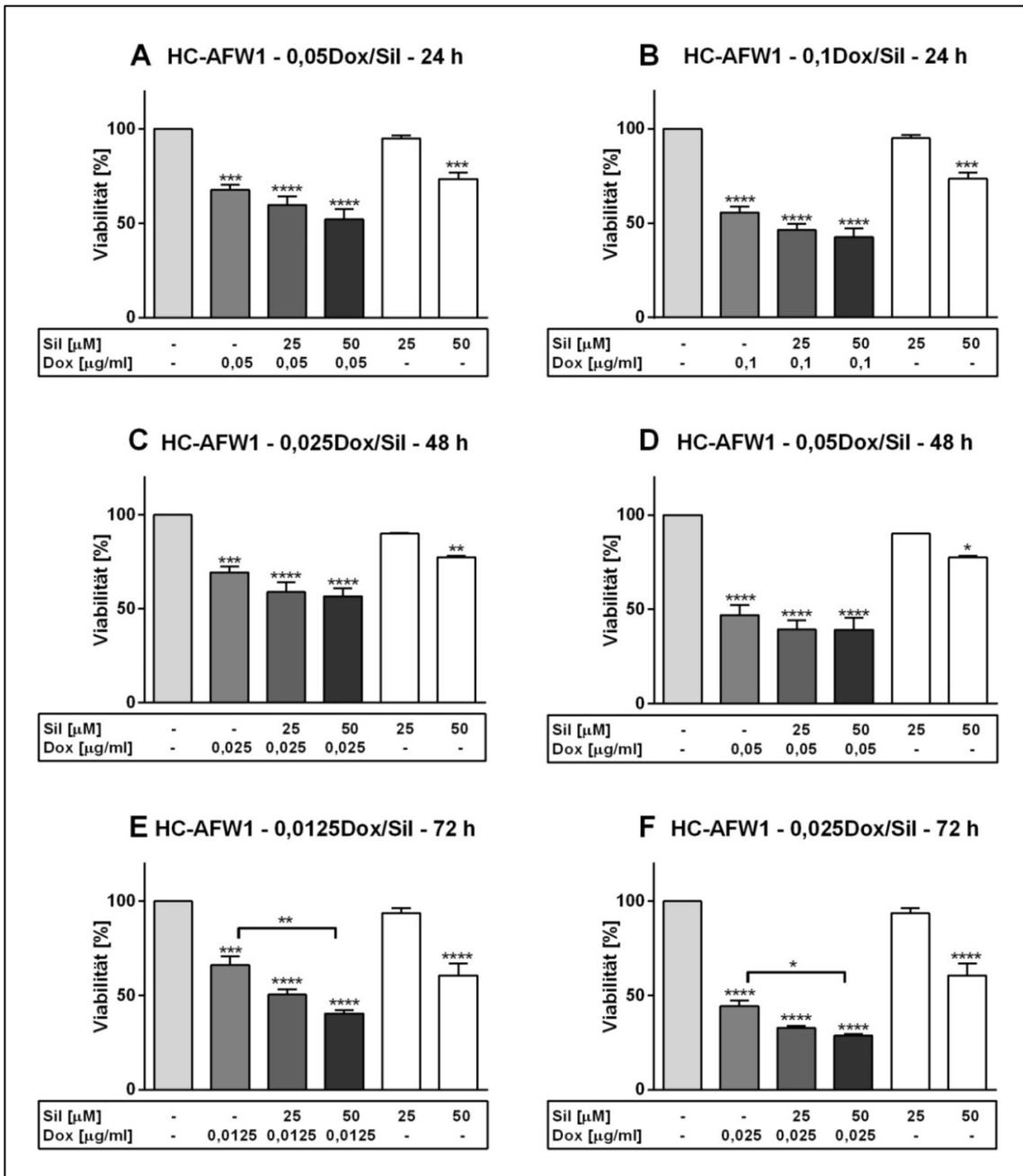


Abb. 18: Viabilitäts-Assay (MTT) der HC-AFW1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) behandelt wurde.

MTT-Assay der 24 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (A) 0,05 µg/ml bzw. (B) 0,1 µg/ml Doxorubicin (n=3). MTT-Assay der 48 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (C) 0,025 µg/ml bzw. (D) 0,05 µg/ml Doxorubicin (n=3). MTT-Assay der 72 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (E) 0,0125 µg/ml bzw. (F) 0,025 µg/ml Doxorubicin (n=3). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Doxorubicin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielles Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

In *Abb. 18* sind folgende Ergebnisse abgebildet: (i) Unter 72-stündiger Behandlung war die Abnahme der Viabilität durch Kombinations-Behandlungen aus Doxorubicin (0,0125 µg/ml oder 0,025 µg/ml) mit Sildenafil (50 µM) signifikant stärker als die unter alleiniger Doxorubicin-Behandlung (*Abb. 18, E, D*). (ii) Für sämtliche Kombinationen aus den beiden Medikamenten wurde eine signifikante Senkung des Anteils vitaler Zellen gemessen, welche zudem in allen Versuchsansätzen tendenziell stärker war als die solitäre chemotherapeutische Behandlung. (iii) Mit jeweils höherer Konzentration (Doxorubicin und/oder Sildenafil) und/oder längerer Inkubationszeit trat eine Verstärkung des Zellstoffwechsels inhibierenden Effektes auf. Dementsprechend konnte der stärkste Effekt, die Hemmung der Zellviabilität, für eine Behandlungszeit von 72 h und eine Kombination aus 0,025 µg/ml Doxorubicin und 50 µM Sildenafil beobachtet werden. (iv) Die Versuchsansätze mit alleinigem Einsatz von 50 µM des Phosphodiesterase-5-Inhibitors Sildenafil führten stets, unabhängig von der Inkubationszeit, zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität. (v) Die Versuchsansätze mit alleinigem Einsatz von Doxorubicin führten stets, unabhängig von der Inkubationszeit, zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität (*Abb. 18*).

Zusammenfassend führt eine Kombinationstherapie aus beiden verwendeten Substanzen (Sildenafil und Doxorubicin) zu einer Verbesserung der Zellstoffwechsel hemmenden Wirkung auf die pHCC-Zellen im Vergleich zur

alleinigen Behandlung mit dem Anthrazyklin Doxorubicin. Dieser Effekt ist besonders stark bei einer Behandlungszeit von 72h ausgeprägt.

3.1.5 MTT Kombinationen Cisplatin und Sildenafil

Zur Feststellung ob, und gegebenenfalls in welchem Maße, ähnliche Effekte bei einer Kombination von Sildenafil mit dem Zytostatikum Cisplatin auftreten, wurde in einer identisch aufgebauten Versuchsreihe mit dem Einsatz von Cisplatin anstelle des Doxorubicins ergründet. Dementsprechend wurde auch hier, wiederum basierend auf den Ergebnissen aus 3.1.2 und 3.1.3 jeweils eine niedrigere und eine höhere Konzentration des Chemotherapeutikums gewählt und mit Sildenafil-Behandlungen mit Konzentrationen von 25 µM und 50 µM kombiniert. Dabei fiel die Wahl auf eine Sildenafil-Konzentration, die Viabilität der jeweiligen Zelllinie nicht signifikant veränderte (25 µM) und eine Sildenafil Konzentration, unter welcher die Viabilität signifikant um 30-40% sank (50 µM). Auch in diesen Versuchen wurden Konzentrationen für beide Medikamente ausgewählt, die je einen geringen und einen stärker ausgeprägten Effekt bei solitärer Behandlung ausgelöst hatten.

HepT1

Für die HepT1-Zelllinie sind die Ergebnisse der Behandlungen mit Cisplatin und/oder Sildenafil in *Abb. 19* aufgeführt.

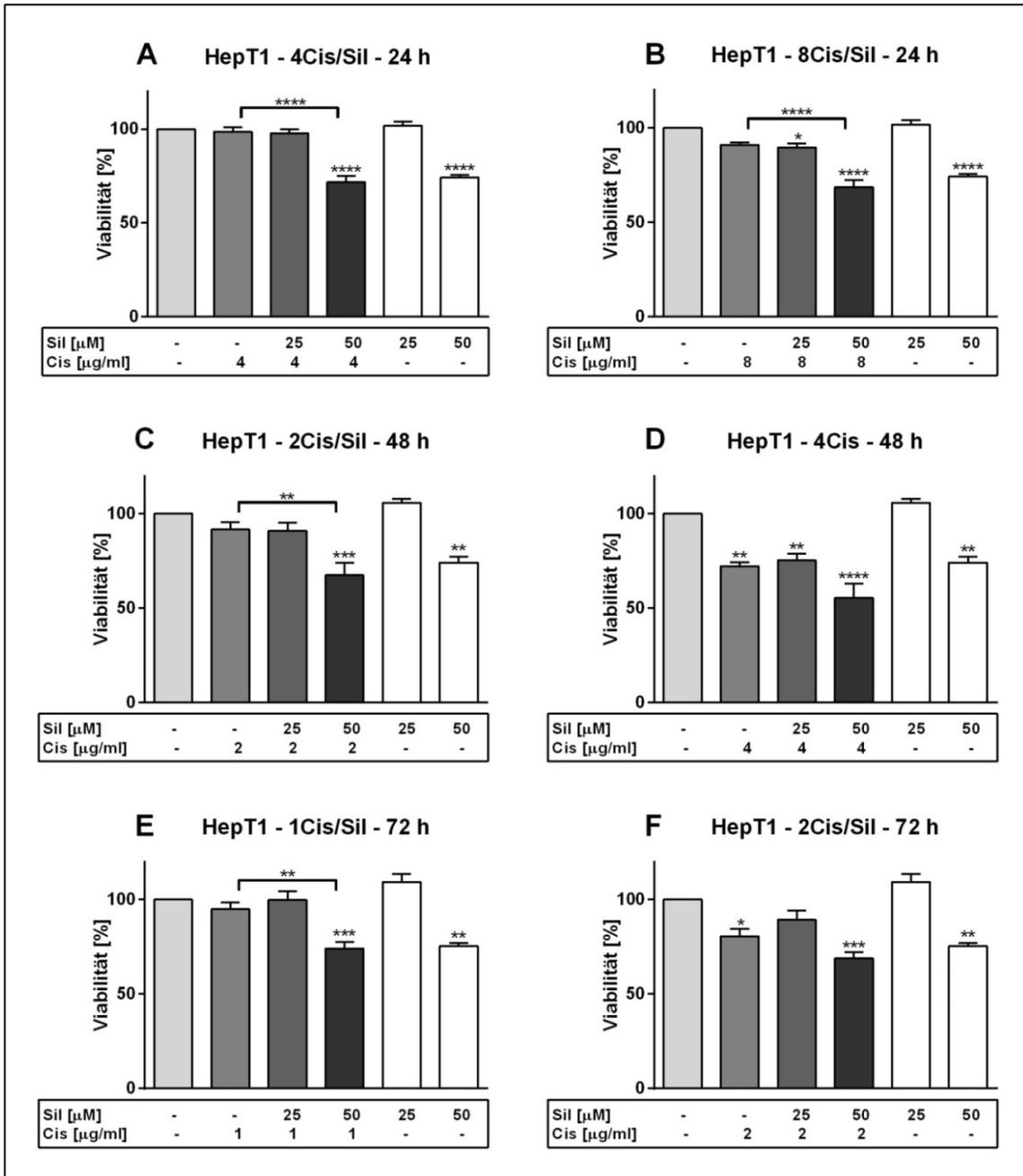


Abb. 19: Viabilitäts-Assay (MTT) der HepT1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) behandelt wurde.

MTT-Assay der 24 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (A) 4 μ g/ml bzw. (B) 8 μ g/ml Cisplatin (n=3). MTT-Assay der 48 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (C) 2 μ g/ml bzw. (D) 4 μ g/ml Cisplatin (n=3). MTT-Assay der 72 h Behandlung der HepT1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (E) 1 μ g/ml bzw. (F) 2 μ g/ml Cisplatin (n=3). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Cisplatin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die

Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Hierbei zeigten sich in *Abb. 19* folgende Ergebnisse: (i) Die Kombinationstherapien bestehend aus 50 μM Sildenafil und einer niedrigeren Cisplatin-Konzentration für alle drei Behandlungszeiten und mit höherer Cisplatin-Konzentration für die 24-stündige Behandlung, wiesen einen signifikant höheren Abfall der Zellviabilität auf, verglichen mit der solitären Cisplatin-Behandlung (*Abb. 19, A, B, C, E*). (ii) Jegliche Kombinationstherapien bestehend aus 50 μM Sildenafil mit dem Chemotherapeutikum und Kombinationstherapien aus 25 μM Sildenafil mit höherer Cisplatin-Konzentration im 24- und 48-stündigen Ansatz führten, unabhängig von der Inkubationszeit zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität. (iii) Dieser Effekt war jedoch in seiner Ausprägung nicht abhängig von der angewandten Inkubationszeit. (iv) Die solitäre Behandlung mit 50 μM Sildenafil führte zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität, unabhängig von der Behandlungszeit. (v) Die solitäre Behandlung mit Cisplatin führte bei einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$, im 48-stündigen Versuchsansatz, und bei einer Konzentration von 8 $\mu\text{g/ml}$ im 72 stündigen Versuchsansatz, zur signifikanten Abnahme der Viabilität (*Abb. 19, D, F*).

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich zusammenfassen, dass die Kombination aus Sildenafil und dem Chemotherapeutikum Cisplatin, in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und der jeweiligen Konzentration einen signifikant stärkeren Effekt auf die Abnahme der Viabilität der Hepatoblastom-Zellen haben kann, als die entsprechende alleinige Chemotherapie. Der Effekt dieser Kombinationstherapien ähnelt dabei in seiner Ausprägung stark dem der alleinigen Therapie mit dem Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil in der entsprechenden Konzentration.

HC-AFW1

Für die Testung der Kombination von Cisplatin und Sildenafil an der HC-AFW1-Zelllinie sind die Ergebnisse in *Abb. 20* aufgeführt.

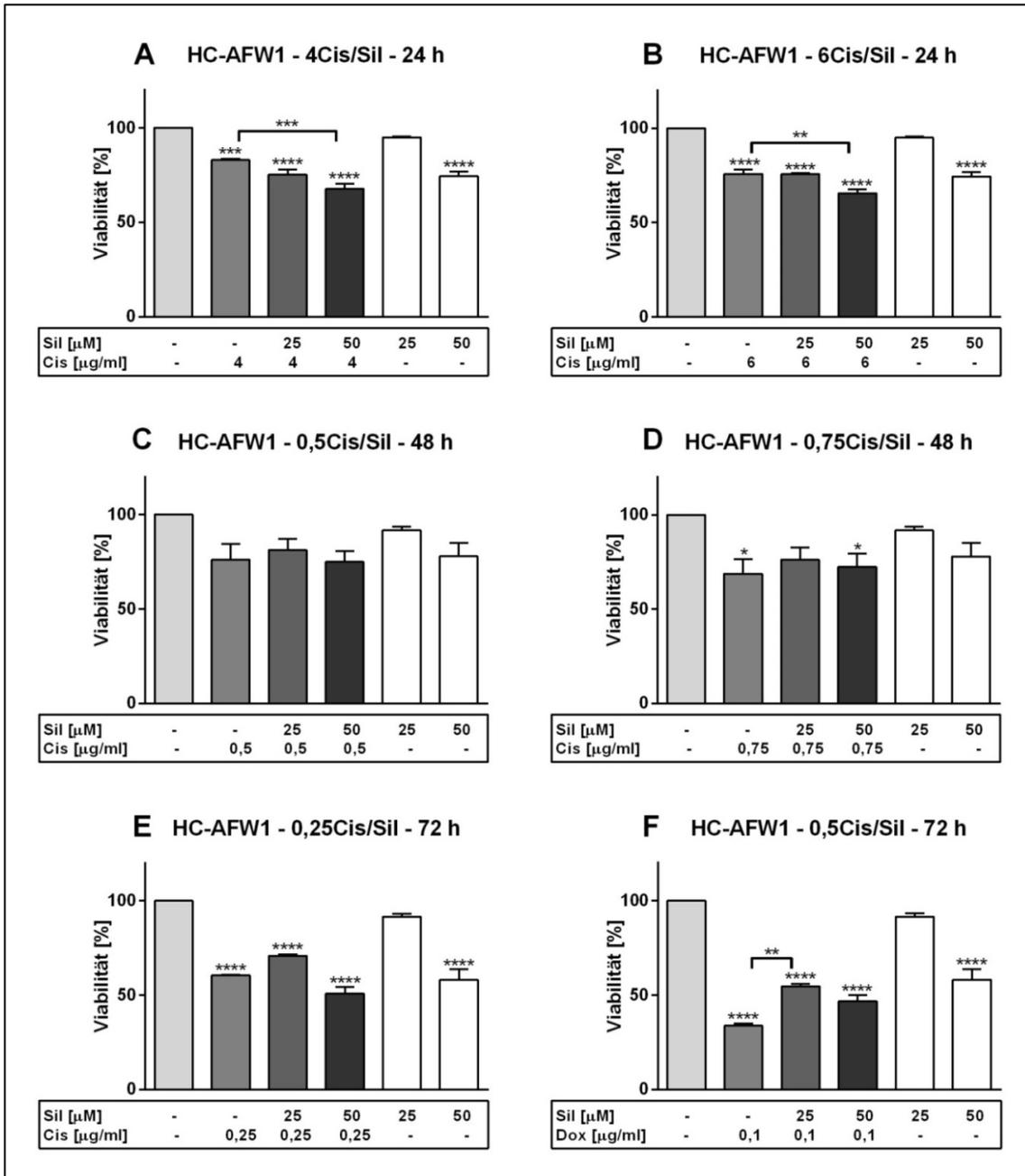


Abb. 20: Viabilitäts-Assay (MTT) der HC-AFW1-Zelllinie, welche mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) behandelt wurde.

MTT-Assay der 24 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (A) 4 μ g/ml bzw. (B) 6 μ g/ml Cisplatin (n=3). MTT-Assay der 48 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (C) 0,5 μ g/ml bzw. (D) 0,75 μ g/ml Cisplatin (n=3). MTT-Assay der 72 h Behandlung der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil und/oder (E) 0,25 μ g/ml bzw. (F) 0,5 μ g/ml Cisplatin (n=3). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Cisplatin-Behandlung ins

Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Folgende Ergebnisse sind aus der *Abb. 20* zu entnehmen: (i) Mit einer Inkubationszeit von 24 h zeigte sich für die Kombinationen aus Cisplatin und 50 μM Sildenafil eine signifikant stärkere Senkung des Anteils vitaler Zellen, als unter alleiniger Behandlung mit Sildenafil (*Abb. 20, A, B*). (ii) Generell nahm die Viabilität unter Kombinationsbehandlung ab und diese Abnahme war mit Ausnahme der Kombinationen von 25 μM Sildenafil mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ oder 0,75 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin und die Kombination von 50 μM mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (jeweils 48h, *Abb. 20, C, D*) stets signifikant. (iii) Sildenafil alleine führte in einer Konzentration von 50 μM im 24- und 48-stündigen Ansatz zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität (*Abb. 20, A, B, E, F*). (iv) Cisplatin alleine führte, außer im 48-stündigen Ansatz mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$, stets zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität. Nach 72 h und einer Behandlungskonzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin war die Abnahme signifikant stärker, als die unter Kombination der gleichen Konzentration mit 25 μM Sildenafil.

Insgesamt wurde ein signifikant stärkerer Effekt im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie im 24 h Ansatz durch die Kombinations-Behandlung erzielt und für eine Behandlung von 48 h und 72 h waren die Unterschiede zumeist nicht stark ausgeprägt.

3.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Neben dem Nachweis der Zellviabilität (siehe 3.1), ist der zugrunde liegende Mechanismus von großem Interesse. Wie in 1.2.1 beschrieben, ist die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species – ROS) ein wichtiger Bestandteil des zytotoxischen Wirkungsmechanismus des Anthracyclins Doxorubicin. Auch zur zytotoxischen Wirkung von Cisplatin trägt die vermehrte Generation von ROS maßgeblich bei (siehe 1.2.2). Dementsprechend lag auch bei dieser Versuchsreihe daher der Fokus auf potenziellen Unterschieden zwischen alleiniger Chemotherapie und der Kombination aus Chemotherapeutikum und Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in 2.2.4 beschrieben. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch am Durchflusszytometer FACS Cantoll.

3.2.1 ROS Sildenafil und/oder Doxorubicin

HepT1

Im ersten Schritt wurde dabei die Wirkung von Doxorubicin und/oder Sildenafil untersucht. *Abb. 21* zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung.

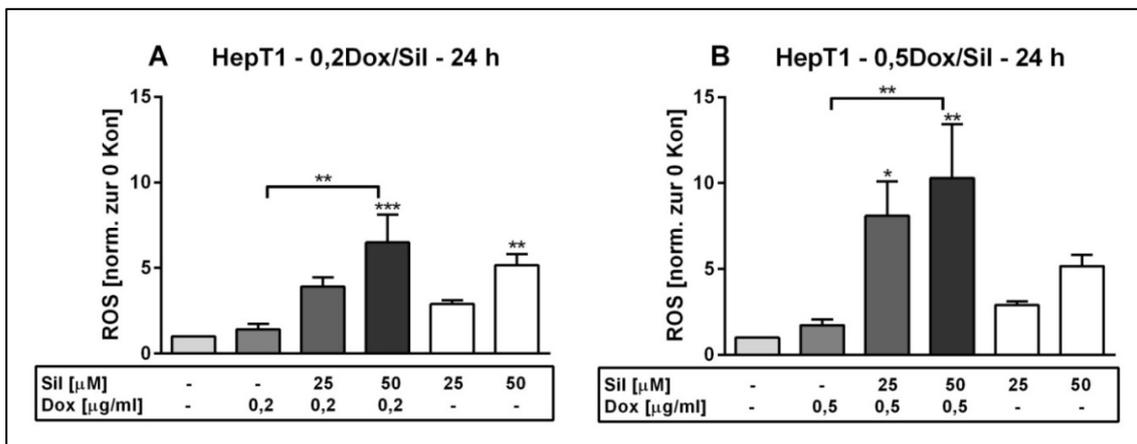


Abb. 21: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der HepT1-Zelllinie unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) für 24 h.

Werte normiert zur unbehandelten Kontrolle; ROS-Produktion in Zellen der Hep-T1-Zelllinie unter 24 h Behandlung mit Sildenafil und/oder (A) 0,2 μ g/ml bzw. (B) 0,5 μ g/ml Doxorubicin (n=4). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Doxorubicin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt.

Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Folgende Ergebnisse ließen sich beobachten: (i) Beide getesteten Kombinationsbehandlungen aus Doxorubicin 0,2 bzw. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ und 50 μM Sildenafil führten im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem Anthrazyklin Doxorubicin zu einer signifikanten Zunahme der ROS-Produktion in den HepT1-Zellen. (ii) Die Zunahme der ROS-Produktion unter Kombinationsbehandlung war dabei jeweils größer als die Summe der Zunahmen unter den Einzelbehandlungen. Der Effekt der Kombination ist um ein Vielfaches größer als der Effekt der alleinigen Chemotherapie. Wurden 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin mit 25 bzw. 50 μM Sildenafil kombiniert, so stieg die ROS-Produktion, verglichen mit der alleinigen Chemotherapie, um das 7- bzw. 13-fache an. Mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin stieg sie um das 10- bzw. 13-fache an. Die Höhe der Effektsteigerung durch Addition von Sildenafil ist damit abhängig von der Sildenafil- und der Doxorubicin-Konzentration. (*Tabelle 15*). (iii) Eine Kombination der beiden Therapeutika führte mit der Ausnahme der Kombination aus 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin und 25 μM Sildenafil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu signifikanter Zunahme der ROS-Produktion. (iv) Die meiste ROS-Produktion konnte folglich, nach einer Behandlung mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ des Chemotherapeutikums Doxorubicin und mit 50 μM Sildenafil detektiert werden. Hierbei wurde ein um mehr als das 10-fache gesteigertes Vorkommen der ROS-Produktion gemessen. (v) Unter solitärer Behandlung mit Sildenafil war für die eine Konzentration von 50 μM Sildenafil eine signifikante Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies zu beobachten. (vi) Die verwendeten Doxorubicin-Konzentrationen führten ohne Zusatz des PDE-5-Inhibitors Sildenafil nicht zu einem signifikant gesteigerten Vorkommen der ROS-Produktion (vergleiche *Abb. 21* und *Tabelle 15*).

3.2.2 ROS Sildenafil und/oder Cisplatin

HepT1

Nachfolgend wurde ebenfalls die Wirkung von Cisplatin auf die HB-Zelllinie in gleicher Versuchsanordnung analysiert. Die unter *Abb. 22* aufgeführten Graphen zeigen die Ergebnisse der Messungen der ROS-Produktion unter Behandlung mit Cisplatin und/oder Sildenafil.

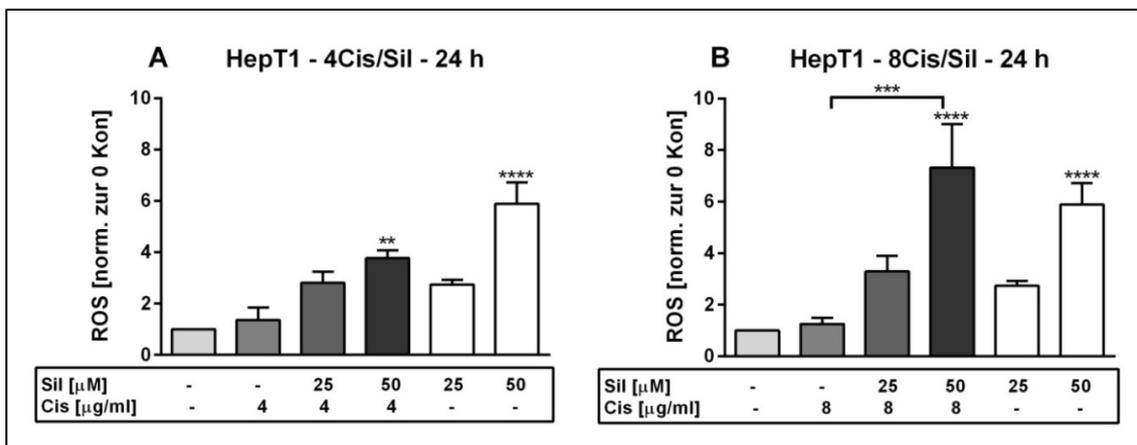


Abb. 22: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der HepT1-Zelllinie unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) für 24 h.

Werte normiert zur unbehandelten Kontrolle; ROS-Produktion in Zellen der Hep-T1-Zelllinie unter 24 h Behandlung mit Sildenafil und/oder (A) 4 μ g/ml bzw. (B) 8 μ g/ml Cisplatin (n=4). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Cisplatin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). ** (p < 0,01), *** (p < 0,001), **** (p < 0,0001).

Aus *Abb. 22* sind folgende Ergebnisse erkennbar: (i) Die Kombination aus Sildenafil (50 μ M) und Cisplatin (8 μ g/ml) steigerte die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Cisplatin signifikant. Bei dieser Kombinations-Behandlung konnte der größte Anstieg der ROS-Produktion verzeichnet werden. (ii) Der Anstieg in der ROS-Produktion war bei Kombinationsbehandlung mit 50 μ M Sildenafil und 8 μ g/ml Cisplatin größer als die Summe der Anstiege unter den entsprechenden Einzelbehandlungen. Mit höherer Sildenafil-Konzentration war eine stärkere Zunahme der ROS-

Produktion zu beobachten. Die Verdopplung der Cisplatin-Konzentration führte nur in Kombination mit Sildenafil zu vermehrter ROS-Produktion. Der Effekt der Kombination war jeweils um ein Vielfaches größer als der Effekt der alleinigen Chemotherapie mit Cisplatin. So überstieg die Wirkung der Kombination von 4 µg/ml Cisplatin und 50 µM Sildenafil, die der alleinigen Behandlung mit 4 µg/ml um das 25-fache. Die Erhöhung des Effektes durch zusätzliche Behandlung mit Sildenafil war sowohl von der Sildenafil-, als auch von der Cisplatin-Konzentration abhängig (*Tabelle 15*). (iii) Unter Kombinationsbehandlung der höheren Sildenafil-Konzentration (50 µM) mit beiden verwendeten Cisplatin-Konzentrationen (4 bzw. 8 µg/ml) stieg die ROS-Produktion, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle signifikant an. (iv) Die alleinige Behandlung mit 50 µM Sildenafil führte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, zum signifikanten Anstieg der ROS-Produktion. (v) Unter solitärer Behandlung mit Cisplatin konnte kein signifikanter Anstieg der ROS-Produktion detektiert werden. (vergleiche *Abb. 22* und *Tabelle 15*)

3.2.3 ROS Sildenafil und/oder Chemotherapie

Somit reagiert die HepT1-Zelllinie unter Kombinationstherapie aus Sildenafil und Chemotherapie (Doxorubicin oder Cisplatin) mit erhöhter ROS-Produktion, verglichen mit einer solitären Chemotherapie. Eine Kombination aus Sildenafil und Chemotherapeutikum bewirkt vielfach höhere ROS-Level als die alleinige Behandlung mit den Chemotherapeutika (*Tabelle 15*). Dabei sind höhere Dosen effektiver als geringere und oftmals ist die Zunahme der ROS-Produktion unter Kombinations-Behandlung größer als die Summe der Zunahmen unter den Einzelbehandlungen. Obwohl sich in der alleinigen Chemotherapie keine oder geringfügige Auswirkung einer erhöhten Behandlungs-Konzentration zeigten, so führte diese, durch Kombination mit unveränderten Sildenafil-Konzentrationen, dennoch zu erhöhter ROS-Produktion.

Tabelle 15: Quotient aus dem Effekt (Differenz der ROS-Produktion im Vergleich zur Nullkontrolle) der Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Doxorubicin (Dox) bzw. Cisplatin (Cis) durch den Effekt der solitären Chemotherapie der jeweiligen Konzentration in der Zelllinie HepT1.

Der Quotient entspricht somit dem Faktor der Vervielfachung der Zunahme der ROS-Produktion durch Addition von Sildenafil im Vergleich zur ROS-Produktion unter alleiniger Chemotherapie. Fett gedruckt: Quotienten, bei denen der Effekt der Kombinationstherapie den der alleinigen Chemotherapie überstieg.

Zelllinie	Chemotherapie [$\mu\text{g/ml}$]	Sildenafil [μM]	Quotient
HepT1	0,2 Dox	25	6,88
		50	12,96
HepT1	0,5 Dox	25	9,74
		50	12,76
HepT1	4 Cis	25	4,99
		50	7,64
HepT1	8 Cis	25	9,02
		50	24,82

3.3 Apoptose

Des Weiteren galt es festzustellen, ob die Abnahme der Zellviabilität (siehe 3.1.) auf der Induktion von Apoptose basiert. Die Messung der Apoptose erfolgte dabei, ähnlich der ROS-Messung, durchflusszytometrisch am FACS Cantoll. Wie in 2.2.4 erläutert erfolgte die Messung der frühen Apoptose.

3.3.1 Apoptose Sildenafil und/oder Doxorubicin

HepT1

Zellen der HepT1-Zelllinie wurden für 72 h mit Doxorubicin oder Sildenafil oder der Kombination aus beiden Therapeutika behandelt. *Abb. 23* zeigt die Ergebnisse der Messung.

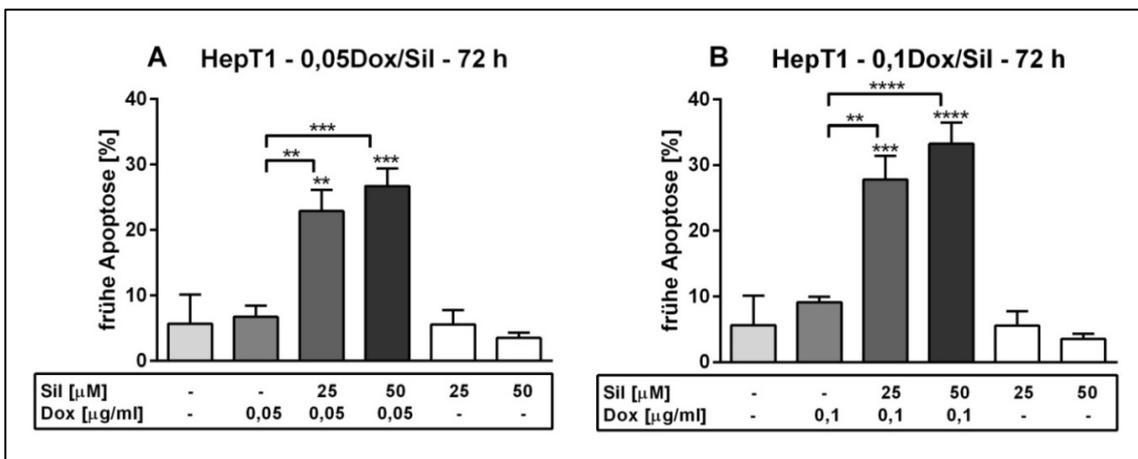


Abb. 23: Prozentualer Anteil der HepT1-Zelllinie, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) in frühe Apoptose übergehen.

Prozentualer Anteil der frühen Apoptose (Annexin V positiv, PI negativ) der Zellen der Hep-T1-Zelllinie nach 72 h Behandlung mit Sildenafil und/oder (A) 0,05 μ g/ml bzw. (B) 0,1 μ g/ml Doxorubicin (n=4). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Doxorubicin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

In *Abb. 23* ist die frühe Apoptose (Annexin V positiv, PI negativ) in HepT1-Zellen zu erkennen: (i) Sämtliche Kombinationen aus Sildenafil und Doxorubicin führten im Vergleich zur Behandlung mit alleiniger Gabe von Doxorubicin zu einer vielfachen und signifikanten Steigerung des Anteils der in Apoptose befindlicher Zellen. Die Zugabe von Sildenafil (25 oder 50 μM) führte dabei zur 16- oder 20-fachen (0,05 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin) bzw. 6- oder 8-fachen (0,1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin) Anstieg des apoptotischen Anteils der Zellen verglichen mit dem Anstieg unter alleiniger Chemotherapie. Damit ist der apoptotische Anteil jeweils abhängig von der Konzentration des PDE-5-Inhibitors Sildenafil und der Konzentration des Chemotherapeutikums (*Tabelle 16*). Dabei überstieg der Anteil apoptotischer (Annexin V positiver) Zellen unter Kombinationsbehandlung deutlich einen Prozentwert von 20%, während unter solitärer Chemotherapie ein Anteil von 10% nicht erreicht wurde. Das Maximum konnte unter Kombination von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin und 50 μM Sildenafil mit einer Apoptose-Rate von 33% detektiert werden. (ii) Jegliche dieser Kombination führten zu einem signifikanten Anstieg der frühen Apoptose der Tumorzellen. (iii) Der Anstieg unter Kombinationsbehandlung war deutlich größer als ein rein additiver Effekt aus den Einzelbehandlungen. (iv) Weder die alleinige Behandlung mit Sildenafil, noch mit Doxorubicin führten zu einem signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen. (vergleiche *Abb. 23* und *Tabelle 16*)

HC-AFW1

Auch Zellen der HC-AFW1-Zelllinie wurden für 72 h mit Doxorubicin oder Sildenafil oder der Kombination aus beiden Therapeutika behandelt. *Abb. 24* zeigt eine Übersicht über die entsprechenden Ergebnisse.

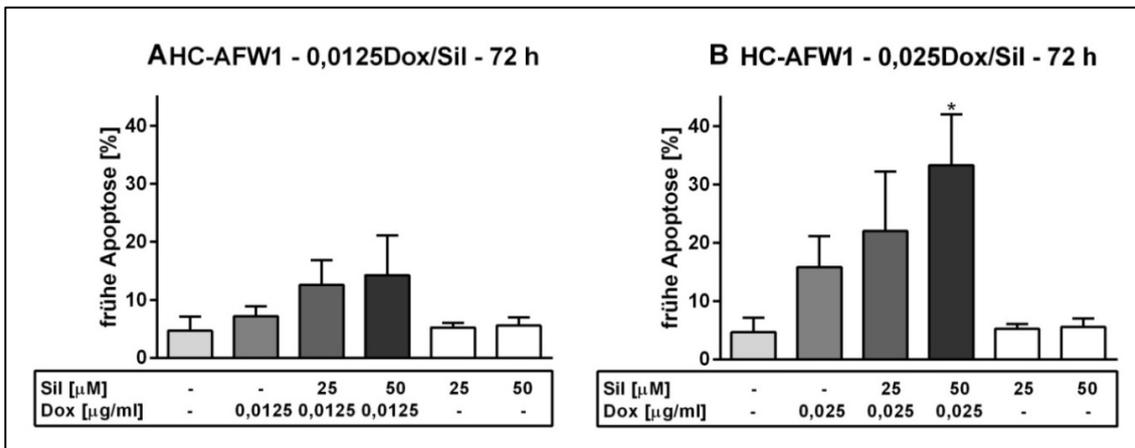


Abb. 24: Prozentualer Anteil der HC-AFW1-Zelllinie, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) in frühe Apoptose übergehen.

Prozentualer Anteil der frühen Apoptose (Annexin V positiv, PI negativ) der Zellen der HC-AFW1-Zelllinie nach 72 h Behandlung mit Sildenafil und/oder (A) 0,0125 μ g/ml bzw. (B) 0,025 μ g/ml Doxorubicin (n=4). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Doxorubicin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * (p<0,05).

Aus den in *Abb. 24* dargestellten Ergebnissen lässt sich folgendes ableiten: (i) Die Rate apoptotischer Zellen war unter Kombinationsbehandlung aus Doxorubicin und Sildenafil stets höher als unter alleiniger Doxorubicin-Behandlung, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant ist (vergleiche *Tabelle 15*). (ii) Jede dieser verwendeten Kombinationen führte zu einer Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen und unter Kombination von 50 μ M Sildenafil und 0,025 μ g/ml Doxorubicin war dieser Effekt signifikant und am stärksten ausgeprägt. Der Anstieg ist damit abhängig von der verwendeten Sildenafil- und Doxorubicin-Konzentration (*Tabelle 15*). (iii) Auch hier war der

Anstieg unter Kombinationsbehandlung deutlich größer als ein rein additiver Effekt aus den Einzelbehandlungen.

3.3.2 Apoptose Sildenafil und/oder Cisplatin

HepT1

Neben der in 3.3.1 beschriebenen Behandlung mit Doxorubicin und/oder Sildenafil wurden die Tumorzellen der HepT1-Zelllinie ebenfalls mit Sildenafil, Cisplatin und den sich ergebenden Kombinationen in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 h behandelt. Dabei ergaben sich die in *Abb. 25* dargestellten Ergebnisse.

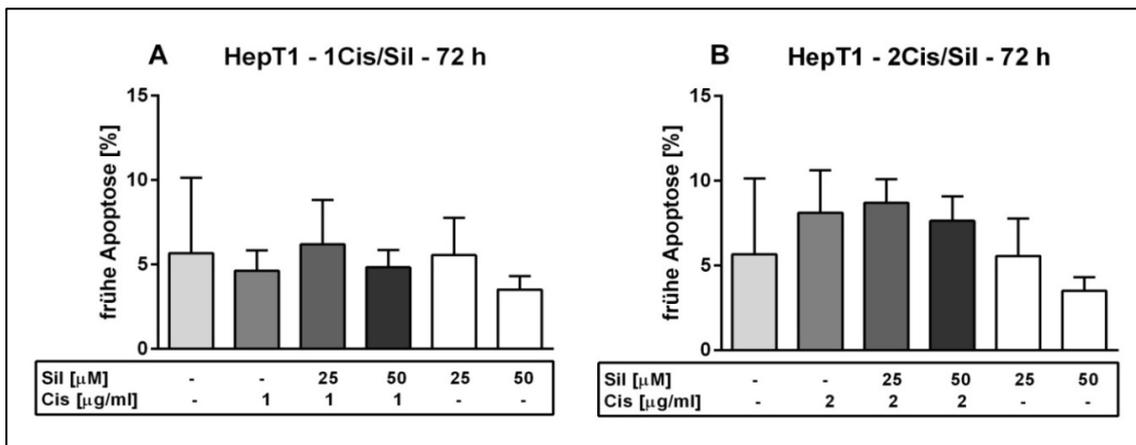


Abb. 25: Prozentualer Anteil der HepT1-Zelllinie, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) in frühe Apoptose übergehen.

Prozentualer Anteil der frühen Apoptose (Annexin V positiv, PI negativ) der Zellen der Hep-T1-Zelllinie nach 72 h Behandlung mit Sildenafil und/oder (A) 1 μ g/ml bzw. (B) 2 μ g/ml Cisplatin (n=3-4). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Cisplatin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni).

Aus den in *Abb. 25* dargestellten Resultaten hingegen lässt sich folgendes feststellen: (i) Auch wenn die Ergebnisse der Kombinationstherapien höher waren als die der alleinigen Cisplatin-Behandlung, so besteht doch kein signifikanter Unterschied. (ii) Kombinierte man Sildenafil und Cisplatin so stieg die frühe Apoptose an, mit Ausnahme der Kombination von 50 μ M Sildenafil mit 1 μ g/ml Cisplatin (wobei unter dieser Kombination dennoch mehr Apoptose gemessen werden konnte, als unter alleiniger Cisplatin-Behandlung), jedoch

ebenfalls nicht signifikant. Der größte Effekt konnte jeweils mit einer Kombination von 25 µM Sildenafil mit 1 oder 2 µg/ml Cisplatin erzielt werden. (iii) Eine alleinige Behandlung mit Sildenafil oder Cisplatin führte zu keinem Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen.

HC-AFW1

Des Weiteren wurden auch Tumorzellen der HC-AFW1-Zelllinie mit Sildenafil, Cisplatin und den sich ergebenden Kombinationen in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 h behandelt. Die sich hieraus ergebenden Ergebnisse sind in *Abb. 26* zusammengefasst.

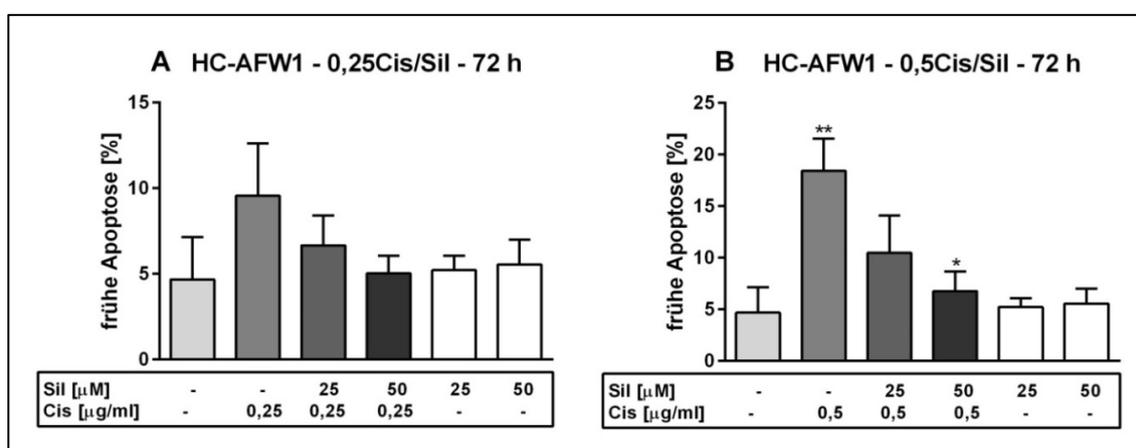


Abb. 26: Prozentualer Anteil der HC-AFW1-Zelllinie, die unter 72-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Cisplatin (Cis) in frühe Apoptose übergehen.

Prozentualer Anteil der frühen Apoptose (Annexin V positiv, PI negativ) der Zellen der HC-AFW1-Zelllinie nach 72 h Behandlung mit Sildenafil und/oder (A) 0,25 µg/ml bzw. (B) 0,5 µg/ml Cisplatin (n=3-4). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Cisplatin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * (p<0,05), ** (p<0,01).

Die in *Abb. 26* gezeigten Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu: (i) Auch wenn hier unter Einzelbehandlungen mit Cisplatin der höchste Anteil an apoptotischen Zellen erreicht wurde, so bestand doch kein signifikanter Unterschied zu den

Kombinations-Behandlungen aus Sildenafil und Cisplatin. (ii) Unter sämtlichen Kombinationsbehandlungen konnte eine Steigerung des Anteils der in Apoptose befindlichen Zellen erzielt werden, unter der Kombination aus 50 µM Sildenafil mit 0,5 µg/ml Cisplatin war diese Steigerung signifikant zur unbehandelten Kontrolle. (iii) Auch eine alleinige Behandlung mit 0,5 µg/ml Cisplatin führte, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, zu einem signifikanten Anstieg, während eine alleinige Behandlung mit Sildenafil keinen signifikanten Effekt hatte.

3.3.3 Apoptose Sildenafil und/oder Chemotherapie

Kombiniert man zur Behandlung der HepT1-Zellen Sildenafil und Doxorubicin, so stieg die frühe Apoptose signifikant und deutlich stärker an, verglichen mit der alleinigen chemotherapeutischen Behandlung. Unter Kombinations-Behandlung von Cisplatin und Sildenafil fiel dieser Anstieg deutlich geringer aus und war weder signifikant kleiner, noch signifikant größer, als der unter solitärer Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin. Die Kombinationsbehandlung der HC-AWF1-Zellen mit Sildenafil und Doxorubicin, führte z. T. und in Abhängigkeit von den jeweiligen Konzentrationen ebenfalls zu signifikanter Steigerung der Apoptoserate, verglichen mit der Behandlung mit dem einzelnen Chemotherapeutikum. Für eine Kombination aus Cisplatin und Sildenafil konnte für diese Zelllinie keine Steigerung der Apoptoserate verglichen mit einer alleinigen Cisplatin Behandlung nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Quotient aus dem Effekt (Differenz der Apoptose-Rate der Tumorzellen im Vergleich zur Nullkontrolle) der Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Doxorubicin (Dox) bzw. Cisplatin (Cis) durch den Effekt der solitären Chemotherapie der jeweiligen Konzentration.

Der Quotient entspricht somit dem Faktor der Vervielfachung der Zunahme der apoptotischen Zellen durch Addition von Sildenafil im Vergleich zur Apoptose-Rate unter alleiniger Chemotherapie. Fett gedruckt: Quotienten, bei denen der Effekt der Kombinationstherapie den der alleinigen Chemotherapie überstieg.

* negativ, da unter Cisplatin (1 µg/ml) alleine weniger Apoptose messbar ist als bei der Nullkontrolle (Abb. 25, A).

** <1 da sowohl unter Cisplatin (1 µg/ml) alleine, als auch unter Kombination mit Sildenafil (50 µM) weniger Apoptose messbar ist als bei der Nullkontrolle (Abb. 25, A). Dies bedeutet, dass die Apoptose-Rate unter Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Cisplatin-Behandlung weniger stark sinkt.

Zelllinie	Chemotherapie [µg/ml]	Sildenafil [µM]	Quotient
HepT1	0,05 Dox	25	16,02
		50	19,61
HepT1	0,1 Dox	25	6,41
		50	8
HC-AFW1	0,0125 Dox	25	3,13
		50	3,79
HC-AFW1	0,025 Dox	25	1,55
		50	2,52
HepT1	1 Cis	25	-0,54*
		50	0,8**
HepT1	2 Cis	25	1,25
		50	0,81
HC-AFW1	0,25 Cis	25	0,41
		50	0,07
HC-AFW1	0,5 Cis	25	0,42
		50	0,15

3.4 RT-PCR

Nach dem Beweis, dass die Kombination aus Sildenafil und Chemotherapeutikum (Doxorubicin bzw. Cisplatin) zu verstärkter ROS-Produktion führen kann (siehe 3.2) und diese als eine der möglichen Ursachen für die vermehrte Apoptose (siehe 3.3) und die verminderte Viabilität (siehe 3.1) angesehen werden kann, sollte des Weiteren ein am Signalweg beteiligter Transkriptionsfaktor gefunden werden.

Beta-Catenin ist hierfür ein wichtiges Target, da es als Proto-Onkogen eine zentrale Rolle einnimmt und neben seiner Bedeutung für die Zellkontakte außerdem eine wichtige Position im Wnt-Pathway besetzt. Des Weiteren ist beta-Catenin in der Onkogenese sowohl im HB, als auch im pHCC von großer Bedeutung (siehe 1.1.1 und 1.1.2). Dabei führt eine vermehrte Expression von beta-Catenin über die Bindung an einen Transkriptionsfaktor unter anderem zur vermehrten Translation von Cyclin D1 und damit zu vermehrter Zellteilung.

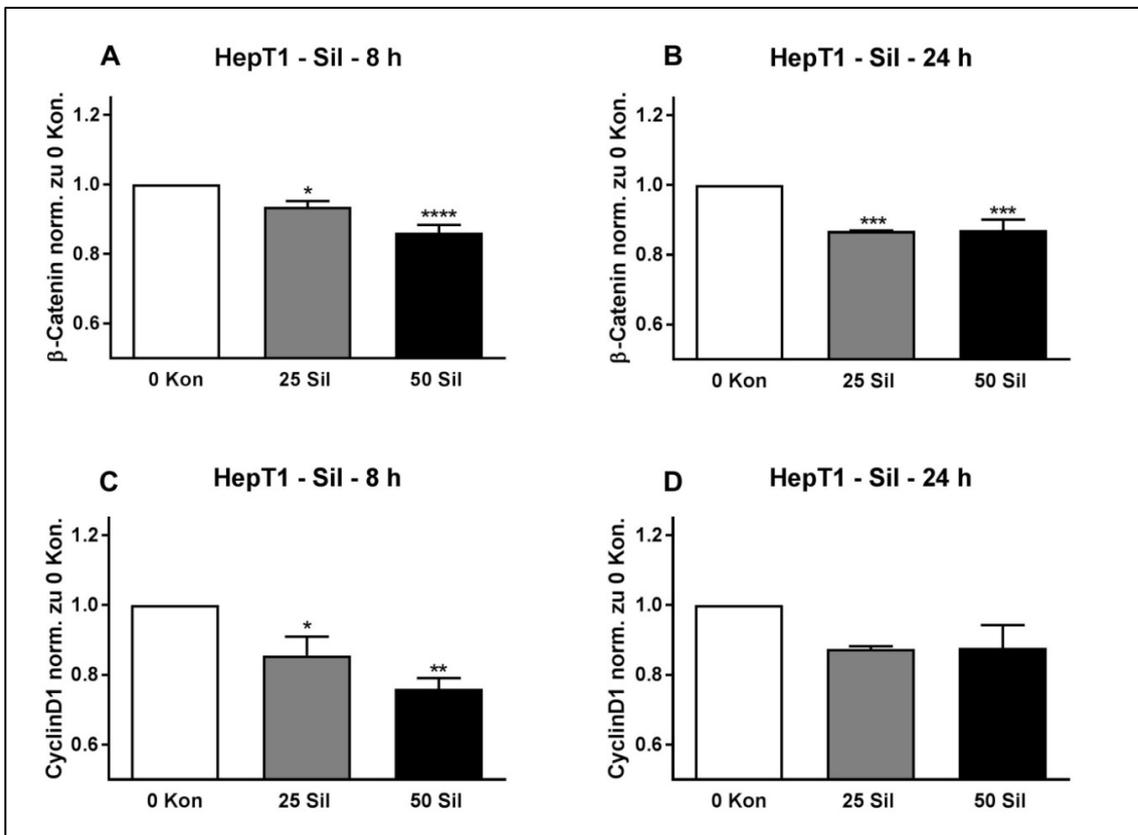


Abb. 27: Expression von beta-Catenin (β -Catenin) und Cyclin D1 auf Transkriptionsebene in HepT1-Zellen unter 8- oder 24-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) normiert zum Vorkommen in unbehandelter 0-Kontrolle (0 Kon).

(A) Expression von beta-Catenin unter 8 h Behandlung mit Sildenafil (n=4), (B) Expression von beta-Catenin unter 24 h Behandlung mit Sildenafil (n=4), (C) Expression von Cyclin D1 unter 8 h Behandlung mit Sildenafil (n=4), (D) Expression von Cyclin D1 unter 24 h Behandlung mit Sildenafil (n=4). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

Wie in *Abb. 27* dargestellt, zeigte sich, dass (i) die Behandlung mit Sildenafil zur Abnahme von beta-Catenin, als auch der von Cyclin D1 auf Transkriptionsebene führte. (ii) Diese Abnahme war für beta-Catenin für beide Sildenafil-Konzentrationen und sowohl für die 8-, als auch für die 24-stündige Behandlung signifikant, während für Cyclin D1 die Abnahme nur für die 8 h-Behandlung signifikant war. Nach 8 h nahm die Konzentration von beta-Catenin, sowie von Cyclin D1 mit höherer Konzentration stärker ab, nach 24 h ist der Effekt bei beiden Sildenafil-Konzentrationen ähnlich. Die stärkste Abnahme wurde sowohl für beta-Catenin, als auch für Cyclin D1 unter Behandlung mit 50 µM Sildenafil für 8 h erreicht.

3.5 Western Blot

Nachdem, nachgewiesen werden konnte, dass die Expression der RNA von beta-Catenin und Cyclin D1 mittels Behandlung der Zellen mit Sildenafil gemindert werden kann, wurden Western Blots für die gleichen Behandlungsansätze durchgeführt. Hierdurch kann nachgewiesen werden, ob der Einfluss des Phosphodiesterase-5-Inhibitors Sildenafil auch über die Translation der RNA hinweg besteht und somit in verminderter Proteinexpression resultiert. In *Abb. 28* sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammenfassend dargestellt.

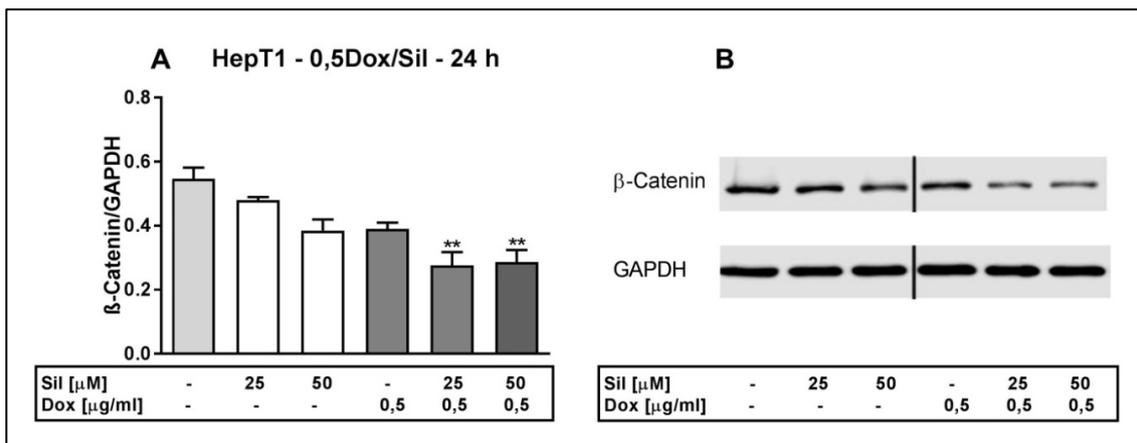


Abb. 28: Messung der Proteinexpression von beta-Catenin/GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in HepT1-Zellen unter 24-stündiger Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) mittels Western Blot.

(A) Expression von beta-Catenin/GAPDH (n=3), (B) Fotografien der Proteinbanden des Western Blots zur Quantifizierung der Expression von beta-Catenin/GAPDH. Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Cisplatin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). **($p < 0,01$).

Folgende Resultate sind aus *Abb. 28* zu entnehmen: (i) Die Abnahme der Expression von beta-Catenin ist unter einer kombinierten Behandlung mit Sildenafil und Doxorubicin größer als unter alleiniger Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin. (ii) Bezogen auf die unbehandelte Kontrolle war die durch beide Kombinations-Behandlungen erfolgte Abnahme als einzige

signifikant und im Ausmaß unabhängig davon ob 25 μM oder 50 μM Sildenafil mit Doxorubicin kombiniert wurden. Dabei war der Effekt unter Kombination von 25 μM Sildenafil mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin größer als eine Addition der Effekte der entsprechenden Einzelbehandlungen.

3.6 ALDEFLUOR® Assay

Wie in 2.2.4 beschrieben, wurden die ALDEFLUOR®-Versuche durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen beider Tumorzelllinien, HepT1 und HC-AWF1 wurden in dieser Versuchsreihe auf deren Expression der ALDH1 unter Behandlung mit Sildenafil für 48 h untersucht. *Abb. 29* zeigt die entsprechenden Ergebnisse

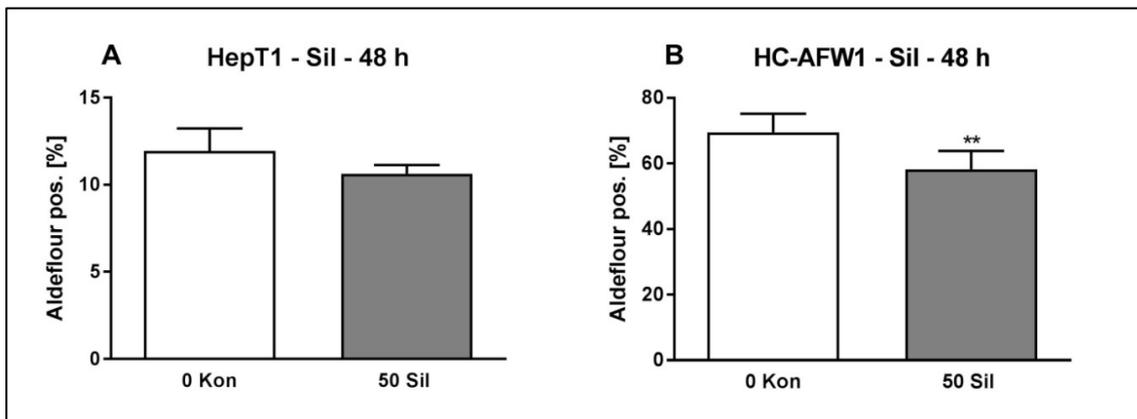


Abb. 29: Messung des absoluten Anteils ALDEFLUOR®-positiv gefärbter Zellen unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) an der Zellpopulation.

(A) HepT1-Zellen unter 48-stündiger Behandlung mit Sildenafil (n=3), (B) HC-AWF1-Zellen unter 48-stündiger Behandlung mit Sildenafil (n=3). Die Auswertung erfolgte über die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). **($p < 0,01$).

Abb. 29 A zeigt dabei das Ergebnis für die Behandlung von HepT1-Zellen mit 50 μ M Sildenafil für 48 h. Es ist eine Abnahme der ALDEFLUOR®-positiv gefärbten Zellen unter Behandlung zu erkennen.

In *Abb. 29 B* ist das Ergebnis für die Behandlung von HC-AWF1-Zellen unter gleichen Bedingungen dargestellt. Dabei kommt es unter Behandlung mit dem PDE5-Inhibitor Sildenafil zu einer signifikanten Abnahme der ALDEFLUOR®-positiv gefärbten Zellen.

3.7 Migration

Des Weiteren war es von Interesse, wie sich die Behandlung mit dem PDE-5-Inhibitors Sildenafil auf die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen auswirkt. Die zur Analyse verwandte *in-vitro* Methode ist in 2.2.5 beschrieben. Die Zellen wurden hierzu 24 h vorbehandelt und anschließend weitere 48 h in Transwell inkubiert. In *Abb. 30* zu finden sind vergleichend zwei Beispiel-Fotografien einer Migration ohne Behandlung (links) und einer Migration unter Kombinations-Behandlung aus Doxorubicin und Sildenafil (rechts) abgebildet. In *Abb. 31* sind die Ergebnisse in graphischer Form zusammengefasst.

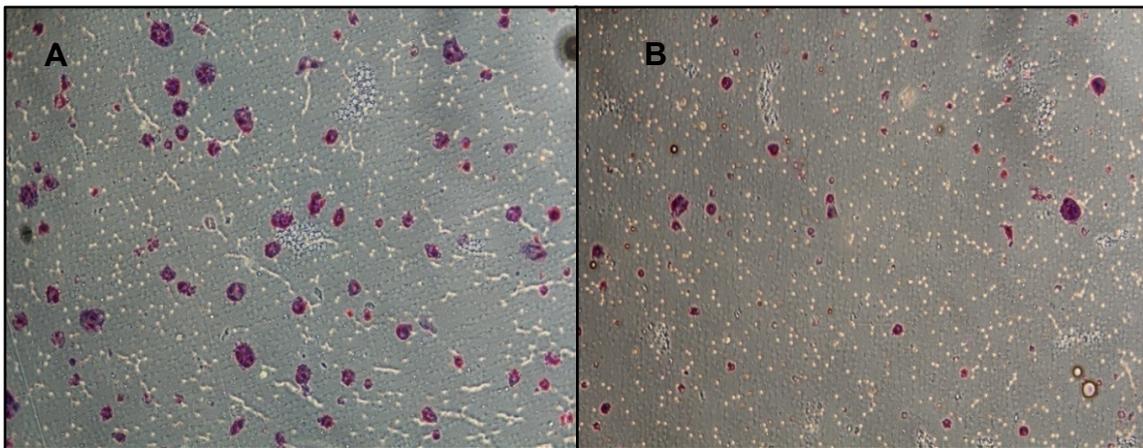


Abb. 30: Beispiel-Fotografien der Migrations-Assays der HepT1-Zelllinie nach einer Migrationsdauer von 48 h (5x Vergrößerung).

(A) Zellen der HepT1 Zelllinie nach 48-stündiger Migration ohne Behandlung, (B) Zellen der HepT1 Zelllinie nach 48-stündiger Migration unter Behandlung mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin und 50 μM Sildenafil für 72 h.

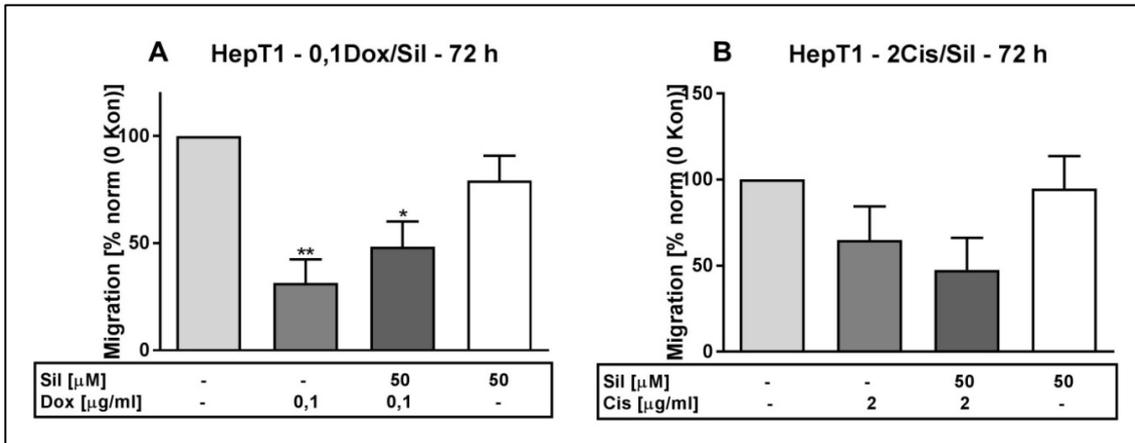


Abb. 31: Migration von HepT1-Zellen unter Behandlung mit Sildenafil (Sil) und/oder Doxorubicin (Dox) und/oder Cisplatin (Cis) normiert zur Migration der unbehandelten 0-Kontrolle (0 Kon).

(A) Migration unter 72 h Behandlung mit Sildenafil (50 μ M) und/oder Doxorubicin (0,1 μ g/ml) für eine Migrationszeit von 48 h (n=3), (B) Migration unter 72 h Behandlung mit Sildenafil (50 μ M) und/oder Cisplatin (2 μ g/ml) für eine Migrationszeit von 48 h (n=3). Die Messergebnisse wurden alle zur Kontrolle und die Kombinations-Behandlungen zusätzlich zur solitären Doxorubicin- bzw. Cisplatin-Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *(p<0,05), **(p<0,01).

Abb. 31 A zeigt die Ergebnisse des Migrationsversuchs an HepT1-Zellen unter Behandlung mit Sildenafil und/oder Doxorubicin. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Migration der Zellen, sowohl unter solitärer Behandlung mit 0,1 μ g/ml Doxorubicin, als auch unter Kombinations-Behandlung mit 0,1 μ g/ml Doxorubicin und 50 μ M Sildenafil. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle sank die Fähigkeit der HepT1-Tumorzellen um mehr als 50%. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen alleiniger Doxorubicin- und der Kombinations-Behandlung gemessen werden. Die alleinige Behandlung mit 50 μ M Sildenafil führte hingegen zu geringer und nicht signifikanter Abnahme der Migration im entsprechenden Zeitraum.

Abb. 31 B zeigt die entsprechenden Ergebnisse des Migrationsversuchs an HepT1-Zellen unter Behandlung mit Sildenafil und/oder Cisplatin. Hierbei konnte keine signifikante Verminderung der Migration der Zellen durch Behandlung nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich auch hier, sowohl bei solitärer

Behandlung mit dem Chemotherapeutikum (2 µg/ml Cisplatin), als auch unter Kombinationsbehandlung mit 2 µg/ml Cisplatin und 50 µM Sildenafil eine verringerte Migration der HepT1-Zellen, wobei der Effekt der Kombinations-Behandlung, mit einer Reduktion um > 50%, den der alleinigen Cisplatin-Behandlung übersteigt. Die alleinige Behandlung mit 50 µM Sildenafil führte hingegen zu geringerer Abnahme der Migration im entsprechenden Zeitraum.

Somit konnte gezeigt werden, dass Sildenafil in Kombination mit Doxorubicin zwar keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie in der Inhibition der Migration bringt, diese aber dennoch signifikant vermindert ist.

Sildenafil in Kombination mit Cisplatin hat sogar einen stärker inhibierenden Effekt auf die Migrationsfähigkeit der Zellen als Cisplatin alleine.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnten erstmals Erkenntnisse über die Wirkung der Chemotherapeutika Doxorubicin, Cisplatin und Sildenafil, auf Zellen der HepT1- und der HC-AWF1-Zelllinie erhoben werden. Zum ersten Mal konnte ein Vergleich der Effektivität der solitären Chemotherapie und der Effektivität der Kombinationstherapien, bestehend aus einem der beiden oben genannten Chemotherapeutika und dem PDE5-Inhibitor Sildenafil, aufgestellt werden. Dabei wurden potenziell für die gemessenen Effekte verantwortliche molekulare Mechanismen ergründet und erstmals die Wirkung von Sildenafil auf die oben genannten Zelllinien beschrieben.

Auf Grund der vielen durch Sildenafil beeinflussten molekularen Mechanismen, ist es aktuell Gegenstand der Tumorforschung vieler Arbeitsgruppen. Tiwari *et al.* sammelte bereits 2013 diverse Ansätze, die auf einen möglichen Nutzen von Sildenafil als Adjuvans zur Chemotherapie diverser Tumorentitäten in Zukunft hinweisen [124].

Wie bereits dargelegt, besteht ein hoher Bedarf für eine effektivere Chemotherapie der beiden Tumorentitäten, v.a. Tumoren hohen Risikos und schlechter Prognose. Nachfolgende Ergebnisse stützen dabei die Hypothese einer potenziellen Verbesserung der aktuellen Chemotherapie des Hepatoblastoms und des pHCC durch den additiven Einsatz von Sildenafil.

4.1 Viabilitätsminderung durch Sildenafil

Sowohl für die verwendete Hepatoblastom- als auch für die pHCC-Zelllinie konnte für Doxorubicin, Cisplatin und Sildenafil eine signifikante Abnahme der Zellviabilität, in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration und dem Behandlungszeitraum, nachgewiesen werden. Eine die Chemotherapie verbessernde Wirkung von PDE5-Inhibitoren ist hinlänglich bekannt und konnte u.a. für Prostata-Karzinome [113-115], Mamma-Karzinome [118], ZNS-Tumoren [122], Lungen-Tumoren [119, 147, 148], Gastrointestinale-Tumoren [121], HCC-Zellen und Kolorektalen-Karzinomzellen [149] zweifelsfrei bewiesen werden. Hierbei verwendete Chemotherapeutika waren u.a. Doxorubicin, Celecoxib, Mitomycin, Gemcitabine, Paclitaxel und Sorafenib. Folglich werden durch

additive Gabe von Sildenafil verschiedenste anti-kanzerogene Wirkungen der Substanzen verstärkt.

Der Nachweis der Viabilitätsabnahme durch alleinige Gabe von Cisplatin oder Doxorubicin für beide Zelllinien steht in Einklang mit bisher publizierten Arbeiten und den aktuellen Leitlinien zur Therapie von Hepatoblastomen [65, 150] und pHCC [48].

Zum aktuellen Zeitpunkt existiert keine wissenschaftliche Arbeit zur Wirkung von Sildenafil, solitär oder in Kombination mit Chemotherapeutika, auf kindliche Lebertumorzellen. Tavallai *et al.* konnte 2015 den Nachweis für die Verminderung der Zellviabilität für adulte HCC-Zellen (Huh7, HEPG2, HEP3B) durch Sildenafil alleine und durch Sildenafil in Kombination mit Sorafenib und Regorafenib erbringen [151]. Im Gegensatz dazu konnte für das Prostata-Karzinom bisher nur eine anti-kanzerogene Wirkung von Sildenafil in Kombination mit anderen Medikamenten bewiesen werden [114].

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass Sildenafil die Viabilität von Hepatoblastom- und pHCC-Zellen mindert.

4.2 Verstärkte Viabilitätsminderung durch additive Gabe von Sildenafil

Da die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese von einer effektiveren Chemotherapie durch die additive Gabe von Sildenafil ausgeht, sind die Ergebnisse der Versuche unter Kombination von Sildenafil und Doxorubicin, bzw. von Sildenafil und Cisplatin von zentraler Bedeutung.

Bisherige Erfahrungen mit Zellen aus Lebertumoren beschränken sich dabei wiederum auf die oben beschriebenen Erkenntnisse von Tavallai *et al.*. Wie auch durch die Kombination mit den anderen, oben genannten Chemotherapeutika, für andere Tumorentitäten, konnte der stoffwechsellindernde Effekt von Doxorubicin und Cisplatin durch Addition von Sildenafil signifikant gesteigert werden. Am Beispiel von Prostata-Karzinom-Zellen konnte Das *et al.* für die Kombination von Sildenafil und Doxorubicin ähnliche Ergebnisse vorweisen [114].

Der größte Benefit konnte bei einer Kombinationstherapie der HepT1-Zelllinie aus Sildenafil und Doxorubicin erzielt werden. Der erzielte Effekt überstieg dabei z. T. eine reine Addition der stoffwechselfördernden Effekte der Einzelsubstanzen.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals bewiesen werden, dass durch zusätzliche Gabe des PDE5-Inhibitors Sildenafil die Viabilität von Hepatoblastom- und pHCC-Zellen signifikant stärker vermindert wurde, als durch alleinige Therapie mit Doxorubicin oder Cisplatin.

Folglich galt es im nächsten Schritt die verantwortlichen Mechanismen zu bestimmen.

4.3 Vermehrte ROS-Produktion durch (additive) Gabe von Sildenafil

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der durch die Substanzen veränderten ROS-Produktion der Tumorzellen. Die Arbeitsgruppe um Das *et al.* nennt neben gesteigerter Caspasenaktivität und verminderter Phosphorylierung von Bad v.a. eine gesteigerte Expression von ROS in Prostata-Tumorzellen als Grund für die durch die Kombinationstherapie verminderte Zellviabilität [114]. Generell ist eine Steigerung der ROS-Produktion innerhalb der Tumorzellen ein vielfach und erfolgreich verfolgter Ansatz der Krebsforschung [152]. So basiert die anti-kanzerogene Wirkung vieler Chemotherapeutika und der Strahlentherapie u. a. auf der vermehrten Generation von ROS in den Tumorzellen [153]. Die Messung der ROS Produktion diente zur Unterstützung der Hypothese, dass auch in der vorliegenden Arbeit eine gesteigerte ROS Produktion eine mögliche Erklärung für die vermehrte Viabilitätsminderung unter Kombinationstherapie bietet.

Auch hier fügt sich die Erkenntnis, dass Doxorubicin und Cisplatin in beiden verwendeten Zelllinien konzentrations- und zeitabhängig die Produktion von ROS steigern in den wissenschaftlichen Kontext ein [67, 68, 82, 154]. Für beide Chemotherapeutika ist dieser Effekt bekannt und an anderen Tumorentitäten detailliert erforscht [67, 85].

Tavalli *et al.* ist es gelungen in HCC-Zellen zu zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Effektivität einer Kombination aus Regorafenib/Sorafenib und Sildenafil und der Fähigkeit der Zellen zur Produktion von ROS besteht [151].

Unsere Arbeit konnte erstmals den Beweis erbringen, dass Sildenafil alleine in der HepT1-Zelllinien bereits die Produktion von ROS signifikant steigern kann. Von großer Bedeutung ist die Erkenntnis, dass die Kombination, sowohl von Sildenafil und Doxorubicin, als auch von Cisplatin und Sildenafil, in Abhängigkeit von den Konzentrationen, zu einer massiven Vervielfachung (teilweise >20-fach) des ROS Vorkommens in den Zellen führen kann. Obwohl Chemotherapeutika-Konzentrationen verwendet wurden, die alleine nicht zu einer signifikanten Steigerung des ROS Vorkommens führten, führte eine Kombination mit Sildenafil zu einem beeindruckenden und signifikanten Anstieg des ROS Vorkommens. Diese Steigerung liefert, auf Grund der destabilisierenden und zellschädigenden Eigenschaften von ROS, einen plausiblen Erklärungsansatz für die verminderte Zellviabilität unter den oben genannten Behandlungen.

Eine Messung der ROS-Produktion in Zellen der HC-AFW1-Zelllinie mittels durchflusszytometrischer Messung war nicht möglich. Da auch eine Postiv-Kontrolle bei dieser Zelllinie keine auswertbaren Ergebnisse hervorbrachte, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um keinen Messfehler, sondern ein strukturelles Problem handelt. Andere Arbeiten konnten mittels CellROX[®]-Assays bereits den Nachweis veränderter ROS Produktion in HC-AFW1-Zellen beispielsweise unter Behandlung mit Curcumin erbringen [155]. Daher sollte die Messung des Einflusses von Sildenafil zukünftig gegebenenfalls auch mittels CellROX[®]-Assay durchgeführt werden.

4.4 Gesteigerte Apoptose durch additive Gabe von Sildenafil

Nach Feststellung des verminderten Zellstoffwechsels und einer starken Erhöhung der ROS-Produktion als potenzielle Ursache, stellte sich die Frage, ob die Tumorzellen in Apoptose oder Nekrose übergehen. Veränderte Apoptosemechanismen in Tumorzellen konnten in vielen Tumoren als eine Ursache für deren fehlgeleitete Proliferation, sowie als ein Ansatzpunkt für eine effektive anti-kanzerogene Therapie ausgemacht werden [156, 157]. Folglich ist

es von großem Interesse in welchem Maße die verwendeten Kombinationstherapien, v.a. im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie zu einer gesteigerten Apoptoserate in den Zellen der HepT1- und HC-AFW1-Zelllinie führen.

Für die HepT1-Zellen konnte eine signifikante und vielfache (bis 20-fach) Steigerung der Apoptose unter Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Sildenafil im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie erzielt werden. Die verwendeten Konzentrationen führten dabei bei alleiniger Anwendung zu keinem signifikanten Anstieg der Apoptose. Wurden Cisplatin und Sildenafil kombiniert, konnte kein signifikanter Unterschied zur alleinigen Cisplatin Behandlung beobachtet werden. Somit führt die Addition von Sildenafil im Zellversuch für HepT1-Zellen entweder zur massiven Zunahme der Apoptose (Doxorubicin), oder verändert die Apoptoserate nicht (Cisplatin).

Für die HC-AFW1 Zellen konnte ebenfalls unter Einzelbehandlung kein signifikanter Anstieg der Apoptose beobachtet werden, jedoch führte eine Kombination von Doxorubicin und Sildenafil in einem Ansatz zur massiven, signifikanten Zunahme. Unter kombinierter Behandlung mit Cisplatin und Sildenafil war die Apoptoserate geringfügig geringer als unter alleiniger Cisplatin Behandlung, ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht.

Diese Steigerung der Apoptose kann u. a. durch die oben beschrieben gesteigerte ROS Produktion erklärt werden. Eine überproportionale Produktion von ROS kann über diverse Mechanismen zur Induktion der Apoptose führen [158]. Dazu zählen die Herunterregelung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl2 und Bcl-XL durch Phosphorylierung [114, 159], sowie die Aktivierung von Caspasen über Cytochrom C [160].

Somit konnte bewiesen werden, dass v.a. mittels der Kombination von Doxorubicin und Sildenafil eine z. T. vielfache Zunahme der Apoptose in den Tumorzellen erreicht werden kann.

4.5 Verminderung der Expression von beta-Catenin und CyclinD1 in RT-PCR und Western Blots durch Sildenafil

Wie bereits in 1.1.1 und 1.1.2 beschrieben, sind bei beiden Tumorentitäten Mutationen des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs bekannt und z. T. von großer Bedeutung in der Tumorgenese. Dabei akkumuliert das Proto-Onkoprotein Beta-Catenin letztendlich im Zellkern und fördert über vermehrte Translation von beispielsweise CyclinD1 die Proliferation der Zellen [33-37, 47]. Folglich ist der durch die Behandlung gewünschte Effekt eine Verminderung des beta-Catenins und des CyclinD1 und damit eine Beschränkung der Zellproliferation. Die Autoren Li H. *et al.*, Li N. *et al.* und Tinsley *et al.* konnten am Beispiel von Mamma- bzw. Colon-Karzinom-Zellen aufzeigen, dass eine Therapie mit einem PDE5-Inhibitor zu verringerter Expression von Beta-Catenin und CyclinD1 führt [120, 161, 162]. Um zu ergründen, ob ein ähnlicher Effekt bei Hepatomzellen nachzuweisen ist, wurden die RT-PCR und WB zunächst an der in den Apoptose Messungen stärker beeinflussten HepT1-Zelllinie durchgeführt.

Die durchgeführten Versuche konnten für HepT1 Zellen die gewünschte Abnahme von beta-Catenin und für CyclinD1 nachweisen. Im Folgenden wurden Western Blots (WB) durchgeführt. Hierbei war die Intention eine Überprüfung des Bestehens des in der RT-PCR gemessenen Effektes über die Translation hinweg.

Auch die Western Blots wurden zunächst nur an der erfolversprechenderen HepT1-Zelllinie durchgeführt. Im Vergleich zur RT-PCR wurde nun jedoch auch mit Doxorubicin behandelt, v.a. um eine potenzielle Verstärkung des Effektes der solitären Chemotherapie durch Addition von Sildenafil zu erkennen.

Während die Einzelbehandlungen mit Sildenafil oder Doxorubicin keine signifikante Abnahme brachten, so war beta-Catenin nach 24-stündiger Behandlungszeit mit den Kombinationen der Therapeutika signifikant reduziert. Somit ist zu folgern, dass die oben beschriebene Steigerung der Apoptose z. T. über Beeinflussung des Wnt/beta-Catenin Signalweg durch Sildenafil verursacht wurde, und dieser Effekt in Kombination mit dem Anthrazyklin Doxorubicin besonders stark ausgeprägt ist.

Aus den Ergebnissen der RT-PCR und der WB ist zu schließen, dass Sildenafil über Verminderung des Transkriptionsfaktors beta-Catenin zur Verminderung der Expression des Zielgens CyclinD1 führt und somit u.a. zum Zellzyklusarrest führen könnte. Von weiterem Interesse wäre eine Überprüfung der Expression von beta-Catenin und CyclinD1 unter Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Cisplatin.

Neben diesem Beweis, sollte zukünftig die Messung der Auswirkung der Behandlungen auf die Expression von weiteren anti- bzw. pro-apoptotischen Proteinen mittels Western Blot erfolgen, um die Auswirkungen von Sildenafil auf die Tumorzellen besser verstehen zu können.

4.6 Reduktion des cancer stem cell - Anteils durch Sildenafil

Die ALDEFLUOR®-Assays nach Behandlung mit Sildenafil dienen der Erforschung des Einflusses des PDE5-Inhibitors auf den Anteil von cancer stem cells (CSC) an Tumorzellen.

Sowohl für HepT1-, als auch für HC-AFW1-Zellen konnte eine Reduktion des Anteils der ALDEFLUOR®-positiv gefärbten Zellen nachgewiesen werden. Für HC-AFW1 war diese Reduktion signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

CSC konnten bereits in vielen Tumoren nachgewiesen werden. Sie besitzen ein großes tumorigenes Potenzial und bilden die Basis für die Weiterentwicklung und Bildung von Subpopulationen der Zellen eines Tumors [163]. Somit bilden CSC zwar ein wichtiges Ziel der anti-kanzerogenen Therapie, entziehen sich dieser aber oftmals durch multiple Mechanismen, wie z. B. ihrer Position in hypoxischen Nischen [164]. Diverse wissenschaftliche Arbeiten konnten nachweisen, dass ein hoher Anteil von CSC in Tumorzellpopulationen mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung korreliert ist [165].

Die Reduktion des Anteils von ALDEFLUOR®-positiv gefärbten Zellen und damit von CSC in HepT1- und HC-AFW1-Zellen ist daher als eine weitere, den Einsatz von Sildenafil als Adjuvans der Chemotherapie unterstützende Erkenntnis.

Eine Messung des Effektes einer Kombination von Sildenafil und Doxorubicin konnte auf Grunde der im FITC-Kanal messbaren Autofluoreszenz des Chemotherapeutikums nicht vorgenommen werden [166].

4.7 Einflüsse von Sildenafil, Doxorubicin und Cisplatin auf die Migrationsfähigkeit der Zellen

Am Beispiel von Tumorzellen der Schilddrüse konnten Sponziello *et al.* 2015 eine Verminderung der Migration von Tumorzellen durch Behandlung mit Sildenafil nachweisen [167].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für HepT1-Zellen zeigen eine Verringerung der Migration, sowohl durch alleinige Chemotherapie mit Doxorubicin oder Cisplatin, als auch deren Kombination mit Sildenafil. Diese Abnahme ist für die sämtliche Versuch mit Doxorubicin signifikant. Die Abnahme lag dabei über 50%.

Wird dieser Versuch nun als *in vitro* Simulation der Migrationsfähigkeit, und damit der Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration in umliegendes Gewebe, die Blutbahn oder die Lymphe *in vivo* angesehen, so scheint es, als würde durch die Addition von Sildenafil zu der Chemotherapie weder ein wesentlicher Vorteil noch ein Nachteil bezüglich des Therapieerfolges verursacht. Für Zellen der HC-AWF1 Zelllinie konnte keine Veränderung der Migration durch Behandlung erreicht werden. Dementsprechend verändert die Addition von Sildenafil auch hier den Effekt der Chemotherapeutika nicht nachteilig für den Therapieerfolg (Daten nicht gezeigt).

4.8 Unterschiede der Effekte auf die verschiedenen Zell-Linien

Tabelle 17 (s.u., 5) zeigt eine stark vereinfachte Übersicht über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die z.T. unterschiedliche Wirkung v.a. bezüglich der Apoptose-Induktion durch die drei einzelnen Substanzen, als auch durch die sich ergebenden Konzentrationsbehandlungen kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. So könnte ein Unterschied in der Wirkung auf die in 4.3 geschilderte Änderung der ROS-Produktion zurückzuführen sein. Zur genauen Ergründung müssten jedoch weitere zur Apoptose-Induktion führende

molekulare Mechanismen und die Einflüsse der jeweiligen Therapie auf diese untersucht werden. Weiterhin würden weitere Untersuchungen der beiden Zelllinien auf vorliegende Mutationen in den u.a. zu Apoptose führenden Signalwegen Aufschluss über die zu Grunde liegenden Mechanismen geben können.

4.9 Ausblicke

Zusammenfassend ist folglich festzustellen, dass Sildenafil großes Potenzial für den möglichen Einsatz als Adjuvans in der Chemotherapie von Hepatoblastomen und pHCCs hat. Die Eigenschaft von Sildenafil u.a. die Minderung des Zellstoffwechsels, die Induktion von Apoptose, die Beeinflussung wichtiger Signalwege und die Reduktion des Anteils von CSC fordern die Expansion der *in vitro* Versuche auf ein *in vivo* Modell. Am Beispiel des Prostata-Karzinoms konnte eine Unterdrückung des Tumorwachstums durch PDE5-Inhibitoren im Mausmodell bereits nachgewiesen werden [168].

Dazu würde sich ein Aufbau ähnlich der 2011 von Ellerkamp *et al.* durchgeführten Etablierung eines orthotopen Hepatoblastoms (Huh6, HepT1) in NOD/LtSz-scid IL2R γ null Mäusen würde sich hierzu eignen [169].

Ein weiterer Vorteil der Übertragung auf ein *in vivo* Modell läge in der Evaluierung der Wirkung der Kombination von Sildenafil mit Doxorubicin oder Cisplatin auf gesundes hepatisches Gewebe. Für eine vermehrte Wirkung auf hepatisches Tumorgewebe spräche, neben dem Einfluss auf die oben genannten und in den Tumorzellen stärker ausgeprägten Signalwegen, auch die Überexpression von PDE5 in HCC-Zellen im Vergleich zu gesundem Lebergewebe im selben Patienten [151].

Des Weiteren ist der erfolgreiche und sichere Einsatz von Sildenafil in der pädiatrischen Medizin zur Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie besonders zu betonen [102, 170]. Folglich existieren bereits detaillierte wissenschaftliche Studien zur Sicherheit und Dosierung des Medikaments in der Behandlung von Kindern.

Durch die Metabolisierung von Sildenafil durch Cytochrom-P450, kann die Sildenafil-Clearance durch Leberfunktionsstörungen vermindert sein. Die Gabe

von Sildenafil ist für Patienten mit schwerer Leberinsuffizienz auf Grund fehlender Ergebnisse zur Sicherheit des Medikamentes bei diesen Patienten kontraindiziert [171]. Sämtliche bei Patienten mit Leberschädigung unter Therapie mit Sildenafil aufgetretenen Verschlechterungen der Leberfunktion waren jedoch von geringem Ausprägungsgrad [172]. Der potenzielle Einsatz von Sildenafil als Adjuvans der Chemotherapie ist dadurch jedoch nur in wenigen Fällen limitiert, da sowohl das Hepatoblastom, als auch das pHCC grundsätzlich nicht die Leberfunktion beeinflussen. Einzig durch eine Gallenabfluss- oder Perfusionsstörung durch Obstruktion, kann es zu einer Einschränkung der Leberfunktion kommen.

Weiterhin sollte eine tiefreichende Erforschung der kardioprotektiven Wirkung von Sildenafil im Zusammenhang mit der durch Therapie mit Doxorubicin verursachten Schädigung von Kardiomyozyten erfolgen. Eine protektive Wirkung von Sildenafil ist vielfach bewiesen [112, 114, 173-176]. Auch konnte bereits an *in vivo* Mausmodellen nachgewiesen werden, dass die Kardiotoxizität von Doxorubicin erfolgreich durch Gabe von PDE5-Inhibitoren gemildert werden kann [128-130].

5 Zusammenfassung

Tabelle 17: Vereinfachte Übersicht über die Ergebnisse dieser Arbeit.

	HepT1	HC-AFW1
Stoffwechselaktivität/Viabilität		
Doxorubicin	↓	↓
Cisplatin	↓	↓
Sildenafil	↓	↓
Doxorubicin + Sildenafil	↓↓	↓↓
Cisplatin + Sildenafil	↓↓	↓↓
ROS-Produktion		
Doxorubicin	→	
Cisplatin	→	
Sildenafil	↑	
Doxorubicin + Sildenafil	↑↑	
Cisplatin + Sildenafil	↑↑	
Apoptose		
Doxorubicin	→	→
Cisplatin	→	↑
Sildenafil	→	→
Doxorubicin + Sildenafil	↑↑	↑
Cisplatin + Sildenafil	→	↑
beta-Catenin RT-PCR		
Sildenafil	↓	
CyclinD1 RT-PCR		
Sildenafil	↓	
beta-Catenin Western Blot		
Doxorubicin	→	
Sildenafil	→	
Doxorubicin + Sildenafil	↓	
Cancer stem cells		
Sildenafil	→	↓
Migration		
Doxorubicin	↓	
Cisplatin	→	
Sildenafil	→	
Doxorubicin + Sildenafil	↓	
Cisplatin + Sildenafil	→	

Legende

↓	<i>signifikante Abnahme</i>
↓↓	<i>signifikant stärkere Abnahme unter Kombinationsbehandlung als unter solitärer Chemotherapie</i>
→	<i>keine signifikante Veränderung</i>
↑	<i>signifikante Zunahme</i>
↑↑	<i>signifikant stärkere Zunahme unter Kombinationsbehandlung als unter solitärer Chemotherapie</i>

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht.

Schmidt, Y.M., et al., *Sildenafil potentiates the cytostatic effect of doxorubicin in pediatric epithelial liver tumor*, Klinische Pädiatrie, 2016

Literaturverzeichnis

1. Statistisches-Bundesamt. *Todesursachenstatistik Destatis*. 2017.
2. Weinberg, A.G. and M.J. Finegold, *Primary hepatic tumors of childhood*. Hum Pathol, 1983. **14**(6): p. 512-37.
3. Fuchs, J., *Solide Tumoren im Kindesalter*. Grundlagen - Diagnostik - Therapie. 2012: Schattauer GmbH.
4. Christian Speer, M.G., *Pädiatrie*. Vol. 4. 2012: Springer Medizin.
5. Stiller, C.A., J. Pritchard, and E. Steliarova-Foucher, *Liver cancer in European children: Incidence and survival, 1978–1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project*. European Journal of Cancer, 2006. **42**(13): p. 2115-2123.
6. Howlander, N., et al., *SEER cancer statistics review, 1975–2008*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2011. **19**.
7. Kuo, C.Y., et al., *Hepatoblastoma in infancy and childhood: a clinical and pathological study of 32 cases*. Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi, 1991. **32**(2): p. 79-87.
8. Litten, J.B. and G.E. Tomlinson, *Liver tumors in children*. Oncologist, 2008. **13**(7): p. 812-20.
9. Linabery, A.M. and J.A. Ross, *Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004)*. Cancer, 2008. **112**(2): p. 416-32.
10. Perilongo, G. and E.A. Shafford, *Liver tumours*. European Journal of Cancer, 1999. **35**(6): p. 953-958.
11. DeBaun, M.R. and M.A. Tucker, *Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry*. The Journal of Pediatrics, 1998. **132**(3): p. 398-400.
12. Kingston, J.E., et al., *Association between hepatoblastoma and polyposis coli*. Arch Dis Child, 1983. **58**(12): p. 959-62.
13. Garber, J.E., et al., *Hepatoblastoma and familial adenomatous polyposis*. J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(20): p. 1626-8.
14. Giardiello, F.M., et al., *Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis*. The Journal of Pediatrics, 1991. **119**(5): p. 766-768.
15. Buckley, J.D., et al., *A case-control study of risk factors for hepatoblastoma. A report from the Childrens Cancer Study Group*. Cancer, 1989. **64**(5): p. 1169-76.
16. Sorahan, T. and R.J. Lancashire, *Parental cigarette smoking and childhood risks of hepatoblastoma: OSCC data*. Br J Cancer, 2004. **90**(5): p. 1016-8.
17. Pang, D., R. McNally, and J.M. Birch, *Parental smoking and childhood cancer: results from the United Kingdom Childhood Cancer Study*. Br J Cancer, 2003. **88**(3): p. 373-81.
18. Feusner, J. and J. Plaschkes, *Hepatoblastoma and low birth weight: A trend or chance observation?* Medical and Pediatric Oncology, 2002. **39**(5): p. 508-509.
19. Brown, J., et al., *Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma — results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Study SIOPEL 1*. European Journal of Cancer, 2000. **36**(11): p. 1418-1425.
20. Aronson, D.C., et al., *Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group SIOPEL-1 study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(6): p. 1245-52.
21. Towbin, A.J., et al., *2017 PRETEXT: radiologic staging system for primary hepatic malignancies of childhood revised for the Paediatric Hepatic International Tumour Trial (PHITT)*. Pediatr Radiol, 2018. **48**(4): p. 536-554.
22. Meyers, R.L., et al., *Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation*. Curr Opin Pediatr, 2014. **26**(1): p. 29-36.

23. Roebuck, D.J., et al., *2005 PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group*. *Pediatr Radiol*, 2007. **37**(2): p. 123-32; quiz 249-50.
24. Perilongo, G., et al., *Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology--SIOPEL 2*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(3): p. 411-21.
25. Maibach, R., et al., *Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: the SIOPEL experience*. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(10): p. 1543-9.
26. Czauderna, P., et al., *Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy*. *Curr Opin Pediatr*, 2014. **26**(1): p. 19-28.
27. Meyers, R.L., et al., *Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(1): p. 122-131.
28. Morland, B., *Protocol of the Pediatric Hepatic International Tumor Trial (PHITT), Birmingham*. 2016.
29. Mascarello, J.T., et al., *Hepatoblastoma characterized by trisomy 20 and double minutes*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1990. **47**(2): p. 243-7.
30. Tomlinson, G.E., et al., *Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005. **44**(2): p. 177-84.
31. Kraus, J.A., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 1 in human hepatoblastoma*. *Int J Cancer*, 1996. **67**(4): p. 467-71.
32. Debuire, B., et al., *Analysis of the p53 gene in European hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas*. *Oncogene*, 1993. **8**(8): p. 2303-6.
33. Park, W.S., et al., *Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma*. *J Pathol*, 2001. **193**(4): p. 483-90.
34. Wei, Y., et al., *Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas*. *Oncogene*, 2000. **19**(4): p. 498-504.
35. Moon, R.T., et al., *WNT and [beta]-catenin signalling: diseases and therapies*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(9): p. 691-701.
36. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. *Dev Cell*, 2009. **17**(1): p. 9-26.
37. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. *Organogenesis*, 2008. **4**(2): p. 68-75.
38. Shim, Y.H., et al., *Hypermethylation of the p16 gene and lack of p16 expression in hepatoblastoma*. *Mod Pathol*, 2003. **16**(5): p. 430-6.
39. Lau, C.S., K. Mahendraraj, and R.S. Chamberlain, *Hepatocellular Carcinoma in the Pediatric Population: A Population Based Clinical Outcomes Study Involving 257 Patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Result (SEER) Database (1973-2011)*. *HPB Surg*, 2015. **2015**: p. 670728.
40. Allan, B.J., et al., *A review of 218 pediatric cases of hepatocellular carcinoma*. *J Pediatr Surg*, 2014. **49**(1): p. 166-71; discussion 171.
41. Chan, K.L., et al., *Paediatric hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: retrospective study*. *Hong Kong Med J*, 2002. **8**(1): p. 13-7.
42. Bosetti, C., F. Turati, and C. La Vecchia, *Hepatocellular carcinoma epidemiology*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014. **28**(5): p. 753-70.
43. Chen, W.J., J.C. Lee, and W.T. Hung, *Primary malignant tumor of liver in infants and children in Taiwan*. *J Pediatr Surg*, 1988. **23**(5): p. 457-61.
44. Chang, M.H., *Decreasing incidence of hepatocellular carcinoma among children following universal hepatitis B immunization*. *Liver Int*, 2003. **23**(5): p. 309-14.

45. Czauderna, P., et al., *Hepatocellular carcinoma in children: results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology group*. J Clin Oncol, 2002. **20**(12): p. 2798-804.
46. Schmid, I. and D. von Schweinitz, *Pediatric hepatocellular carcinoma: challenges and solutions*. J Hepatocell Carcinoma, 2017. **4**: p. 15-21.
47. Buendia, M.A., *Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects*. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(5): p. 530-5.
48. Czauderna, P., *Adult type vs. Childhood hepatocellular carcinoma--are they the same or different lesions? Biology, natural history, prognosis, and treatment*. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(5): p. 519-23.
49. Kim, H., et al., *Expression of cyclin D1, cyclin E, cdk4 and loss of heterozygosity of 8p, 13q, 17p in hepatocellular carcinoma: comparison study of childhood and adult hepatocellular carcinoma*. Liver, 2000. **20**(2): p. 173-8.
50. van Spronsen, F.J., et al., *Hepatocellular carcinoma in hereditary tyrosinemia type I despite 2-(2-nitro-4-(3-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) treatment*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **40**(1): p. 90-3.
51. Franco, L.M., et al., *Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: a case series*. J Inher Metab Dis, 2005. **28**(2): p. 153-62.
52. Knisely, A.S., et al., *Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency*. Hepatology, 2006. **44**(2): p. 478-86.
53. Zhang, X.-F., et al., *Clinical characteristics and outcome of hepatocellular carcinoma in children and adolescents*. Pediatric Surgery International, 2013. **29**(8): p. 763-770.
54. McAteer, J.P., et al., *Hepatocellular carcinoma in children: Epidemiology and the impact of regional lymphadenectomy on surgical outcomes*. Journal of Pediatric Surgery. **48**(11): p. 2194-2201.
55. Walther, A. and G. Tiao, *Approach to pediatric hepatocellular carcinoma*. Clinical Liver Disease, 2013. **2**(5): p. 219-222.
56. Gupta, A.A., et al., *Critical review of controversial issues in the management of advanced pediatric liver tumors*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **56**(7): p. 1013-8.
57. Perilongo, G., et al., *Cisplatin versus Cisplatin plus Doxorubicin for Standard-Risk Hepatoblastoma*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(17): p. 1662-1670.
58. Zsiros, J., et al., *Successful Treatment of Childhood High-Risk Hepatoblastoma With Dose-Intensive Multiagent Chemotherapy and Surgery: Final Results of the SIOPEL-3HR Study*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(15): p. 2584-2590.
59. Brock, P.R., et al., *Sodium Thiosulfate for Protection from Cisplatin-Induced Hearing Loss*. N Engl J Med, 2018. **378**(25): p. 2376-2385.
60. Arcamone, F., et al., *Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peuceetius var. caesius*. Biotechnol Bioeng, 1969. **11**(6): p. 1101-10.
61. Carvalho, C., et al., *Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect*. Curr Med Chem, 2009. **16**(25): p. 3267-85.
62. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. Pharmacological Reviews, 2004. **56**(2): p. 185-229.
63. Weiss, R.B., *The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?* Semin Oncol, 1992. **19**(6): p. 670-86.
64. Lal, S., et al., *Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review*. Curr Drug Metab, 2010. **11**(1): p. 115-28.
65. (GPOH), G.f.P.O.u.H., *S1-Leitlinie 025/011: Hepatoblastom*. 2016.
66. Otte, J.-B., *Progress in the surgical treatment of malignant liver tumors in children*. Cancer Treatment Reviews, 2010. **36**(4): p. 360-371.

67. Thorn, C.F., et al., *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*. Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(7): p. 440-6.
68. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. J Pharm Pharmacol, 2013. **65**(2): p. 157-70.
69. Gewirtz, D.A., *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(7): p. 727-41.
70. Tewey, K.M., et al., *Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II*. Science, 1984. **226**(4673): p. 466-8.
71. Menna, P. and E. Salvatorelli, *Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview*. Chemotherapy, 2017. **62**(3): p. 159-168.
72. Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer, *Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials*. Cancer, 2003. **97**(11): p. 2869-79.
73. Salvatorelli, E., et al., *The concomitant management of cancer therapy and cardiac therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2015. **1848**(10, Part B): p. 2727-2737.
74. Rosenberg, B., L. Vancamp, and T. Krigas, *INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE*. Nature, 1965. **205**: p. 698-9.
75. Rosenberg, B., et al., *Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents*. Nature, 1969. **222**(5191): p. 385-6.
76. Kostova, I., *Platinum complexes as anticancer agents*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006. **1**(1): p. 1-22.
77. Wang, D. and S.J. Lippard, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(4): p. 307-20.
78. Giaccone, G., *Clinical perspectives on platinum resistance*. Drugs, 2000. **59 Suppl 4**: p. 9-17; discussion 37-8.
79. Go, R.S. and A.A. Adjei, *Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin*. J Clin Oncol, 1999. **17**(1): p. 409-22.
80. Abrams, T.J., et al., *SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(5): p. 471-8.
81. Koch, M., et al., *Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(8): p. 1077-90.
82. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol, 2014. **0**: p. 364-78.
83. Wright, E.P., et al., *A Systems Biology Approach to Understanding the Mechanisms of Action of an Alternative Anticancer Compound in Comparison to Cisplatin*. Proteomes. 2014 Dec;2(4):501-26. doi:10.3390/proteomes2040501.
84. Saad, S.Y., T.A. Najjar, and M. Alashari, *Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31**(12): p. 862-7.
85. Brozovic, A., A. Ambriovic-Ristov, and M. Osmak, *The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin*. Crit Rev Toxicol, 2010. **40**(4): p. 347-59.
86. Eastman, A., *The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes*. Pharmacology & Therapeutics, 1987. **34**(2): p. 155-166.

87. Tanida, S., et al., *Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment*. International Journal of Surgical Oncology, 2012. **2012**: p. 8.
88. Boulikas, T. and M. Vougiouka, *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review)*. Oncol Rep, 2003. **10**(6): p. 1663-82.
89. Filipinski, K.K., et al., *Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **86**(4): p. 396-402.
90. Bender, A.T. and J.A. Beavo, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 488-520.
91. Zoraghi, R., et al., *Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 12051-63.
92. Rosen, R.C. and J.B. Kostis, *Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction*. Am J Cardiol, 2003. **92**(9a): p. 9m-18m.
93. Wallis, R.M., et al., *Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro*. Am J Cardiol, 1999. **83**(5a): p. 3c-12c.
94. Boolell, M., et al., *Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction*. Int J Impot Res, 1996. **8**(2): p. 47-52.
95. Webb, D.J., et al., *Sildenafil citrate and blood-pressure-lowering drugs: results of drug interaction studies with an organic nitrate and a calcium antagonist*. Am J Cardiol, 1999. **83**(5a): p. 21c-28c.
96. Rotella, D.P., *Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(9): p. 674-82.
97. Bush, P.A., et al., *Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum*. J Urol, 1992. **147**(6): p. 1650-5.
98. Goldstein, I., et al., *Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group*. N Engl J Med, 1998. **338**(20): p. 1397-404.
99. Rajfer, J., et al., *Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission*. N Engl J Med, 1992. **326**(2): p. 90-4.
100. Uckert, S., et al., *Phosphodiesterase isoenzymes as pharmacological targets in the treatment of male erectile dysfunction*. World J Urol, 2001. **19**(1): p. 14-22.
101. Sastry, B.K., et al., *Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(7): p. 1149-53.
102. Dhariwal, A. and S. Bavdekar, *Sildenafil in pediatric pulmonary arterial hypertension*. J Postgrad Med, 2015. **61**(3): p. 181-92.
103. Vorhies, E.E. and D.D. Ivy, *Drug Treatment of Pulmonary Hypertension in Children*. Paediatr Drugs, 2014. **16**(1): p. 43-65.
104. Galie, N., et al., *Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(25 Suppl): p. D60-72.
105. Galie, N., et al., *Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension*. N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2148-57.
106. Vizza, C.D., et al., *Efficacy of 1, 5, and 20 mg oral sildenafil in the treatment of adults with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind study with open-label extension*. BMC Pulm Med, 2017. **17**(1): p. 44.
107. Pepke-Zaba, J., et al., *Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension*. The Lancet. **338**(8776): p. 1173-1174.

108. Moncada, S. and A. Higgs *The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway*. New England Journal of Medicine, 1993. **329**(27): p. 2002-2012.
109. Tantini, B., et al., *Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(2): p. 131-8.
110. Wang, C., et al., *Sildenafil inhibits human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by decreasing capacitative Ca²⁺ entry*. J Pharmacol Sci, 2008. **108**(1): p. 71-8.
111. Shi, Z., et al., *Roles of sildenafil in enhancing drug sensitivity in cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(11): p. 3735-8.
112. Das, A., et al., *PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer*. Pharmacol Ther, 2015. **147**: p. 12-21.
113. Chavez, A.H., et al., *Incidence rate of prostate cancer in men treated for erectile dysfunction with phosphodiesterase type 5 inhibitors: retrospective analysis*. Asian J Androl, 2013. **15**(2): p. 246-8.
114. Das, A., et al., *Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 18202-7.
115. Hamilton, T.K., et al., *Potential therapeutic applications of phosphodiesterase inhibition in prostate cancer*. World J Urol, 2013. **31**(2): p. 325-30.
116. Ohebshalom, M., et al., *The efficacy of sildenafil citrate following radiation therapy for prostate cancer: temporal considerations*. J Urol, 2005. **174**(1): p. 258-62; discussion 262.
117. Chang, J.F., et al., *Phosphodiesterase Type 5 (PDE5) Inhibitors Sensitize Topoisomerase II Inhibitors in Killing Prostate Cancer Through PDE5-Independent Impairment of HR and NHEJ DNA Repair Systems*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 681.
118. Di, X., et al., *Influence of the phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil, on sensitivity to chemotherapy in breast tumor cells*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **124**(2): p. 349-60.
119. Booth, L., et al., *PDE5 inhibitors enhance the lethality of [pemetrexed + sorafenib]*. Oncotarget, 2017. **8**(8): p. 13464-13475.
120. Li, N., et al., *Sulindac selectively inhibits colon tumor cell growth by activating the cGMP/PKG pathway to suppress Wnt/beta-catenin signaling*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(9): p. 1848-59.
121. Booth, L., et al., *Phosphodiesterase 5 inhibitors enhance chemotherapy killing in gastrointestinal/genitourinary cancer cells*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(3): p. 408-19.
122. Roberts, J.L., et al., *PDE5 inhibitors enhance the lethality of standard of care chemotherapy in pediatric CNS tumor cells*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(6): p. 758-67.
123. Sarfati, M., et al., *Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells*. Blood, 2003. **101**(1): p. 265-9.
124. Tiwari, A.K. and Z.S. Chen, *Repurposing phosphodiesterase-5 inhibitors as chemoadjuvants*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 82.
125. Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, *Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12944-55.
126. Andersen, M.J., et al., *Sildenafil and diastolic dysfunction after acute myocardial infarction in patients with preserved ejection fraction: the Sildenafil and Diastolic Dysfunction After Acute Myocardial Infarction (SIDAMI) trial*. Circulation, 2013. **127**(11): p. 1200-8.

127. Salloum, F.N., et al., *Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1398-406.
128. Fisher, P.W., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity*. Circulation, 2005. **111**(13): p. 1601-10.
129. Koka, S., et al., *Long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy without interfering with chemotherapeutic effect*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(3): p. 1023-30.
130. Koka, S. and R.C. Kukreja, *Attenuation of Doxorubicin-induced Cardiotoxicity by Tadalafil: A Long Acting Phosphodiesterase-5 Inhibitor*. Mol Cell Pharmacol, 2010. **2**(5): p. 173-178.
131. Pietsch, T., et al., *Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma*. Lab Invest, 1996. **74**(4): p. 809-18.
132. Koch, A., et al., *Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene*. Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 269-73.
133. Rikhi, R.R., et al., *Hepatoblastoma: A Need for Cell Lines and Tissue Banks to Develop Targeted Drug Therapies*. Front Pediatr, 2016. **4**.
134. Armeanu-Ebinger, S., et al., *Characterisation of the cell line HC-AFW1 derived from a pediatric hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38223.
135. Stockert, J.C., et al., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. Acta Histochem, 2012. **114**(8): p. 785-96.
136. Schulz, J.G., *Identifikation des Glykosylphosphatidylinositol-verankerten Heparan Sulfat Proteoglykans Glypikan als Toxizitäts-vermittelndem Rezeptor für Beta-Amyloid der Alzheimer'schen Krankheit in der neuronalen PC12 Zelllinie*. 1998, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät-Universitätsklinikum Charité.
137. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2016: p. 1-14.
138. Cho, S.H., et al., *Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer*. Biomicrofluidics, 2010. **4**(4): p. 43001.
139. Bass, D.A., et al., *Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation*. J Immunol, 1983. **130**(4): p. 1910-7.
140. Eruslanov, E. and S. Kusmartsev, *Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry*. Methods Mol Biol, 2010. **594**: p. 57-72.
141. Royall, J.A. and H. Ischiropoulos, *Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells*. Arch Biochem Biophys, 1993. **302**(2): p. 348-55.
142. Pietkiewicz, S., J.H. Schmidt, and I.N. Lavrik, *Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining*. J Immunol Methods, 2015. **423**: p. 99-103.
143. Vermes, I., C. Haanen, and C. Reutelingsperger, *Flow cytometry of apoptotic cell death*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 167-90.
144. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
145. Garibyan, L. and N. Avashia, *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. e6.
146. Hnasko, T.S. and R.M. Hnasko, *The Western Blot*. Methods Mol Biol, 2015. **1318**: p. 87-96.
147. Li, Q. and Y. Shu, *Pharmacological modulation of cytotoxicity and cellular uptake of anti-cancer drugs by PDE5 inhibitors in lung cancer cells*. Pharm Res, 2014. **31**(1): p. 86-96.

148. Booth, L., et al., *Multi-kinase inhibitors interact with sildenafil and ERBB1/2/4 inhibitors to kill tumor cells in vitro and in vivo*. *Oncotarget*, 2016. **7**(26): p. 40398-417.
149. Booth, L., et al., *PDE5 inhibitors enhance celecoxib killing in multiple tumor types*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(5): p. 1115-27.
150. von Schweinitz, D., *Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment*. *Semin Pediatr Surg*, 2012. **21**(1): p. 21-30.
151. Tavallai, M., et al., *Nexavar/Stivarga and Viagra Interact to Kill Tumor Cells*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(9): p. 2281-98.
152. Sun, X., et al., *Selective Induction of Tumor Cell Apoptosis by a Novel P450-mediated Reactive Oxygen Species (ROS) Inducer Methyl 3-(4-Nitrophenyl) Propiolate*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(13): p. 8826-37.
153. Gupta, S.C., et al., *Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy*. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **16**(11): p. 1295-322.
154. Marullo, R., et al., *Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(11): p. e81162.
155. Ellerkamp, V., et al., *Photodynamic Therapy Potentiates the Effects of Curcumin on Pediatric Epithelial Liver Tumor Cells*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(7): p. 3363-72.
156. Cotter, T.G., *Apoptosis and cancer: the genesis of a research field*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(7): p. 501-7.
157. Yang, J., et al., *The role of ROS and subsequent DNA-damage response in PUMA-induced apoptosis of ovarian cancer cells*. *Oncotarget*, 2017. **8**(14): p. 23492-506.
158. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. *Free Radic Res*, 2010. **44**(5).
159. Cadenas, E., *Mitochondrial free radical production and cell signaling*. *Mol Aspects Med*, 2004. **25**(1-2): p. 17-26.
160. Chung, Y.M., Y.S. Bae, and S.Y. Lee, *Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(4): p. 434-42.
161. Li, H., et al., *Pro-apoptotic actions of exisulind and CP461 in SW480 colon tumor cells involve beta-catenin and cyclin D1 down-regulation*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **64**(9): p. 1325-36.
162. Tinsley, H.N., et al., *Inhibition of PDE5 by sulindac sulfide selectively induces apoptosis and attenuates oncogenic Wnt/beta-catenin-mediated transcription in human breast tumor cells*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(8): p. 1275-84.
163. Alison, M.R., S.M. Lim, and L.J. Nicholson, *Cancer stem cells: problems for therapy?* *J Pathol*, 2011. **223**(2): p. 147-61.
164. Baumann, M., M. Krause, and R. Hill, *Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(7): p. 545-54.
165. Alison, M.R., et al., *Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose?* *J Pathol*, 2010. **222**(4): p. 335-44.
166. Reddy, L.H., Couvreur, *Macromolecular Anticancer Therapeutics*. 2010: p. 114-115.
167. Sponziello, M., et al., *PDE5 expression in human thyroid tumors and effects of PDE5 inhibitors on growth and migration of cancer cells*. *Endocrine*, 2015. **50**(2): p. 434-41.
168. Goluboff, E., A Shabsigh , J A Saidi , I B Weinstein , N Mitra , D Heitjan , G A Piazza , R Pamukcu , R Buttyan , C A Olsson, *Exisulind (Sulindac Sulfone) Suppresses Growth of Human Prostate Cancer in a Nude Mouse Xenograft Model by Increasing Apoptosis*. *Urology* 53 (2), 1999: p. 440-445.
169. Ellerkamp, V., et al., *Successful Establishment of an Orthotopic Hepatoblastoma In Vivo Model in NOD/LtSz-scid IL2R γ null Mice*. *PLoS One*, 2011. **6**(8).

170. Karatza, A.A., A. Bush, and A.G. Magee, *Safety and efficacy of Sildenafil therapy in children with pulmonary hypertension*. *Int J Cardiol*, 2005. **100**(2): p. 267-73.
171. PFIZER-PHARMA, P.G., *VIAGRA®-Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels)*. 2016.
172. Giuliano, F., et al., *Safety of sildenafil citrate: review of 67 double-blind placebo-controlled trials and the postmarketing safety database*. *Int J Clin Pract*, 2010. **64**(2): p. 240-55.
173. Adamo, C.M., et al., *Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(44): p. 19079-83.
174. Giannetta, E., et al., *Is chronic inhibition of phosphodiesterase type 5 cardioprotective and safe? A meta-analysis of randomized controlled trials*. *BMC Med*, 2014. **12**: p. 185.
175. Guazzi, M., et al., *PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study*. *Circ Heart Fail*, 2011. **4**(1): p. 8-17.
176. Kukreja, R.C., *Sildenafil and cardioprotection*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(39): p. 6842-7.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik und in Betreuung von Prof. Steven Warmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Evi Schmid, Leiterin Forschungslabore. Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder Bettina Kirchner und Melanie Hauth (beide MTA) von mir eigenständig, und für die RT-PCR in Zusammenarbeit mit Melanie Hauth (MTA) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Evi Schmid. Ich versichere, das Manuskript selbständig (nach Anleitung durch Prof. Marlies Knipper) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

München, den 01.11.2020

Danksagung

Mein Dank gebührt allen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid, für Ihre tatkräftige und zeitintensive Unterstützung, zu Weilen sogar aus dem Urlaub. Für meine herzliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und dafür, dass sie mir bei jeglichen Fragen stets kompetent und geduldig zu Seite stand möchte ich mit hiermit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Steven Warmann für die Ermöglichung dieser Dissertation, die freundliche Aufnahme in das Labor der Kinderchirurgie und Kinderurologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, und dafür, dass ich mich bei Fragen und Problemen stets an Ihn wenden konnte bedanken.

Danken möchte ich zudem sämtlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, den Doktoranten Matias Stagno und Stefan Regenbogen und den MTA Bettina Kirchner und Melanie Hauth. Ich bin sehr dankbar für das durchweg freundliche, heitere Arbeitsklima und für das mir bei der Anleitung vieler komplizierter Versuchsdurchführungen entgegengebrachte Verständnis und Ihre Geduld.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei meinen Freunden und nicht zuletzt meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern, für jegliche Unterstützung und stetigen Rückhalt bedanken.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Yannick Michael Schmidt
Geboren 12.08.1992 in Mönchengladbach

Ausbildung

Seit 07/2019 **Kinderchirurgische Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital LMU, München**
Assistenzarzt der Kinderchirurgie

08/2015 **Stipendiat des IZKF-Promotionskolleg, Tübingen**
Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF)

10/2012 - 05/2019 **Eberhard Karls Universität, Tübingen**
Humanmedizin
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 2,0 26.08.2014
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 2,0 12.04.2018
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 1,0 08.05.2019

04/2017 - 06/2017 **University Hospital of Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesien**
Auslandssemester

08/2016 **Katutura State Hospital, Windhoek, Namibia**
Department for Internal Medicine, TBC-Clinic
Famulatur, 30 Tage

09/2002 - 06/2012 **Erasmus-von-Rotterdam Gymnasium Viersen**
Abitur: 1,0

07/2009 - 01/2010 **NBSC Cromer Campus, Sydney, Australien**
High School Year

Vorträge und Poster

- 10/2016 **Posterpräsentation WCPGHAN Montreal, Kanada**
World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology
and Nutrition
Preis: Young Investigators Award of the ESPGHAN
- 06/2016 **Vortrag Jahrestagung Kind-Philipp-Stiftung, Wilsede**
Forschungstagung pädiatrische Onkologie
- 01/2016 **Posterpräsentation Research Colloquium 2016,
Tübingen**
Research Colloquium of the Faculty of Medicine of the
University of Tuebingen,

Veröffentlichungen

Schmidt, Y.M., et al., *Sildenafil potentiates the cytostatic effect of doxorubicin in pediatric epithelial liver tumor*, Klinische Pädiatrie, 2016

Schmidt, Y.M., et al., *Prophylactic Drain Placement in Childhood Perforated Appendicitis: Does Spillage Matter?*, Frontiers in Pediatrics, 2020