

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung I

(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Aufnahme von [¹³¹I]mIBG und [³H]Noradrenalin in
Neuroblastomzellen:
Einfluss der Vorbehandlung der Zellen mit Zytostatika**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Daniela Hildegard Ballweg
aus Miltenberg

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Fierlbeck

1	Einleitung	1
1.1	Ziel der Untersuchungen	1
1.2	Neuroblastom	2
1.2.1	Einleitung	2
1.2.2	Epidemiologie	2
1.2.3	Pathologie	2
1.2.4	Symptomatik	5
1.2.5	Diagnostik	6
1.2.6	Therapieplan nach Neuroblastomstudie NB 97	8
1.2.6.1	Risikogruppeneinteilung	9
1.2.6.2	Therapieplan	10
1.2.6.3	Erklärung der Therapiebausteine	10
1.2.6.4	[¹³¹ I]mIBG-Therapie	12
1.2.7	Prognose	12
1.3	Zytostatika	13
1.3.1	Cisplatin	13
1.3.1.1	Geschichte	13
1.3.1.2	Chemie	14
1.3.1.3	Wirkungsweise	14
1.3.1.4	Resistenzen	14
1.3.1.5	Pharmakologie	15
1.3.1.6	Dosierung in der Neuroblastomtherapie	15
1.3.1.7	Indikation	15
1.3.1.8	Kontraindikation	15
1.3.1.9	Toxizität	16
1.3.2	Dacarbazin	16
1.3.2.1	Chemie	16
1.3.2.2	Wirkungsweise	16
1.3.2.3	Pharmakologie	17
1.3.2.4	Dosierung in der Neuroblastomtherapie	17
1.3.2.5	Indikation	17
1.3.2.6	Toxizität	17

1.3.3 Doxorubicin=Adriamycin	17
1.3.3.1 Chemie	18
1.3.3.2 Wirkungsweise	18
1.3.3.3 Pharmakologie	18
1.3.3.4 Dosierung bei der Neuroblastomtherapie	19
1.3.3.5 Indikation	19
1.3.3.6 Kontraindikation	19
1.3.3.7 Toxizität	19
1.3.4 Etoposid	20
1.3.4.1 Chemie	20
1.3.4.2 Wirkungsweise	20
1.3.4.3 Resistenzen	21
1.3.4.4 Pharmakologie	21
1.3.4.5 Dosierung in der Neuroblastomtherapie	21
1.3.4.6 Indikation	22
1.3.4.7 Toxizität	22
1.3.5 Vincristin	22
1.3.5.1 Chemie	22
1.3.5.2 Wirkungsweise	22
1.3.5.3 Resistenzen	23
1.3.5.4 Pharmakologie	23
1.3.5.5 Dosierung in der Neuroblastomtherapie	23
1.3.5.6 Indikation	23
1.3.5.7 Kontraindikation	24
1.3.5.8 Toxizität	24
1.3.6 Vindesin	24
1.3.6.1 Chemie	24
1.3.6.2 Wirkungsweise	24
1.3.6.3 Resistenzen	24
1.3.6.4 Pharmakologie	25
1.3.6.5 Dosierung bei der Neuroblastomtherapie	25
1.3.6.6 Indikation	25

1.3.6.7	Kontraindikation	25
1.3.6.8	Toxizität	25
1.3.7	Ifosfamid	25
1.3.7.1	Geschichte	25
1.3.7.2	Chemie	26
1.3.7.3	Wirkungsweise	26
1.3.7.4	Pharmakologie	27
1.3.7.5	Dosierung bei der Neuroblastomtherapie	27
1.3.7.6	Toxizität	27
1.3.7.7	Vergleich Ifosfamid-Cyclophosphamid	28
1.3.8	4-Hydroperoxyifosfamid	28
1.3.8.1	Chemie	28
1.3.8.2	Wirkungsweise	29
1.3.8.3	Pharmakologie	29
1.3.8.4	Toxizität	29
1.4	Katecholaminstoffwechsel	29
1.5	[¹³¹ I]mIBG-Therapie	32
1.6	Ziel und Planung der Arbeit	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Materialien und Medien	35
2.1.1	Chemikalien, Geräte	35
2.2	Methoden	41
2.2.1	Behandlung von Zellkulturen	41
2.2.1.1	Kultivierung der humanen Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly	41
2.2.1.2	Passagieren der Zellen	41
2.2.1.3	Einfrieren der Zellen	42
2.2.1.4	Auftauen der Zellen	42
2.2.1.5	Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer	42
2.2.2	Behandlung der Zellen mit Zytostatika	43
2.2.2.1	Bestimmung der Empfindlichkeit von SK-N-SH und Kelly Zellen auf verschiedene Zytostatika	43

2.2.2.2	Einfluss der Zytostatika-Kombinationen N4 (Adriamycin, Vincristin, Cyclophosphamid), N5 (Vindesin, Cisplatin, Etoposid), N6 (Adriamycin, Vincristin, Ifosfamid, Dacarbazin) auf SK-N-SH und Kelly Zellen	46
2.2.3	MTT-Test	47
2.2.3.1	Theorie	47
2.2.3.2	Herstellung der Lösungen	47
2.2.3.3	Durchführung der Zytotoxizitätstestung mit Hilfe des MTT-Tests	48
2.2.4	Aufnahme von [³ H]Noradrenalin und [¹³¹ I]mIBG in SK-N-SH und Kelly Zellen nach zytostatischer Vorbehandlung	49
2.2.4.1	Herstellung des Zellinkubationspuffers und der Ascorbinsäurelösung	49
2.2.4.2	Einfluss einer Langzeit-Vorbehandlung der Zellen mit N4, N5, N6 (48-72 Stunden) auf die Aufnahme von [³ H]Noradrenalin	50
2.2.4.3	Einfluss einer Kurzzeit-Vorbehandlung (4 Stunden) der Zellen mit N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [³ H]Noradrenalin	51
2.2.4.4	Aufnahme von [³ H]Noradrenalin bzw. [³ H]Dopamin in SK-N-SH und Kelly Zellen	52
2.2.4.5	Aufnahme von [¹³¹ I]mIBG in SK-N-SH und Kelly Zellen	52
2.2.5	RT-PCR	53
2.2.5.1	Lysepuffer	53
2.2.5.2	Gewinnung der Zellen für die PCR (Zytostatika Kurzzeitinkubation)	53
2.2.5.3	Isolierung der RNA aus den Neuroblastomzellen	54
2.2.5.4	Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer	55
2.2.5.5	Reverse Transcriptase Reaktion (cDNA-Synthese)	56
2.2.5.6	Semiquantitative cDNA-Polymerase-Kettenreaktion (cDNA-PCR)	57
2.2.5.7	PCR-System der Firma Perkin Elmer	57

2.2.5.8	Fällen der PCR-Produkte mit Natriumacetat/Ethanol	59
2.2.5.9	Analyse amplifizierter cDNA im Polyacrylamidgel (PAGE)	59
2.2.5.10	Polyacrylamidgel	60
2.2.5.11	Fotografieren / Analyse Ethidiumbromid-gefärbter Polyacrylamidgele	60
2.2.5.12	Identitätsprüfung der PCR-Amplifikate durch Bestimmung der Produktlänge und Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Wirkung verschiedener Zytostatika auf SK-N-SH und Kelly Zellen	62
3.1.1	Konzentrationsabhängige Wirkung einzelner Zytostatika	64
3.1.1.1	Cisplatin	64
3.1.1.2	Etoposid	65
3.1.1.3	Vincristin	66
3.1.1.4	Vindesin	67
3.1.1.5	Doxorubicin	68
3.1.1.6	Dacarbazin	69
3.1.1.7	4-Hydroperoxyifosfamid	70
3.1.2	Wirkung der Zytostatika-Kombinationen	71
3.1.2.1	Kombination N4	73
3.1.2.2	Kombination N5	74
3.1.2.3	Kombination N6	77
3.2	Einfluss der Vorbehandlung mit Zytostatika auf die Aufnahme von [³ H]Noradrenalin und [¹³¹ I]mIBG in die Neuroblastom- zelllinien SK-N-SH und Kelly	79
3.2.1	Vorversuche: Aufnahme von [³ H]Noradrenalin und [³ H]Dopamin in SK-N-SH und Kelly Zellen	79
3.2.2	Einfluss der Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [³ H]Noradrenalin	83
3.2.2.1	Einfluss der Kurzzeitbehandlung mit Zytostatika auf die Aufnahme von [³ H]Noradrenalin	83

3.2.2.1.1 Einfluss der Kurzzeitbehandlung mit niedrig konzentrierten (einfach konzentrierten) Zytostatikakombinationen auf die Aufnahme von [³ H]NA	85
3.2.2.1.2 Einfluss der Kurzzeitbehandlung mit hoch konzentrierten (10fach konzentrierten) Zytostatikakombinationen auf die Aufnahme von [³ H]NA	86
3.2.2.2 Einfluss der Langzeitvorbehandlung mit Zytostatika auf die Aufnahme von [³ H]Noradrenalin	88
3.2.3 Einfluss der Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen auf die Aufnahme von [³ H]Noradrenalin und deren Hemmung durch unmarkiertes mIBG	90
3.2.4 Einfluss der Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5 und N6 auf die Aufnahme von [¹³¹ I]mIBG	92
3.3 Einfluss der Zytostatikakombination auf die Expression des Noradrenalintransporters (RT-PCR)	94
3.3.1 Einfluss der Kurzzeitinkubation mit Zytostatika	95
3.3.2 Einfluss der Langzeitinkubation mit Zytostatika	98
4 Diskussion	102
5 Zusammenfassung	113
6 Literaturverzeichnis	115
Tabellenverzeichnis	122
Abbildungsverzeichnis	122
Anhang	125

Abkürzungen:

AA	Ascorbic acid; Vitamin C
AADC	Aromatische Aminosäure Decarboxylase
Abb	Abbildung
bp	Basenpaare
cDNA	Copy desoxyribonucleic acid; (komplimentäre Desoxyribonucleinsäure)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CT	Computertomographie
d	Tag
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
D β OH	Dopamin- β -Hydroxylase
dCTP	Desoxycystidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetale Bovine Serum
f.c.	Final concentration
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HD	Hochdosis
HVA	Homovanillinsäure
INSS	International Neuroblastoma Staging System
L	Liter
LOH	Loss of heterozygosity
M	Molar (mol/Liter)
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
mIBG	Meta-Iodbenzylguanidin
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
μ l	Mikroliter

Abkürzungsverzeichnis

µM	Mikromolar
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat), reduzierte Form
NAT	Noradrenalintransporter
NGF	Nerve growth factor
OP	Operation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SIADH	Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
VMA	Vanillinmandelsäure
VMAT	Vesikuläre Monoamin-Transporter
Vol	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Ziel der Untersuchungen

Im deutschen Neuroblastom-Therapie-Protokoll NB 97 ist neben der herkömmlichen Behandlung mit Zytostatika als Option die Behandlung mit 131-Iod-meta-Iodbenzylguanidin [¹³¹I]mIBG vorgestellt (Berthold, Neuroblastomstudie NB 97). [¹³¹I]mIBG wird über den Noradreanalintporter NAT in die Neuroblastomzelle aufgenommen (Lode et al., 1995; Carlin, 2003).

Die Therapieerfolge sind jedoch nicht eindeutig. Eine Ursache ist, dass nicht alle Neuroblastomzellen den NAT exprimieren. Außerdem ist die Expression des NATs nicht wie früher angenommen konstant, sondern wird in vielfältiger Weise reguliert (Servidei et al., 1994; Wakade et al., 1996; Shikata et al., 2000). In der Literatur sind verschiedene Substanzen erwähnt, die die Expression des NATs beeinflussen, darunter Interferone, Retinsäure, Cocain, Desipramin, Nerve growth factor (NGF) und Dexamethason (Wakade et al., 1996; Zhu et al., 1997; Toyohira et al., 1998). Wobei allerdings die Effekte (Auf- bzw. Ab-Regulation) sehr heterogen in Bezug auf Zelltypus, Einwirkungsdauer der Substanzen und andere Faktoren sind.

In dieser Arbeit wird untersucht, ob die Vorbehandlung von Neuroblastomzellen mit Zytostatika, die im Studienprotokoll NB 97 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie klinisch verwendet werden, einen Einfluss auf die nachfolgende mIBG-Aufnahme haben.

1.2 Neuroblastom

1.2.1 Einleitung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters. Der Verlauf der Erkrankung kann sehr variabel sein. Im Säuglingsalter können Spontanremissionen sogar bei metastasierten Erkrankungen auftreten, während das 5-Jahres-Überleben älterer Kinder mit metastasierter Erkrankung nur bei etwa 40 % liegt (Studienprotokoll Neuroblastomstudie NB 97).

Wichtige prognostische Parameter sind das Alter des Patienten bei Diagnosestellung, das Erkrankungsstadium sowie molekulargenetische Marker. Die Behandlung des Neuroblastoms muss risikoadaptiert erfolgen. Bei lokalisierten Tumoren ist unter bestimmten Voraussetzungen eine operative Tumorentfernung ausreichend. Bei metastasierten Tumoren und/oder bei Vorliegen von Risikofaktoren ist neben der Operation meist eine intensive Chemotherapie, gegebenenfalls in Kombination mit einer autologen Stammzelltransplantation und/oder mit einer Strahlentherapie oder Immuntherapie erforderlich.

Die Erfolge dieser Behandlungen sind jedoch noch nicht befriedigend.

1.2.2 Epidemiologie

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 130 Kinder an einem Neuroblastom. Es tritt besonders bei Säuglingen und Kleinkindern auf (Kaletsch et al., 1996). 90 % aller Neuroblastomerkrankungen werden in den ersten 5 Lebensjahren diagnostiziert.

1.2.3 Pathologie

Neuroblastome sind embryonale Tumore. Die Tumorzellen sind mit embryonalen sympathischen Ganglienzellen, den sogenannten chromaffinen

Zellen verwandt. Während der Embryonalentwicklung formen sich aus diesen Ganglienzellen große Zellverbände. Diese bilden sich bis zum Zeitpunkt der Geburt weitgehend wieder zurück. Physiologische Residuen des chromaffinen Gewebes sind das Nebennierenmark und der Grenzstrang. Deshalb befindet sich der Primärtumor am häufigsten im Nebennierenmark, gefolgt von cervikalen und thorakalen sympathischen Ganglien des Grenzstrangs. Ungefähr zwei Drittel aller Neuroblastome stammen aus dem Abdomen, vor allem aus dem Nebennierenmark, die übrigen entwickeln sich aus dem Mediastinum oder den sympathischen Ganglien (Fonkalsrund et al., 1985). In ungefähr 10 % aller Fälle wird die primäre Seite des Ursprungs nicht gefunden (Ekert, 1982).

Lokale Neuroblastome sind in aller Regel von einer Bindegewebekapsel umgeben. Die angeschnittene Oberfläche ist rötlich, bröckelig mit nekrotischen und calcifizierten Bereichen (Poplack et al., 1982).

Histologisch besteht der Tumor aus Stromazellen und Neuroblasten unterschiedlicher Reifungsstufen. Reife Neuroblasten erinnern morphologisch an sympathische Ganglienzellen. Die Klassifikation von Hughes (Hughes et al., 1974) mit Modifikation von Harms et al. (Harms et al., 1979) erlaubt eine Einteilung der Tumoren entsprechend dem Ausreifungsgrad der Neuroblasten.

Tab. 1: Histologische Gradeinteilung beim Neuroblastom (modifiziert nach Hughes)

<u>Malignitätsgrad</u>	<u>histologisches Bild</u>
1	<p>Ganglioneuroblastom</p> <p>1a Diffuses Ganglioneuroblastom: diffuse Mischung von unreifen, ausreifenden und reifen Zellelementen</p> <p>1b Ganglioneuroblastom vom Kompositionstyp: Ganglioneurom mit wechselnden Arealen undifferenzierten Neuroblastomgewebes (abrupter Übergang zwischen beiden Tumorkomponenten)</p>
2	<p>Mischbild aus undifferenzierten Zellen und mindestens einigen Zellen mit partiellen Differenzierungen in Ganglienzellen (vesikuläre Kerne mit erkennbarem Nukleolus, Zytoplasma-Kern-Relation angestiegen, Zytoplasmatische Fortsätze)</p>
3	<p>Undifferenziertes, klein- und rundzelliges Tumorgewebe</p>

1.2.4 Symptomatik

Die Klinik des Neuroblastoms ist stark von dessen Lokalisation abhängig.

Am häufigsten wird eine harte irreguläre und fixierte Tumormasse im rechten oder linken Hypochondrium beobachtet. Diese „abdominelle Zellansammlung“ stellt in der Regel den primären adrenalen Tumor oder aber bei Kindern unter einem Jahr eine mit Neuroblastometastasen angefüllte Leber dar.

2/3 der Kinder mit Neuroblastom kommen bereits mit Metastasen in die Klinik, so dass es oft nicht der Primärtumor sondern die sekundären Ausbreitungen sind, die dem Arzt auffallen.

Ein Patient mit metastasiertem Neuroblastom erscheint oft chronisch krank, blass und leicht erregbar. Die Vergrößerungen der Lymphknoten, speziell im cervikalen und axillären Bereich, können oft eine charakteristische Begleiterscheinung des Neuroblastoms sein (Evans et al., 1971). Trotz der Tatsache, dass das Neuroblastom ein Tumor ist, der Katecholamine oder auch das vasointestinale Polypeptid (VIP) synthetisiert und ausscheiden kann, sind Symptome wie Bluthochdruck und Durchfall eher selten.

Trotzdem sollte die Möglichkeit eines Neuroblastoms in Betracht gezogen werden, wenn Hochdruck und Durchfall keine anderen offensichtlichen Ursachen aufweisen. Akute cerebrale Encephalopathie ist eine andere seltene Manifestation des Neuroblastoms.

Die häufigsten Symptome, die mit dem Neuroblastom assoziiert sind:

1. ungeklärte Anämie
2. Fieber unklaren Ursprungs
3. Gedeihstörungen
4. Humpeln, generelle Knochenschmerzen und Weigerung zu gehen
5. Gewebsmasse im Bereich des Abdomens, Beckens oder Mediastinums
6. Plötzliches Auftreten von Querschnittssymptomatik
7. Proptose

1.2.5 Diagnostik

Die Diagnose des Neuroblastoms wird durch histologische Untersuchungen des Tumorgewebes oder durch Nachweis typischer Tumorzellnester im Knochenmark in Verbindung mit erhöhten Katecholaminmetaboliten im Serum oder Urin gestellt.

Tab. 2: International Neuroblastoma Staging System (INSS)-Diagnosekriterien für das Neuroblastom

1. Zweifelsfreie Diagnose aus dem Tumorgewebe oder
2. Nachweis charakteristischer Tumorzellen im Knochenmarkaspirat oder Knochenbiopsat (z.B. Tumorzellnester oder immunozytologisch positive Zellansammlungen) und erhöhter Katecholaminmetabolite (Vanillinmandelsäure (VMA), Homovanillinsäure (HVA)) bzw. Dopamin im Serum oder Urin

Da Neuroblastome maligne Abkömmlinge des sympathischen Nervensystems sind, lassen sie sich sehr gut mit Hilfe der mIBG-Szintigraphie (^{123}I meta-Iodbenzylguanidin) erkennen (Treuner et al., 1984; Kimmig et al., 1984).

Die Bestimmung der Lage, Größe und Ausdehnung des Tumors wird mit Hilfe von Computertomographie (CT), Magnetresonanztomogramm (MRT), Ultraschall und Knochenszintigraphie bestimmt (Brodeur et al., 1988).

Darüber hinaus werden auch immer biologische Marker zur Diagnostik und besonders zur Prognoseabschätzung des Neuroblastoms eingesetzt. Die Amplifikation des Nmyc-Onkogens, das im fortgeschrittenen Stadium häufig erhöht ist, ist stark mit einer schlechten Prognose korreliert (Christiansen et al., 1995). Ein Verlust des Chromosoms 1p (loss of heterozygosity=LOH 1p) tritt meist in der Kombination mit einer Nmyc-Amplifikation auf. Doch auch eine isolierte Deletion von 1p kann laut Ambros und Caron (Ambros et al., 1995; Caron et al., 1996) eine Prognoseverschlechterung bedeuten. Diese sei sogar noch aussagekräftiger als die Nmyc-Amplifikation.

Tab. 3: Nutzen von Tumormarkern

Tumormarker	Nutzen		
	Diagnostisch	Prognostisch	Verlauf
VMA, HVA, Dopamin	+	(+)	+
Neurospezifische Enolase	(+)	(+)	+
LDH	(+)	++	-
Ferritin	-	+	-

Die klinische Einteilung in unterschiedliche Stadien ist aus verschiedenen Gründen wichtig. Vor allem erlaubt sie eine optimierte Anpassung an entsprechende Therapieschemata. Ein Faktor für die Prognose und Wahl der Therapie ist die nachfolgende Stadieneinteilung nach INSS. Neben der klinischen Stadieneinteilung beeinflusst das Alter, die Nmyc-Amplifikation und das Vorhandensein einer bedrohlichen Symptomatik die Prognose.

Maßgebend für die Stadieneinteilung sind chirurgische und histologische Kriterien.

Tab. 4: Internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS

Stadium 1: Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne mikroskopischen Resttumor), repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall. Lediglich unmittelbar am Tumor adhärente, chirurgisch entfernte Lymphknoten dürfen positiv sein. Auch bilaterale Tumoren, die makroskopisch komplett exstirpiert werden können und keinen regionalen Lymphknoten aufweisen, gehören zum Stadium 1.

Stadium 2a: Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; repräsentative ipsi- oder kontralaterale (nicht am Tumor adhärente) Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall.

2r (resektabel): Resttumor $\leq 10\%$ des Ausgangsvolumens oder $< 2-5$ ml

2nr (nicht resektabel): Resttumor $> 10\%$ des Ausgangsvolumens oder $> 2-5$ ml

Stadium 2b: Unilateraler Tumor; regionale, ipsilaterale, nicht adhärenente Lymphknoten zeigen Tumorbefall, kontralaterale Lymphknoten sind histologisch negativ.

Stadium 3: Nichtresektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne Lymphknotenbefall
oder unilateral lokalisierter Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall
oder nicht resektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder durch Lymphknotenbefall.
(Das Überschreiten der Mittellinie ist definiert durch infiltratives Erreichen/Überschreiten der Wirbelkante der Gegenseite)

Stadium 4: Disseminierung des Tumors zu Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Leber, Haut und/ oder anderen Organen.

Stadium 4S: Lokalisierter Primärtumor wie bei Stadium 1, 2a oder 2b und Disseminierung nur in Leber, Haut und/oder Knochenmark. Nur Säuglinge im 1. Lebensjahr. Die Knochenmarksinfiltration ist gering (weniger als 10 % Tumorzellen im Ausstrich, mIBG für Knochenmark negativ).

1.2.6 Therapieplan nach Neuroblastomstudie NB 97

Die Behandlung erfolgt risikoadaptiert. Das Risiko wird durch die Faktoren Nmyc-Amplifikation, Alter, Stadium, das Vorhandensein einer bedrohlichen Symptomatik und das Volumen des in situ belassenen Tumorrestes beschrieben. Die Patienten werden für therapeutische Zwecke in Beobachtungs-, Standardrisiko- und Hochrisikogruppen zusammengefasst.

Die komplette Entfernung eines lokalen Tumors ohne Gefährdung des Kindes und seiner Organe, z.B. der Niere, ist die Methode der Wahl bei allen drei

Risikogruppen. Ist dies nicht möglich, so wird zu einer Subtotalresektion oder Biopsie geraten, um Material für die Nmyc-Bestimmung zu erhalten. Nach der Operation des Patienten ist die jeweilige Therapie abhängig von der Risikogruppe.

1.2.6.1 Risikogruppeneinteilung

Als prognostisch bedeutsam und voneinander unabhängig erwiesen sich die Nmyc-Amplifikation und das Alter (Einjahresgrenze) bei der Diagnose. Mit Hilfe dieser beiden Faktoren lassen sich die Risikogruppen einteilen.

Beobachtungsgruppe

Alle Kinder, die nicht in die Hochrisiko und Standardgruppe fallen.

Standardrisikogruppe

1. Säuglinge mit Neuroblastom der Stadien 1-3 ohne Nmyc-Amplifikation und mit bedrohlicher Symptomatik
2. Kinder mit Neuroblastom über 1 Jahr ohne Nmyc-Amplifikation und
 - a) mit bedrohlicher Symptomatik und/oder
 - b) großem Resttumor

Hochrisikogruppe (HR)

Hierzu zählen alle Altersgruppen der Stadien 1, 2 und 3 mit Nmyc-Amplifikation oder einer 1 p-Deletion sowie das Stadium 4S mit Nmyc-Amplifikation.

Beim Stadium 4 haben die Risikogruppen keine unmittelbar therapeutischen Konsequenzen, da alle Patienten maximal behandelt werden.

1.2.6.2 Therapieplan

Beim Beobachtungspatienten erfolgt eine Therapie nach der OP nur dann, wenn eine Nmyc-Amplifikation festgestellt wird, eine bedrohliche Symptomatik vorliegt oder die erwartete Regression nach 6-12 Monaten unvollständig bleibt. Ansonsten wird die spontane Tumorregression „beobachtet“.

Standardrisikopatienten erhalten postoperativ 4 Blöcke Chemotherapie (jeweils 2 Blöcke N5 und N6). Bei ungenügendem Therapieansprechen wird ggf. ein zweiter operativer Eingriff zur vollständigen Entfernung des Primärtumors vorgenommen oder eine Bestrahlung des Tumorrestes mit 36-40 Gy und eventuell gleichzeitiger mIBG-Therapie durchgeführt.

Hochrisikopatienten erhalten alle derzeit als wirksam beurteilten Therapiemodalitäten, das sind Operation, Zweitoperation, 6 Blöcke Chemotherapie mit jeweils 3 Blöcken N5 und N6 Behandlungen. Zwischen den einzelnen Zytostatikablöcken erfolgt jeweils eine G-CSF (Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor)-Gabe.

Zusätzlich werden lokale Strahlenbehandlungen des Primärtumors eingesetzt. Nach diesen Therapien werden anschließend entweder eine Erhaltungstherapie aus 4 Blöcken Cyclophosphamid oder eine Megatherapie aus [¹³¹I]mIBG-Behandlung mit myoablativer Chemotherapie eingesetzt.

Nach Abschluss der Megatherapie oder Erhaltungstherapie erhalten alle Hochrisikopatienten in kompletter Remission, partieller Remission und stabiler Erkrankung eine Immuntherapie mit dem monoklonalen Anti-GD2-Antikörper ch 14.18 (Neuroblastomstudienprotokoll NB 97).

1.2.6.3 Erklärung der Therapiebausteine

Die Zytostatikablöcke N4, N5, N6 bestehen aus folgenden Zytostatika:

Einleitung

N4:	Adriamycin	0,5 mg/kg x d	d 1, 3, 5
	Vincristin	25 µg/kg x d	d 1, 3, 5
	Cyclophosphamid	10 mg/kg x d	d 1-7
N5:	Cisplatin	40 mg/m ² x d	d 1-4 (96 h)
	Etoposid	100 mg/m ² x d	d 1-4 (96 h)
	Vindesin	3 mg/m ² x d	d 1 (1h)
	Parallelinfusion	3 l/m ² x d	d 1-6
	G-CSF s.c. (nur bei Hochrisikopatienten)	5 µg/kg x d	ab d 8 täglich bis > 10/nl Leukos
N6:	Vincristin	1,5 mg/m ² x d	d 1+8 (1 h)
	Dacarbazin	200 mg/m ² x d	d 1-5 (1 h)
	Ifosfamid	1,5 g/m ² x d	d 1-5 (120 h)
	Adriamycin	30 mg/m ² x d	d 6+7 (4 h)
	Parallelinfusion	3 l/m ² x d	d 1-7
	G-CSF s.c. (nur bei Hochrisikopatienten)	5 µg/kg x d	ab d 9 täglich bis > 10/nl Leukos
N7:	Cyclophosphamid	150 mg/m ² x d	d 1-8
	Mesna	50 mg/m ² /Dosis	d 1-8
Megatherapie:			
	Melphalan	45 mg/m ² x d	d-8 bis -5 (30 min)
	VP16	40 mg/kg x d	d -4 (4h)
	Carboplatin	500 mg/m ² x d	d -4 bis -2 (1h)
	Stammzell- Reinfusion	≥ 10 CD34+ Zellen/kg	d 0
	G-CSF	10 µg/kg x d s.c. oder 2 h i.v.	ab d 0 täglich

Bei aktiven [^{123}I]mIBG speichernden Knochenherden wird vor der Megatherapie zusätzlich eine Hochdosis- ^{131}I mIBG-Therapie durchgeführt. Bei aktivem Primärtumor wird vor der Megatherapie zusätzlich eine lokale Radiotherapie (40 Gy) durchgeführt.

1.2.6.4 [^{131}I]mIBG-Therapie

Die mIBG-Therapie ist ein Teil des Megatherapieprotokolls. Eingesetzt wird dieses, wenn nach den 6 Blöcken Chemotherapie noch [^{123}I]mIBG-speichernde Knochenmetastasen nachweisbar sind. [^{131}I]mIBG wird nur zur Behandlung von Patienten der Hochrisikogruppe und Patienten des Stadium 4 eingesetzt.

Die Behandlung mit [^{131}I]mIBG wird ca. 10 Tage bis 1 Woche vor Beginn der Megachemotherapie eingeleitet. Es wird die maximale individuelle [^{131}I]mIBG-Dosis verabreicht, die zwischen 1,36 Gy und 2,11 Gy liegt (Bolster et al., 1995). Ziel ist es, eine möglichst hohe Strahlendosis in die Skelettmetastasen zu applizieren.

Diese Dosis ist prätherapeutisch schwer abzuschätzen und lag bei 7 Modellpatienten zwischen 4,4 Gy und 4,5 Gy (Bolster et al., 1995).

Die Erfolge mit [^{131}I]mIBG sind nicht eindeutig. Eine der Ursachen ist, dass nicht alle Neuroblastomzellen den NAT exprimieren, über welchen das [^{131}I]mIBG in die Neuroblastomzelle aufgenommen wird. Außerdem ist das Ausmaß der Expression des NATs nicht wie früher angenommen konstant, sondern wird in vielfältiger Weise reguliert.

1.2.7 Prognose

Die Prognose des Neuroblastoms ist abhängig vom Stadium und der Nmyc-Amplifikation des Tumors sowie dem Alter des Patienten bei Diagnosestellung.

Die 5-Jahres-Überlebensraten sind:

Stadium 1-3	87%
Stadium 4	24%
Stadium 4S	81%
alle	61%

Jedoch sind bei Säuglingen sowohl bei den lokalisierten (Stadium 1-3) als auch bei den metastasierten (Stadium 4) Erkrankungen die Überlebenschancen besser. Der Grund dafür ist die mögliche Regression des Tumors bei Säuglingen. Außerdem treten im Säuglingsalter überwiegend prognostisch günstigere Stadien (1, 2, 3, 4S) auf, bei den über 1-jährigen Kindern eher das prognostisch ungünstigere Stadium 4.

Patienten mit einer Nmyc-Amplifikation weisen eine schlechtere Prognose auf.

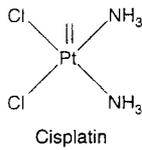
1.3 Zytostatika

1.3.1 Cisplatin

1.3.1.1 Geschichte

Die Antitumorwirkung von Platinverbindungen wurde von Rosenberg (1965) entdeckt, als er die Wirkung von elektrischen Feldern auf das Bakterienwachstum untersuchte. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung von Platinelektroden die Bakterien ihr Wachstum einstellten und Filamente bildeten. Solche Veränderungen kannte man bereits von anderen Tumorchemotherapeutika. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde 1969 die Antitumoraktivität von Cisplatin erstmals beschrieben. Bereits 1971 wurden die ersten klinischen Studien mit der Substanz durchgeführt.

1.3.1.2 Chemie



Cisplatin stellt einen planaren Komplex dar, der am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridliganden und zwei NH₃-Gruppen gebunden hat.

Die Verbindung muss zunächst aktiviert werden, wobei intrazellulär die Chlorliganden durch Wasser ersetzt werden.

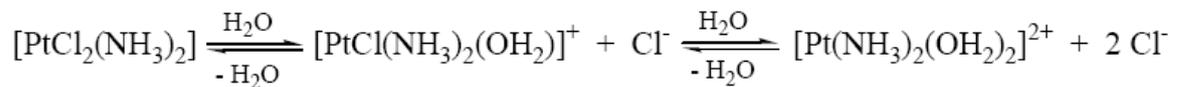


Abb. 1: Aktivierung von Cisplatin durch Ersetzen der Chlorliganden durch Wasser

1.3.1.3 Wirkungsweise

Cisplatin wirkt ähnlich wie Alkylantien durch Vernetzung der DNA-Stränge. Es entstehen Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges wie auch zwischen den komplementären DNA-Strängen. Außerdem kann es zur Hemmung der DNA-Reparatur und zur Alkylierung der RNA und der Proteine kommen.

1.3.1.4 Resistenzen

Tumoren, die eine Resistenz gegenüber alkylierenden Substanzen entwickelt haben, zeigen häufig auch eine Resistenz gegenüber Cisplatin.

Eine Bedeutung für die Resistenzentwicklung sollen intrazelluläre Konzentrationen an Glutathion und zahlreiche SH-Gruppen tragende Metalloproteine haben, die Platinverbindungen binden und inaktivieren. Auch eine vermehrte DNA-Reparatur soll beteiligt sein.

1.3.1.5 Pharmakologie

Cisplatin wird intravenös appliziert. Es wird zu 90 % an Serumproteine gebunden und wird durch passiven, eventuell auch aktiven, Transport ins Gewebe aufgenommen. Cisplatin zeigt eine besonders große Anreicherung im parenchymatösen Gewebe, der Muskulatur und zum Teil auch im Tumorgewebe. Die Elimination erfolgt über die Niere. Die Halbwertszeit für freies Platin liegt bei < 1 Stunde, für das an Plasmaprotein-gebundene Cisplatin bei 44-190 Stunden.

1.3.1.6 Dosierung in der Neuroblastomtherapie

40 mg/m² x d, d 1-4, als 96 h-Dauerinfusion des Blocks N5

1.3.1.7 Indikation

Hauptanwendung für Cisplatin sind Tumoren des Urogenitaltraktes, besonders Hoden-, Ovarialtumoren, Bronchialtumoren und Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich. In der Neuroblastomtherapie wird Cisplatin im Block N5 eingesetzt.

1.3.1.8 Kontraindikation

1. Nephrotoxizität Grad 2 und mehr (Kreatininclearance dauerhaft unter 70 ml/min)
2. Ototoxizität Grad 3 und 4
3. Periphere Neuropathie Grad 3 und 4

Liegen Kontraindikationen vor, wird Cisplatin durch Carboplatin ersetzt. Carboplatin entspricht im Wirkungsmechanismus dem Cisplatin. Jedoch ist die

Umwandlung in die aktive Form beim Carboplatin bedeutend langsamer als beim Cisplatin, so dass die Wirkung langsamer einsetzt und die Substanz weniger aktiv ist. Bei den unerwünschten Nebenwirkungen kommt es bei Carboplatin seltener als bei Cisplatin zu Nephro-, Neurotoxizität sowie Erbrechen. Dosislimitierend ist hier häufig die Knochenmarksdepression.

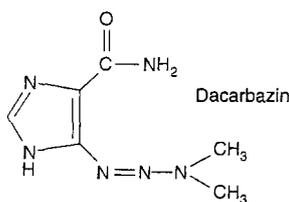
1.3.1.9 Toxizität

Die dosislimitierende Nephrotoxizität von Cisplatin wird durch ausreichende Hydrierung und forcierte Diurese mit Mannit [15%ig] reduziert.

Außerdem können irreversible Hörschäden im Hochtonbereich von 4-8 kHz, heftiges dauerhaftes Erbrechen, periphere Neuropathie, Hyocalcämie, Hypomagnesämie, Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH-Syndrom), Sensibilisierung der Erythrocyten und eine Coombs-positive hämolytische Anämie auftreten. Eine anaphylaktische Reaktion ist selten.

1.3.2 Dacarbazin

1.3.2.1 Chemie



1.3.2.2 Wirkungsweise

Dacarbazin ist ein Triazenderivat, das ursprünglich als Antimetabolit synthetisiert wurde, jedoch ebenfalls als alkylierende Substanz wirkt. Es wird in

der Leber aktiviert und scheint unter Freisetzung von Diazomethan DNA zu methylieren.

1.3.2.3 Pharmakologie

Dacarbazin wird in der Leber metabolisiert und renal eliminiert. Die Plasmahalbwertszeit beträgt ca. 5 Stunden.

1.3.2.4 Dosierung in der Neuroblastomtherapie

intravenös $200 \text{ mg/m}^2 \times \text{d}$ als lichtgeschützte 1 h-Infusion an den Tagen 1-5 des Blockes N6

1.3.2.5 Indikation

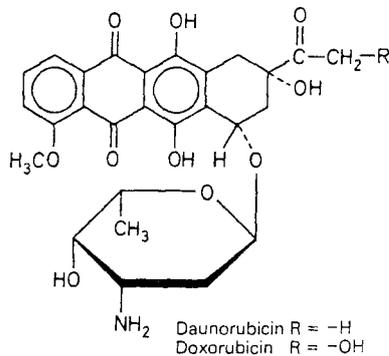
Die Substanz wird insbesondere bei malignen Melanomen, aber auch bei Morbus Hodgkin, Weichteilsarkomen oder als Teil einer Kombination (Block N6) beim Neuroblastom eingesetzt.

1.3.2.6 Toxizität

Dosislimitierende Nebenwirkung ist die Knochenmarksdepression mit Leuko- und Thrombozytopenie. Daneben können Erbrechen, Haarausfall, Exantheme, grippeähnliche Beschwerden, Neuro- und Lebertoxizität auftreten.

1.3.3 Doxorubicin=Adriamycin

1.3.3.1 Chemie



Doxorubicin gehört zu den Antibiotika mit cytostatischer Wirkung. Es ist ein Anthracyclin und wurde ursprünglich aus Kulturen von *Streptomyces peuceletii* isoliert. Die Substanz besteht aus einem Tetracyclinring, der glykosidisch mit dem Aminosucker Daunosamin verbunden ist.

1.3.3.2 Wirkungsweise

Die cytotoxische Wirkung der Anthracycline ist besonders in der S-Phase des Zellzyklus ausgeprägt. Verschiedene Wirkmechanismen sind daran beteiligt. Von großer Bedeutung ist die Interkalation des planaren Moleküls in die DNA bzw. RNA. Hierdurch kommt es zu Strangbrüchen, die einerseits auf eine Hemmung der Topoisomerase II und andererseits auf die Bildung von Radikalen zurückgeführt werden.

1.3.3.3 Pharmakologie

Doxorubicin wird intravenös verabreicht. Es wird in der Leber durch Reduktion NADPH-abhängiger Enzymsysteme aktiviert und vorwiegend über die Galle, in geringen Mengen auch renal, ausgeschieden.

Die terminale Halbwertszeit beträgt ca. 45 h und die Ganzkörperhalbwertszeit 168 h. Beim Zwei-Kompartimenten-Modell unterscheidet man eine α - und β -

Halbwertszeit (HWZ). Die α -HWZ ist die HWZ des initialen Verteilungsprozesses zwischen den Kompartimenten. Die β -HWZ ist die HWZ der terminalen Elimination.

1.3.3.4 Dosierung bei der Neuroblastomtherapie

30 mg/m² x d, am Tag 6+7 des Blockes N6 als 4 h-Dauertherapie und 0,5 mg/kg x d an den Tagen 1, 3 und 5 als 30 min-Kurzinfusion des Blockes N4.

1.3.3.5 Indikation

Doxorubicin wird bei einer Vielzahl von soliden Tumoren (u.a. Mamma-, Bronchialkarzinom, Lymphome, Weichteilsarkome) eingesetzt.

1.3.3.6 Kontraindikation

Nachweis verminderter Myokardfunktion (Kardiotoxizität > Grad 1).

1.3.3.7 Toxizität

Dosislimitierend ist meistens die Knochenmarksdepression mit Leukopenie, geringer Thrombozytopenie und Anämie.

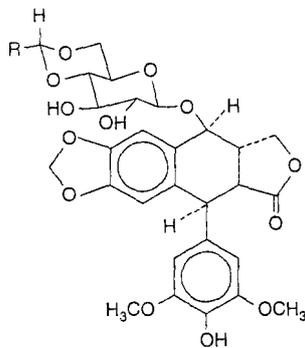
Außerdem ist Doxorubicin durch eine hohe Kardiotoxizität gekennzeichnet. Hierbei kommt es entweder zur frühen, akuten Kardiomyopathie (nicht dosisabhängig, mit Frequenzanstieg, QT-Verlängerung, supraventrikulären Extrasystolen, ventrikulären Extrasystolen) oder nach dosisabhängiger Kumulation zu chronisch irreversiblen Myokardschäden (zunehmend ab 400 mg/m², jedoch auch schon früher jederzeit möglich, besonders nach

vorheriger Bestrahlung des Myokards. Es erfolgt kein Ansprechen auf Digitalispräparate).

Ansonsten kann es zu Stomatitis, Erbrechen, Diarrhö, Leberdysfunktion, reversiblen Haarausfall, Hyperpigmentierung und bei paravasaler Injektion zu schweren lokalen Entzündungen und Nekrosen kommen.

1.3.4 Etoposid

1.3.4.1 Chemie



Etoposid: $R = \text{CH}_3$

Etoposid ist ein Glykosidderivat des Podophyllotoxins, ein Extrakt aus *Podophyllum peltatum*, dem Flussblatt.

1.3.4.2 Wirkungsweise

Etoposid hemmt die Topoisomerase II. Topoisomerasen sind an der Entwindung bestimmter Chromosomenabschnitte beteiligt. Durch Öffnen und anschließendem Wiederverknüpfen von DNA-Strängen schaffen sie die strukturellen Voraussetzungen zur Replikation. Etoposid hemmt die Enzymaktivität einerseits und andererseits stabilisiert es die Bindung von Topoisomerase II an DNA-Spaltstellen, die nachfolgend nicht verschlossen werden können. Zum Zelltod kommt es wahrscheinlich durch Apoptose.

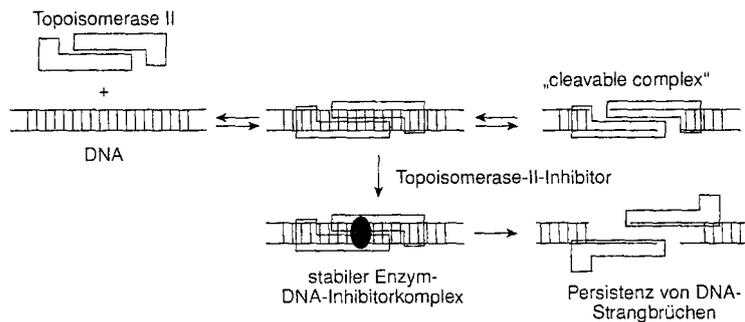


Abb. 2: Wirkung von Etoposid (Topoisomerase-II-Inhibitoren). Das Dimer Topoisomerase II bindet an DNA und schneidet den DNA-Doppelstrang, um so den Durchtritt eines benachbarten DNA-Stranges durch die Lücke („cleavable complex“) zu ermöglichen. Anschließend wird die Lücke wieder verschlossen. Topoisomerase-II-Inhibitoren stabilisieren den „cleavable complex“ und führen zur Persistenz von Strangbrüchen.

1.3.4.3 Resistenzen

Resistenzentwicklung beruht auf der vermehrten Expression des Multi-drug-resistance-Gens (P170-Glykoprotein) und zusätzlich auf Veränderung der Aktivität von Topoisomerase II.

1.3.4.4 Pharmakologie

Etoposid hat eine starke Plasma-Proteinbindung von ca. 94 % und eine starke Anreicherung in parenchymatösen Organen.

Die Ausscheidung erfolgt nach Glucuronidierung bis zu 40 % über die Nieren und gering auch bilär. Die terminale Plasma-Halbwertszeit beträgt 6,4 h.

1.3.4.5 Dosierung in der Neuroblastomtherapie

100 mg/m² x d, Tag 1-4 als 96 h-Infusion des Blockes N5

40 mg/kg x d, Tag 4 als 4 h-Infusion während der Megatherapie

1.3.4.6 Indikation

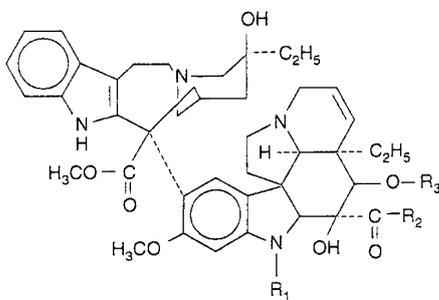
Etoposid wird bei Bronchial-, Hoden- und Ovarialkarzinomen sowie Lymphomen eingesetzt.

1.3.4.7 Toxizität

Es kann zur ausgeprägten Knochenmarksdepression kommen. Außerdem kann es zu Haarausfall, Hypersensitivitätsreaktionen, Hand-Fuß-Syndrom mit schmerzhaftem Palmarerythem, Blasenbildung, Übelkeit, Erbrechen, Mukositis und Diarrhö kommen.

1.3.5 Vincristin

1.3.5.1 Chemie



	R ₁	R ₂	R ₃
Vinblastin	-CH ₃	-OCH ₃	-C(=O)-CH ₃
Vincristin	-CHO	-OCH ₃	-C(=O)-CH ₃
Vindesin	-CH ₃	-NH ₂	-H

1.3.5.2 Wirkungsweise

Vincristin gehört zu den Vinca-Alkaloiden und ist ein Mitosehemmstoff, der spezifisch das Cytoskelettprotein Tubulin bindet und damit die Ausbildung des Spindelapparates blockiert. Dadurch wird die Zelle in der Metaphase der Mitose

arretiert. Dieser Effekt ist irreversibel. Das Ausbleiben der Chromosomentrennung führt zum Zelltod durch Apoptose.

1.3.5.3 Resistenzen

Der wichtigste Resistenzmechanismus ist die vermehrte Expression des P170-Glykoproteins. Weiterhin wurde eine Veränderung der Tubulinstruktur gefunden.

1.3.5.4 Pharmakologie

Die rasche Elimination aus dem Plasma erfolgt durch Aufnahme in praktisch alle Gewebe. Bei Abfall des Vincristin-Serumspiegels wird Vincristin jedoch auch schnell wieder aus den Geweben entfernt. Vincristin wird in der Leber metabolisiert und hauptsächlich über die Galle, ein kleiner Teil jedoch auch über die Niere, ausgeschieden. Die terminale Plasmahalbwertszeit beträgt ca. 85 Stunden.

1.3.5.5 Dosierung in der Neuroblastomtherapie

$1,5 \text{ mg/m}^2 \times \text{d}$ (Einzelmaximaldosis 2,0 mg) als 1 h-Infusion an den Tagen 1 und 8 des Blocks N6.

$0,025 \text{ mg/kg} \times \text{d}$ ab den Tagen 1, 3 und 5 des Blocks N4

1.3.5.6 Indikation

Vinca-Alkaloide sind bei einer Vielzahl von Tumoren, wie z.B. der akuten Leukämie, malignen Lymphomen, Bronchial- und Mammakarzinomen indiziert.

1.3.5.7 Kontraindikation

Neuropathie Grad 3 und 4

1.3.5.8 Toxizität

Dosislimitierend für Vincristin ist die Neurotoxizität (sensorisch und motorisch). Hier kann es zu peripheren Neuropathien mit Neuralgien, Parästhesien, Verlust der Sehnenreflexe, Muskelschwäche und Ataxie kommen. Auch eine Hirnnervenschädigung, z. B. eine bilaterale Facialisparesie mit Ptosis und Doppelbildern ist möglich. Störungen des autonomen Nervensystems führen zu Obstipation bis hin zum paralytischen Ileus und Blasenatonie. Zudem kann es durch zentrale Neurotoxizität zum Syndrom der unangemessenen ADH-Sekretion (SIADH) oder zu epileptischen Anfällen kommen.

Weitere Nebenwirkungen sind: Haarausfall oder bei paravenöser Injektion schwerste lokale Nekrosen.

1.3.6 Vindesin

1.3.6.1 Chemie

siehe Formel 1.3.5.1

1.3.6.2 Wirkungsweise

siehe 1.3.5.2

1.3.6.3 Resistenzen

siehe 1.3.5.3

1.3.6.4 Pharmakologie

Die Metabolisierung von Vindesin erfolgt in der Leber. Eliminiert wird es überwiegend bilär und nur zu 13 % über die Niere. Die terminale Plasma-Halbwertszeit beträgt ca. 24 Stunden.

1.3.6.5 Dosierung bei der Neuroblastomtherapie

3 mg/m² x d, am Tag 1 des Blocks N5 als 1 h-Infusion, EMD 6 mg

1.3.6.6 Indikation

siehe 1.3.5.6

1.3.6.7 Kontraindikation

Neuropathie Grad 3 und 4

1.3.6.8 Toxizität

siehe 1.3.5.8

1.3.7 Ifosfamid

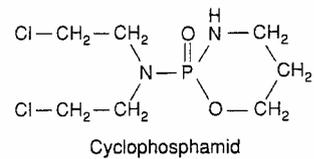
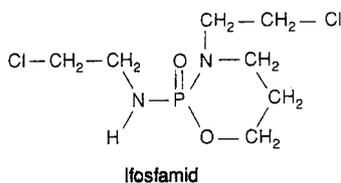
1.3.7.1 Geschichte

Historisch leiten sich die Substanzen vom Schwefel-Lost (Senfgas) ab, das im ersten Weltkrieg eingesetzt wurde. Beim Einsatz des Kampfstoffes wurde beobachtet, dass neben den toxischen Wirkungen von Schwefel-Lost auf Augen, Respirationstrakt und Haut auch eine Schädigung des blutbildenden

und lymphatischen Systems sowie der Magendarmschleimhaut auftrat. Zum damaligen Zeitpunkt war eine therapeutische Anwendung aufgrund der hohen Toxizität nicht möglich.

Bereits 1942 wurden die ersten klinischen Studien mit dieser Substanz durchgeführt. Nachfolgend wurden Hunderte von Substanzen synthetisiert, die alle auf Stickstoff-Lost (das zentrale Schwefelmolekül des Losts wurde durch ein Stickstoffmolekül ersetzt) zurückgingen. Nur sehr wenige Substanzen erwiesen sich als therapeutisch brauchbar.

1.3.7.2 Chemie



Ifosfamid und Cyclophosphamid besitzen beide jeweils 2 Chlorethylgruppen (-CH₂CH₂Cl), von denen beim Ifosfamid eine am zyklischen und die andere am extrazyklischen Stickstoff sitzt.

1.3.7.3 Wirkungsweise

Nach der Aktivierung des Ifosfamids durch die Cytochrom P450-Oxygenase in der Leber (Brock et al., 1973) kommt es zur Alkylierung der DNA.

Die cytotoxische Wirkung ist bei rasch proliferierenden Zellen am größten. Obwohl die Substanz nicht zyklusspezifisch wirkt, sind die Zellen in der späten G₁- und S-Phase besonders sensitiv.

1.3.7.4 Pharmakologie

Ifosfamid wird in der Leber durch Hydroxylierung aktiviert und langsam freigesetzt. Die terminale Plasma-Halbwertszeit der Muttersubstanz beträgt 4-7 Stunden

1.3.7.5 Dosierung bei der Neuroblastomtherapie

1,5 g/m² x d, am Tag 1-5 des Blocks N6 als 120 h-Dauerinfusion
gleichzeitige Mesna-Gabe in Äquivalentdosis und Wässerung erforderlich

Mesna Na⁺[HS-CH₂-CH₂-SO₃]⁻

Mesna ist ein Chemoprotektor, der vor hämorrhagischer Zystitis nach Ifosfamid- oder Cyclophosphamidgabe schützt. Mesna bindet an seiner Sulfhydrylgruppe die toxischen Metabolite des Ifosfamids und Cyclophosphamids wie z.B. Acrolein, 4-OH-Ifosfamid und Chloracetaldehyd und bildet mit ihnen Thioetherverbindungen. Es bietet eine effektivere Prophylaxe des Harntraktes als diverse andere Behandlungen wie z.B. Flüssigkeitsgabe, forcierte Diurese oder N-Acetylcysteingabe (Munshi et al., 1992). Die nicht urotoxischen Nebenwirkungen wie die Nephrotoxizität können durch Mesnagabe nicht verhindert werden.

1.3.7.6 Toxizität

Es kann unter der Therapie zu Knochenmarksdepression (Granulozytopenie, Lymphopenie, seltener Thrombozytopenie) kommen.

Außerdem können Erbrechen, Enterocolitis, hämorrhagische Zystitis (durch regelmäßige Mesna-Gabe vermeidbar), Beeinträchtigung der Spermatogenese, Alopezie und das Syndrom der unangemessenen ADH-Sekretion (SIADH) beobachtet werden. Schließlich kann es auch zur Nephrotoxizität und zur

Encephalopathie mit Desorientiertheit und Verwirrheitszuständen kommen. Desorientiertheit und Verwirrheitszustände sind in der Regel reversibel.

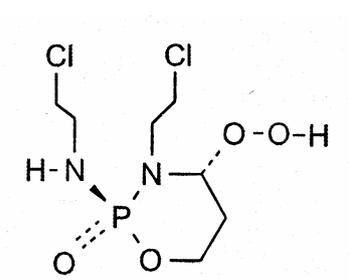
1.3.7.7 Vergleich Ifosfamid-Cyclophosphamid

Ifosfamid und Cyclophosphamid besitzen beide jeweils 2 Chlorethylgruppen (-CH₂CH₂Cl), von denen beim Ifosfamid eine am zyklischen und die andere am extrazyklischen Stickstoff sitzt. Beim Cyclophosphamid sitzen beide am extrazyklischen Stickstoff. Sie gehören beide zu den alkylierenden Substanzen. Ifosfamid hat eine größere zytostatische Aktivität, aber eine geringere myelosuppressive Wirkung als Cyclophosphamid (Loehrer, 1992; Dechant et al., 1991).

Bei der Aktivierung der beiden Substanzen in der Leber entsteht als Nebenprodukt Chloracetaldehyd. Durch die unterschiedliche Anordnung der Chlorethylgruppen entsteht beim Metabolismus des Ifosfamids mehr Chloracetaldehyd als beim Metabolismus des Cyclophosphamids. Die unterschiedlichen Nebenwirkungen und die verschieden starke Ausprägung der Nebenwirkungen werden hierauf zurückgeführt. Chloracetaldehyd wird für die zerebralen Nebenwirkungen (Halluzinationen bis hin zu Enzephalopathien) verantwortlich gemacht (DiMaggio et al., 1994).

1.3.8 4-Hydroperoxyifosfamid

1.3.8.1 Chemie



1.3.8.2 Wirkungsweise

siehe Ifosfamid (1.3.7.)

1.3.8.3 Pharmakologie

Es handelt sich um die aktivierte/hydroxylierte Form des Ifosfamids. In der vorliegenden Arbeit wurde 4-Hydroperoxyifosfamid statt Ifosfamid verwendet, da Ifosfamid von Neuroblastomzellen wahrscheinlich nicht in die aktivierte Form umgewandelt werden kann.

1.3.8.4 Toxizität

siehe Ifosfamid

1.4 Katecholaminstoffwechsel

Der Katecholaminstoffwechsel ist das charakteristische biochemische Merkmal des Neuroblastoms. Die Bestimmung der Katecholamine Dopamin und Noradrenalin bzw. ihrer Metabolite im Serum und Urin werden routinemäßig zur Diagnostik und Therapieverlaufskontrolle des Neuroblastoms verwendet.

Die Analyse der Katecholamin-Abbauprodukte, Homovanillinsäure (HVA, Abbauprodukt von Dopamin) und Vanillinmandelsäure (VMA, Abbauprodukt von Noradrenalin), erwies sich als aussagekräftiger Parameter des Neugeborenen-Screeningprogramms auf Neuroblastome (Schilling et al., 2002; Woods et al., 2002). Der mit dem Katecholaminstatus zusammenhängende Noradrenalintransporter (NAT), der das Wiederaufnahmesystem für Katecholamine darstellt, ist auch für die Anreicherung der katecholaminanalogen Verbindungen meta-Iodbenzylguanidin (mIBG) bei der Diagnostik ($[^{123}\text{I}]\text{mIBG}$) und Therapie ($[^{131}\text{I}]\text{mIBG}$) verantwortlich. Für die Diagnostik und Therapie ist zu berücksichtigen, dass Neuroblastome bezüglich ihres Katecholaminstoffwechsels heterogen sind. Sie besitzen nur eine geringe

Anzahl an Speichervesikeln für Katecholamine. Neben Katecholamin-produzierenden, N(neuronal)-Typ-Neuroblastomen, existieren auch S-Typ-Neuroblastome (Substrat-adhärenzte Formen). S-Typ-Neuroblastome (melanocytäre Neuroblastome) können zwar Vorstufen der Katecholamine, das DOPA, synthetisieren, sind aber nicht zur Synthese der Katecholamine in der Lage. Diese Neuroblastome können bevorzugt Tyrosinase anstelle von Tyrosin-Hydroxylase zur Umwandlung von Tyrosin zu DOPA verwenden (Ross et al., 1983+1985; Kuçi et al., 2002). Außerdem ist die NAT-Expression fraglich.

Neuronale (N-Typ) Neuroblastomzellen synthetisieren über die Tyrosin-Hydroxylase (TH) DOPA. DOPA wird über die DOPA-Decarboxylase zu Dopamin (DA) decarboxyliert. Letzteres wird über die Dopamin- β -Hydroxylase zu Noradrenalin (NA). DA und NA werden in normalen Zellen des sympathischen Nervensystems und beim Phäochromocytom in Speichervesikeln gelagert, wovon es jedoch beim Neuroblastom nur sehr wenige gibt. Nach Freisetzung von DA und NA können beide Katecholamine teilweise vom Na/Cl abhängigen Noradrenalintransporter (NAT) wieder in die Zelle aufgenommen werden, wo sie entweder durch die an der Außenseite der Mitochondrienmembran lokalisierte Monoaminoxidase (MAO) metabolisiert oder wieder in Speichervesikel transportiert werden. Der Noradrenalintransporter kann neben DA und NA auch verschiedene Katecholamin-analoge Verbindungen z.B. meta-Iodbenzylguanidin (mIBG) aufnehmen.

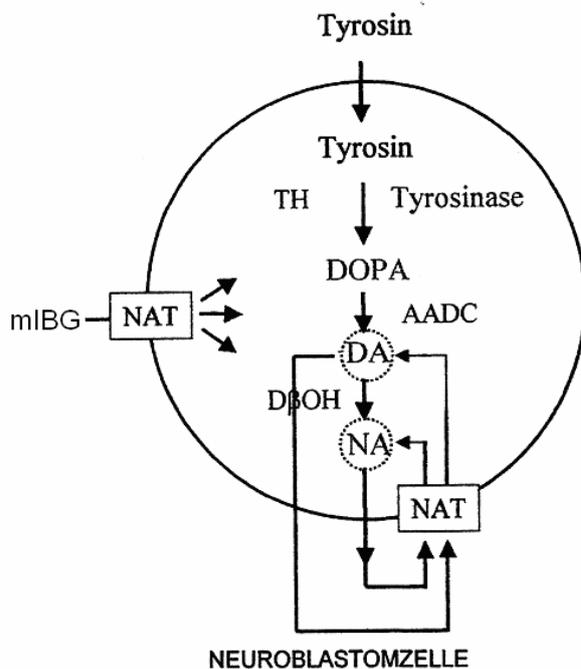
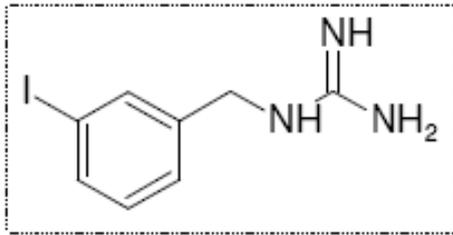


Abb. 3: Übersicht über den Katecholaminstoffwechsel der Neuroblastomzellen. Neuronale (N-Typ) Neuroblastomzellen synthetisieren über die Tyrosin-Hydroxylase (TH) DOPA, aus dem über die DOPA-Decarboxylase (Aromatische Aminosäure Decarboxylase, AADC) Dopamin (DA) und daraus über die Dopamin-β-Hydroxylase (DβOH, DBH) Noradrenalin (NA) entsteht. DA und NA werden in normalen sympathischen Nervenzellen durch Aufnahme über Protonen-abhängige vesiculäre Monoamin-Transporter (VMAT) in Speichervesikeln gelagert, in Neuroblastomzellen sind allerdings nur wenige dieser Vesikel vorhanden (punktierte Kreise). Nach der Freisetzung von DA und NA können beide Katecholamine teilweise vom Na⁺/Cl⁻ abhängigen Noradrenalintransportern (NAT) wieder in die Zelle aufgenommen werden. Der Noradrenalintransporter (NAT) kann neben DA und NA auch verschiedene Katecholamin-analoge Verbindungen z.B. meta-Iodbenzylguanidin (mIBG) aufnehmen. Hemmstoffe des NAT-Transporters: Cocain, Desipramin. Melanocytaire Neuroblastome (S-Typ-Neuroblastome) synthetisieren DOPA mit Hilfe der Tyrosinase (wie Melanomzellen) und synthetisieren keine messbaren Mengen an Dopamin und Noradrenalin, außerdem exprimieren sie den NAT (wahrscheinlich) nicht.

1.5 $[^{131}\text{I}]$ mIBG-Therapie



meta-Iodbenzylguanidin

Meta-Iodbenzylguanidin ist ein Noradrenalinanalogon (Smets et al., 1988).

Erstmals wurde mIBG zur Diagnose des Phäochromozytoms verwendet (Sisson et al., 1981). 2 Jahre später wurde die mIBG-Aufnahme in Neuroblastomzellen von Kimmig et al. und Treuner et al. erfolgreich durchgeführt (Kimmig et al., 1984; Treuner et al., 1984).

Heute wird mIBG für die Therapie ($[^{131}\text{I}]$ mIBG) und zur Diagnostik ($[^{123}\text{I}]$ mIBG) von Neuroblastomtumoren eingesetzt (Klingebiel et al., 1991+1992; Shapiro et al., 1991+1995).

Für die Aufnahme von mIBG in die Neuroblastomzelle gibt es zwei verschiedene Aufnahmesysteme die miteinander konkurrieren. Zum einen wird mIBG spezifisch über den NAT, einen Na/K-ATPase abhängigen Transporter, in die Neuroblastomzelle angereichert, zum anderen über unspezifische Diffusionsvorgänge. mIBG wird ausserdem, z.B. in Herzzellen, über nichtneuronale Transporter aufgenommen (Degrado et al., 1995). Diese Transporter sind physiologischerweise dafür da, Katecholamine aus der Blutbahn zu entfernen, die nicht über die Katecholaminwiederaufnahmesysteme (Dopamintransporter DAT, NAT) in die Zelle zurücktransportiert werden. Die Katecholamine werden durch die Monoaminoxidase (MAO) oder über die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) verstoffwechselt und somit inaktiviert.

Da $[^{123}\text{I}]$ mIBG sich über den Noradrenalintransporter NAT im Tumorgewebe anreichern kann, können sowohl der Primärtumor als auch Metastasen dargestellt werden. Die mIBG-Szintigraphie ist eine sehr sensitive Methode und besser geeignet als das CT. Bei Neuroblastompatienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei ca. 80 % der Patienten ein pathologisches mIBG-

Szintigramm vor. Die Sensivität des mIBG-Szintigramms, ein Neuroblastom zu entdecken, liegt bei 100 %, die des CTs jedoch nur bei 77 % (Adolph et al., 1989).

Neben der [¹²³I]mIBG-Diagnostik wird mIBG in Form des Iod 131-Isotops auch für die Therapie eingesetzt. Ein grundsätzliches Problem beim Einsatz von mIBG besteht darin, dass nicht alle Neuroblastomzellen den NAT exprimieren. mIBG kann nur durch den NAT und nicht durch den Dopamin- oder Serotonintransporter aufgenommen werden. Außerdem ist die Expression des NATs selbst bei Neuroblastomzellen, die mIBG grundsätzlich aufnehmen (wie z.B. SK-N-SH), sehr variabel und beeinflussbar, z.B. durch Desipramin, NGF und Dexamethason (Servidei et al., 1994; Wakade et al., 1996; Shikata et al., 2000).

Ein Vorteil von [¹³¹I]mIBG besteht darin, dass es in größere Zellansammlungen eindringen kann und so durch seine radiotoxischen Eigenschaften auch diejenigen Neuroblastomzellen abtöten kann, die über keinen NAT verfügen. Diese Fernwirkung des Iod 131 nennt man „cross-fire“. Seine Wirkung ist im Vergleich besser als die von monoklonalen Antikörpern (Mairs et al., 1991).

Ein Nachteil ist, dass der Gammastrahler Iod 131 eine relativ große Reichweite hat und daher auch umliegendes gesundes Gewebe schädigen kann.

1.6 Ziel und Planung der Arbeit

Die Fragestellungen, die im Rahmen der Arbeit beantwortet werden sollten, waren:

- A. Beeinflussen die unterschiedlichen Zytostatikavorbehandlungen die Aufnahme von [^{131}I]mIBG/[^3H]NA in die Neuroblastomzelle?
- B. Hat die Dauer und Konzentration dieser Zytostatikavorbehandlung eine Auswirkung auf die [^{131}I]mIBG/[^3H]NA-Aufnahme?
- C. Beeinflussen die unterschiedlichen Zytostatikavorbehandlungen die Expression des NATs ?
- D. Hat die Dauer und Konzentration dieser Zytostatikavorbehandlung eine Auswirkung auf die Expression des NATs?

Der experimentelle Teil dieser Arbeit gliedert sich daher in folgende Teile:

Anmerkung: Für die Aufnahmeversuche wurde aus praktischen Gründen [^3H]NA verwendet, da es wie [^{131}I]mIBG über den NAT in die Neuroblastomzelle aufgenommen werden kann, jedoch besser als [^{131}I]mIBG verfügbar ist.

- A. Ermittlung der Konzentration für die einzelnen Zytostatika bzw. deren Kombination bei der ca. 50-80 % der humanen Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly Zellen überleben (MTT-Test)
- B. Untersuchungen zur [^3H]NA-Aufnahme nach verschiedenen Zytostatikavorbehandlungen - unterschiedliche Dauer und Konzentration
- C. Untersuchungen zur [^{131}I]mIBG-Aufnahme und dessen Speicherkapazität nach Zytostatikavorbehandlung in den Neuroblastomzellen
- D. Untersuchung der Genexpression des NATs nach Zytostatikavorbehandlung mittels RT-PCR

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Medien

2.1.1 Chemikalien, Geräte

Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Firma</i>
Ampuwa	Fresenius Kabi
Ascorbinsäure	Sigma
Cis-Diamineplatinum(1)-dichloride (Cisplatin)	Sigma
Dacarbazin	Sigma
0,001 % Diethylpyrocarbonat in Wasser (DEPC-H ₂ O)	ICN Biomedicals GmbH
Desipramin	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DNase	Qiagen
Doxorubicin	Sigma
EcoLume	ICN Biomedicals GmbH
Ethanol (100 % RNase-frei und DNase- frei)	Roth
Etoposid	Sigma
Fetale Bovine Serum (FBS)	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
4-Hydroperoxyifosfamid	Squarix Biotechnology GmbH
Isopropanol	Merck
Melphalan	Sigma

Unmarkiertes meta-Iodbenzylguanidin (mIBG)	Sigma
MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma
0,9 %-NaCl-Lösung	Fresenius Kabi
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phosphate Buffered Salt Solution (PBS) (+ CaCl ₂ + MgCl ₂) (- CaCl ₂ - MgCl ₂)	GIBCO
Rneasy Mini Kit	Qiagen
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium	Biochrom
Salzsäure (HCl, 1M)	Merck
Streptomycin	Seromed
Triton X-100	Sigma
Trypsin-Versen	Seromed
Trypanblau Solution (0,4 %)	Sigma
Vindesinsulfat	Sigma
Vincristinsulfat	Sigma

Radioaktive Substanzen

<i>Substanz</i>	<i>Firma</i>
[7,8- ³ H]Dopamin (DA) Spezifische Aktivität: 1,52 TBq/mmol (41,0 Ci/mmol) Radioaktive Konzentration: 37 MBq/ml (1,0 mCi/ml)	Amersham Biosciences, Freiburg

[¹³¹ I]meta-Iodbenzylguanidin (mIBG) Radioaktive Konzentration: 12 MBq/ml	Nuklearmedizin Tübingen (Restmengen eines Therapieansatzes)
1-[7,8- ³ H]Noradrenalin (NA) Spezifische Aktivität: 444 GBq/mmol (12 Ci/mmol) Radioaktive Konzentration: 37 MBq/ml (1,0 mCi/ml)	Amersham Biosciences, Freiburg

Plastikartikel und Geräte

Plastikartikel

<i>Artikel</i>	<i>Firma</i>
Combitips, 0,5 ml (10 µl Portion, steril)	Eppendorf
Combitips, 5 ml (100 µl Portion, steril)	Eppendorf
Combitips, 12,5 ml (250 µl Portion, steril)	Eppendorf
Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner
Zellkulturflaschen -162 cm ² mit geradem Hals, ohne Filterdeckel -75 cm ² mit Filterdeckel (0,2 µm)	Costar
Einmalspritzen steril 20 ml	B. Braun
96-Loch-Platten mit flachem Boden Gewebekulturflasche mit Deckel F-Form 96KV	Greiner
Minisart NML Filter, 0,2 µm Porengröße	Sartorius
Pipettenspitzen 10-100 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Sarstedt

Plastikpipetten (steril) Steripette 2 ml Steripette 5 ml Steripette 10 ml Steripette 25 ml	Costar
Polypropylenröhrchen -15 ml -50 ml mit flachem Boden	Greiner
konisch	Becton Dickinson
Sicherheitsverschluss-Eppendorf-Hütchen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Spritze 2 ml	Becton Dickinson
Super Polyethylen vial, 20 ml (Szintillationsröhrchen)	Perkin-Elmar

Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Firma</i>
CS-1 Videoimager	Cybertech, Berlin
ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) Microplate Reader (MR 700)	Dynatech
Inkubator für Zellkulturen	Heraeus
Microwaage	Sartorius
Mikroskop	Wilovert
Schüttler	Heidolph
Spektrophotometer für RNA-Konz.	Pharmacia
Steril-Werkbank	Heraeus
Szintillationscounter	PACKALD

Vortex	Heidolph
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge für Eppendorfgefäße 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge	Hettich

Verschiedenes

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Aluminiumfolie	Pap*star
Deckgläschen 20 x 26 mm	Menzel
Kanüle -20 G (0,9 x 40mm) -24 G (0,55 x 25 mm)	Becton Dickinson
Latex-Handschuhe Saveskin	Kimberly-Clark
Neubauerzählkammer	Assistent
Parafilm Verschlussfolie	Pechiney Plastic Packaging
Pasteur-Pipetten (230 mm lang)	WU Mainz
Pipetboy plus	Integra biosciences
Pipetus-akku	Hirschmann
Repitierpipette	Eppendorf

2.1.2 Zelllinien und Kulturmedien

Kulturmedien

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
RPMI 1640 500 ml	
Fetale Bovine Serum (FBS)	10 %
L-Glutamin	2 mmol/l (f.c.)
Penicillin/Streptomycin	100 IU/ml/100 mg/ml

Einfrriermedium

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration (v/v)</i>
RPMI 1640	80 %
Fetale Bovine Serum (FBS)	10 %
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 %

Zelllinien

<i>Zelllinien</i>	<i>Charakteristika</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Literatur</i>
SK-N-SH	Neuroblastom, human	American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA	Biedler et al., 1973 Spengler et al., 1973
Kelly	Neuroblastom, human	DSMZ, Braunschweig Germany	Kuçi et al., 2002

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung von Zellkulturen

2.2.1.1 Kultivierung der humanen Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly

Beide Neuroblastomzelllinien wachsen adhärent.

Sie wurden in 650 ml- bzw. 250 ml-Zellkulturflaschen in ca. 40 ml bzw. 20 ml RPMI 1640 Medium, dem 10 % FBS, 2 mmol/l (f.c.) L-Glutamin und 100 IU/ml/100 mg/ml Penicillin/Streptomycin zugefügt wurden, liegend gezüchtet (Bodenfläche 162 cm² bzw. 75 cm²).

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit wobei die Flaschen ohne Filterdeckel nicht ganz verschlossen wurden.

Das Wachstum der Zellen wurde kontinuierlich mit dem Mikroskop kontrolliert und das Medium auf Verunreinigung durch Mikroorganismen untersucht. Sobald sich ein dichter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen passagiert. Dies war im Allgemeinen nach 3-4 Tagen bei einer 1/3 oder 1/4 Passage der Fall.

2.1.1.2 Passagieren der Zellen

Das verbrauchte Medium wurde mittels einer Vakuumpumpe vollständig abgesaugt und zu jeder Zellkulturflasche 162 cm² / 75 cm² wurden 2,5 ml bzw. 1,3 ml Versen-Trypsin zugegeben. Die Inkubationszeit für Trypsin betrug 20-60 s. Anschließend wurden die Zellen durch Schwenken und kräftiges Klopfen vom Flaschenboden abgelöst. Die Neutralisation des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (19 °C, 5 min, 380 g). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml neuem Zellkulturmedium gut resuspendiert, auf mehrere

Flaschen (in der Regel 3) verteilt und auf 40 ml bzw. 25 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt.

2.1.1.3 Einfrieren der Zellen

Eine Kulturflasche mit konfluent gewachsenen Zellpopulationen wurde wie oben beschrieben abtrypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Einfriermedium 1-2-mal kurz resuspendiert und auf zwei 2 ml-Einfrierröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden in einige Lagen Zellstoff gewickelt und mindestens 24 Stunden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Zum Schutz der Zellen vor Schädigung während des Einfriervorgangs ist dem Medium DMSO zugesetzt worden. Im warmen Zustand schädigt dieses « Frostschutzmittel » jedoch die Zellen zeitabhängig, weshalb beim Einfrieren und Auftauen von Zellen schnelles Arbeiten unerlässlich ist.

2.1.1.4 Auftauen der Zellen

Das Röhrchen mit der gefrorenen Zellsuspension wurde in der geschlossenen Hand aufgetaut (die Zellsuspension sollte gerade flüssig sein bzw. noch einzelne gefrorene Anteile haben).

Sie wurde sofort in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 ml Medium zugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde mit neuem Medium gut resuspendiert und auf 250 ml- bzw. 750 ml-Zellkulturflaschen überführt. Zum Weiterkultivieren benötigt man zusätzlich 15 ml bzw. 25 ml Medium.

2.1.1.5 Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer

20 μl Zellsuspension wurden mit 20 μl Trypanblaulösung (0,4 %) gemischt.

Bei toten bzw. geschädigten Zellen färben sich Cytoplasma und Zellkern blau, vitale Zellen nehmen dagegen keinen Farbstoff auf.

Die Neubauer-Zählkammer wurde mit der Zellsuspension gefüllt und die Zellzahl der ungefärbten Zellen in allen 4 Quadranten (4 x 16 Quadrate) unter dem Mikroskop bestimmt.

Da das Volumen eines Quadranten 0,1 μl beträgt, wurde die ausgezählte Zellzahl der 4 Quadranten durch 4 dividiert und anschließend mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Das Ergebnis wurde anschließend mit 2 multipliziert um den Verdünnungsfaktor auszugleichen.

2.2.2 Behandlung der Zellen mit Zytostatika

2.2.2.1 Bestimmung der Empfindlichkeit von SK-N-SH und Kelly Zellen auf verschiedene Zytostatika

Für die Untersuchung wurden Zytostatika verwendet, die im Deutschen Neuroblastomprotokoll in den Blöcken N4 (Adriamycin, Vincristin, Cyclophosphamid), N5 (Vindesin, Cisplatin, Etoposid) und N6 (Adriamycin, Vincristin, Ifosfamid, Dacarbazin) verwendet werden. Anstelle von Ifosfamid und Cyclophosphamid wurde bei diesen Zellkulturuntersuchungen die bereits voraktivierte Form, 4-Hydroperoxyifosfamid, verwendet.

Für diese Untersuchungen wurden SK-N-SH und Kelly Zellen in 96-Lochplatten ausgesät, 200 μl Zellsuspension pro Well (10000 SK-N-SH und 7500 Kelly Zellen pro Well). Nach 24 Stunden wurden die Zytostatika in verschiedenen Konzentrationen in 10 μl Portionen den Zellkulturen zugegeben, wobei wie folgt vorgegangen wurde:

Doxorubicin (MG 580) als verbrauchsfertige Lösung (2 mg/ml) von der Apotheke, wie folgt verdünnt:

	Konzentration (20 x)	f.c. im Testansatz
a	1 ml Lösung+ 0,7 ml Medium	100 µM
b	100 µl a+ 900 µl Medium	10 µM
c	100 µl b+ 900 µl Medium	1 µM
d	100 µl c+ 900 µl Medium	0,1 µM
e	100 µl d+ 900 µl Medium	0,01 µM
f	100 µl e+ 900 µl Medium	0,001 µM

Dacarbazin (MG 182,2) als verbrauchsfertige Lösung (10 mg/ml) von der Apotheke, wie folgt verdünnt:

	Konzentration (20 x)	f.c. im Testansatz
a	1 ml Lösung+2,7 ml Medium	100 µM
b	100 µl a+ 900 µl Medium	10 µM
c	100 µl b+ 900 µl Medium	1 µM
d	100 µl c+ 900 µl Medium	0,1 µM
e	100 µl d+ 900 µl Medium	0,01 µM
f	100 µl e+ 900 µl Medium	0,001 µM

Cisplatin (MG 300,06) als verbrauchsfertige Lösung (1 mg/ml) von der Apotheke, wie folgt verdünnt:

	Konzentration (20 x)	f.c. im Testansatz
a	0,2 ml Lösung+ 3,1 ml Medium	10 µM
b	800µl a + 800 µl Medium	5 µM
c	100µl a +900 µl Medium	1 µM
d	100µl b + 900 µl Medium	0,5 µM
e	100µl c +900 µl Medium	0,1 µM
f	100µl d + 900 µl Medium	0,05 µM

Etoposid (MG 600). Lösung (1 mg/ml) von der Apotheke, wie folgt verdünnt:

	Konzentration (20 x)	f.c. im Testansatz
a	0,2 ml Lösung+ 3,14 ml Medium	5 µM
b	0,4 ml a+ 1,6 ml Medium	1 µM
c	0,1 ml a+ 0,9 ml Medium	0,5 µM
d	0,1 ml a+ 1,57 ml Medium	0,3 µM
e	0,2 ml b+ 0,8 ml Medium	0,2 µM
f	0,1 ml b+ 0,9 ml Medium	0,1 µM

Vincristinsulfat (MG 923). Lösung (1 mg/ml) von Apotheke, wie folgt verdünnt:

	Konzentration (20 x)	f.c. im Testansatz
a	0,01 ml Lösung+ 5,4 ml Medium	0,1 µM
b	0,1 ml a+ 0,9 ml Medium	0,01 µM
c	0,1 ml b+ 0,9 ml Medium	0,001 µM
d	0,1 ml c+ 0,9 ml Medium	0,0001 µM
e	0,1 ml d+ 0,9 ml Medium	0,00001 µM
f	0,1 ml e+ 0,9 ml Medium	0,000001 µM

Vindesinsulfat (MG 909,1), Festsubstanz, 2,73 mg in 1,5 ml NaCl 0,9 % gelöst und steril filtriert und wie folgt verdünnt:

	Konzentration (20 x)	f.c. im Testansatz
a	2,73 mg in 1,5 ml NaCl 0,9 %	100 µM
b	0,1 ml a+ 0,9 ml Medium	10 µM
c	0,1 ml b+ 0,9 ml Medium	1 µM
d	0,1 ml c+ 0,9 ml Medium	0,1 µM
e	0,1 ml d+ 0,9 ml Medium	0,01 µM
f	0,1 ml e+ 0,9 ml Medium	0,001 µM

4-Hydroperoxyifosfamid (MG 293,1), Festsubstanz, 1 mg in 1 ml Ampuwa gelöst und steril filtriert und wie folgt verdünnt:

	Konzentration (20 x)	f.c. im Testansatz
a	0,8 ml Lösung+ 0,56 ml Medium	100 µM
b	0,1 ml a+ 0,9 ml Medium	10 µM
c	0,1 ml b+ 0,9 ml Medium	1 µM
d	0,1 ml c+ 0,9 ml Medium	0,1 µM
e	0,1 ml d+ 0,9 ml Medium	0,01 µM
f	0,1 ml e+ 0,9 ml Medium	0,001 µM

Jeweils 6 wells wurden mit den gleichen Zytostatika/ Zytostatika-kombinationen versetzt (10 µl) und für 72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Zellen der Kontrolle wurden mit 10 µl Zellkulturmedium versetzt. Nach 72 Stunden wurde der MTT-Test (siehe 2.2.3.3) zur Bestimmung der Überlebensrate der Zellen durchgeführt.

2.2.2.2 Einfluss der Zytostatika-Kombinationen N4 (Adriamycin, Vincristin, Cyclophosphamid), N5 (Vindesin, Cisplatin, Etoposid), N6 (Adriamycin, Vincristin, Ifosfamid, Dacarbazin) auf SK-N-SH und Kelly Zellen

Aufbauend auf die Ergebnisse von 2.2.2.1 wurde die zytotoxische Wirkung der Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 auf die Zellkulturen bestimmt. Dabei war das Ziel, Zytostatikakombinationen zu bestimmen, die ein ca. 50-80%iges Überleben der Zellen bewirken. Dies wurde mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt (siehe 2.2.3.3). Mit den so vorbehandelten Zellen wurde anschließend die Aufnahmefähigkeit von [¹³¹I]mIBG bzw. [³H]Noradrenalin im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen untersucht (siehe 2.2.4). Parallel dazu wurde der Einfluss dieser Zytostatikakombinationen auf die Expression des NATs (RT-PCR) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ermittelt (siehe 2.2.5).

2.2.3 MTT-Test

2.2.3.1 Theorie

Zur in vitro Bestimmung von Proliferation und Vitalität von Zellen wird häufig der zuerst von Mosmann (Mosmann et al., 1983) beschriebene MTT-Test (MTT = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) verwendet. Das Testprinzip beruht auf der NAD(P)H-abhängigen Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT zu dem entsprechenden alkohollöslichen Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen ist proportional zur Menge des gebildeten Farbstoffs und kann spektrophotometrisch am besten mittels ELISA-Reader in 96-Loch-Platten (Lopez-Ibor et al., 1985; Seeger et al., 1982) bestimmt werden. Da die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen von der Vitalität der Zellen abhängt, kann diese Methode sowohl als Proliferationstest, als auch zur Bestimmung der Zytotoxizität verschiedener Substanzen, verwendet werden.

2.2.3.2 Herstellung der Lösungen

MTT-Stammlösung

5 mg MTT wurden pro ml PBS gelöst. Diese Lösung wurde durch einen 0,2 µm Minisart NML Filter filtriert und bei 4 °C lichtgeschützt (Alufolie) aufbewahrt.

Isopropanol-Triton X-100-Lösung

Die Lösung wurde durch Mischen von 95 ml Isopropanol, 5 ml 2 M HCl und 10 ml Triton X-100 hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

Untersuchungen von Seitz (Seitz et al., 1994) ergaben, dass das Detergenz Triton X-100 die Lyse der Zellen beschleunigt, zur besseren Löslichkeit der Formazankristalle beiträgt, und so die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht.

2.2.3.3 Durchführung der Zytotoxizitätstestung mit Hilfe des MTT-Tests

200 µl Zellsuspension (Kelly: $3,75 \times 10^4$ Zellen/ml; SK-N-SH: 5×10^4 Zellen/ml) wurden mit einer Dispenser Multipipette (Eppendorf) in jedes Well einer 96-Lochplatte gegeben. Lediglich das erste Loch („A1“) blieb leer, es diente zur Referenz. Anschließend wurden die Platten über Nacht in den Brutschrank gestellt (37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂). Am nächsten Tag wurde zu den nun am Plattenboden haftenden Zellen pro Well 10 µl Zytostatikalösung gegeben. Die ersten beiden Reihen („A“ und „B“) dienten als Kontrolle, hier wurde Medium als Volumenausgleich hinzugefügt. Nach Zugabe der Substanzen wurden die Ansätze 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt.

Zur Durchführung des MTT-Tests wurde bei allen Ansätzen das Zellmedium mit Hilfe einer 24 G Nadel, die an einen Vakuumschlauch angeschlossen war, zu 100 % entfernt. Die MTT-Stammlösung wurde 1:9 mit RPMI 1640 verdünnt und jeweils 100 µl in jedes Well gegeben. Die Platten wurden nun für 3 Stunden in den Brutschrank (37 °C) gestellt. Während dieser Zeit erfolgte die Umwandlung des MTTs zu Formazan. Mikroskopisch war dies an der Bildung blauer Kristalle im Bereich der Zellen zu erkennen. Anschließend wurden 100 µl der Isopropanollösung in jedes Well gegeben. Die Ansätze wurden nun luftdicht mit Parafilm verschlossen, mit Alufolie lichtgeschützt verpackt und über Nacht bei Raumtemperatur horizontal geschüttelt. Hierdurch wurden die Formazankristalle gelöst (mikroskopisch: homogen blaue Lösung) und konnten nun photometrisch gemessen werden. Dies geschah mit Hilfe eines Microplate Reader (MR 700) im Dual Mode. Die Referenzlänge wurde auf 550 nm (Filter 5) und die Testwellenlänge auf 630 nm (Filter 4) eingestellt.

2.2.4 Aufnahme von [³H]Noradrenalin und [¹³¹I]mIBG in SK-N-SH und Kelly Zellen nach zytostatischer Vorbehandlung

Ziel der Untersuchung war es, zu bestimmen, ob die Vorbehandlung der Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 einen Einfluss auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen hatte. Da [³H]Noradrenalin wie [¹³¹I]mIBG über den Noradrenalintransporter aufgenommen wird, wurden die meisten Untersuchungen mit [³H]Noradrenalin durchgeführt, da [¹³¹I]mIBG nur sporadisch zur Verfügung stand. Die Spezifität der Aufnahme von [³H]Noradrenalin (bei 37 °C, 30 Minuten) wurde durch parallele Inkubation auf Eis, in Gegenwart eines 10-100-fachen Überschusses an unmarkiertem mIBG und durch den Hemmstoff Desipramin dokumentiert.

Aufbauend auf den in Abschnitt 2.2.2.2 ermittelten Ergebnissen wurden die Zellen mit Zytostatikakombinationen vorbehandelt, die ein ca. 50-80%iges Überleben der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewirkten. Im Einzelnen wurde folgender Versuchsablauf gewählt:

2.2.4.1 Herstellung des Zellinkubationspuffers und der Ascorbinsäurelösung

Inkubationspuffer:

Zur Herstellung des Zellinkubationspuffers wurden 1 g Glucose in 11 ml PBS^{+Ca+Mg} gelöst und steril filtriert. Von dieser Lösung wurden nun 5 ml zu 500 ml PBS^{+Ca+Mg} gegeben und bei 4 °C aufbewahrt.

Ascorbat-Lösung:

Zum Erhalt der Ascorbat-Lösung wurden 19,6 mg Ascorbinsäure in 18 ml Wasser gelöst, steril filtriert, anschließend jeweils 2,5 ml in Plastikröhrchen aliquotiert und bei -40 °C eingefroren.

2.2.4.2 Einfluss einer Langzeit-Vorbehandlung der Zellen mit N4, N5, N6 (48-72 Stunden) auf die Aufnahme von [³H]Noradrenalin

Vorbehandeln der Zellen

Es wurden pro Ansatz ca. 3 bodenbedeckte 162 cm² Zellkulturflaschen benötigt (20 x 10⁶ Zellen).

Aus den Zellkulturflaschen wurde das verbrauchte Medium entfernt und mit jeweils 30 ml frischem Medium aufgefüllt sowie die Zytostatikakombination zugegeben - von jedem einzelnen Zytostatikum 1 ml. Die Zellkulturflaschen wurden nun 2 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach diesen 2 Tagen wurden die Zellen pro Flasche mit 2,5 ml Versen-Trypsin abtrypsinisiert und mit 10 ml Medium neutralisiert. Die Zelllösungen der 3 Flaschen wurden nun in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 380 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 45 ml frischem Medium gut resuspendiert. Es wurden 50 µl Zellsuspension entnommen und die Zellzahl bestimmt. Die restliche Zellsuspension wurde mit geöffnetem Deckel für 2 h zur Erholung in den Brutschrank gestellt. Alle 30 min wurde der Deckel des Röhrchens verschlossen und die Zellsuspension vorsichtig geschüttelt (die Membranen der Neuroblastomzellen sollten möglichst gut von frischem Medium umspült sein und somit besser stabilisiert werden). Nach 2 h wurde die Zellsuspension 5 min bei 380 g zentrifugiert. Das Zellpelett wurde mit 2,5 ml Zellinkubationspuffer aufgefüllt, gut resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Es sollte eine Suspension mit ca. 3-6 x 10⁶ Zellen/ml am Ende vorliegen. Um dieses Ergebnis zu erhalten, wurden je nach Zellzahl die entsprechenden Volumina an Inkubationspuffer zugegeben. (Man kann davon ausgehen, dass von der zu Beginn des Versuchs bestimmten Zellzahl nur etwa 50-60 % der Zellen erhalten wurden, u.a. bedingt durch Zentrifugationsverluste). Es wurde nochmals die Zellzahl bestimmt. Von der Zellsuspension wurden jeweils 500 µl mit Hilfe einer Repitierpipette auf 15 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt.

2.2.4.3 Einfluss einer Kurzzeit-Vorbehandlung (4 Stunden) der Zellen mit N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [³H]Noradrenalin

Vorbehandlung der Zellen

Für einen Ansatz wurden pro Zelllinie ca. 60×10^6 Zellen (4 x 162 cm² Zellkulturflaschen) benötigt.

Es wurden vier 162 cm² Zellkulturflaschen, wie vorher beschrieben, abtrypsiniert und die Zellsuspensionen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die Zellsuspension wurde bei 380 g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml Medium gut resuspendiert und aus der Suspension die Zellzahl bestimmt. Von der Suspension wurden nun jeweils 10 ml in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 40 ml Medium aufgefüllt (Ansätze: Kontrolle, N4, N5, N6). Die Zellröhrchen kamen mit geöffnetem Deckel für 1-2 h zur Erholung in den Brutschrank (37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) und wurden alle halbe Stunde vorsichtig geschüttelt, um die Zellmembranen gut mit frischem Medium zu benetzen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 380 g 5 min zentrifugiert, 30 ml des Überstandes entfernt und mit 20 ml frischem Medium wieder aufgefüllt und gut resuspendiert (in den 30 ml Medium befanden sich nun ca. 10×10^6 Zellen). Zu den 30 ml Zellsuspensionen kamen die Zytostatikakombinationen (N4, N5, N6) dazu - 1 ml pro Zytostatikum (in der Konzentration, bei der ca. 50-80 % der Zellen überlebten bzw. jeweils das 10fache dieser Konzentration). Außerdem wurde ein unbehandeltes Röhrchen als Kontrolle belassen. Die Zentrifugenröhrchen wurden für 4 h Inkubation in den Brutschrank gestellt. Danach wurden für den Ansatz mit der 10fachen Zytostatikakonzentration die Zellen gut resuspendiert und ca. 4×10^6 Zellen pro Ansatz für die RT-PCR (siehe 2.2.5) in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt (ca. 5 ml für Kellys und 2 ml für SK-N-SH Zellen). In jedes 50 ml-Röhrchen wurde 15 ml frisches Medium zugefügt, das Ganze bei 380 g 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 2,5 ml Zellinkubationspuffer (PBS^{+Ca+Mg} + Glucose + Ascorbat) versetzt und gut resuspendiert. Die 2,5 ml wurden in 500 µl Portionen auf 2-4 15 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Die restliche Zelllösung wurde zur Zellzahlbestimmung verwendet (beim 3fach-

Ansatz mit der 10fachen Zytostatikakonzentration wurde ein Ansatz komplett und alle Kontrollen ausgezählt). Die so vorbereiteten Zellen wurden für die Aufnahmeversuche von [³H]Noradrenalin (siehe 2.2.4.4) bzw. [¹³¹I]mIBG (siehe 2.2.4.5) verwendet. Parallel dazu wurde von einem Teil der so vorbehandelten Ansätze das Zellpellet gewonnen und eine RT-PCR (Expression des Noradrenalin-Transporters) durchgeführt (siehe 2.2.5).

2.2.4.4 Aufnahme von [³H]Noradrenalin bzw. [³H]Dopamin in SK-N-SH und Kelly Zellen

In die 15 ml-Röhrchen mit 500 µl Zellsuspension (Vorbehandlung siehe 2.2.4.2 und 2.2.4.3) wurden 10 µl [³H]Noradrenalin (f.c.=1 x 10⁻⁷ mol/l) bzw. [³H]Dopamin und 10 µl Hemmstoff (Desipramin, unmarkiertes mIBG 10 x und 100 x Konzentration) zugegeben. Ein Teil der Proben (ohne Inhibitoren) wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nun wurden die 15-ml Röhrchen mit eiskaltem PBS (± Ca²⁺/Mg²⁺) aufgefüllt und 5 min bei 5-10 °C und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Röhrchen nochmals mit 10 ml PBS aufgefüllt und bei 5-10 °C, 500 g, 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Restflüssigkeit mit einer Pipette vollständig abgesaugt. Zu den Zellpellets wurden nun je 500 µl H₂O/0,1 % Triton X 100 gegeben, das Ganze gevortext und 2-12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen. Danach wurden jeweils 450 µl in ein Szintillationsfläschchen überführt, mit 6 ml Ecolum aufgefüllt und im Szintillationszähler gemessen.

2.2.4.5 Aufnahme von [¹³¹I]mIBG in SK-N-SH und Kelly Zellen

Die 500 µl Zellsuspension (Vorbehandlung siehe 2.2.4.2 und 2.2.4.3) wurde mit 20 µl [¹³¹I]mIBG (f.c.=10⁻⁷ mol/l) versetzt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 3 ml einkaltes PBS (± Ca²⁺/Mg²⁺) zugefügt, das

Röhrchen bei 5-10 °C, 500 g, 5 Minuten zentrifugiert und danach der Überstand abgekippt. Es wurden nochmals 3 ml PBS zugegeben und bei 5-10 °C, 500 g, 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgekippt und die Restflüssigkeit mit einer Pipette entfernt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml [PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) + Glucose (1 g/l)] aufgefüllt und gemessen (=Aufnahmewert). Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden nach dem Zentrifugieren (5-10 °C, 500 g, 5 min) 500 µl Puffer entnommen und das Zellpellet mit dem restlichen Überstand ebenfalls gezählt.

2.2.5 RT-PCR

Anmerkung: Dieser Versuchsblock wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Z. Kuçi durchgeführt

2.2.5.1 Lysepuffer

Zur Herstellung des RNA-Lysepuffers wurde zu 1 ml Puffer RLT (Quiagen Rneasy Kit) 10 µl β-Mercaptoethanol zugegeben.

2.2.5.2 Gewinnung der Zellen für die PCR (Zytostatika Kurzzeitinkubation)

Für einen Dreifachansatz wurden 2 große 750 ml-Zellkulturflaschen (insgesamt ca. 20 x 10⁶ Zellen) auf 4 mittlere 250 ml-Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden für 1-2 Tage im Brutschrank inkubiert. Das verbrauchte Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zytostatikakombinationen (jeweils 0,33 ml pro Zytostatikum) zugegeben. Die Zellkulturflaschen wurden für 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie bis zum Rand mit Medium aufgefüllt; d. h.

die Flasche wurde senkrecht gestellt und das Medium an der Flaschenoberseite entlang laufen lassen bis das Medium den Deckelrand erreichte. Dieses Verfahren war notwendig, um beim Zytostatika Auswaschen möglichst wenige Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Das Medium wurde abgesaugt. Anschließend wurde die Zellkulturflasche nochmals, wie vorher beschrieben, vollkommen aufgefüllt und das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 2,5 ml Trypsin vom Flaschenboden abtrypsiniert und mit 10 ml Medium neutralisiert. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und bei 380 g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS^{-Ca-Mg} gewaschen, d. h. die Zellen wurden durch Klopfen etwas gelockert und ihnen anschließend 10 ml PBS zugeführt, gut resuspendiert und danach bei 380 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet (ca. 4×10^6 Zellen) wurde in 600 μ l Lysepuffer gut gelöst und bei -80 °C eingefroren.

Zum Teil wurden die Zellen für die RT-PCR auch aus dem Zellpool, der für die mIBG-Aufnahmeversuche vorbehandelten Zellen (siehe 2.2.4.2 und 2.2.4.3), entnommen. Es wurden ca. 4×10^6 Zellen aus dem Zellpool, vor Zugabe des Zellinkubationspuffers und Aufteilen auf die 15 ml-Röhrchen, entnommen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, das Pellet danach in 600 μ l Lysepuffer gut gevortext und bei -80 °C eingefroren.

2.2.5.3 Isolierung der RNA aus den Neuroblastomzellen

Ziel: Beurteilung der Expression des NATs (RT-PCR)

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Neuroblastomzellen wurde ein Quiagen Rneasy Kit verwendet.

Zum Isolieren der RNA wurden die bei -80°C gelagerten Zellen wieder aufgetaut und gut gevortext. Zum Homogenisieren der Zellen wurde die 600 μ l Zellsuspension in eine QIAshredder Säule gegeben und 2 min bei 1500 g zentrifugiert. Die Einsätze wurden verworfen, der Durchlauf wurde mittels einer Pipette abgemessen und die gleiche Menge an 70 % Ethanol (ca. 600 μ l)

zugegeben und anschließend gut resuspendiert. Vom Gemisch wurden 700 µl in ein QIAshredder column spin gegeben und 15 sec bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Bei mehr als 700 µl Ethanol-Durchlauf-Gemisch wurde die überschüssige Menge auf den gleichen QIAshredder aufgefüllt und der vorherige Schritt nochmals durchgeführt. Die Säule wurde nun auf einen neuen Untersatz gegeben, 350 µl RW1 (Waschpuffer) zugefügt und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden pro Säule 80 µl DNase-Inkubationspuffer direkt auf die Membran gegeben und 15 min bei 20-30 °C inkubiert. Der Inkubationspuffer setzt sich aus 10 µl DNase-Stammlösung und 70 µl Puffer RDD (DNase-Puffer) zusammen; die Bestandteile wurden gemischt und nicht gevortext. So dann wurden 350 µl Puffer RW1 (Waschpuffer) zugegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde in ein frisches 2 ml-Röhrchen gesetzt, 500 µl Puffer RPE zugegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Nun wurden nochmals 500 µl Puffer RPE zugefügt und 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml-Probengefäß gestellt, 60 µl DEPC-Wasser zugegeben und 1 min bei 8000 g zentrifugiert.

Bei erwarteter RNA-Ausbeute > 30 µg wurde der letzte Schritt mit einem frischen 1,5 ml-Gefäß nochmals wiederholt.

2.2.5.4 Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD260) bestimmt. Hierzu wurde ein GeneQuant II-Photometer (Pharmacia) verwendet, das die Extinktion bei vier festen Wellenlängen (230, 260, 280 und 320 nm) misst. Der Umrechnungsfaktor für die Konzentrationsbestimmung anhand der gemessenen Extinktion der Lösung ist für die Art der Nukleinsäure spezifisch. Für RNA entspricht eine Extinktion von „1“, gemessen bei 260 nm, einer Konzentration von 40 µg/ml.

Zur Messung wird eine UV-durchlässige Quarzküvette (Pharmacia) verwendet. Im Allgemeinen werden 100 µl einer 1:50 oder 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnten RNA-Stammlösung zur Messung eingesetzt. Als Leerwert dient ebenfalls DEPC-Wasser. Zur Kontrolle der Reinheit der RNA-Präparation im Hinblick auf eine mögliche Kontamination mit Proteinen wurde stets auch die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD₂₈₀) bestimmt. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ lag dabei typischerweise zwischen 1,6 und 1,9. Zum Messen wurden 98 µl DEPC-Wasser mit 2 µl des Eluats (1:50 Verdünnung) gut vermischt und 100 µl davon in die Küvette gefüllt. Zum Einstellen des Nullwertes wurden 100 µl Wasser verwendet.

2.2.5.5 Reverse Transcriptase Reaktion (cDNA-Synthese)

Zur Herstellung komplementärer DNA-Stränge wurden 2 µg RNA in ein autoklaviertes RNase freies Eppendorf-Gefäß pipettiert und folgende Chemikalien nach den Vorgaben von Invitrogen zugefügt:

1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml)

x µl 2 µg RNA

1 µl dNTP Mix (jeweils 2,5 mmol/l)

Das Ganze wurde 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Zum Sammeln der Inhalte wurde kurz zentrifugiert und

4 µl 5X First-Strand Buffer

2 µl 0,1 mol/l DTT

1 µl RNaseOUT™ (40 u/µl)

zugefügt.

Der Inhalt wurde vorsichtig gemischt und bei 42 °C 2 min inkubiert.

Anschließend wurde 1 µl (200 U) SuperScript™ II RT zugegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Nun wurde der Ansatz 50 min bei 42 °C inkubiert. Um die Reaktion zu inaktivieren wurde der Ansatz bei 70 °C 15 min erhitzt.

2.2.5.6 Semiquantitative cDNA-Polymerase-Kettenreaktion (cDNA-PCR)

Die PCR wurde für jedes zu bestimmende Merkmal [Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAP-DH), Tyrosinhydroxylase (TH), Noradrenalintransporter (NAT), Dopamintransporter (DAT)] in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Wenn genügend RNA zur Verfügung stand, wurden je 200 ng cDNA-Äquivalent zur Reaktion eingesetzt. Zunächst wurden je 1,25 U TAQ-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) pro 50 µl Reaktionsansatz verwendet und die Proben in einem wassergekühlten Thermocycler 60 (bio-med GmbH) amplifiziert. Um den Pipettierfehler möglichst gering zu halten und für die Amplifikation aller Proben identische Bedingungen sicher zu stellen, wurde ein gemeinsamer Mastermix als Pool hergestellt.

2.2.5.7 PCR-System der Firma Perkin Elmer

5 µl	PCR-Puffer (10x)
4 µl	dTNP
0,25 µl (=1,25 U)	TAQ-Polymerase
<u>28,75 µl</u>	<u>DEPC-H₂O</u>
=38 µl	Mastermix

Pro Reaktionsansatz wurden 2 µl (=200 ng) cDNA-Äquivalent in ein autoklaviertes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Deckel der Eppendorf-Gefäße wurden mit Klammern gesichert und die Proben 3 min im Thermocycler erhitzt um die komplementären DNA-Stränge zu trennen. Die so behandelte cDNA wurde anschließend schnell auf Eis abgekühlt um eine Wiederanlagerung der Einzelstränge zu vermeiden. Zu je 4 µl vorgelegter cDNA-Lösung wurden 36 µl Mastermix pipettiert. Die Amplifikation wurde für jedes Merkmal, bei Anwesenheit nur eines Amplifikationspaares pro Reaktionsansatz, getrennt durchgeführt. In PCR-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Perkin Elmer) wurden 10 µl

der entsprechenden Primerpaare vorgelegt und je 40 µl Reaktionsgemisch zugegeben. (Primer:

GAPDH 325 bp: sense 5'-GAC AAC AGC CTC AAG ATC ATC-3', antisense 5'-GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA-3'

Tyrosinhydroxylase 299 bp: sense 5'-TGT CAG AGC TGG ACA AGT-3', antisense 5'-GAT ATT GTC TTC CCG GTA GC-3'

Noradrenalintransporter 294 bp: sense 5'-GCT TCT ACT ACA ACG TCA TCA TC-3', antisense 5'-CGA TGA CGA CCA TCA G-3'

Dopamintransporter 142 bp: sense 5'-ATA GAC GGC ATC AGA GCA TAC C-3', antisense 5'-ACT TGT TGT AGC TGG AGA AGG C-3')

Durch leichtes Antippen wurden die Proben gemischt und für 1 min bei 200 g zentrifugiert. Zur Amplifikation der entsprechenden Merkmale wurden die Proben einem Dreistufen-Temperaturprogramm unterworfen. Für GAP-DH wurden 28 der folgenden Zyklen durchlaufen, für Tyrosinhydroxylase und Noradrenalin-transporter 38 Zyklen und für Dopamintransporter 40 Zyklen.

Phase I: Denaturierung 96 °C 15 s

Phase II: Hybridisierung 55 °C 30 s

Phase III: Polymerisation 72 °C 90 s

Bei Verwendung der TAQ-DNA-Polymerase von Perkin Elmer muss das Enzym vor der Amplifikation für 10 min bei 95 °C aktiviert werden.

Um eine Kontamination der RNA oder cDNA mit PCR-Produkten zu vermeiden, waren sowohl die Arbeitsplätze, Pipetten und Zentrifugen, als auch die verwendeten Lösungen für RNA-Isolierung/cDNA-Synthese und Amplifikationsprodukte stets voneinander getrennt. Es wurden ausschließlich autoklavierte und RNase-freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet. In regelmäßigen Abständen wurde ein Kontrollansatz mitgeführt, bei dem DEPC-H₂O an Stelle von cDNA verwendet wurde. Die Reinheit der RNA-Präparate in Hinblick auf kontaminierende DNA wurde durch Verwendung von RNA an Stelle von cDNA in der PCR überprüft.

2.2.5.8 Fällern der PCR-Produkte mit Natriumacetat/Ethanol

Um eine möglichst große Bandenschärfe zu erreichen, sollte das Auftragsvolumen für die nachfolgende Analyse der Produkte in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese möglichst gering gehalten werden. Deshalb wurden 4-5 Produkte einer RNA-Spezies, die sich in ihrer Länge um mindestens 40 bp unterscheiden und durch die Elektrophorese einwandfrei getrennt werden konnten, vereinigt. Dazu wurden je 45 µl der Amplifikationsprodukte sowie das jeweilige PCR-Produkt des als interner Standard verwendeten Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gens (GAP-DH) in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 mol/l Natriumacetat und 2,5 Vol. 96 % Ethanol wurden die Proben über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min bei 14000 g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge), der Ethanol-Überstand abpipettiert und die Reaktionsgefäße mit Parafilm verschlossen. Vorhandene Ethanolreste wurden durch Zentrifugation, 15 min bei 40 °C im Vakuum (Vaccum Concentrator, Bachofer), vollständig entfernt. Die Proben wurden in 12 µl TE-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 4 µl PAGE-Ladepuffer 3 x für 10 s gevortext. Nach der Inkubation für 5 min bei 65 °C (verbesserte Lösung der Produkte), wurden die Proben auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen.

2.2.5.9 Analyse amplifizierter cDNA im Polyacrylamidgel (PAGE)

Zur Analyse der Amplifikationsprodukte wurden 8%ige Polyacrylgele mit je 12 Probenauftragstaschen verwendet. Die noch flüssige Gelmatrix wurde, unter Ausschluss von Luftblasen, zwischen gut gereinigte Glasplatten gegossen. Nach 25 min war die Polymerisation des Gels abgeschlossen. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und die Probenauftragstaschen sorgfältig unter fließendem Leitungswasser ausgespült.

Um eventuell vorhandene Sauerstoffbläschen aus der Gelmatrix zu entfernen wurde für 30 min bei 150 V und 30 mA eine Vorelektrophorese durchgeführt.

Anschließend wurden die PCR-Produkte (16 µl) sowie der Längenstandard (8 µl) in die Probenauftragstaschen pipettiert und je nach Länge der Produkte für 3-5 h einer Elektrophorese bei 150 V, 30 mA unterworfen. Als Ladepuffer diente TBE (1x).

2.2.5.10 Polyacrylamidgel

13,3 ml	Acrylamid Rotiphoresegel 30
5 ml	10 %-TBE-Puffer
31,5 ml	Ampuwa
50 µl	TEMED
350 µl	APS

2.2.5.11 Fotografieren / Analyse Ethidiumbromid-gefärbter Polyacrylamidgele

Die fertigen Polyacrylamidgele wurden von der Glasplatte abgelöst, für 7 min mit einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend das überschüssige Ethidiumbromid durch zweimaliges Waschen entfernt. Unter Anregung mit UV-Licht wurden die Gele mit Hilfe einer Videokamera (CS-1, Cybertech) digitalisiert. Dabei erfolgte eine EDV-kompatible sowie eine fotografische Dokumentation (Video Copy Prozessor P67E, Mitsubishi). Um beim Vergleich verschiedener Proben eine semiquantitative Aussage treffen zu können mußte sichergestellt werden, dass die RNA- bzw. cDNA-Menge in allen untersuchten Proben identisch war. Trotz Herstellung gemeinsamer Reaktionsgemische (Mastermix für cDNA-Synthese bzw. PCR) zur Minimierung von Pipettierfehlern kann nicht per se von absolut identischen Bedingungen ausgegangen werden. Abhilfe schuf hier die Angabe relativer Werte für die erhaltenen PCR-Signale. Deshalb wurde für jede RNA-Probe, neben der Amplifikation der interessierenden Gene, ein konstitutiv exprimiertes Gen mit

amplifiziert. Voraussetzung für die Auswahl eines Gens als interner Standard war, dass sich das Expressionsniveau bei allen untersuchten Proben als konstant erwies. In der vorliegenden Arbeit wurde GAP-DH als interner Standard verwendet.

2.2.5.12 Identitätsprüfung der PCR-Amplifikate durch Bestimmung der Produktlänge und Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

PCR-Produkte unterschiedlicher Länge und Sequenz können, trotz gemeinsamer Auftragung, aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens in der PAGE getrennt werden. Im Idealfall zeigt sich für jedes amplifizierte Merkmal eine distinkte Bande. Um die Spezifität der verwendeten PCR-Amplimere bzw. die Identität der erhaltenen Produkte zu überprüfen, wurde die Größe der PCR-Amplifikationsprodukte anhand eines mitgeführten Längensstandards der Fragmentlängen 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67 und 37 bp (Standard VIII, Böhlinger Mannheim, Spaltung des Plasmids pUCBM21 mit der Restriktionsendonukleasen Hpa II, Dra I, und Hind III) in der PAGE überprüft. Zusätzlich wurde eine Spaltung spezifischer Restriktionsenzymstellen auf der PCR-generierten DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen vorgenommen. Dazu wurde in Eppendorf-Gefäße das jeweilige PCR-Amplifikat für 2-3 h bei 37 °C mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (5-10 U/µg DNA) und dem dazu gehörenden Puffer (10 x Konzentrat, vor der Inkubation verdünnt) inkubiert. Im Anschluss an die vollständige Spaltung der Schnittstellen wurden die entsprechenden Fragmente mit Ethanol/NaAc gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % (v/v) EtOH wurden diese in 12 µl TE- und 4 µl Ladepuffer gelöst und eine PAGE durchgeführt. Da sich in Abhängigkeit von der Länge innerhalb der Sequenz des analysierten PCR-Produkts meist mehrere Schnittstellen für jedes verwendete Restriktionsenzym befinden, ergibt sich in der PAGE ein charakteristisches Bandenmuster. Durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker wurde die Größe dieser Subfragmente ermittelt.

3 Ergebnisse

Wie in der Einleitung bereits angemerkt, war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss einer Vorbehandlung mit Zytostatikakombinationen, wie sie im Deutschen Neuroblastomprotokoll NB 97 verwendet werden, auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG zu untersuchen.

In dieser Arbeit sollten dabei Zytostatikakombinationen verwendet werden, die ein ca. 50-80%iges Überleben der Zellen garantieren. Aus diesem Grund wurde zuerst die Empfindlichkeit von SK-N-SH und Kelly Zellen gegenüber einzelnen Zytostatika im MTT-Test ermittelt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Zytostatikakombinationen (N4/N5/N6) gewählt, die ein ca. 50-80%iges Überleben der Zellen im MTT-Test bewirken. An diesen so vorbehandelten Zellen wurde die Aufnahme von [³H]Noradrenalin bzw. [¹³¹I]mIBG im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. Parallel dazu wurde der Einfluss dieser Zytostatikavorbehandlung auf die Expression des Noradrenalintransporters in RT-PCR Untersuchungen bestimmt.

3.1 Wirkung verschiedener Zytostatika auf SK-N-SH und Kelly Zellen

Um für die nachfolgenden [¹³¹I]mIBG-/ [³H]Noradrenalin-Aufnahmeversuche die Zytostatikakonzentrationen zu bestimmen, bei der ca. 50-80 % der Zellen überleben, wurden die beiden für den Versuch verwendeten Zelllinien SK-N-SH und Kelly ausgesät und mit unterschiedlichen [zuerst einzeln (3.1.1.) und anschließend kombiniert (3.1.2.)] Zytostatikakonzentrationen inkubiert.

Für diese Untersuchungen wurde der MTT-Test (siehe 2.2.3.) verwendet. Durchgehend wurden dabei 10000 SK-N-SH- bzw. 7500 Kelly-Zellen/200 µl Medium ausgesät und nach 24 Stunden mit je 10 µl entsprechend konzentrierter Zytostatikalösung versetzt. Nach 72 Stunden wurde der MTT-Test durchgeführt. Die in den Graphiken angegebenen Werte stellen, wenn

nicht anders vermerkt, Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dar. Angegeben sind die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (= 100 %-Wert) erhaltenen Messwerte. Ziel war, die Zytostatikakonzentration zu ermitteln, bei der ca. 50-80 % der Zellen überleben. Die in den Graphiken angegebenen Zytostatikakonzentrationen entsprechen den Konzentrationen im Testansatz (f.c.).

Die Skalierung der x-Achse ist logarithmisch.

3.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung einzelner Zytostatika

3.1.1.1 Cisplatin

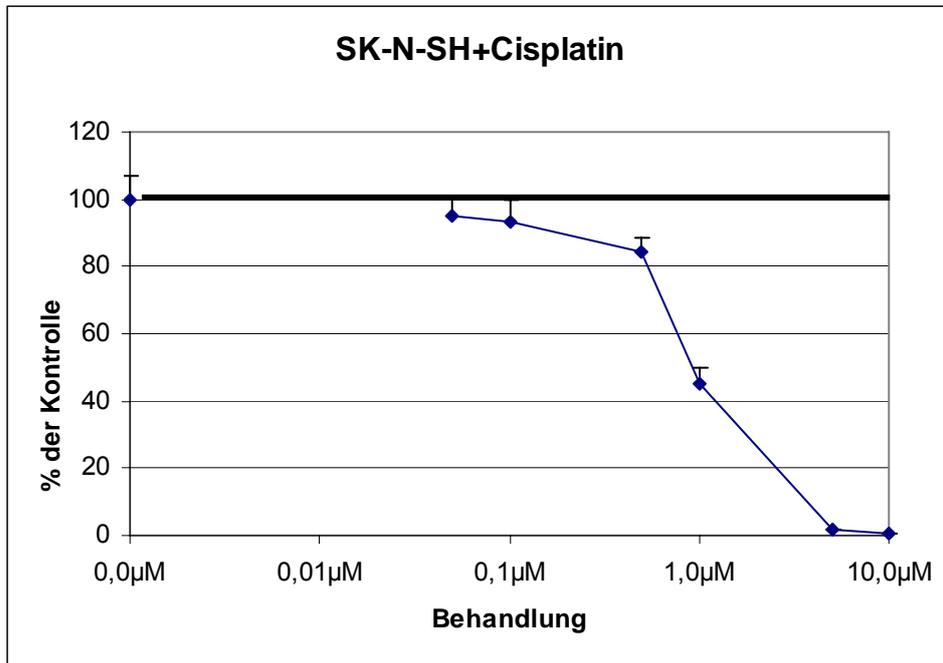


Abb. 4a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Cisplatin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen. Der Kontroll-Wert befindet sich bei $x=0,0 \mu\text{M}$.

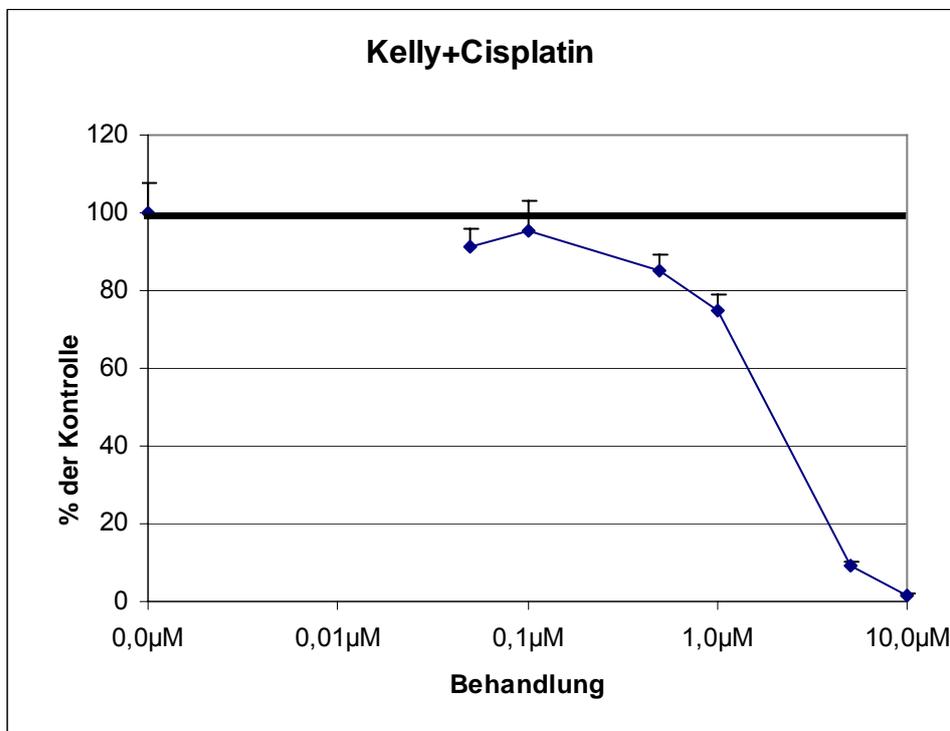


Abb. 4b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Cisplatin auf das Überleben von Kelly-Zellen. Der Kontroll-Wert befindet sich bei $x=0,0 \mu\text{M}$.

3.1.1.2 Etoposid

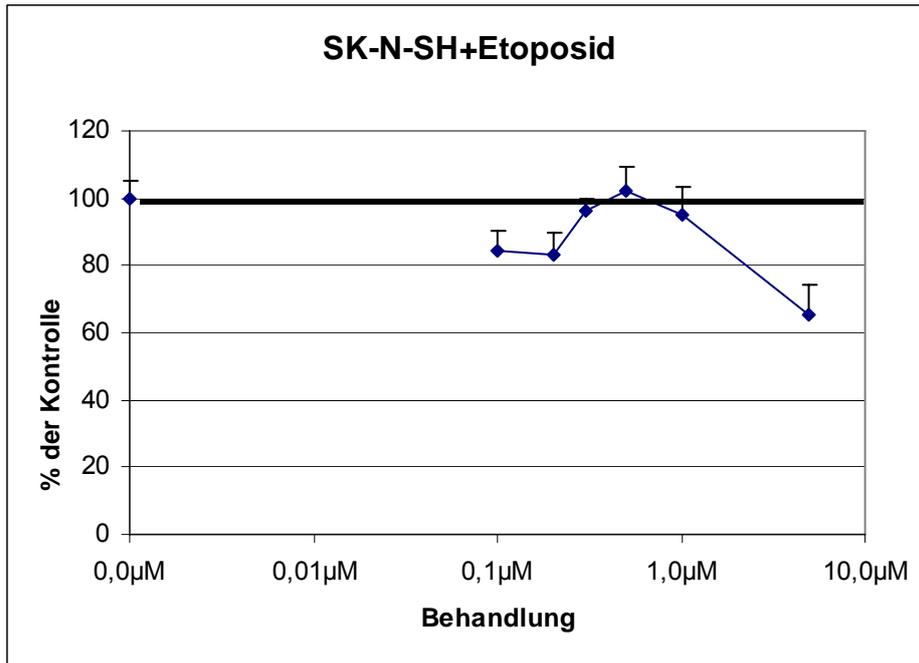


Abb. 5a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Etoposid auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen. Der Kontroll-Wert befindet sich bei $x=0,0 \mu\text{M}$.

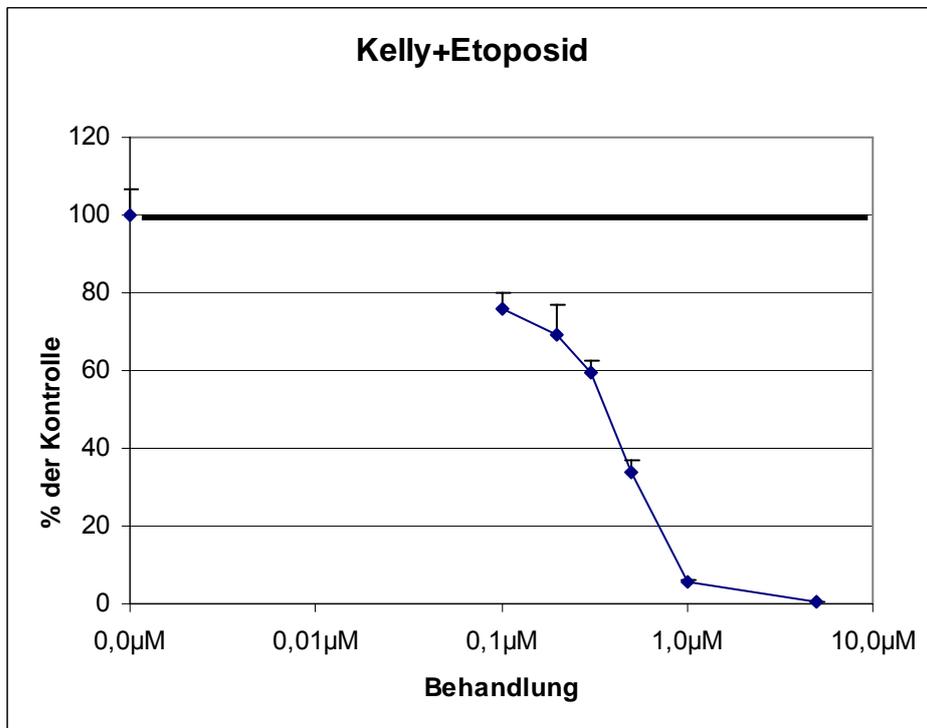


Abb. 5b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Etoposid auf das Überleben von Kelly-Zellen. Der Kontroll-Wert befindet sich bei $x=0,0 \mu\text{M}$.

3.1.1.3 Vincristin

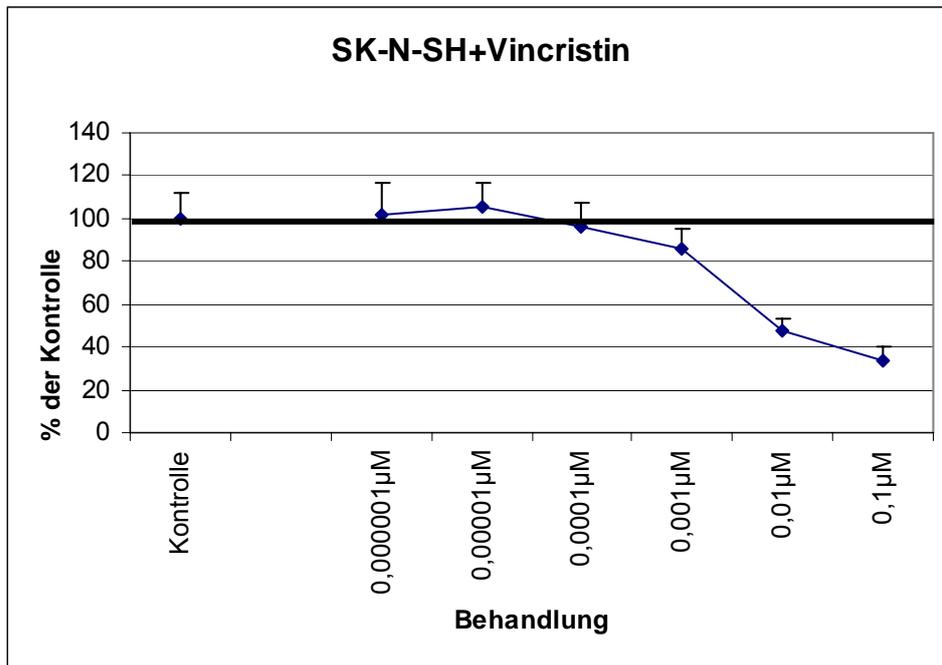


Abb. 6a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vincristin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.

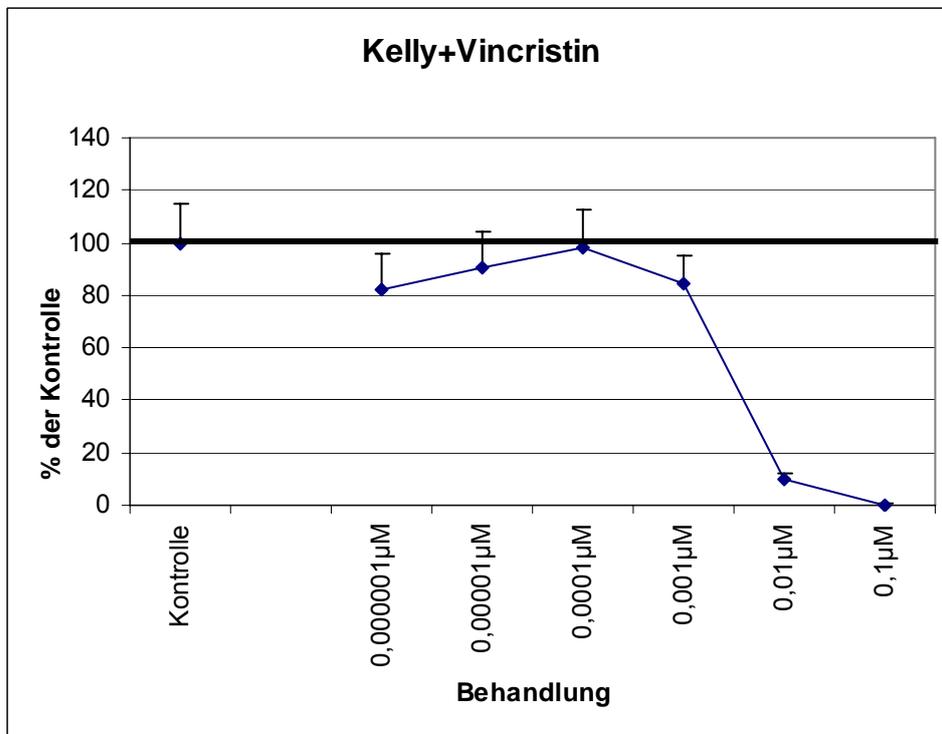


Abb. 6b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vincristin auf das Überleben von Kelly-Zellen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

3.1.1.4 Vindesin

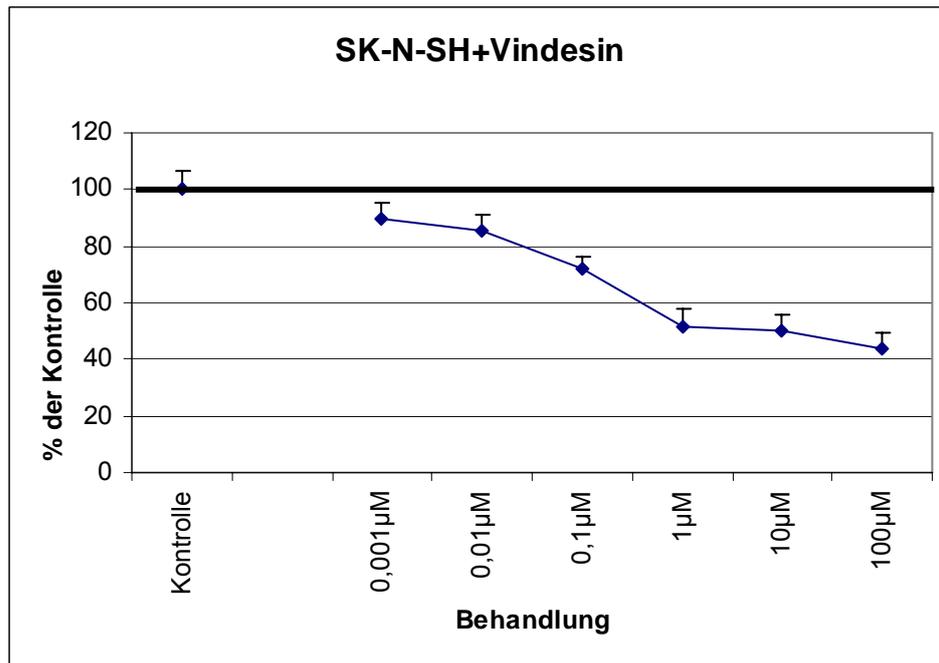


Abb. 7a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vindesin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.

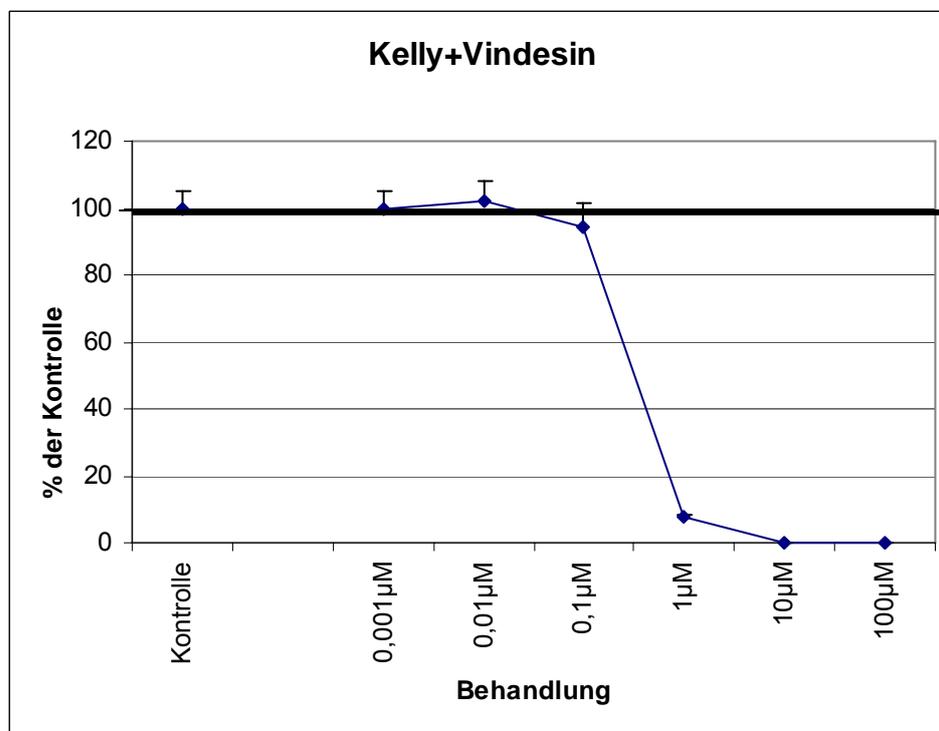


Abb. 7b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vindesin auf das Überleben von Kelly-Zellen.

3.1.1.5 Doxorubicin

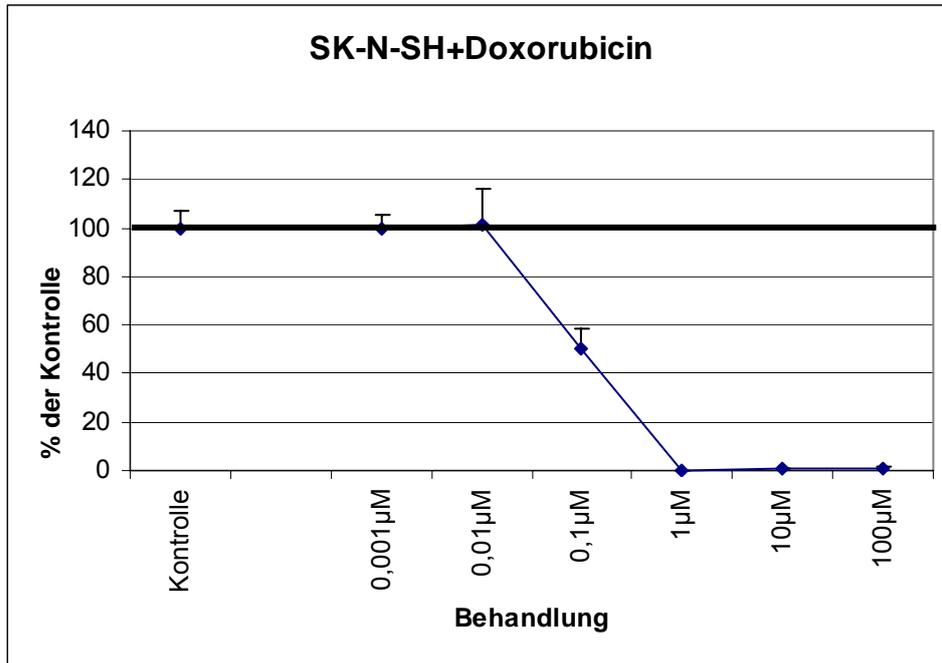


Abb. 8a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Doxorubicin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.

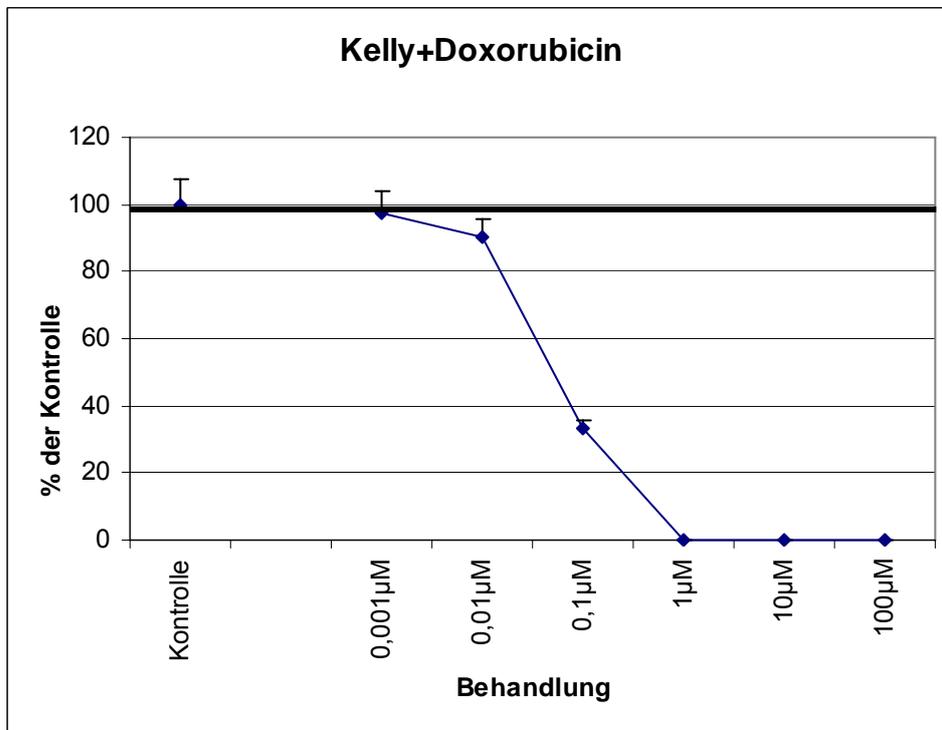


Abb. 8b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Doxorubicin auf das Überleben von Kelly-Zellen.

3.1.1.6 Dacarbazin

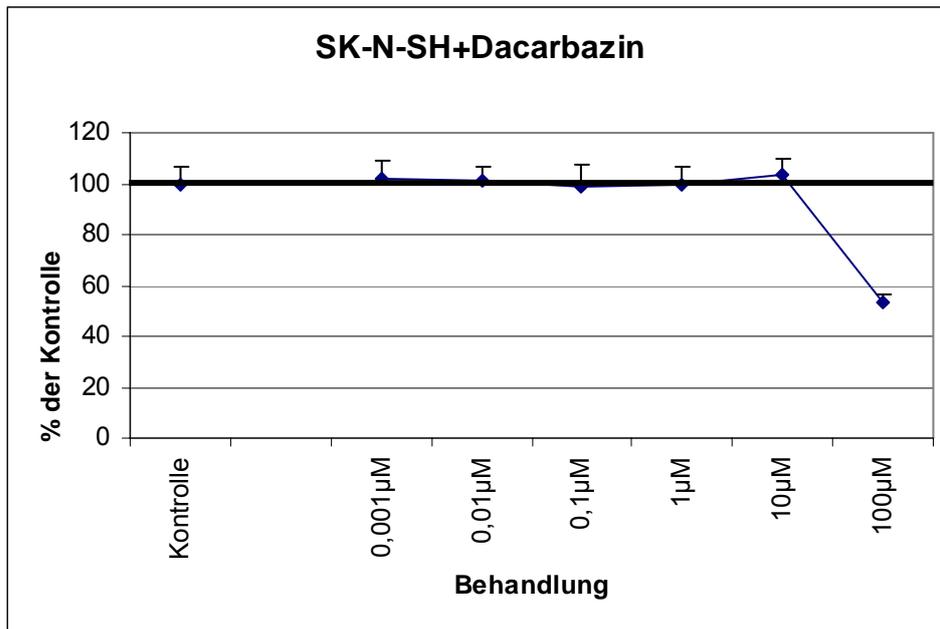


Abb. 9a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Dacarbazin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.

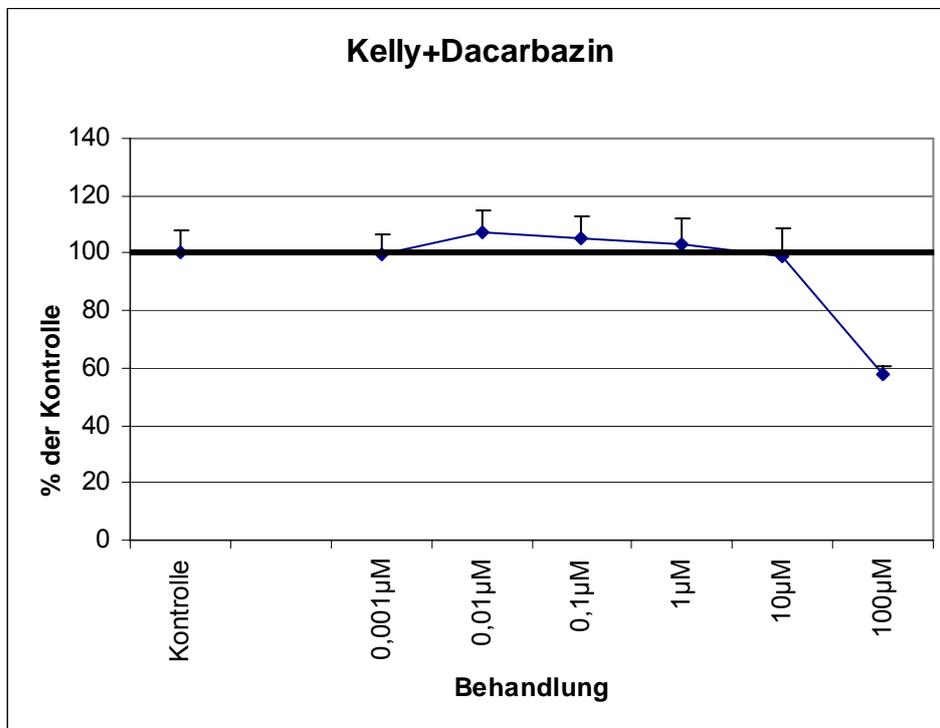


Abb. 9b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Dacarbazin auf das Überleben von Kelly-Zellen.

3.1.1.7 4-Hydroperoxyifosfamid

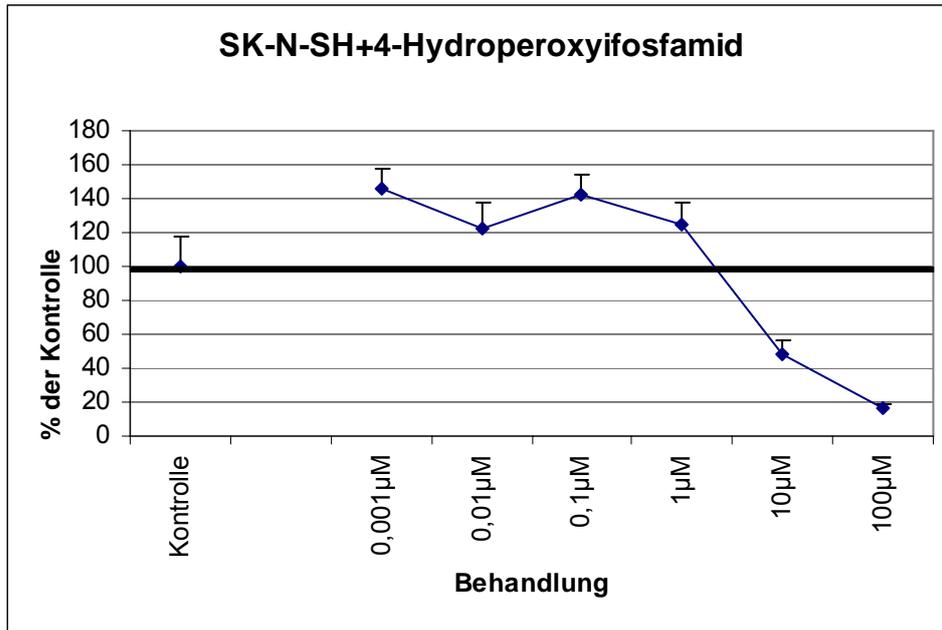


Abb. 10a: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an 4-Hydroperoxyifosfamid auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.

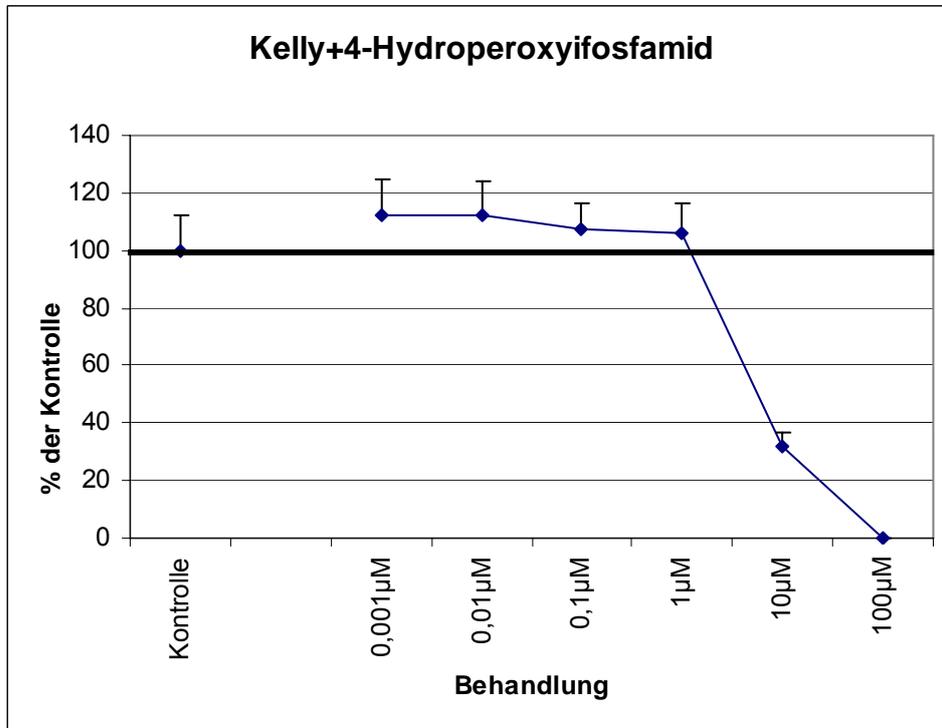


Abb. 10b: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an 4-Hydroperoxyifosfamid auf das Überleben von Kelly-Zellen.

3.1.2 Wirkung der Zytostatika-Kombinationen

Im Neuroblastom-Studienprotokoll NB 97 der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie werden drei Zytostatikakombinationen in der Therapie von Neuroblastomen verwendet:

N4: Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid*

N5: Vindesin, Etoposid, Cisplatin

N6: Vincristin, Doxorubicin, Ifosfamid*, Dacarbazin

Statt Ifosfamid/Cyclophosphamid wurden in den hier beschriebenen Versuchen 4-Hydroperoxyifosfamid verwendet. 4-Hydroperoxyifosfamid ist die aktivierte Form des Ifosfamids. Ifosfamid wird in vivo in der Leber durch die Cytochrom P450-Oxygenase (= Hydroxylase) aktiviert. Da Neuroblastomzellen dies jedoch nicht können, wurde die aktivierte Form direkt eingesetzt. Die aktivierte Form kann die Zellmembran penetrieren und in der Neuroblastomzelle weiter metabolisiert werden (Meyer et al., 1997). Da die beiden Substanzen (Ifosfamid und Cyclophosphamid) sich nur in der Position einer Chloethylgruppe unterscheiden und dies nur eine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Metabolisierung in die hydroxylierte Form und auf das Ausmaß der Nebenwirkungen in vivo hat, wurden für die nachfolgenden Versuche für Cyclophosphamid und Ifosfamid nur 4-Hydroperoxyifosfamid als aktivierte Form verwendet.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche mit den Zytostatikakombinationen wurden die unter 3.1.1. ermittelten Einzelkonzentrationen so kombiniert, dass ein ca. 50-80%iges Überleben der Zellen ermöglicht wurde. Bei den in Abb. 11-14 geschilderten Versuchsserien wurden die Zytostatikakonzentrationen erst einzeln, dann in Kombination, zu den Zellen gegeben. In den Graphiken sind die dabei erhaltenen Ergebnisse für die Einzelsubstanzen im Vergleich zu den Kombinationen angegeben. Darauf aufbauend wurden dann die Zytostatikakonzentrationen bestimmt, die bei den Kombinationen ein ca. 50-80%iges Überleben der Zellen gewährleisten sollten. Mit diesen

Zytostatikakonzentrationen wurden die Zellen vor der Gabe von [³H]Noradrenalin und [¹³¹I]mIBG behandelt.

Pro Versuch wurden in 96-well-Platten 10000 SK-N-SH-Zellen bzw. 7500 Kelly-Zellen/200 µl Medium ausgesät und nach 24 Stunden mit je 10 µl entsprechend konzentrierten Zytostatikalösungen (siehe 3.1.1.) und deren Kombinationen versetzt. Nach 72 Stunden wurde der MTT-Test wie unter 2.2.3. beschrieben durchgeführt. Die in den Graphiken angegebenen Werte stellen, wenn nicht anders vermerkt, Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dar. Angegeben sind die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (= 100 %-Wert) erhaltenen Messwerte. Die in den Graphiken angegebenen Zytostatikakonzentrationen entsprechen den Konzentrationen im Testansatz (f.c.).

Bei den Kellyzellen der Kombination N4 (siehe Abb. 11b) ist es nicht gelungen, die Zytostatikakonzentrationen zu ermitteln, bei denen 50-80 % der Zellen überlebten. Ein ähnliches Problem ergab sich bei den Kellyzellen der Kombination N6 (siehe Abb. 14b).

3.1.2.1 Kombination N4

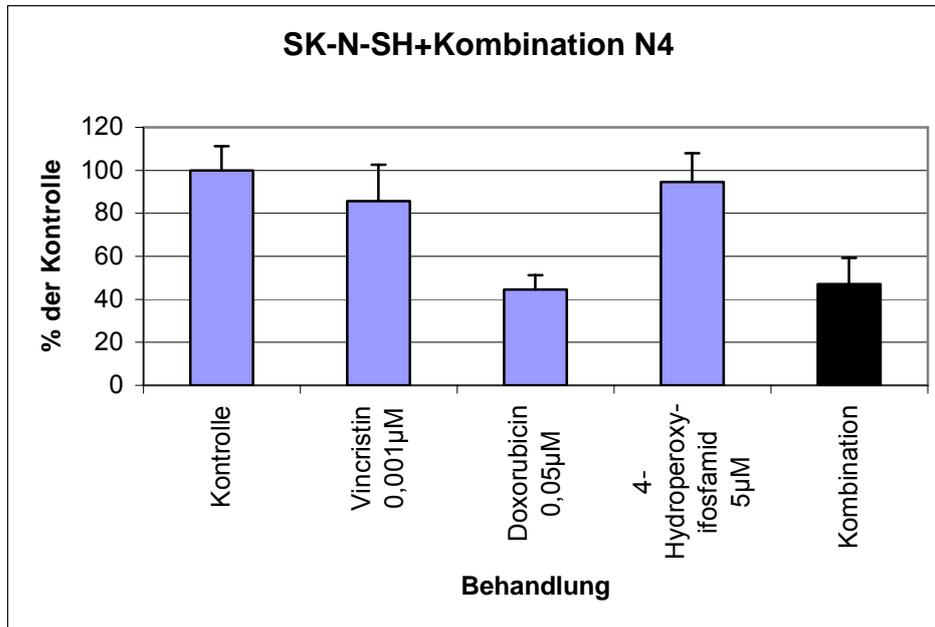


Abb. 11a: Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N4 auf das Überleben von SK-N-SH Zellen.

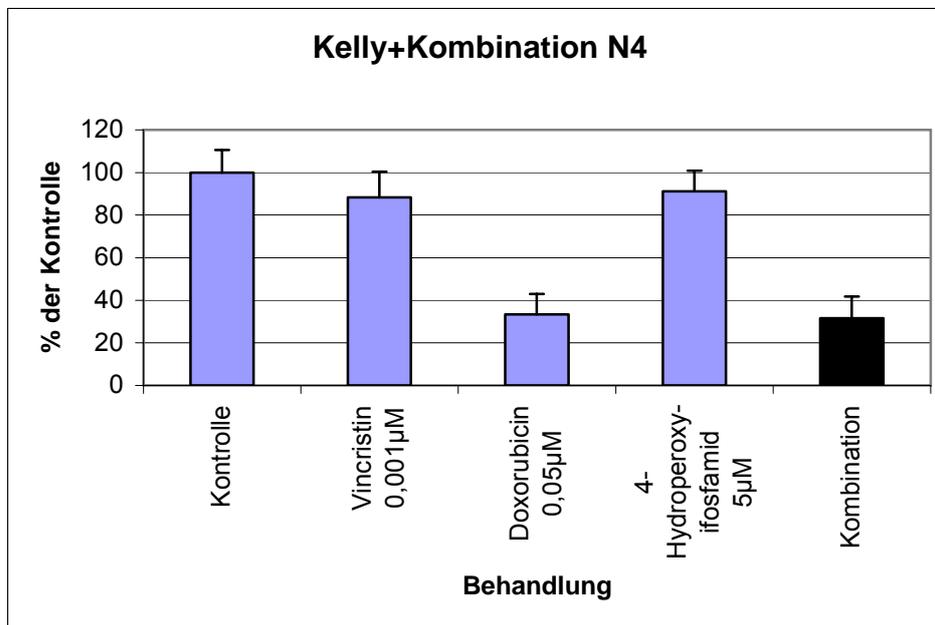


Abb. 11b: Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N4 auf das Überleben von Kelly-Zellen.

3.1.2.2 Kombination N5

Für die Kombination N5 war es nicht einfach die Konzentrationen zu bestimmen, bei der ein ca. 50-80%iges Überleben der Zellen erreicht wurde. Die Abbildung 12 auf der nächsten Seite zeigt den Verlauf der Versuche, die durchgeführt wurden um das gewünschte Ziel zu erreichen.

Für die [³H]NA/[¹³¹I]mIBG-Aufnahmeversuche wurden schließlich die in Abb. 13 gezeigten Zytostatikakonzentrationen verwendet, die ein Überleben der Zellen von 50-80 % gewährleisteten.

Ergebnisse

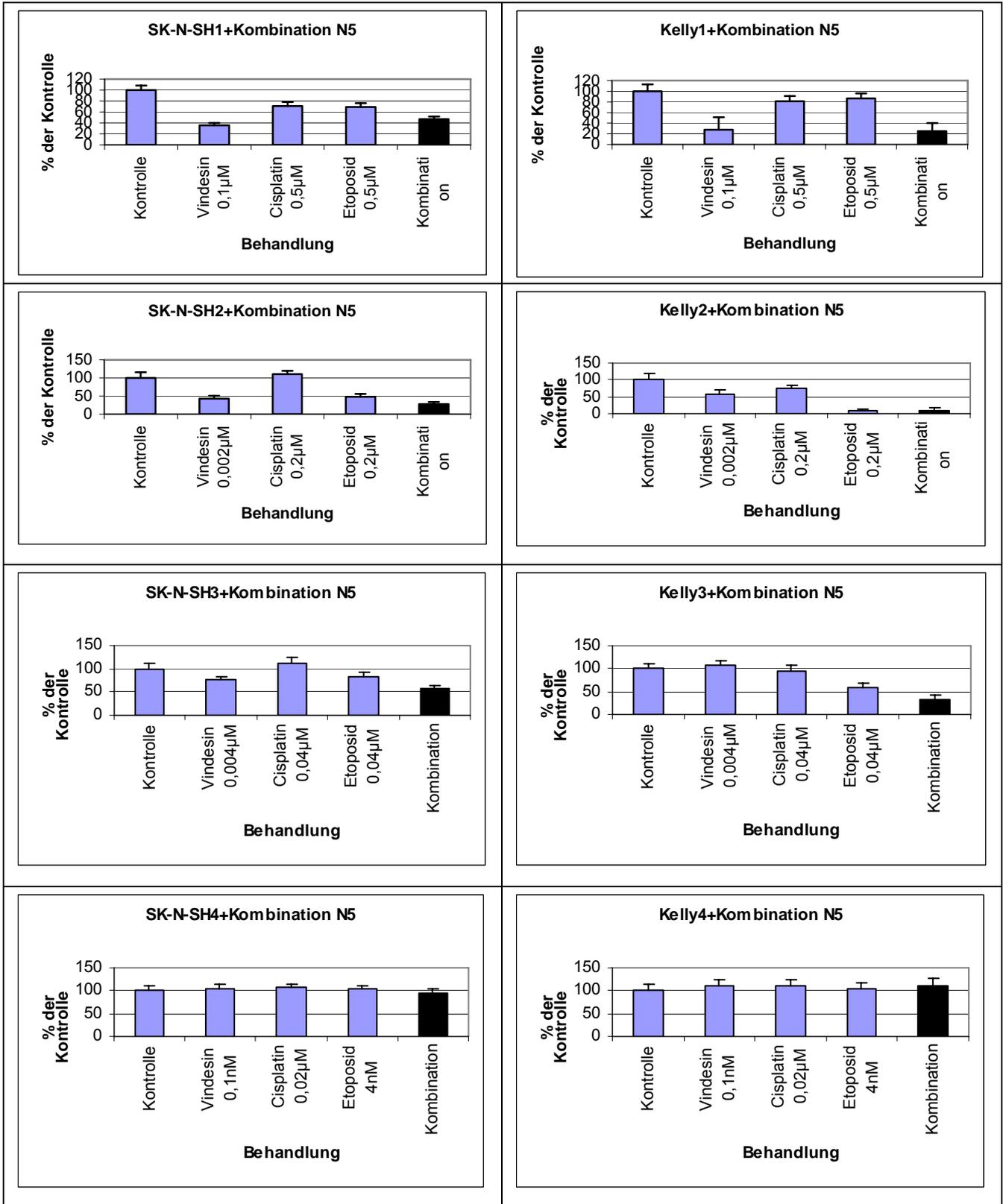


Abb. 12: Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N5 auf das Überleben von SK-N-SH- und Kelly-Zellen. Es sind vier verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen jeweils mit Kelly- und SK-N-SH-Zellen dargestellt.

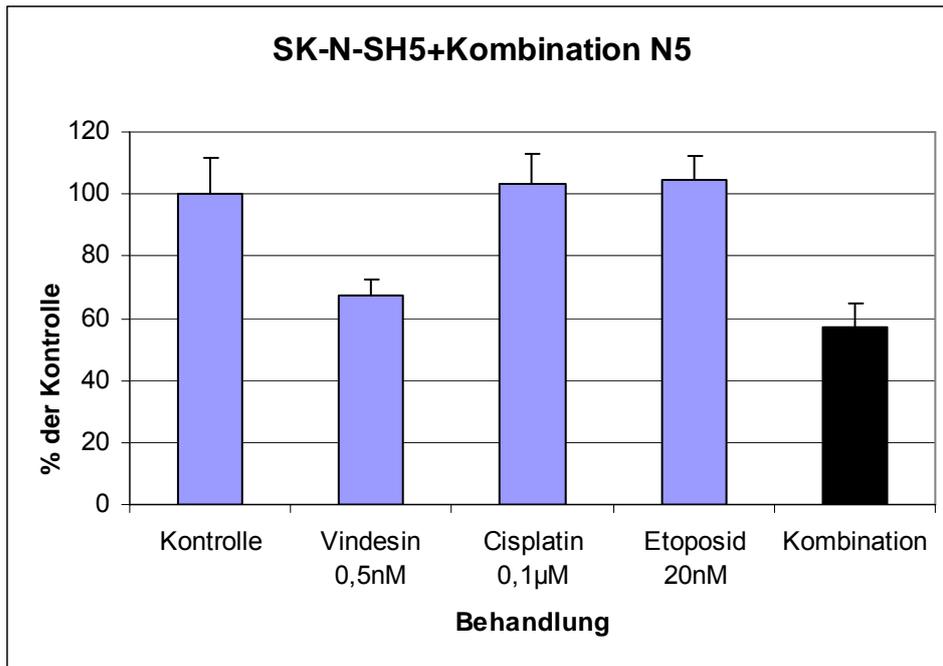


Abb. 13a: Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N5 auf das Überleben von SK-N-SH Zellen.

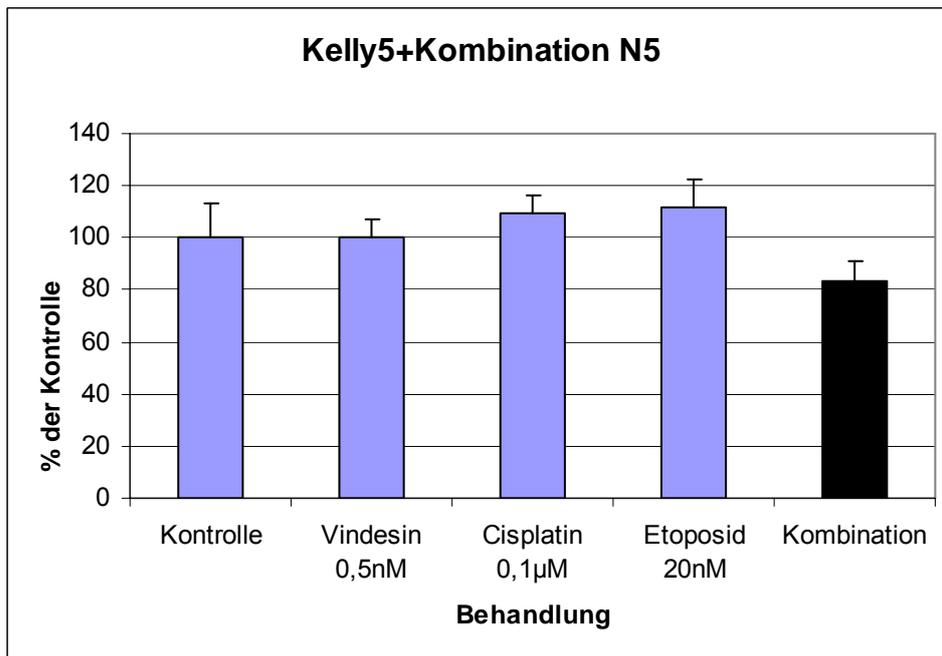


Abb. 13b: Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N5 auf das Überleben von Kelly-Zellen.

3.1.2.3 Kombination N6

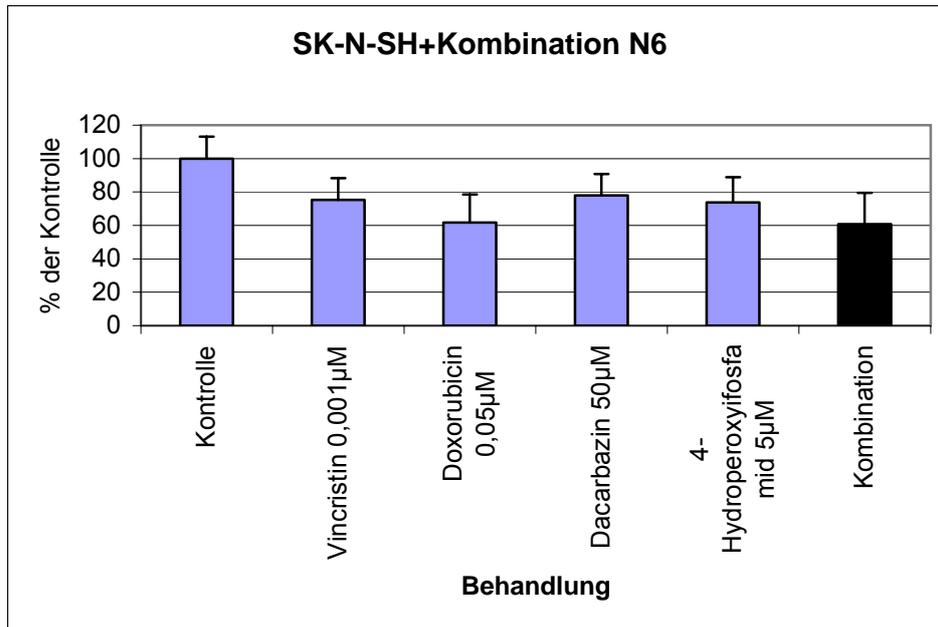


Abb. 14a: Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N6 auf das Überleben von SK-N-SH Zellen. Die Werte für 4-Hydroperoxyfosfamid stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

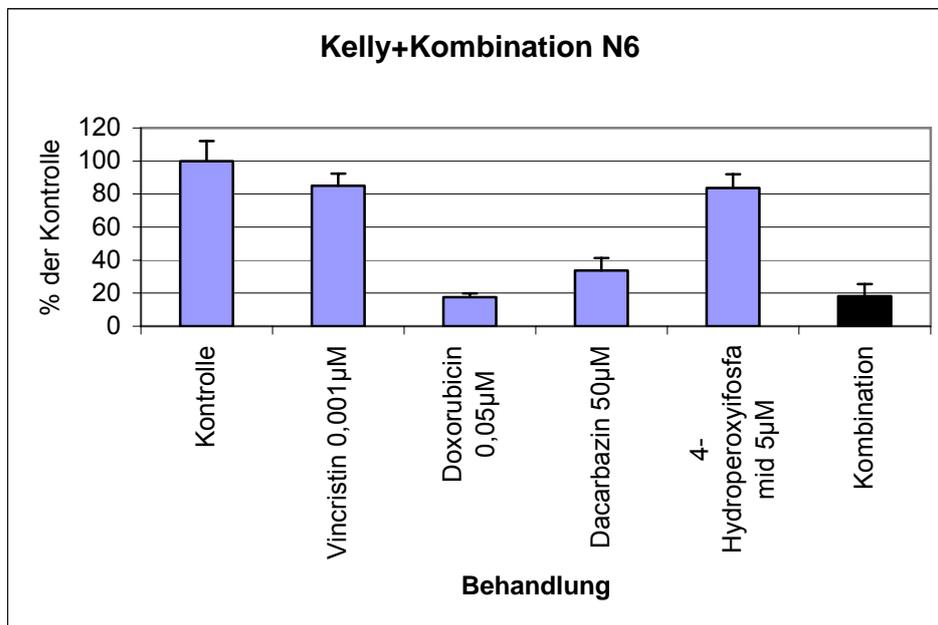


Abb. 14b: Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N6 auf das Überleben von Kelly-Zellen. Die Werte für Doxorubicin, Dacarbazin und Kombination stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

In dem Versuchsteil N6 zeigte sich, dass mit den so gewählten Zytostatikakonzentrationen ein annäherungsweise Überleben von ca. 50-80 % nicht gegeben war. Deshalb wurde für die folgenden [¹³¹I]mIBG- und [³H]Noradrenalin-Aufnahmeversuche die Konzentration von Doxorubicin auf 0,03 µmol/l und Dacarbazin auf 30 µmol/l gesenkt. Dies war für die Durchführung der Aufnahmeversuche eine Erleichterung und für die Ergebnisse ermöglichte es einen einfacheren Vergleich, da Doxorubicin nun für die Zytostatikakombinationen N4 und N6 in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde.

Für die nachfolgenden Aufnahmeversuche wurden schließlich folgende Zytostatikakonzentrationen verwendet:

Behandlung	(f.c.)
N4 (Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid)	Vincristin: 1 nmol/l Doxorubicin: 0,03 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 5 µmol/l
N5 (Vindesin, Etoposid, Cisplatin)	Vindesin: 0,5 nmol/l Etoposid: 20 nmol/l Cisplatin: 0,1 µmol/l
N6 (Vincristin, Doxorubicin, Ifosfamid, Dacarbazin)	Vincristin: 1 nmol/l Doxorubicin: 0,03 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 5 µmol/l Dacarbazin: 30 µmol/l

Obwohl SK-N-SH- und Kelly-Zellen unterschiedlich empfindlich auf die Zytostatikakombinationen reagierten, wurden für die radioaktiven Aufnahmeversuche für beide Zelllinien die gleichen Zytostatikakonzentrationen verwendet, um komparable Verhältnisse für den direkten Vergleich zu erhalten.

3.2 Einfluss der Vorbehandlung mit Zytostatika auf die Aufnahme von [³H]Noradrenalin und [¹³¹I]mIBG in die Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly

Ziel der nachfolgenden Versuche war es, den Einfluss der Zytostatikavorbehandlung auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG zu untersuchen. Da dieses jedoch in der Praxis schwer verfügbar war, wurden die meisten Versuche mit [³H]Noradrenalin durchgeführt, das wie mIBG über den NAT in die Neuroblastomzellen aufgenommen wird.

3.2.1 Vorversuche: Aufnahme von [³H]Noradrenalin und [³H]Dopamin in SK-N-SH und Kelly Zellen

[³H]Noradrenalin und [³H]Dopamin werden über den ATP-abhängigen, Na/Cl-abhängigen Noradrenalintransporter NAT in die Neuroblastomzelle aufgenommen. Jedoch wird nur [³H]Noradrenalin spezifisch über diesen transportiert, [³H]Dopamin kann auch über den Dopamintransporter (DAT) in die Zelle aufgenommen werden. Ausser [³H]NA und [³H]DA können, wie bereits erwähnt, auch Katecholamin-analoge Verbindungen wie metiodbenzylguanidin [¹³¹I]mIBG über den Noradrenalintransporter NAT in die Neuroblastomzellen transportiert werden. Ein spezifischer Hemmstoff für den NAT ist Desipramin. Für die Versuche wurden die unbehandelten SK-N-SH- und Kelly-Zellen mit 10 µl [³H]Noradrenalin (f.c. 10⁻⁷ mol/l) bzw. [³H]Dopamin (f.c. 10⁻⁷ mol/l) und 20 µl des Hemmstoffs Desipramin (f.c. 0,6 µmol/l) versetzt. Nach 30 min Inkubation wurde die Aufnahme in die Neuroblastomzellen gemessen. Die in den Grafiken dargestellten Werte entsprechen den Messwerten eines Versuchs. Die Angaben „100 %=Aufnahme von 1,25 x 10⁻¹² Molen Dopamin/10⁶ Zellen/30 min“ sagt eigentlich nur aus, wieviel Radioaktivität nach 30 min Inkubation mit 10⁻⁷ mol/l [³H]DA bzw. [³H]NA in 1 x 10⁶ Zellen geblieben ist. Ein Teil des [³H]DA bzw. [³H]NA kann inzwischen schon metabolisiert und ausgeschieden worden sein. Der Einfachheit halber

wurde trotzdem die Beschriftung NA bzw. DA/ 10^6 Zellen/30 min durchgehend gewählt.

In den nachfolgenden Auswertungen zeigt sich eine fast vollständige Hemmung der [^3H]Noradrenalin-Aufnahme durch Desipramin, sowohl bei SK-N-SH-Zellen wie auch bei Kelly-Zellen. Im Vergleich dazu wird die Aufnahme von [^3H]Dopamin durch Desipramin weniger stark gehemmt. Die Inkubation auf Eis führte zu einer ca. 95%igen Reduzierung der Aufnahme beider Katecholamine.

Wie aus den Abbildungen 15 und 16 zu erkennen ist, nehmen SK-N-SH-Zellen sowohl mehr [^3H]Dopamin als auch [^3H]Noradrenalin auf als Kelly-Zellen:

[^3H]Dopamin: $12,5 \times 10^{-13}$ Mole (SK-N-SH) vs $6,6 \times 10^{-13}$ Mole (Kelly)

[^3H]Noradrenalin: $15,6 \times 10^{-13}$ Mole (SK-N-SH) vs $4,39 \times 10^{-13}$ Mole (Kelly)].

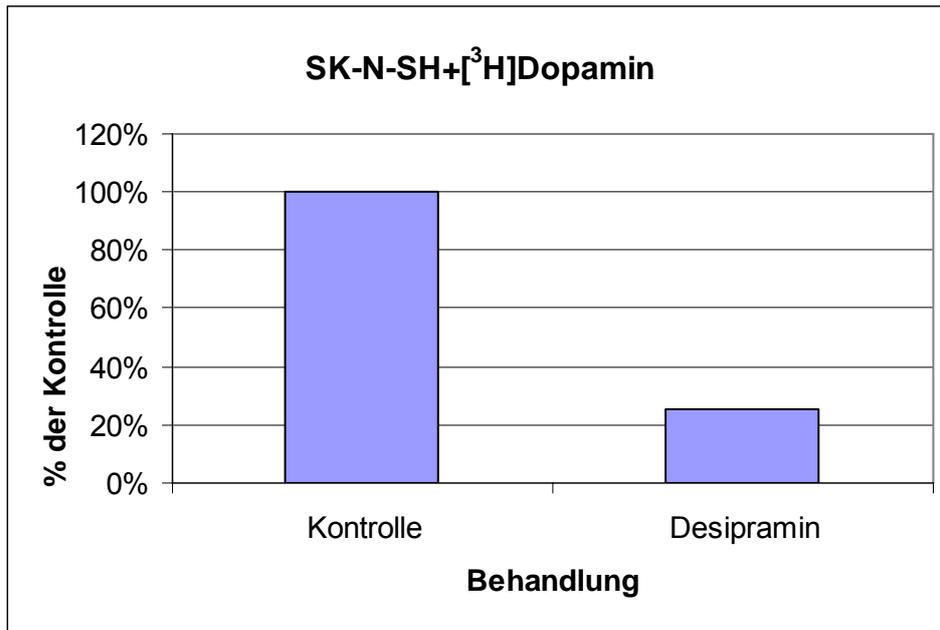


Abb. 15a: Aufnahme von [³H]Dopamin (10^{-7} mol/l) in die SK-N-SH-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin.

Kontrolle: 100 % \triangleq Aufnahme von $1,25 \times 10^{-12}$ Molen Dopamin/ 10^6 Zellen/30 min

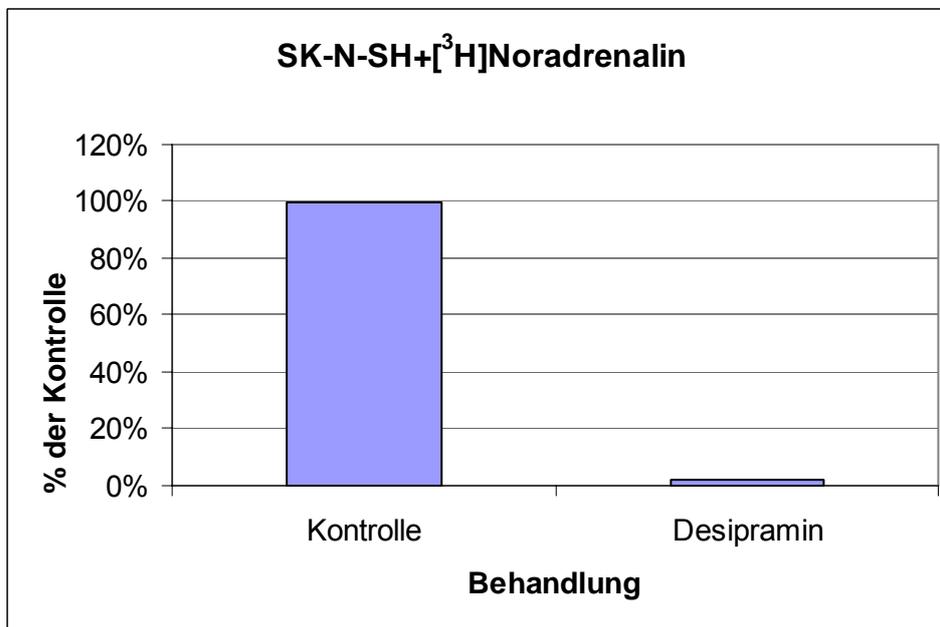


Abb. 15b: Aufnahme von [³H]Noradrenalin (10^{-7} mol/l) in die SK-N-SH-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin. Kontrolle:

100 % \triangleq Aufnahme von $1,56 \times 10^{-12}$ Molen Noradrenalin/ 10^6 Zellen/30 min

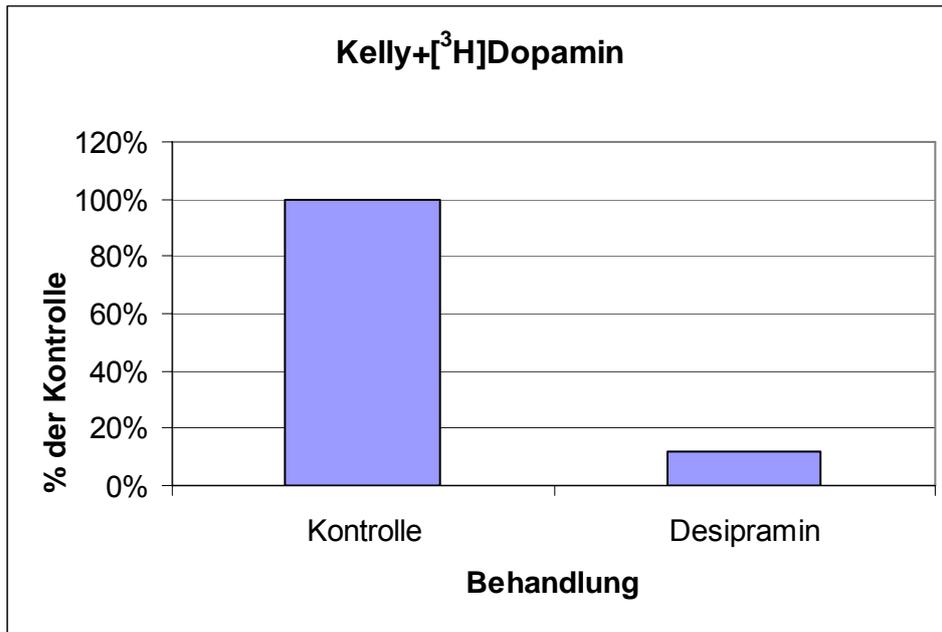


Abb. 16a: Aufnahme von [³H]Dopamin (10^{-7} mol/l) in die Kelly-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin.

Kontrolle: 100 % \triangleq Aufnahme von $6,6 \times 10^{-13}$ Molen Dopamin/ 10^6 Zellen/30 min

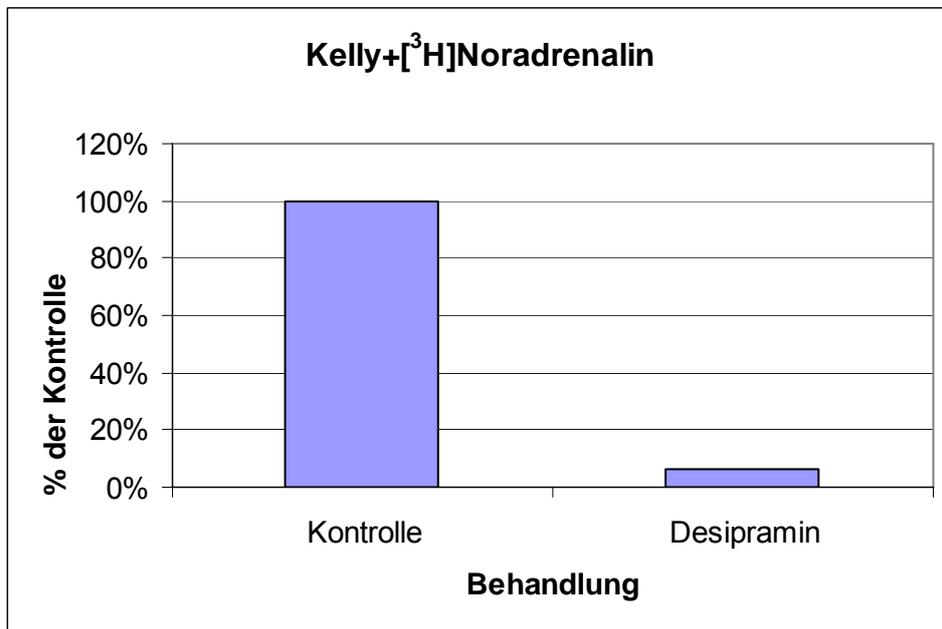


Abb. 16b: Aufnahme von [³H]Noradrenalin(10^{-7} mol/l) in die Kelly-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin.

Kontrolle: 100 % \triangleq Aufnahme von $4,39 \times 10^{-13}$ Molen Noradrenlin/ 10^6 Zellen/30 min

3.2.2 Einfluss der Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [³H]Noradrenalin

Um festzustellen, ob die Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 einen Einfluss auf die Aufnahme [³H]Noradrenalin hat, wurden beide Zelllinien SK-N-SH und Kelly mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 48-72 Stunden (Langzeitinkubation) vorbehandelt. Nach dem Auswaschen der Zytostatika wurden die überlebenden Zellen mit [³H]NA versetzt. Zur Vorbehandlung kamen Kombinationen von Zytostatikakonzentrationen zum Einsatz, die aufgrund der Voruntersuchungen (siehe 3.1.2.) ein 50-80%iges Überleben der Zellen garantieren sollten.

Zusätzlich wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen nur 4 Stunden (Kurzzeitinkubation) mit den Zytostatikakombinationen vorinkubiert wurden. In dieser Versuchsserie wurden die Zellen zum einen mit der üblichen Zytostatikakonzentration, die ein ca. 50-80%iges Überleben bei Langzeitinkubation gewährleisten sollte, zum anderen mit der 10fach höheren Konzentration behandelt. Vor der Zugabe von [³H]NA wurden die Zytostatika ausgewaschen.

Die Versuche sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

3.2.2.1 Einfluss der Kurzzeitbehandlung mit Zytostatika auf die Aufnahme von [³H]Noradrenalin

Für die Kurzzeitinkubation wurden die beiden Zelllinien SK-N-SH und Kelly 4 Stunden mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) als Suspensionskultur (einfach konzentriert und 10fach konzentriert) inkubiert.

Behandlung	einfach konzentriert (f.c.)	10fach konzentriert (f.c.)
N4 (Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid)	Vincristin: 1 nmol/l Doxorubicin: 0,03 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 5 µmol/l	Vincristin: 10 nmol/l Doxorubicin: 0,3 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 50 µmol/l
N5 (Vindesin, Etoposid, Cisplatin)	Vindesin: 0,5 nmol/l Etoposid: 20 nmol/l Cisplatin: 0,1 µmol/l	Vindesin: 5 nmol/l Etoposid: 200 nmol/l Cisplatin: 1 µmol/l
N6 (Vincristin, Doxorubicin, Ifosfamid, Dacarbazin)	Vincristin: 1 nmol/l Doxorubicin: 0,03 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 5 µmol/l Dacarbazin: 30 µmol/l	Vincristin: 10 nmol/l Doxorubicin: 0,3 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 50 µmol/l Dacarbazin: 300 µmol/l

Nach dem Auswaschen der Zytostatika kamen zu den in 500 µl Inkubationspuffer suspendierten Zellen 10 µl [³H]NA (f.c. 1 x 10⁻⁷ mol/l). Nach 30 min Inkubation wurde die Aufnahme des [³H]NA in die Neuroblastomzelle gemessen und die Ergebnisse (Hemmung der Aufnahme) auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen.

Die in den Graphiken dargestellten Werte stellen, wenn nicht anders vermerkt, Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen (einfach konzentriert) und drei unabhängigen Versuchen (10fach konzentriert) dar.

Wie aus den nachfolgenden Abbildungen ersichtlich hatte die Kurzzeit-Zytostatikavorbehandlung bei beiden Zytostatikakonzentrationen (einfach konzentriert und 10fach konzentriert) keinen signifikanten Einfluss ($p \leq 0,05$) auf die [³H]NA Aufnahme.

3.2.2.1.1 Einfluss der Kurzzeitbehandlung mit niedrig konzentrierten (einfach konzentrierten) Zytostatikakombinationen auf die Aufnahme von [³H]NA

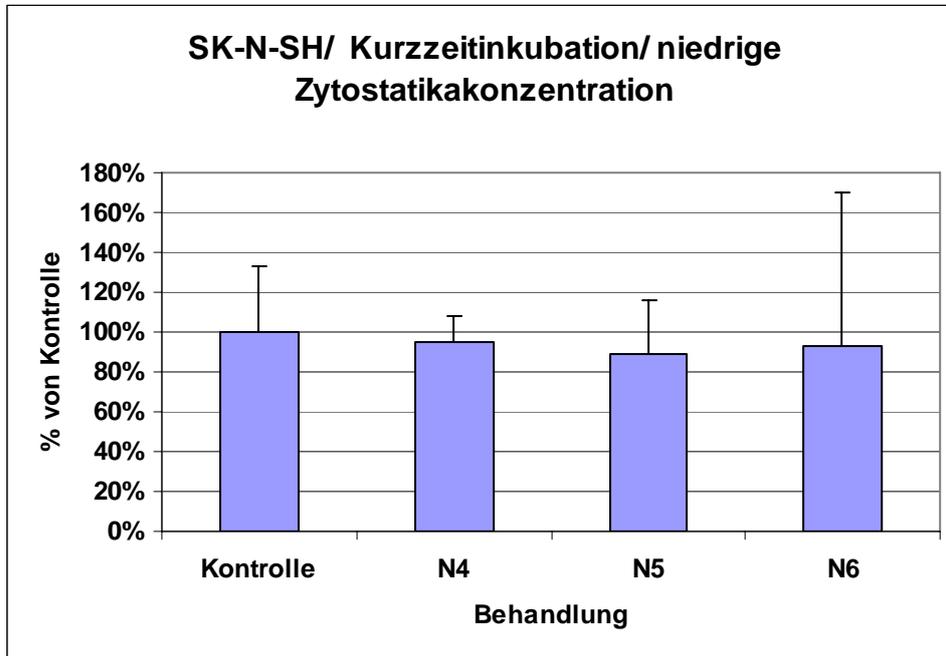


Abb. 17a: Einfluss der 4-stündigen Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³H]NA bei SK-N-SH Zellen. Kontrolle : 100 % \triangleq Aufnahme von $1,53 \times 10^{-12}$ Molen [³H]NA/ 10^6 Zellen/30 min.

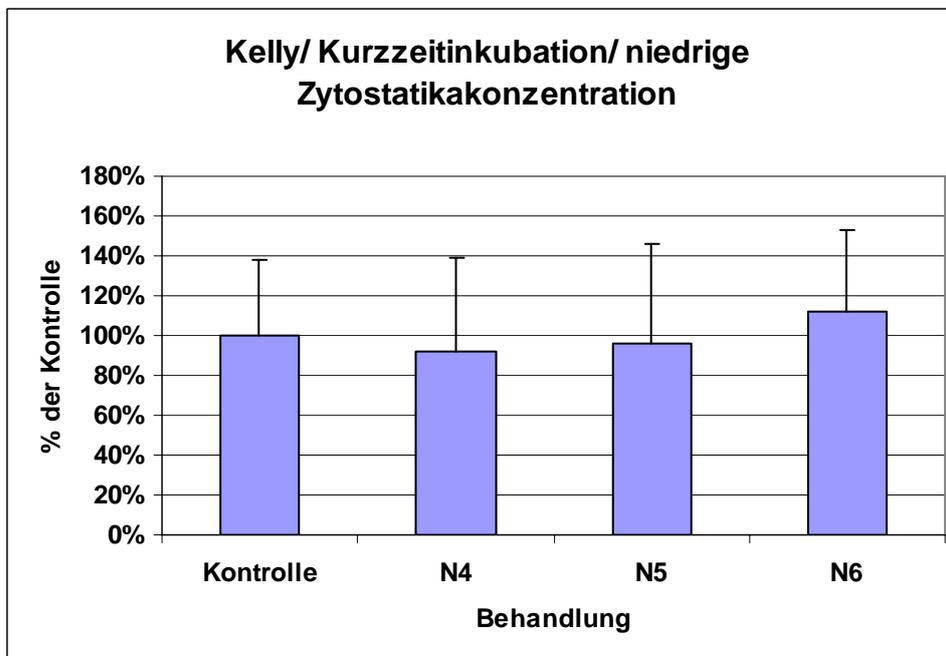


Abb. 17b: Einfluss der 4-stündigen Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³H]NA bei Kelly-Zellen. Kontrolle : 100 % \triangleq Aufnahme von $3,77 \times 10^{-13}$ Molen [³H]NA/ 10^6 Zellen/30 min.

3.2.2.1.2 Einfluss der Kurzzeitbehandlung mit hoch konzentrierten (10fach konzentrierten) Zytostatikakombinationen auf die Aufnahme von [³H]NA

Um festzustellen, ob eine höher konzentrierte Zytostatikakombination Einfluss auf die [³H]NA-Aufnahme hat, wurden die beiden Zelllinien mit der 10fach erhöhten Zytostatikakombination 4 Stunden vorbehandelt.

In der nachfolgenden Auswertung zeigt sich eine leichte, statistisch ($p \leq 0,05$) nicht signifikante, Aufnahmesteigerung von [³H]NA bei der Vorbehandlung mit der Kombination N6.

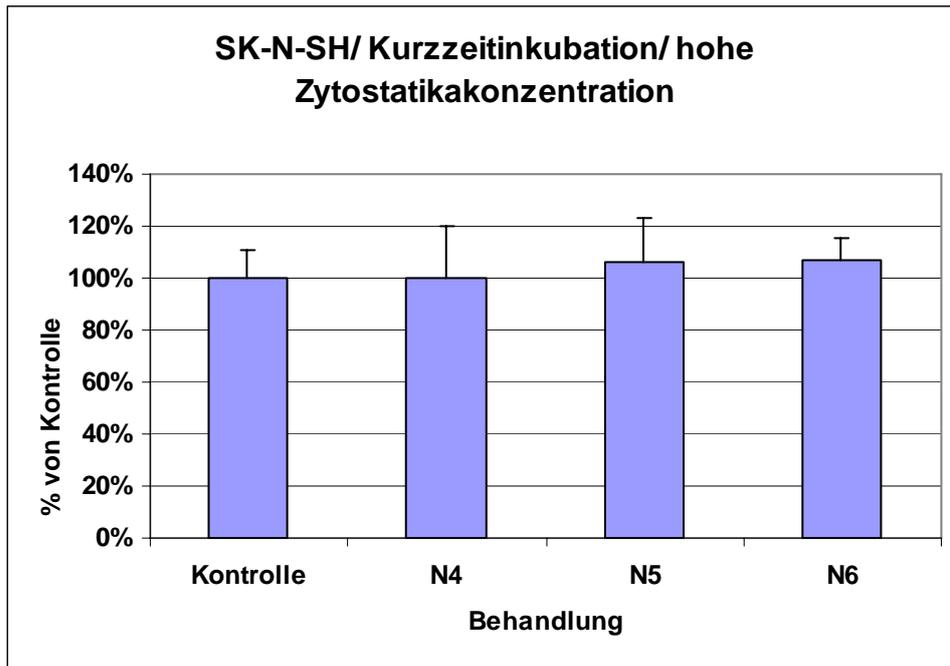


Abb. 18a: Einfluss der 4-stündigen 10fach konzentrierten Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³H]NA bei SK-N-SH Zellen. Kontrolle : 100 % \triangleq Aufnahme von $1,36 \times 10^{-12}$ Molen [³H]NA/ 10^6 Zellen/30 min.

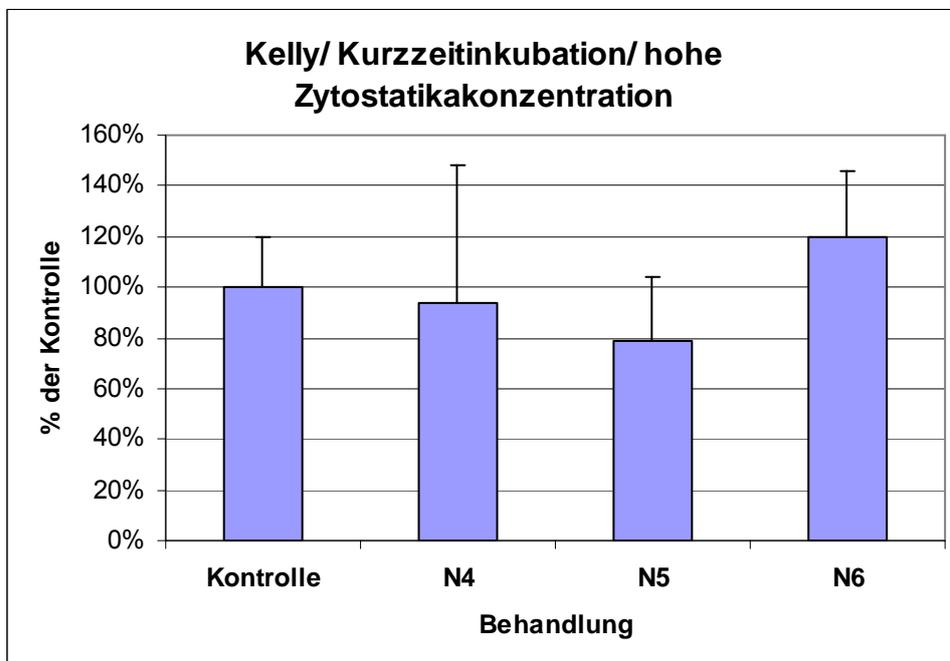


Abb. 18b: Einfluss der 4-stündigen 10fach konzentrierten Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³H]NA bei Kelly Zellen. Kontrolle : 100 % \triangleq Aufnahme von $6,2 \times 10^{-13}$ Molen [³H]NA/ 10^6 Zellen/30 min.

3.2.2.2 Einfluss der Langzeitvorbehandlung mit Zytostatika auf die Aufnahme von [³H]Noradrenalin

Um festzustellen, ob eine längere Behandlung Einfluss auf die Aufnahme von [³H]NA in die Neuroblastomzellen hat, wurden die beiden Zelllinien 48-72 Stunden mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert, anschließend wurden die Zytostatika ausgewaschen. Dann wurden zu den in 500 µl Inkubationspuffer suspendierten Zellen pro Ansatz 10 µl [³H]NA (f.c. 1 x 10⁻⁷ mol/l) zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die [³H]NA-Aufnahme in die Neuroblastomzellen gemessen und die Messergebnisse der mit Zytostatika vorbehandelten Zellen auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen.

Falls nicht anders vermerkt, stellen die in den Graphiken dargestellten Werte Mittelwerte und Standardabweichungen zweier unabhängiger Versuche dar.

Auch hier zeigte die Zytostatikavorbehandlung keinen signifikanten Effekt auf die [³H]NA-Aufnahme bzw. lässt sich lediglich eine leichte Aufnahmesteigerung bei N6 erkennen.

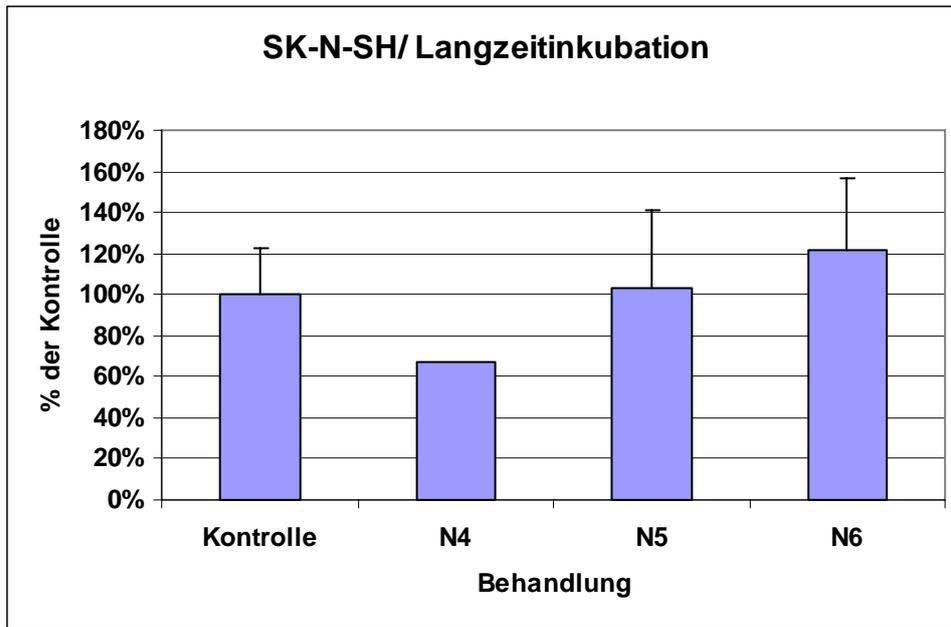


Abb. 19a: Einfluss der Zytostatikavorbehandlungen N4, N5, N6 (Langzeit) auf die Aufnahme von [³H]NA bei SK-N-SH Zellen. Kontrolle: 100 % \pm Aufnahme von $9,55 \times 10^{-13}$ Molen [³H]NA/ 10^6 Zellen/30 min. Bei N4 liegt nur ein Versuch vor.

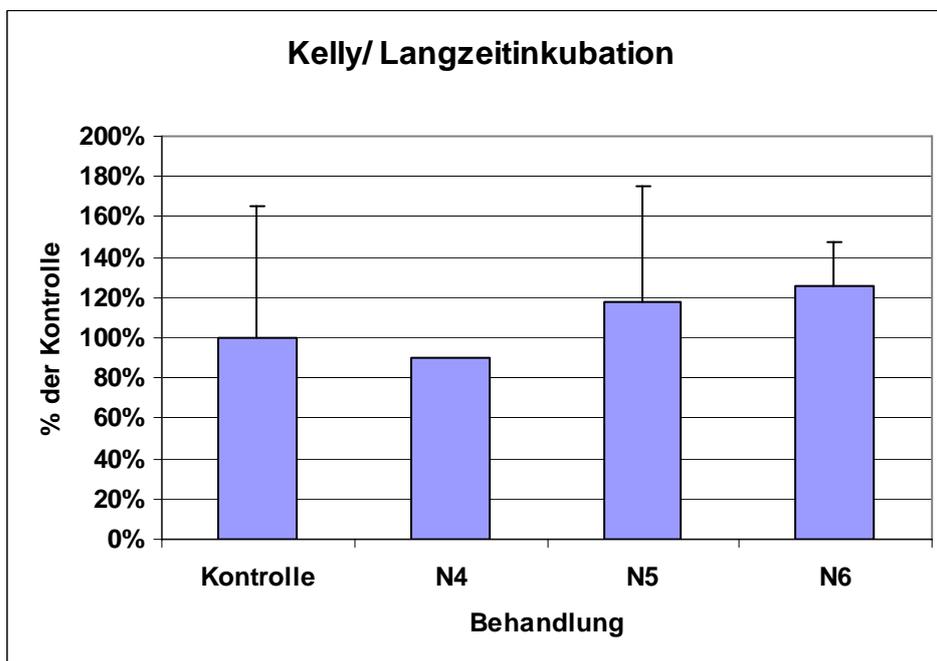


Abb. 19b: Einfluss der Zytostatikavorbehandlungen N4, N5, N6 (Langzeit) auf die Aufnahme von [³H]NA bei Kelly Zellen. Kontrolle: 100 % \pm Aufnahme von $9,1 \times 10^{-14}$ Molen [³H]NA/ 10^6 Zellen/30 min. Bei N4 liegt nur ein Versuch vor.

3.2.3 Einfluss der Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen auf die Aufnahme von [³H]Noradrenalin und deren Hemmung durch unmarkiertes mIBG

Ziel der Untersuchung dieser Arbeit in Hinblick auf die Klinik war, den Einfluß einer Zytostatikavorbehandlung auf die Aufnahme von radioiodmarkiertem mIBG zu untersuchen. Da [¹³¹I] (¹²³I) mIBG nur sehr selten zur Verfügung stand, (siehe aber 3.2.4.), wurde versucht die Auswirkungen der Zytostatikavorbehandlung auf die mIBG-Aufnahme indirekt darzustellen. Dazu wurden die mit [³H]NA behandelten Zellen in Gegenwart eines 100fach molaren Überschusses an unmarkiertem mIBG [10^{-5} mol/l] inkubiert, um die [³H]NA-Aufnahme über den NAT kompetitiv mit mIBG zu hemmen.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Zellen zum einen für 48-72 h (Langzeitinkubation) zum anderen für 4 h (Kurzzeitinkubation) mit der üblichen Zytostatikakonzentration, die ein 50-80%iges Überleben bei Langzeitinkubation gewährleisten, inkubiert. Nach der Vorbehandlung mit Zytostatika wurde die Aufnahme von [³H]NA gemessen.

Die Messergebnisse der Hemmung der [³H]NA-Aufnahme durch einen 100fach molaren Überschuss an unmarkiertem mIBG wurden auf die Ergebnisse der jeweiligen Zellen ohne Hemmstoff bezogen. Die Werte in der Tabelle stellen Mittelwerte aus 3 (Kurzzeit) bzw. 2 (Langzeit) unabhängigen Versuchen dar. Für Kontrolle N4 und Kontrolle N4 + mIBG der Langzeitbehandlung liegt nur ein Versuch vor.

In der nachfolgenden Tabelle zeigt sich, dass die [³H]NA-Aufnahme in die beiden Neuroblastomzellen SK-N-SH und Kelly durch unmarkiertes mIBG gut gehemmt wird. Des Weiteren zeigt sich, dass die Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 keinen signifikanten Effekt auf die [³H]NA-Aufnahme und deren Hemmung hat.

Es lässt sich lediglich eine leichte [³H]NA-Aufnahmesteigerung bei der Kombination N6 erkennen. (Die Hemmung mit mIBG bei der Langzeitbehandlung der Kelly-Zellen zeigt ungewöhnlich hohe Werte.)

Tab. 5: Einfluss der Zytostatikavorbereitung auf die Hemmung der [³H]NA-Aufnahme durch einen 100fach molaren Überschuss an unmarkiertem mIBG in SK-N-SH- und Kelly-Zellen

	Kurzzeit (4 h)	Kurzzeit (4 h)	Langzeit (48-72 h)	Langzeit (48-72 h)
	SK-N-SH	Kelly	SK-N-SH	Kelly
Unbehandelte Kontrolle	100 % \triangleq $1,46 \times 10^{-12}$ mole	100 % \triangleq $3,18 \times 10^{-13}$ mole	100 % \triangleq $9,55 \times 10^{-13}$ mole	100 % \triangleq $9,1 \times 10^{-14}$ mole
+mIBG	3 % \pm 0,7 %	7 % \pm 1,1 %	2,9 % \pm 1,2%	20 % \pm 8,2 %
Kontrolle N4	100 % \triangleq $1,35 \times 10^{-12}$ mole	100 % \triangleq $2,57 \times 10^{-13}$ mole	100 % \triangleq $6,41 \times 10^{-13}$ mole	100 % \triangleq $8,15 \times 10^{-14}$ mole
+mIBG	5 % \pm 1,0 %	6 % \pm 0,4 %	2,9 % \pm 0 %	31,5 % \pm 0 %
Kontrolle N5	100 % \triangleq $1,3 \times 10^{-12}$ mole	100 % \triangleq $2,75 \times 10^{-13}$ mole	100 % \triangleq $9,84 \times 10^{-13}$ mole	100 % \triangleq $1,07 \times 10^{-13}$ mole
+ mIBG	4 % \pm 1,2 %	6 % \pm 0,9 %	3,1 % \pm 1,4 %	20 % \pm 1,1 %
Kontrolle N6	100 % \triangleq $1,7 \times 10^{-12}$ mole	100 % \triangleq $3,51 \times 10^{-13}$ mole	100 % \triangleq $1,16 \times 10^{-12}$ mole	100 % \triangleq $1,15 \times 10^{-13}$ mole
+mIBG	7 % \pm 8,14 %	6 % \pm 1,0 %	3,4 % \pm 1,5 %	24 % \pm 0,5 %

Zellen wurden 48-72 Stunden (Langzeit) bzw. 4 Stunden (Kurzzeit) mit den in 3.2.2.1. beschriebenen Zytostatikakombinationen („niedrig konzentriert“) behandelt und anschließend nach Auswaschen der Zytostatika mit 10^{-7} mol/l [³H]NA inklusiv bzw. ohne 10^{-5} mol/l mIBG 30 Minuten behandelt.

100 % \triangleq Aufnahme von x Molen (siehe Tabelle) [³H]NA/ 30 min/ 10^6 Zellen.

%-Werte mIBG: geben die Menge an aufgenommenem [³H]NA im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (100 %) an.

3.2.4 Einfluss der Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5 und N6 auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG

Um festzustellen, ob die Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 einen Einfluss auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG in die Neuroblastomzellen hat, wurden die beiden Zelllinien SK-N-SH und Kelly mit den Zytostatikakombinationen, die ein etwa 50-80%iges Überleben garantierten (siehe 3.1.2), 48-72 Stunden vorbehandelt. Nach Auswaschen der Zytostatika wurden die überlebenden Zellen mit [¹³¹I]mIBG versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung der [¹³¹I]mIBG-Aufnahme in die Neuroblastomzellen. Die Messergebnisse der mit Zytostatika vorbehandelten Zellen wurden auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen. Da, im Gegensatz zu [³H]NA, bei Verwendung von Iod 131 die Radioaktivität in den Zellen direkt gemessen werden kann (ohne Lyse der Zellen durch die Aufnahme in die Szintillationsflüssigkeit), wurden nach der ersten Messung die Zellen nochmals mit Puffer aufgefüllt, 2 Stunden bei 37 °C weiter inkubiert und nochmals gemessen. So konnte bestimmt werden, wieviel des ursprünglich aufgenommenen [¹³¹I]mIBGs sich nach 2,5 Stunden noch im Zellpellet befand.

Die Grafiken stellen Ergebnisse eines Versuchs dar. Die Zytostatikavorbehandlung zeigte auch auf die [¹³¹I]mIBG Aufnahme keinen nennenswerten Effekt.

Das [¹³¹I]mIBG wurde freundlicherweise, als „Restmenge“ einer Patientenbehandlung mit [¹³¹I]mIBG, von der Nuklearmedizin Tübingen (Ärztl. Direktor Prof. Dr. R. Barres) zur Verfügung gestellt.

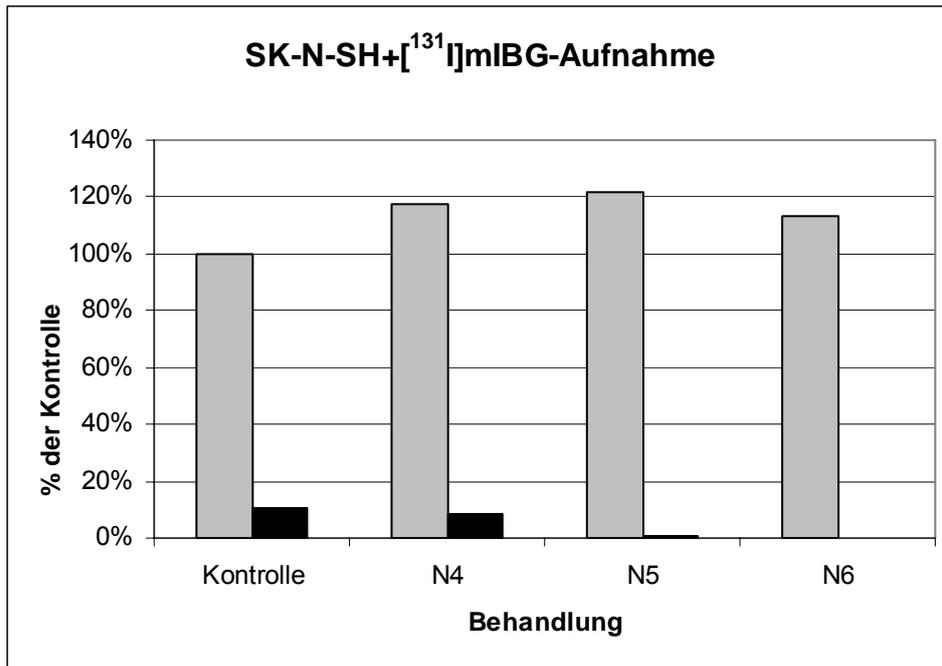


Abb. 20a: Einfluss der Zytostaktikavorbehandlung N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG und dessen Speicherung in den SK-N-SH-Zellen. 100 % \triangleq $1,19 \times 10^{-12}$ mole mIBG/ 10^6 Zellen/30 min. Der graue Balken stellt die Radioaktivität in den Zellen nach 30 min Inkubation mit 10^{-7} mol/l [¹³¹I]mIBG dar. Der schwarze Balken zeigt die verbliebene Radioaktivität in den Zellen nach 150minütiger Inkubation im Inkubationspuffer bei 37 °C.

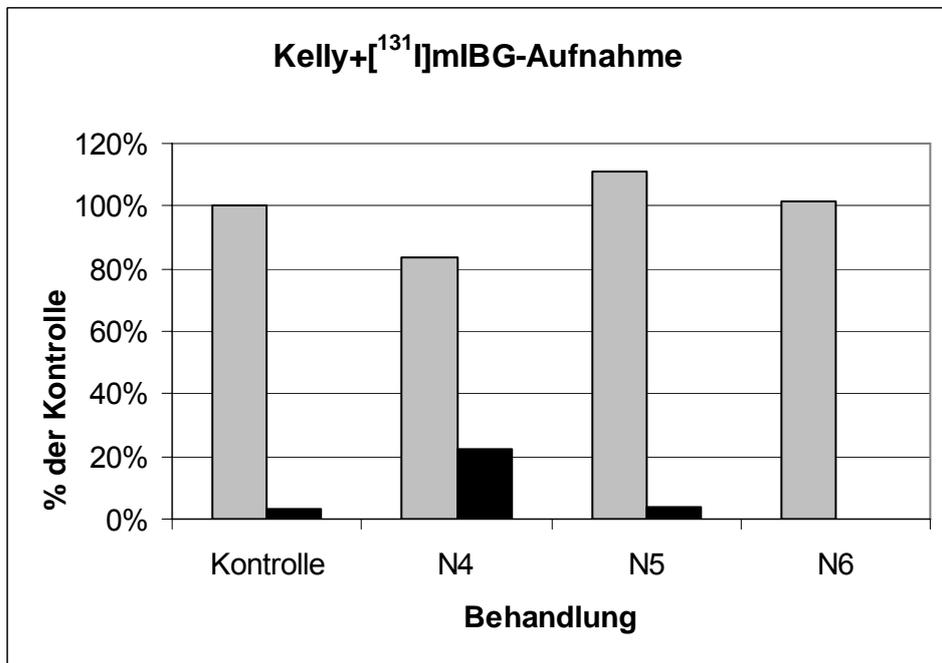


Abb. 20b: Einfluss der Zytostaktikavorbehandlung N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG und dessen Speicherung in den Kelly-Zellen. 100 % \triangleq $0,74 \times 10^{-12}$ mole mIBG/ 10^6 Zellen/30 min. Der graue Balken stellt die Radioaktivität in den Zellen nach 30 min Inkubation mit 10^{-7} mol/l [¹³¹I]mIBG dar. Der schwarze Balken zeigt die verbliebene Radioaktivität in den Zellen nach 150minütiger Inkubation im Inkubationspuffer bei 37 °C.

3.3 Einfluss der Zytostatikakombination auf die Expression des Noradrenalintransporters (RT-PCR)

Die Fähigkeit der Zellen des sympathischen Nervensystems zur Synthese von Katecholaminen ist verbunden mit der Expression eines Katecholamin-Wiederaufnahme-Systems. Der Noradrenalintransporter (NAT) ist für die Wiederaufnahme von Katecholaminen und mIBG in die Neuroblastomzelle verantwortlich. Die Behandlung mit [¹³¹I]mIBG ist im Neuroblastom-Therapieprotokoll NB 97 als eine Option neben der herkömmlichen Zytostatikatherapie aufgeführt. Jedoch sind die Therapieerfolge mit [¹³¹I]mIBG nicht eindeutig. Eine Ursache liegt darin begründet, dass nicht alle Neuroblastomzellen den NAT exprimieren. Ausserdem wird die Expression des NATs in vielfältiger Weise reguliert (Servidei et al., 1994; Wakade et al., 1996; Shikata et al., 2000) und bleibt nicht, wie früher angenommen, konstant. Deshalb wurde der Einfluss von Zytostatika auf die Expression des NATs untersucht.

SK-N-SH- und Kelly-Zellen wurden, wie unter 2.2.5.2 beschrieben, mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 vorbehandelt (Kurzzeit und Langzeit). Anschließend wurde die NAT-Expression der so vorbehandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle analysiert. Neben der Expression des NATs wurde auch die Expression weiterer Gene des Katecholaminstoffwechsels (DAT und TH) mittels RT-PCR (siehe 2.2.5.) untersucht. Nach dem Auftrennen der PCR-Produkte durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das fertige Gel mit Ethidiumbromid eingefärbt und die Banden, unter Anregung von UV-Licht, mit dem CS-1 Videoimager fotografiert. Zum Vergleich der Banden wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) als interner Standard verwendet.

Hauptziel dieser Untersuchung war, herauszufinden, ob die unterschiedliche Dauer und Konzentration der Zytostatikavorbehandlung einen Einfluss auf die NAT-Expression hat.

3.3.1 Einfluss der Kurzzeitinkubation mit Zytostatika

Die Zelllinien Kelly und SK-N-SH wurden, wie unter 2.2.5.2 beschrieben, 4 h mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 (einfach- und 10fach-konzentriert) vorbehandelt und anschließend die Expression der Gene des Noradrenalintransporters (NAT), des Dopamintransporters (DAT) und der Tyrosinhydroxylase (TH) bestimmt.

Wie in den nachfolgenden Graphiken zu sehen, variierte die Expression der einzelnen Gene leicht, je nach metabolischem Status der Zelllinie.

Bei der Expression der Gene des Katecholaminmetabolismus ohne Zytostatikavorbehandlung zeigten Kelly-Zellen (Abb. 21a, b) im Vergleich zu SK-N-SH-Zellen deutliche Signale für NAT, DAT und TH. Wohin gegen bei den SK-N-SH-Zellen nur ein deutliches Signal für den NAT, jedoch kein Signal für den DAT und TH zu sehen war.

Bei der Zytostatikavorbehandlung der Zellen zeigte sich folgender Einfluss auf die beiden Zelllinien:

Kelly Abb. 21a (Konzentration einfach)

NAT: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

DAT: bei N5 und N6 zeigt sich ein Anstieg der Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle

TH: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

Kelly Abb. 21b (Konzentration 10fach)

NAT: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

DAT: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

TH: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

SK-N-SH Abb. 21c (Konzentration einfach)

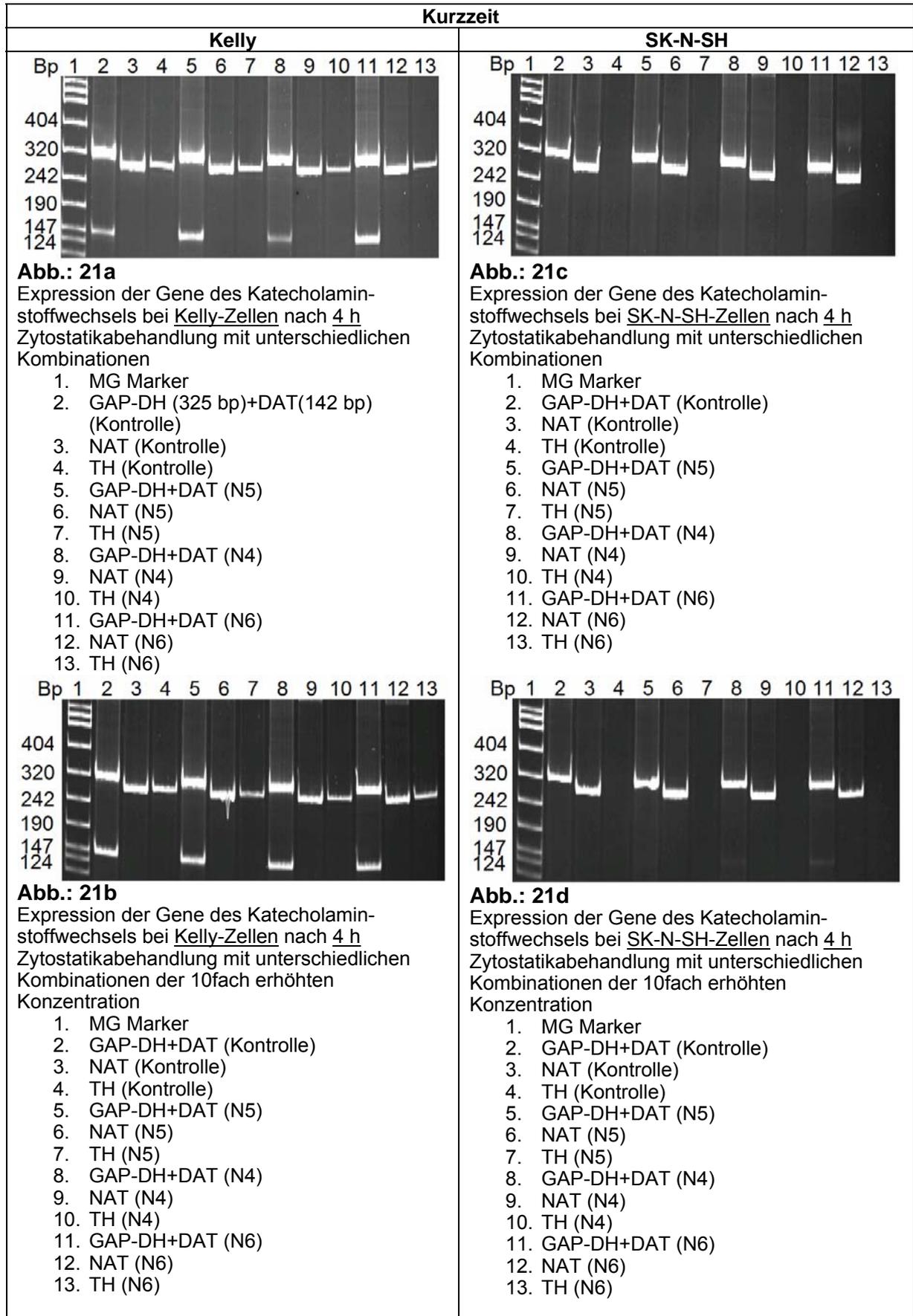
NAT: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

DAT: kein Signal

SK-N-SH Abb. 21d (Konzentration 10fach)

NAT: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

DAT: N5 und N6 zeigen minimale Signalintensität



3.3.2 Einfluss der Langzeitinkubation mit Zytostatika

Die Zelllinien Kelly und SK-N-SH wurden, wie unter 2.2.4.2 beschrieben, 48-72 h mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 vorbehandelt und anschließend die Expression der Gene des Noradrenalintransporters (NAT), des Dopamintransporters (DAT) und der Tyrosinhydroxylase (TH) bestimmt.

Wie in den nachfolgenden Graphiken zu sehen, variierte die Expression der einzelnen Gene leicht, je nach metabolischem Status der Zelllinie.

Bei der Expression der Gene des Katecholaminmetabolismus ohne Zytostatikavorbehandlung zeigen Kelly-Zellen (Abb. 22a, b) im Vergleich zu SK-N-SH-Zellen deutliche Signale für NAT, DAT und TH. Wohin gegen bei den SK-N-SH-Zellen nur ein deutliches Signal für den NAT jedoch kein Signal für den DAT und TH zu sehen war.

Bei der Zytostatikavorbehandlung der Zellen zeigte sich folgender Einfluss auf die beiden Zelllinien:

Kelly Abb. 22a (Konzentration einfach)

NAT: N6 zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Signalminderung

DAT: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

TH: N4 und N5 zeigen einen leichten Signalintensitätsanstieg im Vergleich zur Kontrolle

Kelly Abb. 22b (Konzentration 10fach)

In dieser Abbildung gab es in den Taschen 11 und 12 einen Pipettierfehler, so dass über diese Taschen keine Aussage getroffen werden kann.

NAT: Kontrolle, N4, N5, zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

DAT: Kontrolle, N4, N5, zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

TH: N4 und N5 zeigen im Vergleich zur Kontrolle leichte Signalintensitätsabfälle

SK-N-SH Abb. 22c (Konzentration einfach)

NAT: Kontrolle, N4, N5, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

DAT: leichte Signale bei Kontrolle, N4, N5, N6

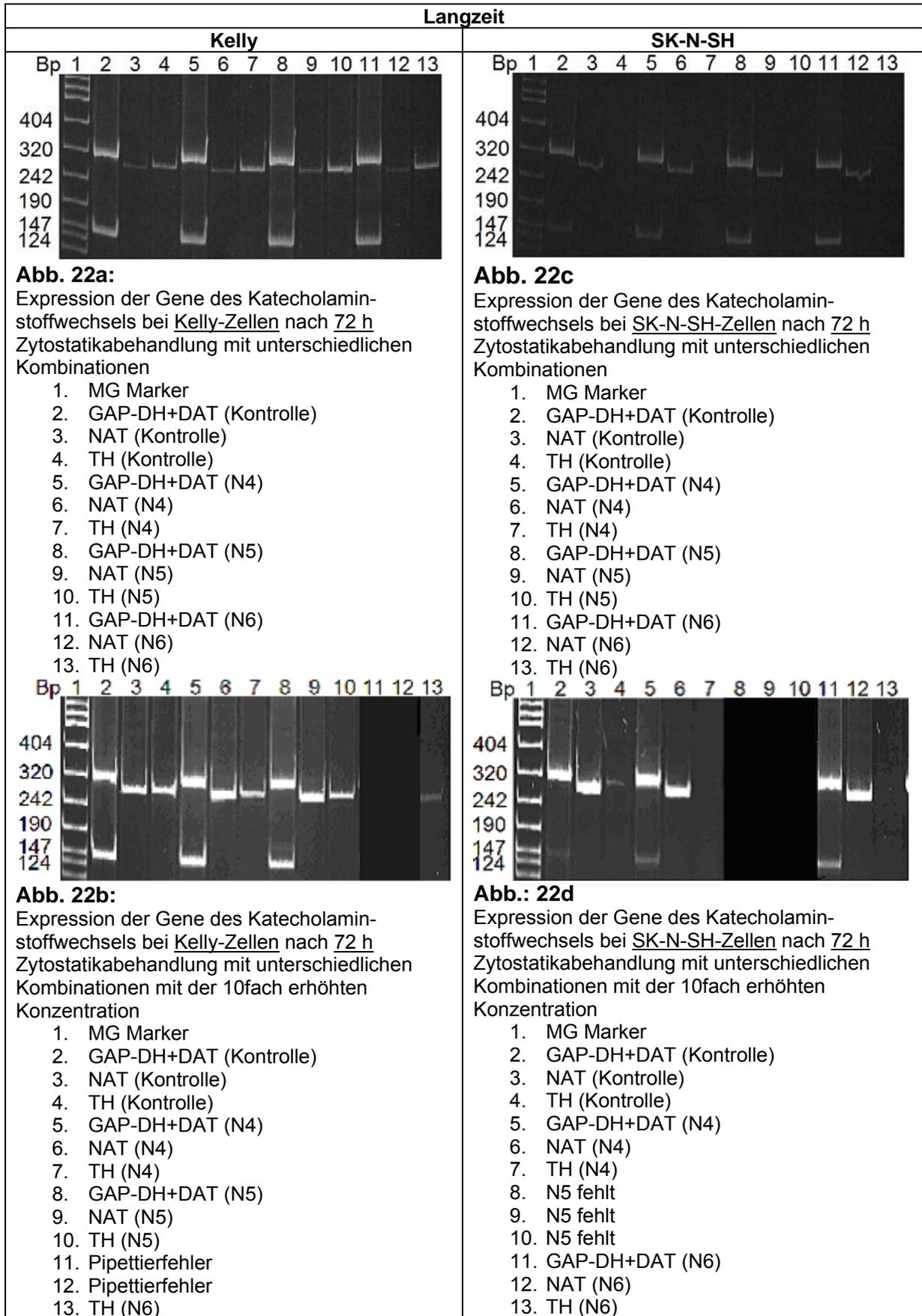
SK-N-SH Abb. 22d (Konzentration 10fach)

Bei dieser Abbildung fehlt N5

NAT: Kontrolle, N4, N6 zeigen in etwa die gleiche Signalintensität

DAT: leichte Signale bei Kontrolle, N4, N6; die Signalintensität von N6 ist im
Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigert

TH: leichtes Signal bei Kontrolle



Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 unter keinen Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die NAT-Expression hatte.

Bei den SK-N-SH zeigte sich ein Anstieg der DAT-Signalintensität unter Zytostatikavorinkubation (Langzeit) siehe Abb. 22d.

4 Diskussion

Im deutschen Neuroblastom-Therapie-Protokoll ist neben der herkömmlichen Behandlung mit verschiedenen Zytostatikakombinationen (N4, N5, N6) die Behandlung mit [¹³¹I]mIBG als eine Option vorgesehen.

Wie in der Einleitung erwähnt, war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss einer Vorbehandlung mit Zytostatikakombinationen, wie sie in der Neuroblastomtherapie verwendet werden, auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG in Neuroblastomzellen zu untersuchen.

[¹³¹I]mIBG wird über den Noradrenalintransporter (NAT) in die Neuroblastomzelle aufgenommen. Je mehr Neuroblastomzellen innerhalb eines Tumorzellverbandes den NAT exprimieren bzw. je intensiver dessen Expression in jeder einzelnen Neuroblastomzelle ist, desto erfolgreicher sollte eine Therapie mit [¹³¹I]mIBG sein. In der Literatur sind verschiedene Substanzen erwähnt, die die NAT-Expression beeinflussen, darunter Interferone, Retinsäure, Cocain, Desipramin, Dexamethason (Wakade et al., 1996; Zhu et al., 1997; Toyohira et al., 1998), aber auch Zytostatika wie Cisplatin (Armour et al., 1997) und Doxorubicin (Meco et al., 1999).

In dieser Arbeit sollte nun ermittelt werden, ob die Vorbehandlung mit Zytostatikakombinationen die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG in die Neuroblastomzellen positiv oder negativ beeinflusst, um für den klinischen Einsatz die Information zu erhalten, ob der Einsatz von [¹³¹I]mIBG zu den vorgesehenen Therapiezeitpunkten sinnvoll oder kontraindiziert ist. Dies sollte zum einen funktionell durch [¹³¹I]mIBG bzw. [³H]NA-Aufnahmeversuche, zum anderen auf molekulargenetischer Ebene durch Darstellen der NAT-Expression mittels RT-PCR untersucht werden. Da [¹³¹I]mIBG und [³H]NA beide über den Noradrenalintransporter aufgenommen werden und unmarkiertes mIBG in der Lage ist, die Aufnahme von [³H]NA kompetitiv zu hemmen, wurde der Großteil der Versuche aus praktischen Gründen mit [³H]NA (\pm 10-100fach kaltes mIBG) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde die [³H]NA-Aufnahme i.a. zu mehr als 95 % gehemmt.

Als Zytostatikakombinationen wurden die Kombinationen N4, N5, N6 aus dem Studienprotokoll NB 97 der pädiatrischen Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie verwendet. Die Konzentration der Zytostatikakombinationen wurde so gewählt, dass ein ca. 50-80%iges Überleben der Neuroblastomzellen angestrebt wurde (MTT-Test). In der Abfolge an Therapieoptionen wird in der Klinik erst die Chemotherapie eingesetzt. Wird durch diese keine totale Remission erreicht und sind noch [^{123}I]mIBG speichernde Tumorreste in der Szintigraphie sichtbar, wird mit einer [^{131}I]mIBG-Therapie begonnen. Die Neuroblastomzellen sind also schon mit Zytostatika behandelt worden, wurden durch diese aber noch nicht abgetötet.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten in vitro Untersuchungen wurden 2 humane Neuroblastomzelllinien verwendet: SK-N-SH und Kelly. SK-N-SH-Zellen zeigen eine sehr gute Expression des NATs (Carlin et al., 2003; Kuçi et al., 2002; Mairs et al., 1994). Im Gegensatz dazu zeigen Kelly-Zellen nur eine moderate Expression des NATs (Lode et al., 1995; Seitz, 2000). Im Folgenden sollen die Ergebnisse diskutiert werden, die bei der Behandlung der beiden Zelllinien mit den einzelnen Zytostatika bzw. Zytostatikakombinationen im MTT-Test erhalten wurden. Anschließend werden die Aufnahmeversuche mit [^3H]NA bzw. [^{131}I]mIBG vor und nach Zytostatikabehandlung besprochen und schließlich die RT-PCR Versuche bezüglich der Expression des NATs.

4.1 MTT-Test

Wie unter 3.1. dargestellt, wurde mittels MTT-Test erst die Konzentration der einzelnen Zytostatika und anschließend die Konzentrationen der Kombinationen an Zytostatika ermittelt, bei der ca. 50-80 % der Kelly als auch der SK-N-SH Zellen überlebten. Hier zeigte sich (siehe Abb. 4-14), dass Kelly-Zellen generell sensibler auf Zytostatikabehandlungen reagierten. Die unterschiedliche Sensibilität der Neuroblastomzellen auf Zytostatika wird auch von Spengler (Spengler et al., 1986) beschrieben. In dieser Arbeit zeigte sich, dass SK-N-SH Zellen weniger sensibel auf Vincristin und andere Antimetabolite reagierten als

andere Neuroblastomzellen. Für die hier vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass die Konzentration der Zytostatikakombination so gewählt wurde, dass bei der Behandlung nicht mehr als 50-80 % der Kelly-Zellen abgetötet wurden.

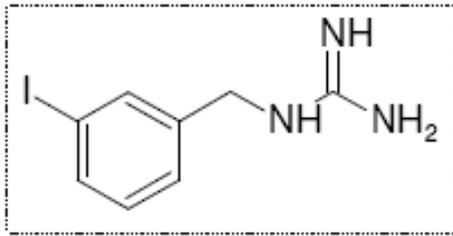
4.2 $[^3\text{H}]\text{NA}$ bzw. $[^{131}\text{I}]\text{mIBG}$ -Aufnahme

Meta-Iodbenzylguanidin ist ein Noradrenalin-Analogon (Smets et al., 1988).

Erstmals wurde mIBG zur Diagnose des Phäochromozytoms verwendet (Sisson et al., 1981). Zwei Jahre später wurde die mIBG-Aufnahme in Neuroblastomzellen von Kimming sowie von Treuner erfolgreich durchgeführt (Kimming et al., 1984; Treuner et al., 1984).

Heute wird mIBG zur Therapie ($[^{131}\text{I}]\text{mIBG}$) und Diagnostik ($[^{123}\text{I}]\text{mIBG}$) von Neuroblastomtumoren eingesetzt (Klingebiel et al., 1991+1992; Shapiro et al., 1991+1995).

Für die Aufnahme von Noradrenalin (NA) und mIBG in die verschiedenen Körperzellen gibt es zwei Aufnahmesysteme die miteinander konkurrieren. Zum einen wird NA/mIBG von Neuroblastomzellen spezifisch über den Na/K-ATPase abhängigen NAT angereichert (Lode et al., 1995; Glowniak et al., 1993), zu einem geringeren Grad auch durch einen unspezifischen Diffusionsvorgang. Ausserdem wurde die Aufnahme von NA in Nierenzellen über organische Kationen Transporter (OCT 2) (Gründemann et al., 1997+1998 a und b) und mIBG in Herzzellen (Degrado et al., 1995) über extraneuronale Monoamintransporter (EMT) beschrieben. Diese Transporter sind physiologischerweise dafür da, Katecholamine, die nicht über die Katecholaminwiederaufnahmesysteme (NAT, DAT) in die Zelle zurücktransportiert werden, aus der Blutbahn aufzunehmen. Der Vorteil des mIBGs für die Therapie besteht darin, dass es aufgrund seiner chemischen Struktur (siehe Abb. 23) nicht wie die Katecholamine durch MAO oder COMT abgebaut werden kann. Da es weder eine „reine“ Aminogruppe (Angriffspunkt von MAO), noch OH-Gruppen (Angriffspunkt für COMT) besitzt (Wieland et al., 1981; Mangner et al., 1986). Dadurch kann mIBG länger in den Zellen verweilen und besser wirken.



meta-Iodbenzylguanidin

Abb. 23: Strukturformel von meta-Iodbenzylguanidin

Da [¹²³I]mIBG sich über den Noradrenalintransporter im Tumorgewebe anreichert, können sowohl der Primärtumor als auch Metastasen dargestellt werden. Die mIBG-Szintigraphie ist eine sehr sensitive Methode und besser geeignet als das CT. Bei Patienten mit einem Neuroblastom liegt zur Diagnosestellung bei 81,8 % der Patienten ein positives mIBG-Szintigramm vor. Die Sensitivität ein Neuroblastom zu entdecken, liegt mit dem mIBG-Szintigramm bei 100 %, mit dem CT jedoch nur bei 77 % (Adolph et al., 1989). Auch gegenüber dem Somatostatinszintigramm ist das mIBG-Szintigramm bei der Tumorsuche besser (Schilling et al., 2000). In einer Arbeit von Hero (Hero et al., 2001) wurde diskutiert, ob sich die Bilder der mIBG-Szintigraphie als Verlaufsparemeter eignen würden. Es zeigte sich jedoch in dieser Studie, dass das mIBG-Szintigramm nach Chemotherapie keine Aussage über den Verlauf geben konnte: Für das Überleben des Patienten war es unbedeutend, ob das mIBG-Szintigramm unverändert war oder eine Besserung des Befundes darstellte, bei dem keine mIBG-speichernden Herde mehr entdeckt werden konnten. Die Arbeit von Hero zeigte, dass sich Plasmakatecholaminspiegel und Knochenmarksaspirate als mögliche Verlaufsparemeter für die weitere Prognose des Tumors eignen.

Im Gegensatz zur Diagnostik mit [¹²³I]mIBG ist die Therapie mit [¹³¹I]mIBG nicht so erfolgreich. [¹³¹I]mIBG kann nur durch den NAT-Transporter und nicht durch den Dopamin- oder Serotonintransporter aufgenommen werden (Glowniak et al., 1993). Diese werden allerdings bei den Neuroblastomzellen nicht oder nur gering exprimiert (Lode et al., 1995). [¹³¹I]mIBG dringt in Zellansammlungen besser ein als ¹³¹I-gelabelte Antikörper, was ein Grund für die bessere Wirkung von [¹³¹I]mIBG im Vergleich zu diesen Antikörpern sein könnte (Mairs et al., 45

1991). In einem Zellverband kann [¹³¹I]mIBG, das von NAT-exprimierenden Neuroblastomzellen aufgenommen wird, durch β/γ -Strahlung auch Nachbarzellen abtöten, die über keinen NAT verfügen. Diesen Effekt nennt man Cross-fire-Effekt (Cunningham et al., 1998; Boyd et al., 1999). Nachteil des [¹³¹I]mIBGs ist, dass der Gammastrahler Iod 131 eine relativ große Reichweite hat und daher auch umliegendes gesundes Gewebe schädigen kann. Ein sicherer Erfolg der [¹³¹I]mIBG-Therapie ist die Schmerzlinderung (Voute et al., 1988; Troncone et al., 1991). Einer der Gründe für den mäßigen Erfolg der [¹³¹I]mIBG-Therapie könnte sein, dass nicht alle Neuroblastomzellen den NAT exprimieren. Es kann z.B. sein, dass bei einem Neuroblastompatienten einige Metastasen NAT-positiv und andere NAT-negativ sind: Selbst wenn die NAT-negativen Metastasen durch [¹²³I]mIBG nicht darstellbar sind, ist der Diagnostikbefund aufgrund der anderen, [¹²³I]mIBG aufnehmenden Neuroblastomzellen, positiv (\triangleq beweisend für ein Neuroblastom). Gerade die NAT-negativen Neuroblastomzellen werden allerdings die Ursache des Nichtansprechens der Therapie mit [¹³¹I]mIBG sein. Weiterhin ist die Expression des NATs durch verschiedene Substanzen beeinflussbar, wie z.B. durch Desipramin, NGF und Dexamethason (Wakade et al., 1996; Zhu et al., 1997; Toyohira et al., 1998), Cisplatin (Armour et al., 1997) und Doxorubicin (Meco et al., 1999). In der hier vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich die Aufnahme von [³H]NA (siehe 3.2.2.) untersucht, da [³H]NA aus praktischen Gründen besser verfügbar war als [¹³¹I]mIBG und genau wie dieses über den Noradrenalintransporter in die Neuroblastomzelle aufgenommen wird.

Dass [³H]NA spezifisch über den NAT aufgenommen wird, zeigt Abb. 15 und 16. Hier wurde die Aufnahme von [³H]NA und [³H]DA, mit/ohne Hemmung des NATs durch seinen spezifischen Hemmstoff Desipramin, (Glowniak et al., 1993) verglichen. Es zeigte sich, dass es bei der Hemmung durch Desipramin zu fast keiner [³H]NA-Aufnahme kam und dass [³H]DA, das auch über den NAT sehr gut aufgenommen wird, durch Desipramin ebenfalls deutlich geringer aufgenommen wurde.

Der Vergleich zwischen SK-N-SH- und Kelly-Zellen zeigte, dass SK-N-SH-Zellen [³H]NA (siehe Tabelle 5) und [¹³¹I]mIBG (siehe Abb. 20) besser

aufnehmen als Kelly-Zellen, was in Einklang mit dem Befund steht, dass SK-N-SH-Zellen den NAT besser exprimieren als Kelly-Zellen (Kuçi et al., 2002).

Bei der Auswertung der Versuche in 3.2.2. zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der [³H]NA-Aufnahme zwischen den beiden unbehandelten und den beiden mit Zytostatika vorbehandelten Neuroblastomzellen. Außerdem hatten weder Dauer noch Dosis der Zytostatikavorbehandlung einen Einfluss auf die [³H]NA-Aufnahme. Auch bei der [¹³¹I]mIBG-Aufnahme in Abb. 20a und b zeigte sich keine Verschlechterung durch die Vorbehandlung mit den Zytostatikakombination N4, N5, N6 im Vergleich zur Aufnahme in die unbehandelten Neuroblastomzellen. Es scheint, dass die [³H]NA- bzw. [¹³¹I]mIBG-Aufnahme durch die Vorbehandlung mit Zytostatika sogar leicht gesteigert wurde (siehe Abb. 17-20).

Ein Grund für die leicht gesteigerte [¹³¹I]mIBG-Aufnahme könnte am Cisplatin liegen. In der Arbeit von Armour (Armour et al., 1997) wird beschrieben, dass Cisplatin eine gesteigerte mIBG-Aufnahme und NAT-Expression bewirkt. Darüber hinaus beschrieben Troncone (Troncone et al., 1995) und Mastrangelo (Mastrangelo et al., 1995), dass die [¹³¹I]mIBG-Therapie in Kombination mit Cisplatin effektiver sei und dass Cisplatin als „radiosensitiser“ wirke.

Andererseits zeigte Cisplatin in der Zytostatikakombination N5 in der vorliegenden Arbeit keine gesteigerte [³H]NA-Aufnahme (siehe Abb. 17-19) und nur eine leicht erhöhte [¹³¹I]mIBG-Aufnahme (siehe Abb. 20). Ein Grund für das Fehlen des positiven Effekts von Cisplatin auf die Aufnahme von [³H]NA könnte zum einen in einer Interaktion mit den anderen Zytostatika dieser Kombination liegen, zum anderen konzentrationsbedingt sein; möglicherweise wurde in der vorliegenden Arbeit eine zu niedrige Konzentration an Cisplatin eingesetzt. Des weiteren könnte es daran liegen, dass in der hier vorliegenden Arbeit andere Zellen/Zelllinien verwendet wurden als in den zuvor zitierten Arbeiten. Außer Cisplatin bewirkt auch Doxorubicin eine stärkere Akkumulation von mIBG in den Neuroblastomzellen und eine erhöhte Expression des NATs (Meco et al., 1999). In den hier vorliegenden Versuchen ist Doxorubicin in der Kombination N4 und N6 enthalten, jedoch nur N6 zeigt eine leichte Aufnahmesteigerung. Über die

anderen Zytostatika dieser Kombinationen gibt es in der Literatur keine näheren Angaben.

In der hier vorliegenden Arbeit kommt es hauptsächlich bei der Zytostatikakombination N6 zu einer gesteigerten [³H]NA- und [¹³¹I]mIBG-Aufnahme. Die Steigerung der [³H]NA-Aufnahme zeigt sich hauptsächlich bei der Kurzzeitvorbehandlung (4 h) mit der 10fachen Konzentration (Abb. 18a und b) und der Langzeitvorbehandlung (48-72 h) (Abb. 19a und b). Bei den mit N4 vorbehandelten Zellen zeigte sich eine leicht geminderte [³H]NA-Aufnahme (Abb. 18b, 19a und b).

Die Zytostatikakombinationen N4 (Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid) und N6 (Doxorubicin, Vincristin, Ifosfamid, Dacarbazin) sind bis auf das Dacarbazin identisch. In der hier vorliegenden Arbeit wurde statt Cyclophosphamid und Ifosfamid die aktivierte Form des Ifosfamids 4-Hydroperoxyifosfamid verwendet. Ifosfamid und Cyclophosphamid sind sehr ähnliche Substanzen. Sie unterscheiden sich nur durch die Position einer Chlorethylgruppe. Die Wirkungsweise beider Zytostatika ist identisch. Der einzige Unterschied liegt in der unterschiedlichen Geschwindigkeit bei der Metabolisierung in die hydroxylierte/aktivierte Form und ein unterschiedliches Nebenwirkungsspektrum. Diese Unterschiede konnten für die vorliegenden Versuche außer Acht gelassen werden, da hier mit Zellkulturen gearbeitet wurde. Beide Substanzen müssen in vivo erst in der Leber aktiviert werden. Diese Aktivierung kann von den Neuroblastomzellen nicht durchgeführt werden, weshalb hier gleich die aktivierte Substanz eingesetzt wurde. Da in der Arbeitsgruppe schon gute Erfahrungen mit 4-Hydroperoxyifosfamid gemacht wurden (Meyer et al., 1997), wurde diese Substanz für die vorliegenden Versuche verwendet. Da der einzige Unterschied der beiden Zytostatikakombinationen N4 und N6 das Zytostatikum Dacarbazin ist, wäre es für die Zukunft interessant zu wissen, ob eine Vorbehandlung allein mit Dacarbazin eine gesteigerte [¹³¹I]mIBG-Aufnahme bewirkt.

Weiterhin wurde in den vorliegenden Versuchen untersucht, ob die Vorbehandlung mit Zytostatika einen Einfluss auf die Speicherkapazität der

Neuroblastomzellen für Radioaktivität hat. Hierfür wurde die [^{131}I]mIBG Konzentration in den Zellen 150 min nach Zugabe des [^{131}I]mIBGs gemessen und die Werte der behandelten Zellen auf die der unbehandelten Zellen bezogen (Siehe Abb. 20a und b). Hierbei zeigte sich, dass die Zytostatikavorbehandlung keinen Einfluss auf die Speicherkapazität von [^{131}I]mIBG in den Neuroblastomzellen hat. Dies bestätigt die Aussage von Armour (Armour et al., 1997), der beobachtete, dass Cisplatin ebenfalls keinen Einfluss auf die Speicherkapazität von [^{131}I]mIBG in die Neuroblastomzellen hat.

Nimmt man zumindest eine gewisse Übertragbarkeit der in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturversuche mit der Situation am Patienten an, dann bedeutet dies für die Klinik, dass eine [^{131}I]mIBG-Therapie auch nach schon vorher stattgefundenener Zytostatikatherapie sinnvoll ist, da die Chemotherapie keinen negativen Einfluss auf die Aufnahme von [^{131}I]mIBG hat. Basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen scheint es nicht notwendig in der Therapieabfolge (erst Chemotherapie und dann [^{131}I]mIBG-Therapie) eine Umstellungen vornehmen zu müssen. Von einigen Autoren wird diskutiert, ob man die [^{131}I]mIBG-Therapie nicht ganz an den Anfang der Therapie stellen sollte, d.h. direkt nach der Diagnosestellung (Paffenholz et al., 1989), jedoch ist dieser Vorschlag, die [^{131}I]mIBG-Therapie vor der Chemotherapie einzusetzen, nach dem wie vorher besprochenen positiven Einfluss einiger Zytostatika, zumindest in Hinblick auf mögliche negative Effekte durch eine vorausgegangene Zytostatikabehandlung, offensichtlich nicht nötig.

4.3 PCR

Besondere Bedeutung für die Aufnahme von [^{131}I]mIBG in die Neuroblastomzelle und somit auch für den Therapieerfolg der [^{131}I]mIBG-Therapie hat die Expression des Noradrenalintransporters. Ein sehr sensitives Verfahren um die Expression des NATs bis zur Ebene der Transkription darzustellen ist die RT-PCR (Wang et al., 1989), sie gibt jedoch keinen definitiven Aufschluss darüber, ob der Transporter auch wirklich auf der Zellmembran exprimiert wird. Die

Amplifikation individueller RNA-Moleküle kann durch Kombination von reverser Transkription der RNA in cDNA und PCR erreicht werden (RT-PCR). In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression des Noradrenalintransporters NAT, der für die Wiederaufnahme von Katecholaminen bzw. die mIBG-Aufnahme in die Neuroblastomzelle verantwortlich ist, untersucht werden. Daneben wurde die Expression des DATs und der TH (Tyrosinhydroxylase) bestimmt. Die Amplifikation wurde semiquantitativ ausgewertet. Als interner Standard wurde GAP-DH verwendet.

Wie in der Arbeit von Kuçi et al. 2002 beschrieben, exprimieren SK-N-SH und Kelly-Zellen den Noradrenalintransporter. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NAT-Expression bei Kelly und SK-N-SH-Zellen weder durch die Konzentration (einfache und 10fache Konzentration) noch durch die Dauer (4 h und 48-72 h) der Inkubation der verschiedenen Zytostatikakombinationen beeinflusst wurde (siehe Abb. 21 und 22). Über die unterschiedlich hohe Expression des NATs beider Zelllinien kann in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden, da die PCR-Ergebnisse nur semiquantitativ ausgewertet wurden und sich hier kein Unterschied ergibt (siehe Abb. 21 und 22). Die durch die Zytostatikakombinationen nicht beeinflusste NAT-Expression in SK-N-SH- und Kelly-Zellen steht in Zusammenhang mit der unveränderten [¹³¹I]mIBG-Aufnahme in die Neuroblastomzellen. Dieser Zusammenhang zwischen der NAT-Expression und der mIBG-Aufnahme wurde auch von Lode et al. 1995 und Amour et al. 1997 beschrieben.

In der Arbeit von Carlin (Carlin et al., 2003) wird diskutiert, ob man die Expression des Noradrenalintransporters mit Hilfe der real-time PCR als prognostischen Faktor für den Erfolg der [¹³¹I]mIBG-Therapie bzw. für die [¹³¹I]mIBG-Aufnahme in die Neuroblastomzelle heranziehen kann. Eine PCR wäre schneller und einfacher durchführbar als ein mIBG-Szintigramm. Bei der Auswertung zeigte sich, dass bei einer vorhandenen NAT-Expression die mIBG-Aufnahme in die Zelle gut funktioniert, jedoch ein Fehlen der NAT-Expression bedeutete nicht, dass der Tumor kein [¹³¹I]mIBG aufnahm.

Ein weiterer Ansatz in der Literatur, um die [¹³¹I]mIBG-Aufnahme in vitro zu steigern, ist die Gentherapie. In der Arbeit von Boyd (Boyd et al., 1999) wird

versucht, den Noradrenalintransporter auch in Zellen einzubauen, die normalerweise den Noradrenalintransporter nicht synthetisieren um somit die [¹³¹I]mIBG-Therapie auch für andere Tumoren einsetzen zu können. Die Arbeit zeigte, dass Zellen die vorher keinen NAT besaßen und folglich auch kein mIBG aufnehmen konnten, nach der in vitro Gentherapie mIBG aufnehmen. Dieser Ansatz ist in der klinischen Praxis jedoch schlecht anwendbar, da man die Gene nicht selektiv in die gewünschten Neuroblastomzellen einbauen kann.

4.4 Fazit

Die hier dargestellten in vitro Versuche zeigten, dass die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG/ [³H]NA nicht negativ durch die Zytostatikavorbehandlung beeinflusst wurde sondern sogar eher positiv. Somit besteht zumindest auf der Basis dieser Versuche und den Daten aus der Literatur kein Grund die Therapieabfolge wie sie z. Z. besteht (erst Chemotherapie danach [¹³¹I]mIBG-Therapie) umzustellen. In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob es einzelne Zytostatika gibt, die die [¹³¹I]mIBG-Aufnahme in Neuroblastomzellen verschlechtern oder verbessern, wie dies für das Cisplatin in der Arbeit von Armour (Armour et al., 1997) beschrieben wurde. Es wurde vor allem besonderer Wert auf die Zytostatikakombinationen, wie sie klinisch beim Neuroblastom eingesetzt werden, gelegt. Das Zytostatikum Dacarbazin könnte in Zukunft besondere Beachtung finden, da sich bei den hier vorliegenden Versuchen eine leichte Aufnahmesteigerung bei der Zytostatikakombination N6 zeigte. Diese unterscheidet sich von der Zytostatikakombination N4 (leicht abgeschwächte Aufnahme) nur durch das Zytostatikum Dacarbazin. Es wäre interessant die Vorbehandlung der Neuroblastomzellen mit Dacarbazin, im Vergleich zu einer Vorbehandlung mit Cisplatin und einer Vorbehandlung mit Doxorubicin zu untersuchen, um so eine Aussage für die Klinik treffen zu können, welche Kombination vor einer [¹³¹I]mIBG-Therapie am besten geeignet ist.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kelly und SK-N-SH Zellen den NAT exprimieren. SK-N-SH Zellen nahmen im Vergleich zu den Kelly Zellen mehr [¹³¹I]mIBG bzw. [³H]NA auf. Dies liegt an der vermutlich

höheren Expression des NATs bei den SK-N-SH-Zellen (in der hier vorliegenden Arbeit wurde keine quantitative Aussage zur NAT-Expression getroffen). Durch die unveränderte Expression des NATs nach Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen N4, N5, N6 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und der unveränderten [¹³¹I]mIBG-Aufnahme (keine signifikante Steigerung oder Minderung der Aufnahme) (siehe Abb. 20a und b) nach Vorbehandlung derselben Zytostatikakombinationen kann ein Zusammenhang zwischen der NAT-Expression der Neuroblastomzelle und der Aufnahme von [¹³¹I]mIBG angenommen werden. Für die Zukunft wäre interessant zu untersuchen, wie man die NAT-Expression steigern könnte, um die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG zu steigern und einen besseren Therapieerfolg zu erzielen. In der Arbeit von Kippenberger (Kippenberger et al., 1999) wurde gezeigt, dass ein Grossteil der NAT von PC-12 Phäochromozytomzellen sich primär in den Speichervesikeln und nicht an der Zellmembran befindet. Ist dies repräsentativ für die Neuroblastomzellen so wäre es interessant, ob und wie man den Transport des NATs aus den Speichervesikeln an die Zellmembran beeinflussen könnte. Allerdings muss angemerkt werden, dass Neuroblastomzellen im Vergleich zu Phäochromocytomzellen generell weniger Speichervesikel besitzen. Eine Expression des DATs konnte hauptsächlich bei den Kellyzellen beobachtet werden (siehe Abb. 21 und 22). Hier zeigte sich, dass die Zytostatikavorinkubation keinen Einfluss auf die Genexpression hatte. Bei den SK-N-SH Zellen, die normalerweise den DAT nicht exprimieren (siehe Abb. 21c und d), zeigte sich nach Langzeit-Vorinkubation mit beiden Konzentrationen (einfach- und 10fach-konzentriert) ein leichtes Signal bei allen Zytostatikakombinationen (siehe Abb. 22c und d).

5 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters. Es geht aus dem sympathischen Nervengewebe hervor, seine Zellen sind mit den chromaffinen Zellen verwandt. Sein biochemisches Merkmal ist die Katecholaminsynthese. Der für die Katecholaminwiederaufnahme verantwortliche Noradrenalintransporter NAT ist in der Klinik sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie des Neuroblastoms sehr wichtig. Die Diagnostik kann mit Hilfe des [¹²³I]mIBGs erfolgen. Auch in der Behandlung des Neuroblastoms gibt es neben der herkömmlichen Therapie mit Zytostatika die Option der Behandlung mit [¹³¹I]mIBG. mIBG wird über zwei verschiedene Transportwege in die Neuroblastomzelle aufgenommen - zum einen über den Noradrenalintransporter zum anderen über unspezifische Diffusionsvorgänge. Die Prognose bzw. die Therapieerfolge für Neuroblastompatienten sind altersabhängig im Stadium IV eher schlecht. Ein Grund für die schlechten Therapieerfolge der [¹³¹I]mIBG-Therapie liegt daran, dass nicht alle Neuroblastomzellen den Noradrenalintransporter exprimieren bzw. dessen Expression nicht konstant sondern in vielfältiger Weise beeinflussbar ist.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Zytostatikavorbehandlung mit den klinisch verwendeten Kombinationen N4: Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, N5: Vindesin, Etoposid, Cisplatin, N6: Vincristin, Doxorubicin, Ifosfamid, Dacarbazin, einen Einfluss auf die Aufnahme von [¹³¹I]mIBG in die Neuroblastomzellen SK-N-SH und Kelly haben.

Aus praktischen Gründen wurde in der hier vorliegenden Arbeit statt [¹³¹I]mIBG hauptsächlich [³H]NA verwendet. [³H]NA wird wie mIBG spezifisch über den NAT in die Neuroblastomzelle aufgenommen. SK-N-SH-Zellen nahmen [³H]NA besser auf als Kelly-Zellen, was wahrscheinlich an der höheren NAT-Expression der SK-N-SH-Zellen liegt. Die Aufnahme von [³H]NA wurde in Anwesenheit von Desipramin (Hemmstoff des NATs) und in Gegenwart eines 10-100fach molaren Überschuss an mIBG fast vollständig gehemmt. Vor den Aufnahmeversuchen mit Zytostatika-vorbehandelten Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Tests ermittelt, welchen Effekt verwendete Zytostatikakonzentrationen auf

das Überleben der Zellen hatten. Hierzu wurden erst die Einzelsubstanzen und dann die Kombinationen getestet. Dabei zeigte sich, dass Kellyzellen sensibler auf die Zytostatikavorbehandlung reagierten als die SK-N-SH-Zellen. Für die nachfolgenden Aufnahmeversuche wurden die Zytostatikakonzentrationen verwendet, die ein annäherungsweise 50-80%iges Überleben der Zellen gewährleisteten. Bei der Untersuchung der [³H]NA-Aufnahme nach Zytostatikavorinkubation unterschiedlicher Dauer (Kurzzeit: 4 h, Langzeit: 48-72 h) und unterschiedlicher Konzentration [einfach (Konzentration bei der ca. 50-80 % der Zellen überlebten) und der 10fachen Konzentration] zeigte sich, dass die Dauer und Konzentration der Zytostatikavorbehandlung keinen negativen Einfluss auf die [³H]NA-Aufnahme hatte. Nur bei der Zytostatikakombination N6 kam es zu einer leichten Aufnahmesteigerung. Bei den anderen Kombinationen gab es keine positiven oder negativen Auffälligkeiten. Wurde [¹³¹I]mIBG anstelle von [³H]NA für die Aufnahmeversuche verwendet, erhielt man ganz analoge Ergebnisse. Auch die Speicherkapazität für [¹³¹I]mIBG wurde durch die Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen nicht beeinflusst. Bei den RT-PCR Untersuchungen zeigte sich, dass die Expression des NATs durch die Vorbehandlung mit den unterschiedlichen Zytostatikakombinationen unverändert blieb.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vorbehandlung mit den Zytostatikakombinationen keinen negativen Einfluss auf die [³H]NA/ [¹³¹I]mIBG-Aufnahme zeigte. Nimmt man eine Übertragbarkeit dieser Versuche auf die Klinik an, ergibt sich keine Notwendigkeit, die Reihenfolge der Therapieabläufe, wie sie z. Z. bestehen, zu ändern bzw. bestimmte Zytostatikakombinationen nicht mehr für die Therapie der Neuroblastome zu verwenden. Auffällig war hingegen die leichte Steigerung der [³H]NA- und [¹³¹I]mIBG-Aufnahme bei Vorinkubation der Zellen mit der Zytostatikakombination N6 (Doxorubicin, Vincristin, Ifosfamid, Dacarbazin), was wahrscheinlich auf Dacarbazin zurückzuführen ist. In einem zukünftigen Projekt sollte deshalb die Wirkung dieses Zytostatikums auf die mIBG-Aufnahme und die NAT-Expression untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

Adolph J, Kimmig B. Diagnosis and therapy of neuroectodermal tumors. *Radiologe*. 1989; 29(1):32-42.

Ambros PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, Ladenstein R, Fink FM, Horcher E, Printz G, et al. Regression and progression in neuroblastoma. Does genetics predict tumour behaviour? *Eur J Cancer*. 1995; 31A(4):510-515.

Armour A, Cunningham SH, Gaze MN, Wheldon TE, Mairs RJ. The effect of cisplatin pretreatment on the accumulation of MIBG by neuroblastoma cells in vitro. *Br J Cancer*. 1997; 75(4):470-476.

Berthold F. Kooperative multizentrische Therapieoptimierungsstudie für die Behandlung von Säuglingen, Kindern und Jugendlichen mit Neuroblastom (Neuroblastomstudie NB 97). Studienprotokoll vom 30.09.1998

Bolster AA, Hilditch TE, Wheldon TE, Gaze MN, Barrett A. Dosimetric considerations in ¹³¹I-MIBG therapy for neuroblastoma in children. *Br J Radiol*. 1995; 68 (809):481-490.

Boyd M, Cunningham SH, Brown MM, Mairs RJ, Wheldon TE. Noradrenaline transporter gene transfer for radiation cell kill by ¹³¹I meta-iodobenzylguanidine. *Gene therapy*. 1999;6(6):1147-1152.

Brock N, Hoefler-Janker H, Hohorst HJ, Scheef W, Schneider B, Wolf HC. Die Aktivierung von Ifosfamid an Mensch und Tier. *Arzneimittelforschung*. 1973; 23(1):1-14.

Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1988; 6(12):1874-1881.

Carlin S, Mairs RJ, McCluskey AG, Tweddle DA, Sprigg A, Estlin C, Board J, George RE, Ellershaw C, Pearson AD, Lunec J, Montaldo PG, Ponzoni M, van Eck-Smit BL, Hoefnagel CA, van den Brug MD, Tytgat GA, Caron HN. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for prediction of the uptake of meta-[(¹³¹I)]iodobenzylguanidine by neuroblastoma tumors. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(9):3338-3344.

Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bokkerink J, Egeler M et al.: Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996; 334(4):225-230.

Christiansen H, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe HJ, Lampert F. Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1995; 31A(4):541-544.

Cunningham SH, Mairs RJ, Wheldon TE, Welsh PC, Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Toxicity to neuroblastoma cells and spheroids of benzylguanidine conjugated to radionuclides with short-range emissions. *Br J Cancer*. 1998; 77(12):2061-2068.

Dechant KL, Brogden RN, Pilkington T, Faulds D. Ifosfamide/mesna. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. *Drugs*. 1991; 42(3):428-467.

Degrado TR, Zalutsky MR, Vaidyanathan G. Uptake mechanisms of meta-[123I]iodobenzylguanidine in isolated rat heart. *Nucl Med Biol*. 1995; 22(1):1-12.

DiMaggio JR, Brown R, Baile WF, Schapira D. Hallucinations and ifosfamide-induced neurotoxicity. *Cancer*. 1994; 73(5):1509-1514.

Ekert H., 1982

Leukemias.

In: Paediatric Haematology and Oncology, Ekert, H., (hersg.). Blackwell Scientific Publications.

Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. *Children's cancer study group A. Cancer*. 1971; 27(2):374-378.

Fonkalsrud EW, Feig SA, Weisenburger TH, 1985.

Neuroblastoma.

In: *Cancer treatment*; Haskell, C.M. (Hrsg.)

2. Aufl., W.B. Saunders Company, p 618-624.

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage; Mai 2001:949-983.

Glowniak JV, Kilty JE, Amara SG, Hoffman BJ, Turner FE. Evaluation of metaiodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine and serotonin transporters. *J Nucl Med*. 1993;34(7):1140-1146.

Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Örding N, Schmidt A, Schömig E.

Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *J Biol Chem*. 1997; 272(16):10408-10413.

Gründemann D, Köster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, Obermüller N, Schömig E. Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem*. 1998a; 273(47):30915-30920.

- Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci.* 1998b; 1(5):349-351.
- Harms D, Wilke H. [Grading procedures for neuroblastoma]. *Klin Padiatr.* 1979; 191(2):228-233.
- Hero B, Hunneman DH, Gahr M, Berthold F. Evaluation of catecholamine metabolites, mIBG scan and bone marrow cytology as response markers in stage 4 neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36(1):220-223.
- Hughes M, Marsden HB, Palmer MK. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer.* 1974; 34:1706-1711.
- Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J:
Jahresbericht 1995 des deutschen Kinderkrebsregisters.
1996.
- Kimmig B, Brandeis WE, Eisenhut M, Bubeck B, Hermann HJ, zum Winkel K. Scintigraphy of neuroblastoma with I-131 metaiodobenzylguanidine. *J Nucl Med.* 1984; 25(7):773-775.
- Kippenberger AG, Palmer DJ, Comer AM, Lipski J, Burton LD, Christie DL. Localization of the noradrenaline transporter in rat adrenal medulla and PC12 cells: evidence for its association with secretory granules in PC 12 cells. *J Neurochem.* 1999; 73(3):1024-1032.
- Klingebiel T, Berthold F, Treuner J, Schwabe D, Fischer M, Feine U, Maul FD, Walters W, Wehinger H, Niethammer D. Metaiodobenzylguanidine (mIBG) in treatment of 47 patients with neuroblastoma: results of the German Neuroblastoma Trial. *Med Pediatr Oncol.* 1991; 19(2):84-88.
- Klingebiel T, Reuland P, Feine U, Niethammer D. [Follow-up evaluation of metastatic neuroblastoma using high dose [¹³¹I-meta]iodobenzylguanidine]. *Nuklearmedizin.* 1992; 31(6):209-212.
- Kuçi Z, Bruchelt G, Seitz G, Karov Y, Or R, Handgretinger R, Niethammer D, Hahn T. Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. *Anticancer Res.* 2002; 22(6c):4325-4329.
- Lode HN, Bruchelt G, Seitz G, Gebhardt S, Gekeler V, Niethammer D, Beck J. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastoma cell lines: correlations to metaiodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression. *Eur J Cancer.* 1995; 31A(4):586-590.
- Loehrer PJ Sr. The history of ifosfamide. *Semin Oncol.* 1992; 19:2-6.
-

Lopez-Ibor B, Schwartz AD. Neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am.* 1985; 32(3):755-778.

Mairs RJ, Angerson W, Gaze MN, Murray T, Babich JW, Reid R, McSharry C. The distribution of alternative agents for targeted radiotherapy within human neuroblastoma spheroids. *Br J Cancer.* 1991; 63(3):404-409.

Mairs RJ, Livingstone A, Gaze MN, Wheldon TE, Barrett A. Prediction of accumulation of ¹³¹I-labelled metaiodobenzylguanidine in neuroblastoma cell lines by means of reverse transcription and polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1994; 70(1):97-101.

Mangner TJ, Tobes MC, Wieland DW, Sisson JC, Shapiro B. Metabolism of iodine-131 metaiodobenzylguanidine in patients with metastatic pheochromocytoma. *J Nucl Med.* 1986; 27(1): 37-44.

Mastrangelo S, Tornesello A, Diociaiuti L, Riccardi R, Rufini V, Troncone L. Treatment with meta-[¹³¹I]iodobenzylguanidine and cisplatin in stage IV neuroblastoma. *Q J Nucl Med.* 1995; 39:69-71.

Meco D, Lasorella A, Riccardi A, Servidei T, Mastrangelo R, Riccardi R. Influence of cisplatin and doxorubicin on ¹²⁵I-meta-iodobenzylguanidine uptake in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer.* 1999; 35(8):1227-1234.

Meyer T, Wierse G, Weinrebe W, Treuner J, Niethamer D, Bruchelt G. Effects of cyclophosphamide and ifosfamide on neuroblastoma cells before and after activation by microsomes. *Anticancer Res.* 1997; 17(2A):981-986.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.

Munshi NC, Loehrer PJ, Williams SD, Langefeld C, Sledge G, Nichols CR, Roth BJ, Neuman A, Walsh WB, Einhorn LH. Comparison of N-acetylcysteine and mesna as uroprotectors with ifosfamide combination chemotherapy in refractory germ cell tumors. *Invest New Drugs.* 1992; 10(3):159-163.

Paffenholz V, Ebener U, Kornhuber B. Uptake and release of iodine-labelled m-iodobenzylguanidine in a neuroblastoma cell culture system and its importance in neuroblastoma therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1989; 115(3):269-275.

Poplack, D.G., Blatt, J., 1982.
Neuroblastoma.

In: *Cancer in young children*; Levine, A.S. (Hrsg.).
Masson Publishing, USA, Inc, p663-681.

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1983; 71: 741-747.

Ross RA, Biedler JL. Presence and regulation of tyrosinase activity in human neuroblastoma cell variants in vitro. *Cancer Res.* 1985; 45(4):1628-1632.

Rutgers M, Buitenhuis CK, van der Valk MA, Hoefnagel CA, Voute PA, Smets LA. [(131)I] and [(125)I] metaiodobenzylguanidine therapy in macroscopic and microscopic tumors: a comparative study in SK-N-SH human neuroblastoma and PC 12 rat pheochromocytoma xenografts. *Int J Cancer.* 2000; 90(6):312-325.

Schilling FH, Bihl H, Jacobsson H, Ambros PF, Martinsson T, Borgstrom P, Schwarz K, Ambros IM, Treuner J, Koger P. Combined (111)In-pentetreotide scintigraphy and (123)I-mIBG scintigraphy in neuroblastoma provides prognostic information. *Med Pediatr Oncol.* 2000 Dec;35(6):688-691

Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J, Zorn U, Michaelis J. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med.* 2002; 346(14): 1047-1053.

Seeger RC, Siegel SE, Sidell N. Neuroblastoma: clinical perspectives, monoclonal antibodies, and retinoic acid. *Ann Intern Med.* 1982; 97:873-884.

Seitz G. Wachstum und Ferritinsynthese der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH unter dem Einfluss pro- und anti-oxidativer Agenzien. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen, 1994.

Seitz G. Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung von Neuroblastomzelllinien und klinischen Tumorproben – Catecholaminstoffwechsel, oxidativer Streß und Zelltod. Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen, 2000.

Servidei T, Lasorella A, Iavarone A, Riccardi R, Mastrangelo R. MIBG uptake is increased by neuronal differentiation of neuroblastoma (NB) cells induced by retinoic acid (RA) and nerve growth factor (NGF). *Pogr Clin Biol Res* 1994; 385:428.

Shapiro B. Summary, conclusions, and future directions of [131I]metaiodobenzylguanidine therapy in the treatment of neural crest tumors. *J Nucl Biol Med.* 1991; 35:357-363.

Shapiro B, Sisson JC, Shulkin BL, Gross MD, Zempel S. The current status of radioiodinated metaiodobenzylguanidine therapy of neuro-endocrine tumors. *Q J Nucl Med.* 1995; 39:55-57.

Shikata A, Shikata T, Sotozono Y, Hosoi H, Matsumura T, Sugimoto T, Sawada T. Neuronal differentiation in human neuroblastoma cells by nerve growth factor following TrkA up-regulation by interferon-gamma. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 34(6):394-401.

Sisson JC, Frager MS, Valk TW, Gross MD, Swanson DP, Wieland DM, Tobes MC, Beierwaltes WH, Thompson NW. Scintigraphic localization of pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 1981; 305:12-17.

Smets LA, Bout B, Wisse J. Cytotoxic and antitumor effects of the norepinephrine analogue meta-iodo-benzylguanidine (MIBG). *Cancer Chemother Pharmacol.* 1988; 21(1):9-13.

Smets LA, Loesberg C, Janssen M, Metwally EA, Huiskamp R. Active uptake and extravesicular storage of m-iodobenzylguanidine in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Cancer Res.* 1989; 49(11):2941-2944.

Spengler BA, Ross RA, Biedler JL. Differential drug sensitivity of human neuroblastoma cells. *Cancer Treat Rep.* 1986; 70(8):959-965.

Toyohira Y, Yanagihara N, Minami K, Ueno S, Uezono Y, Tachikawa E, Kondo Y, Kashimoto T, Izumi F. Down-regulation of noradrenaline transporter by interferon-alpha in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Neurochrom.* 1998; 70(4):1441-1447.

Treuner J, Feine U, Niethammer D, Muller Schaumburg W, Meinke J, Eibach E, Dopfer R, Klingebiel T, Grumbach S. Scintigraphic imaging of neuroblastoma with [¹³¹I]iodobenzylguanidine. *Lancet.* 1984; 1:333-334.

Troncone L, Rufini V, Riccardi R, Lasorella A, Mastrangelo R. The use of [¹³¹I]metaiodobenzylguanidine in the treatment of neuroblastoma after conventional therapy. *J Nucl Biol Med.* 1991; 35(4):232-236.

Troncone L, Rufini V, Luzi S, Mastrangelo R, Riccardi R. The treatment of neuroblastoma with [¹³¹I]MIBG at diagnosis. *Q J Nucl Med.* 1995; 39:65-68.

Voute PA, Hoefnagel CA, de Kraker J. ¹³¹I-meta-iodobenzylguanidine in diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Bull Cancer.* 1988; 75(1):107-111.

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(24):971-21.

Wakade AR, Wakade TD, Poosch M, Bannon MJ. Noradrenaline transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells are controlled by dexamethasone and nerve growth factor. *J Physiol.* 1996; 494:67-75.

Wieland DM, Brown LE, Tobes MC, Rogers WL, Marsh DD, Mangner TJ, Swanson DP, Beierwaltes WH. Imaging the primate adrenal medulla with [¹²³I]

and [131I] meta-iodobenzylguanidine: concise communication. J Nucl Med. 1981; 22(4):358-364.

Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Weitzman S, Bunin G, Levy I, Brossard J, Dougherty G, Tuchman M, Lemieux B. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. N Engl J Med. 2002; 346(14):1041-1046.

Zhu MY, Ordway GA. Down-regulation of norepinephrine transporters on PC12 cells by transporter inhibitors. J Neurochem. 1997; 68(1):134-141.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Histologische Gradeinteilung beim Neuroblastom (modifiziert nach Hughes).....	4
Tab. 2:	INSS-Diagnosekriterien für das Neuroblastom.....	7
Tab. 3:	Nutzen von Tumormarkern.....	7
Tab. 4:	Internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS	7
Tab. 5:	Einfluss der Zytostatikavorbereitung auf die Hemmung der [3H]NA-Aufnahme durch einen 100fach molaren Überschuss an unmarkiertem mIBG in SK-N-SH- und Kelly-Zellen	92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aktivierung von Cisplatin, durch Ersetzen der Chlorliganden durch Wasser	14
Abb. 2:	Wirkung von Etoposid (Topoisomerase-II-Inhibitoren).	21
Abb. 3:	Übersicht über den Katecholaminstoffwechsel der Neuroblastomzellen.....	31
Abb. 4a:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Cisplatin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.	64
Abb. 4b:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Cisplatin auf das Überleben von Kelly-Zellen.	64
Abb. 5a:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Etoposid auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.	65
Abb. 5b:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Etoposid auf das Überleben von Kelly-Zellen.	65
Abb. 6a:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vincristin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.	66
Abb. 6b:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vincristin auf das Überleben von Kelly-Zellen.	66
Abb. 7a:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vindesin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.	67
Abb. 7b:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Vindesin auf das Überleben von Kelly-Zellen.	67
Abb. 8a:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Doxorubicin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.	68
Abb. 8b:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Doxorubicin auf das Überleben von Kelly-Zellen.	68
Abb. 9a:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Dacarbazin auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.	69
Abb. 9b:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Dacarbazin auf das Überleben von Kelly-Zellen.	69
Abb. 10a:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an 4-Hydroperoxyifosfamid auf das Überleben von SK-N-SH-Zellen.	70
Abb. 10b:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an 4-Hydroperoxyifosfamid auf das Überleben von Kelly-Zellen.....	70

Abb. 11a:	Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N4 auf das Überleben von SK-N-SH Zellen.....	73
Abb. 11b:	Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N4 auf das Überleben von Kelly-Zellen.	73
Abb. 12:	Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N5 auf das Überleben von SK-N-SH und Kelly- Zellen.....	75
Abb. 13a:	Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N5 auf das Überleben von SK-N-SH Zellen.....	76
Abb. 13b:	Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N5 auf das Überleben von Kelly- Zellen.	76
Abb. 14a:	Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N6 auf das Überleben von SK-N-SH Zellen.....	77
Abb. 14b:	Einfluss einzelner Zytostatika und deren Kombination N6 auf das Überleben von Kelly- Zellen.	77
Abb. 15a:	Aufnahme von [³ H] Dopamin (10 ⁻⁷ mol/l) in die SK-N-SH-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin.	81
Abb. 15b:	Aufnahme von [³ H]Noradrenalin(10 ⁻⁷ mol/l) in die SK-N-SH-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin.	81
Abb. 16a:	Aufnahme von [³ H]Dopamin (10 ⁻⁷ mol/l) in die Kelly-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin... ..	82
Abb. 16b:	Aufnahme von [³ H]Noradrenalin(10 ⁻⁷ mol/l) in die Kelly-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C und deren Hemmung durch Desipramin... ..	82
Abb. 17a:	Einfluss der 4-stündigen Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³ H]NA bei SK-N-SH Zellen.	85
Abb. 17b:	Einfluss der 4-stündigen Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³ H]NA bei Kelly-Zellen.	85
Abb. 18a:	Einfluss der 4-stündigen 10fach konzentrierteren Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³ H]NA bei SK-N-SH Zellen..	87
Abb. 18b:	Einfluss der 4-stündigen 10fach konzentrierteren Zytostatikavorbehandlung N4, N5, N6 (Kurzzeitinkubation) auf die Aufnahme von [³ H]NA bei Kelly Zellen..	87
Abb. 19a:	Einfluss der Zytostatikavorbehandlungen N4, N5, N6 (Langzeit) auf die Aufnahme von [³ H]NA bei SK-N-SH Zellen	89
Abb. 19b:	Einfluss der Zytostatikavorbehandlungen N4, N5, N6 (Langzeit) auf die Aufnahme von [³ H]NA bei Kelly Zellen	89
Abb. 20a:	Einfluss der Zytostaktikavorbehandlung N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [¹³¹ I]mIBG und dessen Speicherung in den SK-N-SH-Zellen. ...	93
Abb. 20b:	Einfluss der Zytostaktikavorbehandlung N4, N5, N6 auf die Aufnahme von [¹³¹ I]mIBG und dessen Speicherung in den Kelly-Zellen..	93
Abb. 21a	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei Kellyzellen nach 4 h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen	97

Abb. 21b	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei Kellyzellen nach 4 h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen der 10fach erhöhten Konzentration	97
Abb. 21c	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei SK-N-SH-Zellen nach 4 h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen	97
Abb. 21d	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei SK-N-SH-Zellen nach 4 h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen der 10fach erhöhten Konzentration	97
Abb. 22a	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei Kellyzellen nach 72 h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen	100
Abb. 22b	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei Kellyzellen nach 72 h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen mit der 10fach erhöhten Konzentration.....	100
Abb. 22c	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei SK-N-SH-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen.	100
Abb. 22d	Expression der Gene des Katecholaminstoffwechsels bei SK-N-SH-Zellen nach 72h Zytostatikabehandlung mit unterschiedlichen Kombinationen mit der 10fach erhöhten Konzentration.....	100
Abb. 23:	Strukturformel von meta-Iodobenzylguanidin	105

Anhang

Tabellen zu Kapitel 3.1.1

77,34 ± 11,55 = Mittelwert (bezogen auf Kontrolle = 100 %) ± SD

Abb. 4-10

n ≥ 3

SK-N-SH + Melphalan

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 4,23	100 ± 4,71	100 ± 5,88
0,1 µM	77,34 ± 11,55	89,47 ± 4,85	95,24 ± 4,17
0,5 µM	92,23 ± 8,2	85,09 ± 3,13	89,52 ± 5,79
1 µM	100,32 ± 6,97	99,99 ± 5,62	85,71 ± 8,10
5 µM	76,69 ± 11,16	82,46 ± 7,55	44,76 ± 19,86
10 µM	59,22 ± 5,92	68,42 ± 8,88	40 ± 4,04
50 µM	23,62 ± 9,76	37,72 ± 9,75	22,86 ± 12,53

Kelly + Melphalan

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 9,35	100 ± 3,77	100 ± 6,20
0,1 µM	90,3 ± 7,05	87,56 ± 3,89	101,92 ± 9,55
0,5 µM	100,7 ± 4,54	85,57 ± 5,46	95 ± 12,92
1 µM	87,5 ± 10,66	80,1 ± 6,23	88,46 ± 9,73
5 µM	16,6 ± 13,94	21,9 ± 9,65	42,3 ± 30,49
10 µM	1,3 ± 11,66	2,49 ± 20,16	6,15 ± 56,89
50 µM	0,5 ± 13,97	0,5 ± 48,99	1,15 ± 21,9

SK-N-SH + Cisplatin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 8,19	100 ± 6,77	100 ± 5,68
0,05 µM	101,65 ± 3,71	82,9 ± 9,84	100 ± 6,15
0,1 µM	95,87 ± 5,09	84,62 ± 10,89	100,1 ± 4,33
0,5 µM	81,82 ± 1,7	80,34 ± 10,1	90,01 ± 4,13
1 µM	44,63 ± 5,27	40,17 ± 12,54	51,49 ± 10,43
5 µM	0,83 ± 36,18	1,7 ± 18,54	1,98 ± 21,31
10 µM	0 ± 233,5	0 ± 114,8	1,98 ± 34,81

Kelly + Cisplatin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 8,3	100 ± 1027	100 ± 4,57
0,05 µM	98,46 ± 4,55	99,55 ± 4,85	75,71 ± 6,02
0,1 µM	94,87 ± 7,51	106,7 ± 9,18	84 ± 7,2
0,5 µM	88,2 ± 5,65	94,64 ± 4,79	72,57 ± 4
1 µM	77,44 ± 7,40	82,14 ± 5,54	64,86 ± 3,45
5 µM	6,66 ± 16,82	8,48 ± 11,67	12,57 ± 6,23
10 M	0,5 ± 37,15	2,23 ± 11,71	2,29 ± 12,87

SK-N-SH +Etoposid

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 4,23	100 ± 4,71	100 ± 5,88
0,1 µM	82,19 ± 12,93	87,72 ± 4,74	82,86 ± 3,71
0,2 µM	91,58 ± 5,52	82,46 ± 9,04	75,24 ± 9,58
0,3 µM	101,93 ± 3,58	11,41 ± 5,42	75,24 ± 2,18
0,5 µM	110,99 ± 7,53	123,68 ± 7,72	72,38 ± 4,65
1 µM	110,99 ± 7,24	106,14 ± 8,62	68,57 ± 11,36
5 µM	70,22 ± 8,67	71,93 ± 7,86	54,29 ± 27,61

Kelly + Etoposid

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 9,35	100 ± 3,768	100 ± 6,20
0,1 µM	78,9 ± 5,68	64,18 ± 7,97	84,23 ± 4,23
0,2 µM	74,2 ± 17,53	59,7 ± 8,05	74,23 ± 6,23
0,3 µM	66,2 ± 2,58	51,24 ± 7,24	60,77 ± 7,46
0,5 µM	37,5 ± 12,28	30,85 ± 8,5	33,85 ± 5,91
1 µM	8,8 ± 8,79	2,99 ± 11,79	5,38 ± 12,59
5 µM	0,5 ± 16,1	0 ± 244,95	0,38 ± 77,46

SK-N-SH + Vincristin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 9,36	100 ± 6,20	100 ± 3,83
0,001 µM	38,14 ± 8,41	55,65 ± 8,51	64,49 ± 11,32
0,01 µM	26,8 ± 17,6	37,1 ± 8,29	47,66 ± 15,09
0,1 µM	21,65 ± 10,43	35,48 ± 4,30	44,86 ± 13,37
1 µM	18,56 ± 12,75	29,84 ± 4,08	46,73 ± 6,20
10 µM	40,21 ± 12,23	40,32 ± 10,83	48,6 ± 16,09
100 µM	37,11 ± 12,41	29,03 ± 20,97	28,97 ± 10,22

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 13,52	100 ± 9,05	100 ± 12,63
0,000001 µM	80,68 ± 13,01	96,34 ± 14,36	128,13 ± 16,06
0,00001 µM	95,65 ± 12,35	91,46 ± 8,22	129,69 ± 11,42
0,0001 µM	99,03 ± 9,07	100 ± 13,74	90,63 ± 9,82
0,001 µM	72,95 ± 10,66	108,54 ± 14,12	75 ± 7,7
0,01 µM	30,43 ± 12,74	65,85 ± 6,18	46,89 ± 16,48
0,1 µM	19,81 ± 19,48	46,34 ± 11,02	35,94 ± 22,91

Kelly + Vincristin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch3
Kontrolle	100 ± 5,63	100 ± 4,04	100 ± 5,8
0,001 µM	10,53 ± 12,85	7,95 ± 11,57	9,62 ± 13,46
0,01 µM	1,44 ± 36,33	1,67 ± 0	2,09 ± 7,90
0,1 µM	0 ± 77,46	0 ± 0	0 ± 0
1 µM	0 ± 122,4	0,42 ± 109,5	0 ± 244,9
10 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
100 µM	0 ± 55,9	0 ± 159,9	

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	100 ± 13,29	100 ± 15,37
0,000001 µM	93,83 ± 17,24	71,05 ± 14,21
0,00001 µM	96,3 ± 15,88	85,53 ± 13,88
0,0001 µM	104,94 ± 14,11	92,11 ± 14,66
0,001 µM	86,42 ± 12,86	82,89 ± 12,63
0,01 µM	9,88 ± 18,73	9,87 ± 20,7
0,1 µM	0 ± 95,74	0,66 ± 69

SK-N-SH + Vindesin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 9,36	100 ± 6,20	100 ± 3,832
0,001 µM	79,38 ± 6,58	91,94 ± 3,03	98,13 ± 5,51
0,01 µM	71,13 ± 9,24	90,32 ± 5,96	95,33 ± 5,41
0,1 µM	60,82 ± 10,55	73,39 ± 2,77	81,31 ± 6,99
1 µM	50,52 ± 17,62	44,35 ± 6,41	58,88 ± 12,03
10 µM	58,76 ± 7,77	46,77 ± 11,88	44,86 ± 15,72
100 µM	50,52 ± 8,72	39,52 ± 16,01	41,86 ± 13,25

Kelly + Vindesin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 5,63	100 ± 4,04	100 ± 5,8
0,001 µM	111 ± 5,53	97,07 ± 3,7	91,21 ± 6,18
0,01 µM	109,09 ± 2,06	96,23 ± 8,37	100,84 ± 7,15
0,1 µM	112,44 ± 11,35	80,33 ± 6,2	89,54 ± 4,62
1 µM	8,6 ± 5,63	6,28 ± 7,40	7,53 ± 15,68
10 M	0 ± 77,46	0 ± 244,9	0 ± 0
100 µM	0 ± 122,4	0 ± 244,9	0 ± 244,9

SK-N-SH + Doxorubicin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 10,15	100 ± 4,31	100 ± 6,19
0,001 µM	100 ± 7,18	95,16 ± 8,24	102,91 ± 3,98
0,01 µM	92,42 ± 14	100 ± 15,83	110,68 ± 14,08
0,1 µM	50 ± 26,19	40,32 ± 4,53	60,19 ± 18,15
1 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 77,46
10 µM	0 ± 244,9	1,61 ± 91,28	0 ± 244,9
100 µM	1,51 ± 77,46	1,61 ± 55,9	0 ± 244,9

Kelly + Doxorubicin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 5,71	100 ± 9,46	100 ± 7,79
0,001 µM	82,6 ± 8,07	113,4 ± 5,11	95,4 ± 9,06
0,01 µM	78,26 ± 4,83	104,12 ± 6,44	88,51 ± 7,22
0,1 µM	28,26 ± 9,09	40,2 ± 6,09	32,18 ± 6,57
1 µM	0 ± 15,49	0 ± 48,99	0 ± 244,9
10 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 244,9
100 µM	0 ± 12,89	0 ± 24,84	0 ± 244,9

SK-N-SH + Dacarbazin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 4,31	100 ± 6,19	100 ± 10,15
0,001 µM	100 ± 5,64	103,88 ± 4,20	103,03 ± 9,45
0,01 µM	96,77 ± 4,08	107,77 ± 5,81	100 ± 6,01
0,1 µM	98,39 ± 4,53	93,2 ± 13,34	104,55 ± 8,88
1 µM	98,39 ± 6,57	102,91 ± 5,57	96,97 ± 9,86
100 µM	53,23 ± 5,91	49,51 ± 3,15	57,58 ± 5,87

Kelly + Dacarbazin

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 5,71	100 ± 9,46	100 ± 7,79
0,001 µM	85,5 ± 8,54	115,46 ± 7,32	97,7 ± 5,91
0,01 µM	87,68 ± 7,05	128,87 ± 4,58	105,75 ± 9,43
0,1 µM	86,96 ± 6,83	116,49 ± 12,62	111,49 ± 2,88
1 µM	88,4 ± 13,31	113,4 ± 6,58	108,05 ± 5,97
10 µM	81,88 ± 8,83	112,37 ± 7,67	102,3 ± 12,91
100 µM	52,17 ± 4,84	61,86 ± 6,97	58,62 ± 5,71

SK-N-SH + 4-Hydroperoxyifosfamid

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 13,55	100 ± 22,02	100 ± 17,67
0,001 µM	119,48 ± 9,08	139,22 ± 8,77	179,49 ± 6,79
0,01 µM	109,09 ± 12,12	111,76 ± 10,85	146,15 ± 14,85
0,1 µM	131,17 ± 8,38	131,37 ± 6,39	164,1 ± 10,57
1 µM	119,48 ± 6,72	135,29 ± 10,79	120,51 ± 12,07
10 µM	50,65 ± 25,75	56,86 ± 9,66	38,46 ± 15,44
100 µM	14,29 ± 17,32	19,61 ± 19,55	15,38 ± 9,58

Kelly + 4-Hydroperoxyifosfamid

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 15,83	100 ± 9,12	100 ± 11,68
0,001 µM	148,1 ± 9,04	117,84 ± 10,1	71,37 ± 17,63
0,01 µM	137,55 ± 10,01	120,54 ± 9,64	79,22 ± 11,86
0,1 µM	120,68 ± 4,33	102,7 ± 17,5	81,96 ± 3,22
1 µM	120,68 ± 8,84	108,11 ± 8,79	89,8 ± 12,36
10 µM	41,77 ± 11,58	23,24 ± 12,61	30,98 ± 20,24
100 µM	0 ± 180,9	0 ± 617,9	0 ± 27,04

Tabellen zu Kapitel 3.1.2

Abb. 11-14

SK-N-SH + Zytostatikakombination N4

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 12,81	100 ± 10,23	100 ± 10,72
Vincristin (0,001 µM)	88,29 ± 10,1	100 ± 34,62	68,9 ± 10,43
Doxorubicin (0,05 µM)	60 ± 8,91	38,41 ± 14,94	35,37 ± 25,66
Ifosfamid (5 µM)	124,39 ± 9,00	73,51 ± 12,88	85,98 ± 22,71
Kombination	63,41 ± 18,56	35,76 ± 23,94	42,07 ± 38,15

Kelly + Zytostatikakombination N4

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 12,73	100 ± 8,27	100 ± 10,70
Vincristin (0,001 µM)	89,24 ± 20,51	88,32 ± 12,96	87,43 ± 7,22
Doxorubicin (0,05 µM)	45,18 ± 24,86	31,47 ± 38,54	23,5 ± 23,39
Ifosfamid (5 µM)	100,8 ± 9,92	77,66 ± 11,04	95,08 ± 11,07
Kombination	47,01 ± 15,63	24,87 ± 63,68	22,95 ± 31,72

SK-N-SH + Zytostatikakombination N5

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 6,53	100 ± 7,24	100 ± 11,55
Vindesin (0,1 µM)	11,33 ± 12,5	18,23 ± 11,26	78 ± 11,48
Cisplatin (0,5 µM)	66 ± 10,1	66,99 ± 7,37	79 ± 13,67
Etoposid (0,5 µM)	62,67 ± 8,79	60,59 ± 8,93	83,5 ± 13,1
Kombination	25,33 ± 6,12	33,5 ± 6,24	82,5 ± 12,01

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 8,97	100 ± 8,72	100 ± 8,67
Vindesin (0,02 µM)	63,18 ± 10,07	74,54 ± 75,46	11,43 ± 10,46
Cisplatin (0,1 µM)	96 ± 5,94	211,11 ± 3,49	91,43 ± 7,15
Etoposid (0,1 µM)	95,52 ± 7,66	195,37 ± 6,04	88,57 ± 7,63
Kombination	69,65 ± 7,43	76,39 ± 71,75	20,71 ± 11,01

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 19,12	100 ± 18,86	100 ± 10,31
Vindesin (0,002 µM)	38,24 ± 10,41	76,8 ± 8,02	12,9 ± 113,8
Cisplatin (0,2 µM)	107,65 ± 10,37	136,46 ± 7,86	86,64 ± 8,47
Etoposid (0,2 µM)	40 ± 14,83	76,79 ± 11,38	27,65 ± 31,11
Kombination	15,29 ± 19,84	42 ± 24,26	24,88 ± 22,83

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 11,33	100 ± 13,63	100 ± 10,85
Vindesin (0,0004 µM)	74,31 ± 6,20	77,34 ± 9,71	80,54 ± 10,3
Cisplatin (0,04 µM)	106,94 ± 9,99	110,34 ± 9,26	121,72 ± 10,37
Etoposid (0,04 µM)	84,72 ± 10,03	82,76 ± 10,86	85,07 ± 7,75
Kombination	57,64 ± 16,01	57,64 ± 11,89	52,49 ± 10,22

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 10,09	100 ± 9,63	100 ± 13,96
Vindesin (0,1 nM)	99,7 ± 7,90	107,32 ± 11,04	108,54 ± 10,95
Cisplatin (0,02 µM)	106,67 ± 2,09	109,45 ± 7,36	106,61 ± 11,23
Etoposid (4 nM)	104,24 ± 11	106,1 ± 3,36	99,72 ± 10,12
Kombination	94,85 ± 10,55	89,94 ± 12	98,35 ± 7,68

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 12,33	100 ± 13,43	100 ± 9,93
Vindesin (0,5 nM)	73,54 ± 18,02	55,36 ± 13,86	73,66 ± 10,26
Cisplatin (0,1 µM)	113 ± 10,16	91,96 ± 9,66	105,65 ± 7,46
Etoposid (20 nM)	112,56 ± 9,30	100 ± 5,17	101,61 ± 7,07
Kombination	57,4 ± 16,19	46,43 ± 14,19	68,01 ± 10,6

Kelly + Zytostatikakombiantion N5

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 7,21	100 ± 14,71	100 ± 16,78
Vindesin (0,1 µM)	16,58 ± 10,33	38,56 ± 117,8	
Cisplatin (0,5 µM)	92,51 ± 5,96	73,86 ± 18,08	77,78 ± 12,68
Etoposid (0,5 µM)	101,07 ± 7,15	81,05 ± 13,54	77,78 ± 12,65
Kombination	19,25 ± 16,28	30,72 ± 89,13	

Zytostatikakonzentration	Versuch 1
Kontrolle	100 ± 12,44
Vindesin (0,02 µM)	
Cisplatin (0,1 µM)	96,53 ± 3,91
Etoposid (0,1 µM)	102,78 ± 11,45
Kombination	

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 9,18	100 ± 9,4	100 ± 36,35
Vindesin (0,002 µM)	69,57 ± 10,88	44,85 ± 24,03	53,28 ± 48,45
Cisplatin (0,2 µM)	3,1 ± 197,9	0 ± 97,6	18,25 ± 44,01
Etoposid (0,2 µM)	93,17 ± 9,28	86,06 ± 8,34	44,53 ± 38,76
Kombination	1,86 ± 340,3	0 ± 113,2	28,47 ± 39,02

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 9,63	100 ± 17,04	100 ± 10,47
Vindesin (0,0004 µM)	102,86 ± 8,59	105,12 ± 13,34	110,69 ± 12,24
Cisplatin (0,04 µM)	32,57 ± 28,64	40,88 ± 23,91	103,87 ± 8,84
Etoposid (0,04 µM)	93,14 ± 8,3	105,11 ± 11,73	88,55 ± 15,61
Kombination	36 ± 22,52	26,28 ± 36,21	34,35 ± 51,74

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 16,52	100 ± 11,63	100 ± 12,73
Vindesin (0,1 nM)	83,01 ± 14,15	116,49 ± 11,63	129,75 ± 15,18
Cisplatin (0,02 µM)	80,69 ± 10,41	113,92 ± 7,31	122,15 ± 17,19
Etoposid (4 nM)	84,94 ± 13,3	124,74 ± 7,85	125,32 ± 12,07
Kombination	123,94 ± 9,88	102,58 ± 9,77	110,76 ± 15,54

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 18,17	100 ± 8,94	100 ± 12,61
Vinblastin (0,5 nM)	101,69 ± 8,08	96,83 ± 2,68	103,19 ± 8,96
Cisplatin (0,1 µM)	108,43 ± 9,09	106,79 ± 6,25	112,75 ± 3,63
Etoposid (20 nM)	107,87 ± 13,98	105,43 ± 6,08	122,31 ± 8,56
Kombination	73,6 ± 14,22	89,59 ± 8,09	86,06 ± 6,90

SK-N-SH + Zytostatikakombination N6

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 12,28	100 ± 16,67	100 ± 10,65
Vincristin (0,001 µM)	73,81 ± 8,97	51,7 ± 33,67	100,51 ± 14,7
Doxorubicin (0,05 µM)	44,76 ± 17,74	76,19 ± 43,85	64,29 ± 14,22
Dacarbazin (50 µM)	92,38 ± 12,17	35,37 ± 42,18	106,12 ± 11,75
Ifosfamid (5 µM)	110,48 ± 11,78	10,2 ± 217,7	100,51 ± 10,17
Kombination	53,81 ± 17,28	51,7 ± 45,62	77,04 ± 29,85

Kelly + Zytostatikakombination N6

Zytostatikakonzentration	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	100 ± 14,78	100 ± 13,63	100 ± 8,07
Vincristin (0,001 µM)	93,56 ± 6,16	68,26 ± 17,49	93,58 ± 4,52
Doxorubicin (0,05 µM)	24,26 ± 11,98	0 ± 168,6	28,44 ± 13,78
Dacarbazin (50 µM)	44,06 ± 9,85	8,38 ± 142,4	49,08 ± 11,76
Ifosfamid (5 µM)	108,91 ± 7,14	38,32 ± 29,04	104,13 ± 5,38
Kombination	16,83 ± 26,26	20,96 ± 65,51	16,51 ± 25,34

Als f.c. wurden für die mIBG-Aufnahmeversuche und RT-PCR-Versuche die folgenden Zytostatikakonzentrationen verwendet:

Behandlung	(f.c.)
N4 (Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid)	Vincristin: 1 nmol/l Doxorubicin: 0,03 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 5 µmol/l
N5 (Vindesin, Etoposid, Cisplatin)	Vindesin: 0,5 nmol/l Etoposid: 20 nmol/l Cisplatin: 0,1 µmol/l
N6 (Vincristin, Doxorubicin, Ifosfamid, Dacarbazin)	Vincristin: 1 nmol/l Doxorubicin: 0,03 µmol/l 4-Hydroperoxyifosfamid: 5 µmol/l Dacarbazin: 30 µmol/l

Tabelle zu Kapitel 3.2.1.1
Abb. 15 a+b

Aufnahme von [³H]NA und [³H]DA in SK-N-SH-Zellen und der Hemmung von Eis, Desipramin (DI), Nisoxethin (NIS), GBR

[³H]NA = 294426 = 100 %

[³H]DA = 161809 = 100 %

Anhang

100 % = $0,5 \times 10^{-8}$ mole/500 μ l

Substanz	NA / DA	Messwerte	cpm	Stand. abw.	%Einbau	nmole	Zellzahl	mole/10 ⁶ Zellen	Hemmstoffe %
KO	161809	3815 3470	3642,5	244,0	2,25%	1,1E-10	9,00E+5	1,25E-10	100%
DI	161809	238 1626	932	981,5	0,58%	2,9E-11	9,00E+5	3,20E-11	25,6%
NIS	161809	1212 1303	1257,5	64,3	0,78%	3,9E-11	9,00E+5	4,32E-11	34,5%
GBR	161809	3035 2917	2976	83,4	1,84%	9,2E-11	9,00E+5	1,02E-10	81,7%
EIS	161809	169 112	140,5	40,3	0,09%	4,3E-12	9,00E+5	4,82E-12	3,9%
KO	294426	7964 8588	8276	441,2	2,81%	1,4E-10	9,00E+5	1,56E-10	100%
DI	294426	231 138	184,5	65,8	0,06%	3,1E-12	9,00E+5	3,48E-12	2,2%
NIS	294426	1712 2010	1861	210,7	0,63%	3,2E-11	9,00E+5	3,51E-11	22,5%
GBR	294426	5629 5946	5787,5	224,2	1,97%	9,8E-11	9,00E+5	1,09E-10	69,9%

Tabelle zu Kapitel 3.2.1.1
Abb. 16 a+b

Aufnahme von [³H]NA und [³H]DA in Kelly-Zellen und der Hemmung von Eis, Desipramin (DI), Nisoxethin (NIS), GBR

[³H]NA = 294426 = 100 %

[³H]DA = 161809 = 100 %

100 % = $0,5 \times 10^{-8}$ mole/500 μ l

Substanz	NA / DA	Messwerte	cpm	Stand. abw.	%Einbau	nmole	Zellzahl	mole/10 ⁶ Zellen	Hemmstoffe %
KO	161809	2031 1847	1939	130,1	1,20%	5,99E-11	9,00E+05	6,66E-11	100%
DI	161809	236 212	224	17,0	0,14%	6,92E-12	9,00E+05	7,69E-12	11,6%
NIS	161809	727 679	703	33,9	0,43%	2,17E-11	9,00E+05	2,41E-11	36,3%
GBR	161809	1604 1326	1465	196,6	0,91%	4,53E-11	9,00E+05	5,03E-11	75,6%
EIS	161809	79 522	300,5	313,2	0,19%	9,29E-12	9,00E+05	1,03E-11	15,5%
KO	294426	2464 2194	2329	190,9	0,79%	3,96E-11	9,00E+05	4,39E-11	100%
DI	294426	168 127	147,5	29,0	0,05%	2,5E-12	9,00E+05	2,78E-12	6,3%
NIS	294426	677 669	673	5,7	0,23%	1,14E-11	9,00E+05	1,27E-11	28,9%
GBR	294426	1804 2025	1914,5	156,3	0,65%	3,25E-11	9,00E+05	3,61E-11	82,2%

Tabellen zu Kapitel 3.2.2.1.1 und 3.2.3
Abb. 17 und Tabelle 5

[³H]NA-Aufnahme nach kurzer einfacher Vorinkubation der Zytostatikakombinationen N4-N6 bei SK-N-SH-Zellen und der Hemmung mit unmarkiertem mIBG

100 % = 471286

100 % = $0,5 \times 10^{-10}$ mole/500 μ l

Substanz	100%	Mess- werte	cpm	Standard- abweich	%Einbau	nmole	Zellzahl	mole/10 ⁶ Zellen	Hemm- stoffe %
KO 1	471286	19604 22483	21043,5	2035,8	4,47%	2,23E-12	2,08E+06	1,07E-12	100%
N5 1	471286	19254 16750	18002	1770,6	3,82%	1,91E-12	1,30E+06	1,47E-12	136,7%
N4 1	471286	20432 21551	20991,5	791,3	4,45%	2,23E-12	1,40E+06	1,59E-12	148,0%
N6 1	471286	20626 16318	18472	3046,2	3,92%	1,96E-12	1,88E+06	1,04E-12	97,0%
KO 2	471286	22697 23401	23049	497,8	4,89%	2,45E-12	1,15E+06	2,13E-12	100,0%
N5 2	471286	18662 18591	18626,5	50,2	3,95%	1,98E-12	1,55E+06	1,27E-12	60%
N4 2	471286	19085 18110	18597,5	689,4	3,95%	1,97E-12	1,22E+06	1,62E-12	76%
N6 2	471286	18788 17234	18011	1098,8	3,82%	1,91E-12	6,00E+05	3,18E-12	150%
KO 3	471286	20887 23246	22066,5	1668,1	4,68%	2,34E-12	2,00E+06	1,17E-12	100,0%
N5 3	471286	23654 23150	23402	356,4	4,97%	2,48E-12	2,17E+06	1,14E-12	98%
N4 3	471286	16562 0	16562		3,51%	1,76E-12	2,09E+06	8,41E-13	72%
N6 3	471286	21737 0	21737		4,61%	2,31E-12	2,65E+06	8,70E-13	74%
KO 1+ mIBG	471286	511 1527	1019	718,4	0,22%	1,08E-13	2,08E+06	5,21E-14	100,0%
N51+ mIBG	471286	483 763	623	198,0	0,13%	6,61E-14	1,30E+06	5,08E-14	97,7%
N4 1+ mIBG	471286	818 821	819,5	2,1	0,17%	8,69E-14	1,40E+06	6,21E-14	119,3%
N6 1+ mIBG	471286	824 527	675,5	210,0	0,14%	7,17E-14	1,88E+06	3,81E-14	73,2%
KO 2+ mIBG	471286	920 580	750	240,4	0,16%	7,96E-14	1,15E+06	6,92E-14	100,0%
N52 + mIBG	471286	1341 1087	1214	179,6	0,26%	1,29E-13	1,55E+06	8,31E-14	120,1%
N42+ mIBG	471286	924 938	931	9,9	0,20%	9,88E-14	1,22E+06	8,10E-14	117,0%
N6 2+	471286	1578	1811,5	330,2	0,38%	1,92E-13	6,00E+05	3,20E-13	462,9%

Anhang

mIBG		2045							
KO 3+ mIBG	471286	303 1067	685	540,2	0,15%	7,27E-14	2,00E+06	3,63E-14	100,0%
N53+ mIBG	471286	1579 832	1205,5	528,2	0,26%	1,28E-13	2,17E+06	5,89E-14	162,2%
N4 3+ mIBG	471286	608 945	776,5	238,3	0,16%	8,24E-14	2,09E+06	3,94E-14	108,5%
N6 3+ mIBG	471286	571	571		0,12%	6,06E-14	2,65E+06	2,29E-14	62,9%

[³H]NA-Aufnahme nach kurzer einfacher Vorinkubation der Zytostatikakombinationen N4-N6 bei Kelly-Zellen und der Hemmung mit unmarkiertem mIBG

100 % = 282566

100 % = $0,5 \times 10^{-10}$ mole/500 μ l

Substanz	100%	Mess- werte	cpm	Standard- abweich	%Einbau	nmole	Zellzahl	mole/10 ⁶ Zellen	Hemm- stoffe%
KO 1	282566	5082 5574	5328	347,9	1,89%	9,43E-13	2,98E+06	3,16E-13	100%
N5 1	282566	5470 4383	4926,5	768,6	1,74%	8,72E-13	3,48E+06	2,51E-13	79,2%
N4 1	282566	5136 4723	4929,5	292,0	1,74%	8,72E-13	3,49E+06	2,50E-13	79,0%
N6 1	282566	5044 4747	4895,5	210,0	1,73%	8,66E-13	3,19E+06	2,72E-13	85,8%
KO 2	282566	5130 5245	5187,5	81,3	1,84%	9,18E-13	4,20E+06	2,19E-13	100,0%
N5 2	282566	5484 5584	5534	70,7	1,96%	9,79E-13	3,62E+06	2,71E-13	124%
N4 2	282566	4619 6118	5368,5	1060,0	1,90%	9,5E-13	4,86E+06	1,95E-13	89%
N6 2	282566	6213 7587	6900	971,6	2,44%	1,22E-12	2,87E+06	4,25E-13	195%
KO 3	282566	6170 5544	5857	442,6	2,07%	1,04E-12	2,47E+06	4,20E-13	100,0%
N5 3	282566	5894 11091	5894		2,09%	1,04E-12	3,43E+06	3,04E-13	72%
N4 3	282566	8 6648	6648		2,35%	1,18E-12	3,62E+06	3,25E-13	77%
N6 3	282566	7083 6746	6914,5	238,3	2,45%	1,22E-12	3,45E+06	3,55E-13	85%
KO 1 + mIBG	282566	455 391	423	45,3	0,15%	7,48E-14	2,98E+06	2,51E-14	100,0%
N5 1 + mIBG	282566	398 428	413	21,2	0,15%	7,31E-14	3,48E+06	2,10E-14	83,6%
N4 1 + mIBG	282566	330 487	408,5	111,0	0,14%	7,23E-14	3,49E+06	2,07E-14	82,5%
N6 1 + mIBG	282566	395 414	404,5	13,4	0,14%	7,16E-14	3,19E+06	2,24E-14	89,3%
KO 2 +	282566	453	479	36,8	0,17%	8,48E-14	4,20E+06	2,02E-14	100,0%

Anhang

mIBG		505							
N5 2 + mIBG	282566	394 491	442,5	68,6	0,16%	7,83E-14	3,62E+06	2,17E-14	107,3%
N4 2 + mIBG	282566	360 470	415	77,8	0,15%	7,34E-14	4,86E+06	1,51E-14	74,9%
N6 2 + mIBG	282566	488 528	508	28,3	0,18%	8,99E-14	2,87E+06	3,13E-14	155,2%
KO 3 + mIBG	282566	453 385	419	48,1	0,15%	7,41E-14	2,47E+06	3,00E-14	100,0%
N5 3 + mIBG	282566	378 346	362	22,6	0,13%	6,41E-14	3,43E+06	1,87E-14	62,2%
N4 3 + mIBG	282566	382 483	432,5	71,4	0,15%	7,65E-14	3,62E+06	2,11E-14	70,4%
N6 3 + mIBG	282566	524 380	452	101,8	0,16%	8E-14	3,45E+06	2,32E-14	77,2%

Tabellen zu Kapitel 3.2.2.1.2 (1-3) und 3.2.2.1.1 (4)
Abb. 18 (1-3) und 17 (4)

[³H]NA-Aufnahme nach kurzer 10fach konzentrierter (1-3) und einfacher (4)
Vorinkubation der Zytostatikakombinationen N4-N6 bei SK-N-SH-Zellen

100 % = 310885

100 % = $0,35 \times 10^{-10}$ mole/500 μ l

Substanz	100%	Mess- werte	cpm	Standard abweich.	%Einbau	nmole	Zellzahl	mole/10 ⁶ Zellen	Hemm- stoffe %
KO 1	310885	21117 20818	20967,5	211,4	6,74%	2,36E-12	2,82E+06	8,37E-13	100%
N5 1	310885	24572 21230	22901	2363,2	7,37%	2,58E-12	2,15E+06	1,20E-12	143,3%
N4 1	310885	24734 23107	23920,5	1150,5	7,69%	2,69E-12	2,39E+06	1,13E-12	134,9%
N6 1	310885	19814 19227	19520,5	415,1	6,28%	2,2E-12	2,01E+06	1,09E-12	130,6%
KO 2	310885	25588 25905	25746,5	224,2	8,28%	2,9E-12	2,83E+06	1,03E-12	100,0%
N5 2	310885	23965 17267	20616	4736,2	6,63%	2,32E-12	2,83E+06	8,22E-13	80%
N4 2	310885	19621 20693	20157	758,0	6,48%	2,27E-12	2,83E+06	8,03E-13	78%
N6 2	310885	24022 22890	23456	800,4	7,54%	2,64E-12	2,83E+06	9,35E-13	91%
KO 3	310885	26567 24947	25757	1145,5	8,29%	2,9E-12	2,92E+06	9,95E-13	100,0%
N5 3	310885	29500 22785	26142,5	4748,2	8,41%	2,94E-12	2,92E+06	1,01E-12	101%
N4 3	310885	21794 27081	24437,5	3738,5	7,86%	2,75E-12	2,92E+06	9,44E-13	95%
N6 3	310885	27066 26002	26534	752,4	8,53%	2,99E-12	2,92E+06	1,02E-12	103%
KO 4	310885	19382	18392,5	1399,4	5,92%	2,07E-12	1,69E+06	1,23E-12	100,0%

Anhang

einfach		17403							
N5 4 einfach	310885	16949 16539	16744	289,9	5,39%	1,89E-12	1,69E+06	1,12E-12	91,0%
N4 4 einfach	310885	17241 19864	18552,5	1854,7	5,97%	2,09E-12	1,69E+06	1,24E-12	100,9%
N6 4 einfach	310885	12088 527	6307,5	8174,9	2,03%	7,1E-13	1,69E+06	4,20E-13	34,3%

[³H]NA-Aufnahme nach kurzer 10fach konzentrierter (1-3) und einfacher (4)
Vorinkubation der Zytostatikakombinationen N4-N6 bei Kelly-Zellen

100 % = 310885

100 % = $0,35 \times 10^{-10}$ mole/500 μ l

Substanz	100%	Mess- werte	cpm	Standard- abweich	%Einbau	nmole	Zellzahl	mole/10 ⁶ Zellen	Hemm- stoffe %
KO 1	310885	10358 9209	9783,5	812,5	3,15%	1,1E-12	3,19E+06	3,46E-13	100%
N5 1	310885	10181 9860	10021	227,0	3,22%	1,13E-12	2,30E+06	4,92E-13	142,1%
N4 1	310885	10516 10252	10384	186,7	3,34%	1,17E-12	3,99E+06	2,93E-13	84,7%
N6 1	310885	11032 12170	11601	804,7	3,73%	1,31E-12	3,17E+06	4,13E-13	119,3%
KO 2	310885	11413 11017	11215	280,0	3,61%	1,26E-12	2,87E+06	4,40E-13	100,0%
N5 2	310885	12268 11334	11801	660,4	3,80%	1,33E-12	2,87E+06	4,63E-13	105%
N4 2	310885	9961 11365	10663	992,8	3,43%	1,2E-12	2,87E+06	4,18E-13	95%
N6 2	310885	13542 12290	12916	885,3	4,15%	1,45E-12	2,87E+06	5,07E-13	115%
KO 3	310885	10934 12012	11473	762,3	3,69%	1,29E-12	2,51E+06	5,16E-13	100,0%
N5 3	310885	17088 14199	15644	2042,8	5,03%	1,76E-12	2,51E+06	7,03E-13	136%
N4 3	310885	12116 10728	11422	981,5	3,67%	1,29E-12	2,51E+06	5,13E-13	100%
N6 3	310885	14726 13583	14155	808,2	4,55%	1,59E-12	2,51E+06	6,36E-13	123%
KO 4 einfach	310885	10101 11827	10964	1220,5	3,53%	1,23E-12	3,20E+06	3,86E-13	100,0%
N5 4 einfach	310885	12605 12238	12422	259,5	4,00%	1,4E-12	3,20E+06	4,37E-13	113,3%
N4 4 einfach	310885	11188 13306	12247	1497,7	3,94%	1,38E-12	3,20E+06	4,31E-13	111,7%
N6 4 einfach	310885	13228 11956	12592	899,4	4,05%	1,42E-12	3,20E+06	4,43E-13	114,8%

Tabellen zu Kapitel 3.2.2.2
Abb. 19

[³H]NA-Aufnahme nach langer Vorinkubation der Zytostatikakombinationen N4-N6 bei SK-N-SH-Zellen

Behandlung	nmol/10 ⁶ Zellen		Mittelwert	Standard.abw	%-Werte	Stand.abw.%Werte
Kontrolle	8,00E-13	1,11E-12	9,55E-13	2,19203E-13	100%	23%
N4	6,41E-13		6,41E-13		67%	
N5	7,27E-13	1,24E-12	9,84E-13	3,62746E-13	103%	38%
N6	9,26E-13	1,40E-12	1,16E-12	3,35169E-13	122%	35%

[³H]NA-Aufnahme nach langer Vorinkubation der Zytostatikakombinationen N4-N6 bei Kelly-Zellen

Behandlung	nmol/10 ⁶ Zellen		Mittelwert	Standard.abw	%-Werte	Stand.abw.%werte
Kontrolle	4,90E-14	1,33E-13	9,10E-14	5,9397E-14	100%	65%
N4	8,15E-14		8,15E-14		90%	
N5	7,08E-14	1,44E-13	1,07E-13	5,176E-14	118%	57%
N6	1,01E-13	1,29E-13	1,15E-13	1,9799E-14	126%	22%

Danksagung

Für das Gelingen dieser Arbeit möchte ich allen die mich unterstützt haben meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Bruchelt, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Durch die hervorragende Betreuung, die unzähligen Anregungen sowie seine ständige Unterstützung - sogar während der „Nachtschicht“ - war die Dissertation in dieser Form erst möglich.

Außerdem danke ich Frau Dr. Z. Kuçi für ihre Geduld beim Lehren der Methoden und für ihre Hilfe bei jeglicher Art von Schwierigkeiten während der Laborarbeit. Durch ihre kompetente, tatkräftige und nette Unterstützung hat sie mir die Arbeit im Labor erleichtert.

Frau G. Merkel danke ich für den freundlichen Einstieg in den Laboralltag, das geduldige Lehren der Technik des Zellkultivierens sowie ihre Unterstützung und Hilfe.

Der Nuklearmedizin Tübingen danke ich für das Bereitstellen des [¹³¹I]mIBGs.

Ein Dankeschön auch an die Apotheke der Kinderklinik für das Überlassen von Zytostatikaresten für die Vorinkubation der Zelllinien.

Meinen Eltern danke ich für die langjährige Unterstützung sowie die motivierenden Worte und moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Daniela Hildegard Ballweg
geboren am 28.04.1981
in Miltenberg/Bayern

Schulbesuch:

1987-1991 Frauenwald-Grundschule, Bad Nauheim
1991-2000 St. Lioba Gymnasium, Bad Nauheim

2000-2001 Soziales Jahr im „House of Light“ in Leeds
(Großbritannien)

Studium:

2001-2003 Medizinstudium an der Justus-Liebig Universität
Giessen
2003-2007 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

Praktisches Jahr:

Chirurgie St. John´s Medical College and Hospital der Rajiv
Gandhi University, Bangalore (Indien)

Pädiatrie Olgahospital, Stuttgart

Innere Medizin Bürgerhospital, Stuttgart und
Bristol Royal Infirmary, Bristol (Großbritannien)

08.11.2007 Ärztliche Prüfung