

Aus dem Institut für Anatomie II:  
Experimentelle Morphologie  
im Zentrum für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. U. Schumacher

Das Proliferationsverhalten  
von humanen Neuroblastomzellen unter  
niedermolekularen Substanzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dorothea Schulz  
aus Hamburg

Hamburg, 2008

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 15. Dezember 2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Schumacher  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Santer  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Klutmann

# Arbeitshypothese und Fragestellung

Bei verschiedenen genetisch bedingten Stoffwechselstörungen, die zu einer Akkumulation von niedermolekularen Metaboliten im Organismus führen, kann man Störungen der Nervenzellen und ihrer Aktivität mit entsprechender klinischer Symptomatik beobachten.

Viele der erkrankten Patienten weisen unter anderem pathologische Veränderungen der Hirnstrukturen auf und sind mental retardiert. In den letzten Jahren wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Anreicherung der verschiedenen Metabolite Einfluss auf das Wachstum der neuronalen Zellen haben könnte und so die klinische Symptomatik der einzelnen Erkrankungen hervorruft.

Humane Neuroblastomzellen sind, im Gegensatz zu humanen Neuroblasten, sehr gut in Kultur zu halten und lassen sich auf die für die Proliferationsversuche benötigte Menge hochzüchten. Daher wurden für alle Versuche als Neuroblastenmodell insgesamt sieben humane Neuroblastomzelllinien verwendet. In der experimentellen Neurobiologie ist die Methode etabliert, Neuroblastomzelllinien als Neuronenmodell zu verwenden (Greene und Tischler, 1976; Koizumi *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit soll das Proliferationsverhalten von humanen Neuroblastomzellen, die von verschiedenen Zelllinien abstammen, unter verschiedenen Metaboliten, die in Stoffwechselstörungen akkumulieren (3-Hydroxy-Glutarsäure, Phenylalanin, Leukotrien C<sub>4</sub>, Leucin) untersucht werden. Ziel dieser Versuche ist es, zur Aufklärung der Mechanismen, die in den verschiedenen Stoffwechselstörungen zu neuronalen Veränderungen führen, beizutragen. Außerdem soll Phenylbutyrat, einem Medikament, das neuroprotektiv wirken soll und das in klinischen Studien als Chemotherapeutikum gegen Krebs eingesetzt wird, auf seine Wirkung auf das Wachstumsverhalten von humanen Neuroblastomzellen getestet werden.

Weiterführend sollen die humanen Neuroblastomzellen exemplarisch auf die Veränderung der Zellzyklusphasen unter Phenylbutyrat untersucht werden. Auch hier gibt es bis jetzt keine hinreichende Erklärung, wie Phenylbutyrat neuronale Zellen beeinflusst. Die Versuchsanordnung dieser Arbeit soll dazu beitragen, diesen Mechanismus zu verstehen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Erblich bedingte Stoffwechselerkrankungen . . . . .	6
1.2	Phenylketonurie . . . . .	6
1.3	4-Phenylbutyrat . . . . .	8
1.4	Glutarazidurie . . . . .	8
1.5	Maple Syrup Urine Disease . . . . .	9
1.6	Zellwegersyndrom . . . . .	10
1.7	Zellzyklus . . . . .	11
1.8	Neuroblastenmodell . . . . .	13
1.8.1	Neuroblastomzelllinien . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Material . . . . .	15
2.1.1	Zelllinien . . . . .	15
2.2	Methoden . . . . .	15
2.2.1	Zellkultur . . . . .	15
2.2.2	Erstellung der Eichkurven . . . . .	16
2.2.3	Herstellung der Substratlösungen . . . . .	17
2.2.4	Zellproliferationsversuche . . . . .	18
2.2.5	DNA-Analyse durch Laser Scanning Cytometrie . . . . .	19
2.2.6	Statistische Analyse . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1	Zellproliferationsassay . . . . .	23
3.1.1	Darstellung nach Substanzen . . . . .	23
3.1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Zelllinien . . . . .	32
3.2	Morphologische Veränderungen . . . . .	40
3.2.1	SKNSH-Zellen . . . . .	41

3.2.2	SHSY5Y-Zellen . . . . .	42
3.2.3	LAN1-Zellen . . . . .	43
3.2.4	LAN5-Zellen . . . . .	44
3.2.5	LS-Zellen . . . . .	45
3.2.6	Kelly-Zellen . . . . .	46
3.2.7	IMR32-Zellen . . . . .	47
3.3	Laser Scanning Cytometrie . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Erblich bedingte Stoffwechselerkrankungen

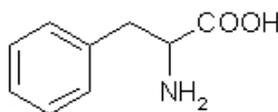
Genetisch bedingte Stoffwechselerkrankungen werden durch fehlende oder mutierte Enzyme bedingt. Dadurch kommt es nicht nur zu einem Fehlen der Enzymprodukte sondern auch zu einem Aufstau der Enzymsubstrate, die entweder zu anderen niedermolekularen Metaboliten umgebaut werden oder in ihrer ursprünglichen Form im Körper der Erkrankten akkumulieren.

In dieser Arbeit wurden niedermolekulare Metabolite von vier Störungen des Aminosäurestoffwechsels untersucht: Phenylalanin akkumuliert bei der Phenylketonurie (PKU), 3-Hydroxy-Glutarsäure findet sich bei Patienten mit Glutaracidurie Typ I (GA I) erhöht, beim Zellwegersyndrom sammelt sich unter anderem Leukotrien C<sub>4</sub> im Körper der Patienten an und bei der Ahornsiruperkrankung (Maple Syrup Urine Disease, MSUD) kommt es zu einer Akkumulation von Leucin.

Allen diesen Stoffwechselerkrankungen ist es gemein, daß zusätzlich zu den Symptomen, die durch die unmittelbare Störung der Stoffwechselwege entstehen, ein Schaden des zentralen Nervensystems mit entsprechender klinischer Symptomatik vorliegt.

## 1.2 Phenylketonurie

Phenylalanin (Phe) ist eine für den Menschen essentielle, proteinogene Aminosäure, deren Stoffwechselstörung die Phenylketonurie (PKU) darstellt.



**Abbildung 1.1:** Phenylalanin, 2-Amino-3-phenyl-propionsäure

PKU-Patienten weisen eine erhöhte Plasmakonzentration dieser Aminosäure auf. Dabei korreliert die Konzentration von Phe mit dem Schweregrad der klinischen Symptomatik

(Muntau *et al.*, 2000).

1934 beschrieb der norwegische Arzt Asbjørn Følling als erster diese autosomal-rezessiv vererbte Störung des Aminosäuremetabolismus (Jervis, 1939), die mit einer mentalen Retardation der erkrankten Personen assoziiert ist (Folling, 1934). Sie beruht auf einem Defekt des Leberenzym Phenylalaninhydroxylase, das für den Abbau von Phe zu Tyrosin zuständig ist (Jervis, 1953). Durch diese Störung des Aminosäurestoffwechsels kommt es zu einer Anreicherung von Phe im Körper, das in alternative Abbauprodukte wie Phenylacetat, Phenallaktat und Phenylpyruvat verstoffwechselt wird (Muntau *et al.*, 2000).

Trotz intensiver Forschung blieb die Pathogenese der mentalen Retardation weiter im Unklaren. Die Ergebnisse neuropathologischer Untersuchungen an Gehirnen von PKU-Erkrankten zeigten ein vielfältiges morphologisches Bild. Zum einen fand man eine blasse Anfärbung des Myelins, die auf einen Defekt der Oligodendrozyten hinweist (Alvord *et al.*, 1950). Zum anderen lassen eine Abnahme der dendritischen Dornen von kortikalen Pyramidenzellen und eine Größenabnahme eben dieser Zellen auf einen Defekt der Neurone selbst schließen. Eine gesteigerte Hirnzeldichte ist sowohl mit einem Defekt der Oligodendrozyten als auch mit einer Störung der Neuronen vereinbar (Bauman und Kemper, 1982).

Eine konstante Gemeinsamkeit der morphologischen Untersuchungen ist die Reduktion des Hirngewichts von PKU-Patienten auf 80 % der Kontrollgruppe (Jervis, 1963). Man geht davon aus, dass all diese Veränderungen, hervorgerufen durch die Hyperphenylalaninämie, Ausdruck einer Entwicklungsstörung der Neurone und der sie umgebenden Glia sind (Bauman und Kemper, 1982). Bis zur Einführung einer früh beginnenden, konsequenten phenylalaninarmen Diät Ende der 50er Jahre zeigte sich ab dem ersten Lebenshalbjahr ein hochgradiger, zumeist progredienter mentaler Entwicklungsrückstand. In 75-90 % der Fälle waren EEG-Veränderungen zu beobachten, 25 % der Patienten litten unter Krampfanfällen. Es waren sowohl Pyramidenbahnzeichen (gesteigerte Muskeleigenreflexe) als auch extrapyramidale Störungen (erhöhter Muskeltonus) zu finden. Weiterhin zeigte sich eine Mikrozephalie. Die Lebenserwartung ist bei diesem Krankheitsbild jedoch nicht eingeschränkt (Muntau *et al.*, 2000).

In Fällen der milden PKU, in denen die Konzentration des Phenylalanins in Liquor und Blut nicht über 10 mg/dl steigt, werden keine neurologischen Symptome beobachtet (Weglage *et al.*, 1997).

## 1.3 4-Phenylbutyrat

4-Phenylbutyrat (4-PB) ist eine dem Phenylalanin strukturverwandte Substanz und unterscheidet sich nur durch eine fehlende Aminogruppe und die Anzahl der C-Atome (vergleiche Abbildung 1.1 mit Abbildung 1.2). Sie wird als neuroprotektiv beschrieben (Inden *et al.*, 2007) und wurde in mehreren klinischen Studien als ein Chemotherapeutikum gegen Krebs eingesetzt (Gilbert *et al.*, 2001; Gore und Carducci, 2000; Gore *et al.*, 2002; Warrell *et al.*, 1998).



Abbildung 1.2: 4-Phenylbutyrat

Mehrere Studien haben eine Differenzierung und eine Wachstumsinhibition von verschiedenen humanen malignen Tumoren unter 4-PB beobachtet (DiGiuseppe *et al.*, 1999; Gore *et al.*, 1997; Shack *et al.*, 1996). Huang *et al.* zeigten einen antiproliferativen Effekt von 4-PB auf humane Colonkarzinomzellen (Huang und Waxman, 1998), auch humane Melanomzellen reagierten mit einer Wachstumsminderung (Liu *et al.*, 1994). Li *et al.* beschrieben als erste Arbeitsgruppe einen irreversiblen antiproliferativen und differenzierenden Effekt von 4-PB auf humane Medulloblastomzellen (Li *et al.*, 2004).

Gleichzeitig wird Phenylbutyrat in der Behandlung der Hyperammonämie bei Kindern mit Harnstoffzyklusstörungen eingesetzt (Brusilow *et al.*, 1984).

## 1.4 Glutarazidurie

3-Hydroxy-Glutarsäure (3-OH-GA) ist eine niedermolekulare Substanz, die bei der Glutarazidurie Typ I (GA I) in den erkrankten Patienten akkumuliert.

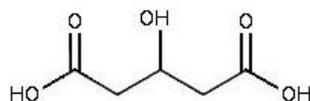


Abbildung 1.3: 3-Hydroxy-Glutarsäure

Die GA I ist ein autosomal-rezessiv vererbter Mangel an mitochondrialer Glutaryl-CoA-Dehydrogenase. Durch diesen Mangel kommt es zu einer Störung im Abbau der

Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan und dadurch zu einer Anreicherung von 3-OH-GA, Glutarat, Alpha-Ketoglutarat und Gluctaconat im Körper (Goodman *et al.*, 1975; Goodman und Frerman, 1995; Hoffmann *et al.*, 1996). Die Akkumulation von 3-OH-GA scheint spezifisch für die GA I zu sein, während die anderen Metabolite auch bei anderen Stoffwechselerkrankungen in erhöhten Konzentrationen gefunden werden (Baric *et al.*, 1999).

Pathologisch-anatomisch lassen sich gliöse Veränderungen in den Basalganglien, sowie im Caudatum und Putamen feststellen (Bennett *et al.*, 1986; Goodman *et al.*, 1977, 1987). Charakteristisch ist eine Makrozephalie bei frontotemporaler Atrophie und Vergrößerung der Inselzysternen (Amir *et al.*, 1989; Bergman *et al.*, 1989; Goodman *et al.*, 1987; Hoffmann und Zschocke, 1999; Iafolla und Kahler, 1989; Yamaguchi *et al.*, 1987). Diese Veränderungen spiegeln sich auch in der Bildgebung wieder, in der Magnet-Resonanztomographie (MRT) zeigt sich eine Atrophie der Basalganglien und des frontotemporalen Kortex (Hoffmann *et al.*, 1996).

Klinisch zeigen sich bei diesen Patienten eine akute progressive oder intermittierende Dystonie und Dyskinese, die nach encephalopathischen Krisen, ausgelöst durch fiebrhafte Infekte oder Impfungen, auftreten (Kyllerman und Steen, 1980). Chronisch zeigt sich eine mentale Retardation von unterschiedlicher Schwere (Dunger und Snodgrass, 1984; Gregersen *et al.*, 1977). Es werden aber auch Patienten ohne jegliche klinische Symptomatik beschrieben (Amir *et al.*, 1989; Iafolla und Kahler, 1989).

Bis jetzt ist der genaue Mechanismus, der zu den neuropathologischen Veränderungen und dem daraus resultierenden klinischen Bild führt, ebenfalls nicht hinreichend verstanden.

## 1.5 Maple Syrup Urine Disease

Leucin ist eine für den Menschen essentielle, verzweigt-kettige Aminosäure.

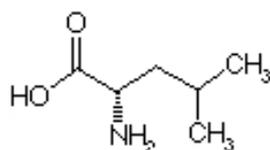


Abbildung 1.4: Leucin

Bei der Maple Syrup Urine Disease (MSUD), einer autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung, kommt es durch einen fehlerhaft codierten 2-Ketosäuren-Dehydrogenase-Komplex zu einer Anreicherung sowohl besonders von Leucin, als auch von Isoleucin und Valin im Blut, Liquor cerebrospinalis, Urin und Hirngewebe der Patienten (Snyderman, 1988).

Charakteristisch sind akute enzephalopathische Krisen, die mit progressiven neurologischen Zeichen wie Hirnödemen, epileptischen Krämpfen und Koma einhergehen (Chuang und Shih, 2001). In bildgebenden Verfahren konnte bei MSUD-Patienten ein Schaden an Neuronen und weißer Masse sowie pathologische Veränderungen der Basalganglien nachgewiesen werden (Brismar *et al.*, 1990; Steinlin *et al.*, 1998). Daneben werden postpartal eine chronische mentale Retardation (Chuang und Shih, 2001) und eine Störung der Myelinisation beobachtet (Langenbeck, 1984).

Während der enzephalopathischen Krisen, die durch Infektionen, Fieber, Impfungen oder Operationen ausgelöst werden können, findet man außerordentlich erhöhte Konzentrationen von Leucin, Valin und Isoleucin im Blut, Liquor und Hirngewebe (Riviello *et al.*, 1991; Levin *et al.*, 1993). Sobald die Plasmakonzentration in der Akuttherapie reduziert wird, bilden sich alle neurologischen Zeichen innerhalb einiger Tage zurück (Chuang und Shih, 2001).

Die lebenslange Kontrolle und Reduktion der Plasmaleucinkonzentration durch diätetische Maßnahmen in der Langzeittherapie zeigen eine positive Korrelation mit den intellektuellen Leistungen der Patienten (Chuang und Shih, 2001).

## 1.6 Zellwegersyndrom

Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) gehört zu den Cysteinyl-Leukotrienen und ist ein Produkt des 5-Lipoxygenase-Signalweges des Arachidonsäurestoffwechsels.

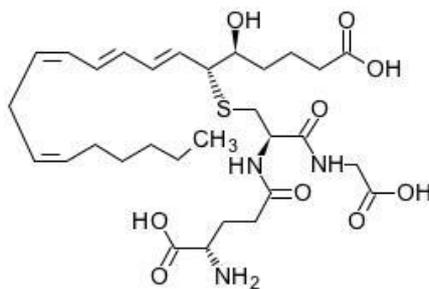


Abbildung 1.5: Leukotrien C<sub>4</sub>

Es bewirkt eine Kontraktion der glatten Muskulatur und einen Austritt von Plasmaproteinen aus Gefäßen in das Gewebe (Extravasation) (Murphy *et al.*, 1979; Hammarström, 1983; Lewis und Austen, 1984; Samuelsson *et al.*, 1987).  $LTC_4$  wird im Blut zu  $LTE_4$  metabolisiert (Keppler *et al.*, 1989; Hammarström *et al.*, 1981).  $LTE_4$  wird dann via  $\beta$ -Oxidation (Sala *et al.*, 1990) in Peroxisomen abgebaut (Jedlitschky *et al.*, 1991). Diese Verstoffwechselung erfolgt hauptsächlich in Hepatozyten (Appelgren und Hammarström, 1982; Hagmann *et al.*, 1984; Keppler *et al.*, 1985), die Metabolite werden über die Galle und den Urin ausgeschieden (Maltby *et al.*, 1990; Huber *et al.*, 1990).

In Patienten mit Zellwegersyndrom (ZS), einer peroxisomalen Stoffwechselstörung, ist der Abbau von  $LTC_4$ ,  $LTD_4$  und  $LTE_4$  gestört. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Ausscheidung von Metaboliten der genannten Leukotriene, die nicht mehr über die  $\beta$ -Oxidation weiter abgebaut werden können, im Urin der Patienten (Mayatepek *et al.*, 1993).

Das ZS wird autosomal-rezessiv vererbt und beruht auf heterogenen genetischen Defekten in der Genese der Peroxisomen. Patienten mit ZS leiden unter schwerwiegenden neurologischen Defiziten. Es sind Störungen der neuronalen Migration beschrieben, die zu spezifischen zytoarchitektonischen Strukturveränderungen der zerebralen Hemisphären - hauptsächlich perisylvisch und die medial angrenzende frontoparietale Konvexität, dem Cerebellum und den inferioren olivaren Komplexen führen. Diese Einschränkung der Migration ist ab dem 3 Schwangerschaftsmonat kontinuierlich zu sehen. Zusätzlich dazu zeigt sich eine Demyelinisierung der weißen Substanz. Weiterhin zeigen ZS-Patienten schwerwiegende organische Störungen der Augen und der Ohren und sind dadurch meist blind und taub. Außerdem kann eine progressive hepatorenale Insuffizienz auftreten. Die Lebenserwartung dieser Patienten liegt unter einem Jahr (Gould *et al.*, 2001).

## 1.7 Zellzyklus

Im Hinblick auf die Fragestellung nach Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der Neuroblastomzellen durch die verschiedenen Substanzen wird hier ein kurzer Einblick in die Zellzyklusphasen einer normalen Zelle gegeben.

Der Zellzyklus setzt sich aus der Interphase, in der die Zelle ihre normalen Funktionen erfüllt und sich auf die nächste Teilung vorbereiten kann, und aus der Mitosephase (Teilungsphase), zusammen.

Die Interphase lässt sich in die Phasen G1, S und G2 unterteilen.

- In der G1-Phase (gap-1-Phase, Präsynthesephase) erfüllt die Zelle ihre normalen Funktionen. In dieser Phase liegt ein einfacher diploider DNA-Gehalt vor. Diese Phase lässt sich noch einmal unterteilen in die G1a-Phase, in der die DNA noch sehr kondensiert ist, und die G1b-Phase, in der die DNA als lockeres Chromatin vorliegt.
- In der Synthesephase wird die DNA verdoppelt.
- Die G2-Phase (gap-2-Phase, prämitotische Phase) ist charakterisiert durch einen doppelten (tetraploiden) DNA-Gehalt. In dieser Phase werden etwaige Replikationsfehler korrigiert.

Während der Mitosephase teilt sich die Zelle. In der Karyokinese werden die Chromosomen mit Hilfe des Spindelapparates auf zwei neue Kerne verteilt. Das Zytoplasma wird in der Zytokinese auf die entstehenden Tochterzellen aufgeteilt.

Nach der M-Phase kann die Zelle entweder wieder in die G1-Phase eintreten oder aber in der G0-Phase verweilen. Dieses ist ein sehr stabiler Zustand, in dem die Zelle ihre normalen Funktionen erfüllt und sich nicht teilt. Viele Zellen des Körpers können, zum Beispiel bei Zellverlust in dem jeweiligen Organ, wieder aus der G0- in die G1-Phase übertreten und sich teilen (z. B. Hepatozyten), andere können nicht mehr in die G1-Phase zurückkehren (z. B. Neurone) (Welsch, 2003).

## 1.8 Neuroblastomzellen als Modell für Neuroblasten

Die oben beschriebenen Stoffwechselerkrankungen zeigen alle eine makroskopische und/oder mikroskopische Umwandlung der Hirnstruktur mit daraus resultierenden polymorphen Symptomen (Bauman und Kemper, 1982; Amir *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 2001; Chuang und Shih, 2001). Es werden sowohl Veränderungen der Neurone als auch der Gliazellen beschrieben. Beide Zellarten differenzieren sich während der Embryonalentwicklung aus Neuroblasten. Mit der Differenzierung verlieren sie ihre Teilungsfähigkeit (Sadler, 2003).

Humane Neuroblastomzellen stehen aus mehreren Gründen nicht für die Versuche in der Zellkultur zur Verfügung. Zum einen müssten sie aus embryonalem Gewebe gewonnen werden, was eine ethische Problematik aufwirft. Zum anderen lassen sich die Neuroblasten nur schwer in Kultur halten und es ist nicht möglich, die für die Versuche nötige Menge an Zellen zu reproduzieren.

Deswegen wurden humane Neuroblastomzelllinien als Modell für humane Neuroblasten eingesetzt. Dieses Vorgehen wird auch in der Neurobiologie gewählt (Koizumi *et al.*, 1999; Greene und Tischler, 1976). Anders (2004) verglich in seiner Diplomarbeit Neuroblastomzellen mit einer Cortexzellkultur und zeigte, dass man Neuroblastomzellen für funktionelle Versuche durchaus als Neuronenmodell einsetzen kann.

### 1.8.1 Neuroblastomzelllinien

Im folgenden Kapitel sollen kurz die verwendeten Zelllinien vorgestellt werden.

Die Neuroblastomzelllinie SKNSH wurde 1970 im Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York etabliert. Sie beinhaltet zwei deutlich unterschiedliche Zelltypen, einen neuroblastischen und einen epithelialen. In der Karyotypanalyse beider Zelltypen wurden 47 Chromosomen identifiziert (Biedler *et al.*, 1973).

Als homogene neuroblastenähnliche Zellen wurden SHSY5Y verwendet, ein Subklon des oben beschriebenen neuroblastischen Anteils der Zelllinie SKNSH (Biedler *et al.*, 1978).

Die Zellen der Linie IMR32 wurden 1967 am Institute of Medical Research in Camden, New Jersey etabliert. Auch diese zeigten, wie SKNSH, zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen. Sowohl die neuroblastenartigen als auch die differenzierteren Zellen besaßen einen hyperploiden Chromosomensatz und die für diese Zelllinie typischen Markern (Tumilowicz *et al.*, 1970).

Die humane Neuroblastomzelllinie Kelly wurde an der Mount-Sinai-School of Medicine, New York etabliert (Schwab *et al.*, 1983).

Die Zelllinie LAN1 wurde 1977 am Department of Pediatrics, UCLA School of Medicine, Los Angeles, Californien etabliert. Diese Neuroblastomzellen wiesen einen inkonstanten, hypotetraploiden Chromosomensatz auf (Seeger *et al.*, 1977). 1982 wurde hier auch LAN5 als weitere Neuroblastomzelllinie etabliert (Seeger *et al.*, 1982).

Die Zelllinie LS wurde 1989 im Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen etabliert. Sie war charakterisiert durch einen über 50 Passagen stabilen hyperdiploiden Karyotypen (Rudolph *et al.*, 1991).

Die Neuroblastomzellen der Linien IMR32 (Pelidis *et al.*, 1998; Schwab *et al.*, 1983), LAN1 (Thiele, 1998), Kelly (Preis *et al.*, 1988; Schwab *et al.*, 1983) und LS (Rudolph *et al.*, 1991) besitzen eine vervielfältigte *N-myc*-Sequenz auf ihrer DNA.

Die Neuroblastomzellen der Linie SKNSH sind nicht *N-myc*-amplifiziert, expressieren aber *N-myc* (Pelidis *et al.*, 1998; Preis *et al.*, 1988).

Für den SKNSH-Subklon SHSY5Y und für die Zelllinie LAN5 sind keine *N-myc*-Amplifikationen beschrieben.

Eine zusammenfassende Darstellung der Zelllinien und ihrem *N-myc*-Status bietet Tabelle 4.1 (S.54).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Die Zelllinien SHSY5Y und LS wurden von Herrn Prof. Dr. Herbert Hildebrandt (Abteilung für zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) bezogen. Die Zelllinien SKNSH, IMR32, Kelly, LAN1 und LAN5 stellte Herr Prof. Dr. Rudolf Erttmann (Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) zur Verfügung.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

Alle nachfolgend beschriebenen Methoden wurden unter einer Sicherheitswerkbank Klasse 2 (SterilGard<sup>®</sup> Class II Type A/B3, The Baker Company, Stanford, Maine, USA) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen (37°C, 100 % relative Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>) in 200 ml Zellkulturflaschen (PE Vented Cap, USA, Sarstedt, Inc.). Gezüchtet wurden die Zellen in ca. 15 ml RPMI Medium (RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamin; Gibco, Paisley, Schottland) unter Zugabe von 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS, Gibco, Paisley, Schottland), 100 U/ml Penicillin sowie 100 mg/ml Streptomycin (Gibco, Paisley, Schottland); diese Mischung wird im folgenden als Kulturmedium bezeichnet.

Das Kulturmedium wurde zwei- bis dreimal in der Woche ausgewechselt. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie konfluent waren. Dazu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit ca. 5 ml Phosphatpuffer (Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, - MgCl<sub>2</sub>, - CaCl<sub>2</sub>, Gibco, Paisley, Schottland) gespült. Danach wurden die Zellen mit je 5 ml 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA (Gibco, Paisley, Schottland) für

5 Minuten bei 37° C inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Kulturflaschenboden lösten, wurde die Reaktion mit 5 ml Kulturmedium gestoppt, um die zellschädigende Wirkung des Trypsin-EDTAs zu beenden. Ein Teil dieser so entstandenen Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturflaschen verteilt, der andere Teil wurde für die Zellproliferationsversuche genutzt (siehe unten).

Vor der Durchführung der Versuche wurden alle Neuroblastomzellkulturen sowohl mit dem DAPI-Fluoreszenztest (Vectorshild, Mounting fluorescence with DAPI, Vector Lab. Inc., Burlingham, Ca 94010) als auch durch eine PCR (Mycoplasma-PCR-Detection-Kit, VenorGem, minerva biolabs, Berlin, Germany) auf Mykoplasmen untersucht. Bei keiner der Zelllinien ließen sich Mykoplasmen detektieren.

### 2.2.2 Erstellung der Eichkurven

In dieser Arbeit sollte das Proliferationsverhalten von Neuroblastomzelllinien unter verschiedenen Substraten getestet werden. Daher war es zunächst wichtig, vor der Versuchsdurchführung die Zellkonzentration mittels Eichkurven zu bestimmen, die ein optimales Wachstumsverhalten für jede Zelllinie gewährleistet.

Die Zellen sollten sich während der Versuche in einem exponentiellen Wachstum befinden. Die Zellkonzentration durfte nicht zu hoch gewählt werden, um eine Wachstumshemmung während der Versuchsdurchführung durch überhöhte Zellzahl auszuschließen. Die Zahl der ausgesäten Zellen durfte aber auch nicht zu gering gewählt werden, da dadurch eine maximal hemmende Wirkung eines Substrates hätte verschleiert werden können.

Für jede Zelllinie wurde ausgehend von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml über weitere Verdünnungsschritte bis zu einer Konzentration von  $6 \times 10^3$  Zellen/ml mit Kulturmedium eine Verdünnungsreihe erstellt. Die jeweiligen Zellkonzentrationen wurden in sechsfachen Ansätzen in 96-*well*-Mikrotiterplatten (Sarstedt, INC, Newton, USA) zu je 90  $\mu$ l pro *well* ausgesät und für 24 Stunden bei Standardbedingungen inkubiert, um ein optimales Anwachsen zu ermöglichen. Als Kontroll-Leerwert für den ELISA-Reader wurde in sechs *wells* pro 96-*well*-Mikrotiterplatte 90  $\mu$ l Kulturmedium pipettiert.

Nach 24 Stunden wurde in jedes *well* 10  $\mu$ l Kulturmedium als Ersatz für die Substrate gegeben. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.

Mit dem Cell Proliferation Kit II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde nach insgesamt 72 Stunden die mitochondriale Enzymaktivität, die mit der Zellzahl korreliert, bestimmt. Dazu wurde XTT *labeling reagent* und *electron coupling reagent* in einer Konzentration von 50 : 1 gemischt und je 50  $\mu$ l dieser Lösung in jedes

well gegeben.

Zelllinie	Zellzahl [Zellen/ml]
Kelly	15.000
LAN1	200.000
LAN5	250.000
LS	25.000
IMR32	25.000
SKNSH	40.000
SHSY5Y	150.000

**Tabelle 2.1:** Optimale Aussähkonzentration der Neuroblastomzelllinien [Zellen/ml] bei einer Versuchsdauer von 72 Stunden

Die Mikrotiterplatten wurden dann zur weiteren Inkubation in den Brutschrank gestellt. Nach 4, 6, 12 und 24 Stunden wurden die Extinktionen im ELISA-Reader bestimmt. Für die Zelllinien LAN1, LAN5, Kelly, SKNSH und IMR32 stellte sich die Messung sechs Stunden nach Zugabe des XTT-Assays als optimales Zeitfenster heraus, für SHSY5Y und LS war die Messung nach 24 Stunden besser geeignet. Alle weiteren Messungen wurden daher nach diesem Zeitschema durchgeführt.

In Tabelle 2.1 sind die ermittelten optimalen Zellkonzentrationen für eine Versuchsdauer von 72 Stunden zusammenfassend dargestellt.

### 2.2.3 Herstellung der Substratlösungen

Von jedem verwendeten Substrat wurde eine Lösung mit dem Kulturmedium hergestellt. Da sich nicht alle Stoffe in dem Medium lösen ließen, mussten verschiedene andere Lösungsmittel verwendet werden.

3-Hydroxy-Glutarsäure (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Braulke, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) konnte in dem Kulturmedium gelöst werden.

Phenylalanin und Leucin (bezogen von SigmaAldrich, CHEMIE GmbH, Steinheim Deutschland) wurden jeweils in 1 m Salzsäure (HCl, Merck KgaA Darmstadt, Deutschland) gelöst, mit Medium versetzt und mit Natronlauge (NaOH, Merck KgaA Darmstadt, Deutschland) auf den pH-Wert des Kulturmediums titriert.

Phenylbutyrat (SigmaAldrich, CHEMIE GmbH, Steinheim Deutschland) wurden in 1 m Natronlauge gelöst, dazu wurde Medium in der entsprechenden Menge gegeben und

die Lösung mit 1 m HCl wieder auf den vorherigen pH-Wert titriert.

Das Leukotrien C<sub>4</sub> (SigmaAldrich, CHEMIE GmbH, Steinheim Deutschland) war bei Lieferung in Methanol gelöst. Diese Lösung wurde in entsprechenden Mengenverhältnissen mit dem Nährmedium vermengt.

Die jeweiligen Kontrolllösungen wurden nach den selben Verfahren ohne die Metaboliten hergestellt.

Alle Lösungen wurden zum Schluss mit einem Stericup™ (Millipore Corporation, Billerica, USA) steril filtriert und dann kühl gelagert.

#### 2.2.4 Zellproliferationsversuche

Um die Wirkung der niedermolekularen Substrate auf die Zellproliferation der Neuroblastomzellen zu bestimmen, wurde das Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien mit und ohne Zugabe des jeweiligen Substrats zum Kulturmedium untersucht. Die Kontrollen beinhalteten das jeweilige Lösungsmittel ohne Substrat.

Um eventuelle Effekte des Lösungsmittels zu erkennen und als Fehlerquelle auszuschließen, wurden pro Versuch auch Neuroblastomzellen in normalem Kulturmedium ohne weitere Zusätze ausgesät.

Die Zellproliferation wurde anhand der mitochondrialen Enzymaktivität bestimmt, die mit der Zellzahl korreliert (XTT-Test, Boehringer Mannheim, Deutschland).

Die Zellsuspension, die beim Zellkulturflaschenwechsel - wie oben beschrieben - gewonnen wurde, wurde in 30 ml Weißkappenröhrchen (Greiner bio-one, UK) pipettiert und für 10 Minuten bei 1.500 U/min zentrifugiert (Heraeus Sepatech Labufuge A). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert und vorsichtig durchmischt. Nach Herstellung einer 1:100-Verdünnung mit 10 ml CASY<sup>®</sup>ton und 100 ml Zellsuspension wurde die Zellzahl im CASY<sup>®</sup>-Zellzählgerät (CellCounter Analyser System, Schärfe System GmbH, Reutlingen, D 72764) ermittelt.

Die Neuroblastomzelllinien wurden in den ermittelten optimalen Konzentrationen (siehe Tabelle 2.2.2 (S.16)) zu jeweils 90 ml in 96-*well* -Mikrotiterplatten ausgesät.

Die Zelllinien wurden alle für 24 Stunden inkubiert, um ein optimales Anwachsen zu gewährleisten. Dann wurden 10 ml Lösung mit den jeweiligen Substraten in jedes *well* hinzugegeben.

Nach 48 Stunden Inkubation aller Neuroblastomzelllinien mit dem jeweiligen Substrat bei Standardbedingungen wurde in jedes *well* 50 ml XTT-Lösung (Boehringer Mannheim) pipettiert. Je nach Proliferationsgeschwindigkeit wurden die Zelllinien unterschiedlich lange im Brutschrank inkubiert: LAN1, LAN5, Kelly, SKNSH und IMR32

für 6 Stunden, LS und SHSY5Y für 24 Stunden. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem Dynatech MR 3.13 Microelisa Reader (Dynex Technologies, Ashford, UK) gemessen.

### 2.2.5 DNA-Analyse durch Laser Scanning Cytometrie

Um festzustellen, ob die Substrate, die *in vitro* das Proliferationsverhalten der Neuroblastomzellen beeinflussen, auch Einfluss auf den Zellzyklus nehmen, wurde eine Laser Scanning Cytometrie Untersuchung (LSC) durchgeführt.

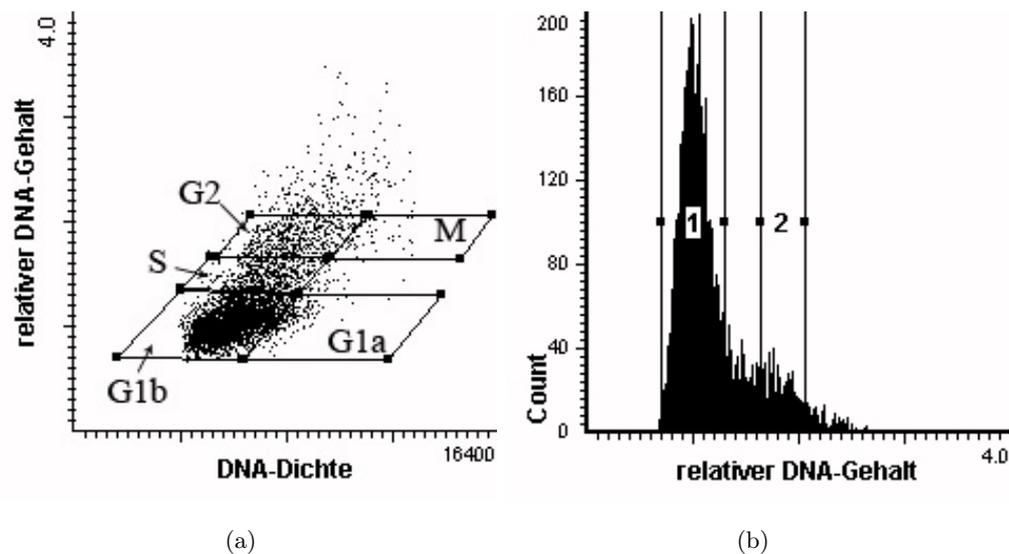
Bei der LSC wird der DNA-Gehalt in Zellen mit Hilfe eines DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs bestimmt. Die eingefärbten Zellen werden auf einen Objektträger aufgebracht und von einem Laser abgescannt. Anhand des Fluoreszenzsignals können Aussagen über Menge und Dichte der enthaltenen DNA gemacht werden.

In mitotischen Zellen ist die DNA kondensierter als in Zellen in der Interphase. Für die verschiedenen Phasen der Zellteilung sind bestimmte Verhältnisse zwischen Menge und Dichte der DNA charakteristisch. Auf diese Weise können mittels LSC die unterschiedlichen Zellphasen gegeneinander diskriminiert werden (Cancer Research UK, 2002).

Die Abbildung 2.1 (S.20) stellt beispielhaft eine LSC-Messung für die Zellen der Linie LAN1 dar.

In a) ist die DNA-Dichte gegen den relativen DNA-Gehalt aufgetragen. Jeder Punkt symbolisiert eine Zelle mit entsprechenden Werten. Das Raster grenzt die einzelnen Zellzyklusphasen voneinander ab. In der Phase G1a liegt ein einfacher diploider DNA-Gehalt vor, die DNA ist kondensiert. In der Phase G1b liegt die DNA als lockeres Chromatin vor, der DNA-Gehalt hat sich nicht verändert. In der S-Phase wird die DNA repliziert, der DNA-Gehalt in der einzelnen Zelle steigt. In der Zellzyklusphase G2 liegt die DNA weiterhin in einer unkondensierten Form vor, die Zelle hat einen doppelten (tetraploiden) DNA-Gehalt. In der Mitose-Phase liegt die DNA in der kondensierten Form der Chromosomen vor, um eine spezifische Verteilung auf die zwei entstehenden Tochterzellen zu ermöglichen, die DNA-Dichte ist hoch. Dieser Zyklus spiegelt sich in Diagramm a) wider.

In b) ist die Verteilung des relativen DNA-Gehalts in einem Histogramm festgehalten. Nach einem ersten Peak erkennt man einen starken Abfall der Häufigkeit für hohe relativen DNA-Gehalte. Die eingefügten Linien bezeichnen die Phasengrenzen der Phasen G1 (1) und G2/M (2), welche den waagerechten Linien in Abbildung a) entsprechen.



**Abbildung 2.1:** Exemplarische Darstellung der LSC-Auswertung am Beispiel der LAN1-Neuroblastomzellen; in a) ist der relative DNA-Gehalt gegen die DNA-Dichte aufgetragen, die Phasengrenzen trennen die einzelnen Phasen des Zellzyklus voneinander; im Histogramm b) ist die Verteilung des relativen DNA-Gehalts dargestellt, die Phasengrenzen entsprechen denen aus Diagramm a).

### Präparation der Cytospins für LSC

Wie bei den Zellproliferationsversuchen wurden die Neuroblastomzellen zentrifugiert und die Zellzahl im CASY<sup>®</sup>-Zellzähler bestimmt.

Die Zelllinien wurden dann in der jeweiligen optimalen Zellkonzentration (siehe oben) in 4,5 ml Nährmedium in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

Nach 24 h Inkubation zum optimalen Anwachsen wurde in die Zellkulturflaschen jeweils 0,5 ml der vorbereiteten Substrat- bzw. Kontrolllösung dazugegeben.

Die Zellen wurden nun alle für 48 h bei Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen mikroskopiert und photographiert um eventuelle morphologische Veränderungen zu dokumentieren.

Nach Ablösen der Zellen vom Flaschenboden mittels Trypsin wurden die jeweiligen Zellsuspensionen in 30 ml Weißkappenröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert (Heraeus Sepatech Labufuge A). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets je in mindestens 5 ml Paraformaldehyd (PFA, Merck 1.04005) aufgeschwemmt. Dieses dient zur Fixierung der Zellen.

Nach 20 min wurden die Neuroblastomzellen wieder aus dem PFA zentrifugiert (Hera-

eus Sepatech Labufuge A) und in ca. 10 ml PBS gewaschen.

Die so fixierten Zellen wurden nun auf HistoBond<sup>®</sup>-Objektträger (Marienfeld GmbH & Co.KG, Deutschland) auszentrifugiert (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R). Die so entstandenen sogenannten Cytospins wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann bei -80<sup>o</sup> Celsius eingefroren.

### **DNA-Färbung**

Die Cytospins wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut, auf die schon fixierten Zellen wurde ca. 150  $\mu$ l RNase (1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt; Roche Applied Science, Deutschland) gegeben und dann bei 37<sup>o</sup> C im Brutschrank inkubiert.

Nach 30 Minuten wurden die Cytospins dreimal 5 min in TBS gewaschen. 150  $\mu$ l des DNA-Fluoreszenzfarbstoffes DRAQ 5 (1:100 in TBS verdünnt; bio-status, UK) wurde auf jeden Cytospin pipettiert. Nach einer lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur von 15 min wurde der Farbstoff, der nicht an DNA gebunden hatte, mit TBS abgewaschen. Die Cytospins wurden mit Deckgläsern versehen.

Die Fluoreszenz der angefärbten DNA wurde mit dem Laser Scanning Cytometer BX50 (CompuCyte Software: WinCyte v.3.4) visualisiert und quantifiziert.

### **2.2.6 Statistische Analyse**

Die ausgewerteten Daten der Zellproliferationsassays wurden mit den sieben beschriebenen Neuroblastomzelllinien in jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen mit jeweils vier Ansätzen pro Konzentration und Substrat erhoben.

Die gemessenen Extinktionen der behandelten Zellen wurden als prozentuales Überleben im Vergleich auf die Extinktionen der Lösungsmittelkontrolle (100 %) bezogen.

Für die Bestimmung der Zellzyklusphasen mit der LSC wurden in drei voneinander unabhängigen Vorgängen jeweils vier Cytospins angefertigt, angefärbt und gescannt, so dass auch hier zwölf Werte pro Zelllinie ausgewertet werden konnten.

Beispielhaft wurden vier Cytospins jeder Neuroblastomzelllinie im Hinblick auf die Zyklusphasenveränderung unter Phenylbutyrate genauer mit der CompuCyte Software ausgewertet.

Der ungepaarte zweiseitige Students T-Test wurde durchgeführt, um die statistische Signifikanz der erzielten Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollen und behandelten Zellen darzustellen.

Um die Ergebnisse untereinander zu vergleichen wurde ein Friedman-Test mit anschließendem Dunn's post-Test durchgeführt.

Alle statistischen Auswertungen und Diagramme wurden unter der Nutzung der Software GraphPad Prism™ (Intuitive Software for Science, San Diego, USA) erstellt. Als statistisch signifikantes Ergebnis wurde  $p < 0,05$  angenommen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellproliferationsassay

#### 3.1.1 Darstellung nach Substanzen

Zunächst wird der Zusammenhang zwischen dem Proliferationsverhalten der Zelllinien und jeder einzelnen Substanz dargestellt.

#### Neuroblastome unter Phenylalanin

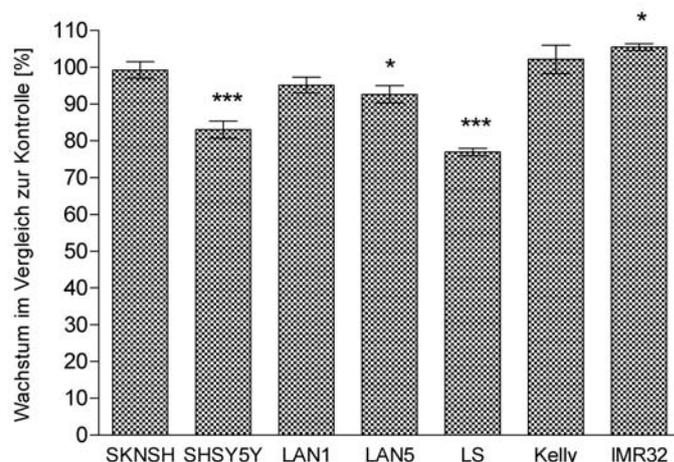
In Abbildung 3.1 (S.24) ist die Wirkung von Phenylalanin auf die jeweilige Zelllinie zusammenfassend dargestellt.

Die SKNSH-, LAN1- und Kelly-Neuroblastomzellen reagierten unter 40 mg/dl Phenylalanin nicht signifikant mit ihrem Proliferationsverhalten. SHSY5Y-, LS- und LAN5-Zellen dagegen reagierten mit einer deutlichen Wachstumsminde rung. Bei SHSY5Y sank die Proliferation auf 83 % der Kontrolle ab ( $p < 0,0001$ ), bei LS sank das Wachstum sogar auf 77 % der Kontrolle ( $p < 0,0001$ ) und LAN5-Zellen reagierte auf Phenylalanin mit einer Minderung auf 92 % der Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Die Neuroblastomzellen der Linie IMR32 stiegen mit ihrer Proliferation signifikant um 5 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Vergleicht man die Ergebnisse der Linien LS, LAN5 und SHSY5Y mit dem *Friedman*-Test und darauffolgendem *Dunn's-post*-Test, so zeigt sich, dass Phe auf die Zellen der drei Neuroblastomlinien einen gleichstarken antiproliferativen Effekt hat, es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen ( $p > 0,05$ ).

Der leicht proproliferative Effekt von Phe auf die Zellen der Linie IMR32 unterscheidet sich nicht signifikant von den Ergebnissen von Kelly, SKNSH und LAN1 auf Phe.



**Abbildung 3.1:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **40 mg/dl Phenylalanin**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Signifikante Proliferationsminderung der SHSY5Y-Zellen (auf 83% der Kontrolle), LS-Zellen (auf 77% der Kontrolle) und LAN5-Zellen (auf 92% der Kontrolle) (\*\*\*:p<0,0001, \*:p<0,05). Die Proliferationssteigerung der Zellen der Linie IMR32 unterscheidet sich nicht signifikant zu den Ergebnissen von SKNSH, LAN1 und Kelly.

### Neuroblastome unter Phenylbutyrat

Abbildungen 3.2 (S.25), 3.3 (S.26) und 3.4 (S.26) stellen zusammenfassend die Wirkung von Phenylbutyrat in den einzelnen Konzentrationen auf die Neuroblastomzelllinien dar.

Ausnahmslos alle Zellen der sieben Neuroblastomlinien reagierten auf Phenylbutyrat mit einer Minderung des Proliferationsverhaltens.

Mit einer Abnahme des Wachstums auf 11 % der Kontrolle ( $p < 0,0001$ ) zeigten LAN5-Zellen die stärkste Suppression unter 5,0 mMol Phenylbutyrat. 1,25 bzw. 2,5 mMol bewirkten immer noch eine Minderung der Proliferation auf 67 % ( $p < 0,0001$ ) bzw. 58 % der Kontrolle ( $p < 0,0001$ ).

LAN1-Zellen senkten unter 5,0 mMol Phenylbutyrat die Proliferationsrate auf 25 % im Vergleich zur Kontrolle, unter 2,5 mMol kam es zu einer Senkung auf 48 % und unter 1,25 mMol fiel das Wachstum von LAN1-Zellen auf 65 % der Kontrolle ( $p < 0,0001$ ).

Die IMR32-Zellen reagierten auf 1,25 mMol Phenylbutyrat mit einer erniedrigten Wachstumsrate von 86 % ( $p < 0,0001$ ), auf 2,5 mMol mit 80 % ( $p < 0,0001$ ) Wachstum im Vergleich zur Kontrolle und auf 5,0 mMol mit einer Senkung der Proliferationsrate auf 31 % ( $p < 0,0001$ ).

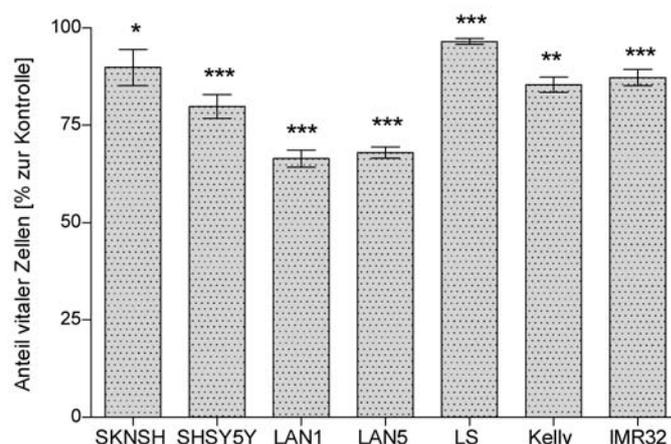
Auch Kelly-Zellen zeigten unter Phenylbutyrat eine Minderung des Wachstums: 1,25 mMol

bewirkten eine Senkung der Rate auf 84 % ( $p=0,0003$ ), 2,5 mMol eine Senkung auf 65 % ( $p<0,0001$ ) und 5,0 mMol eine Senkung auf 35 % der Kontrolle ( $p<0,0001$ ).

Bei der Neuroblastomzellen der Linie LS kam es zu der geringsten Absenkung des Wachstums unter Phenylbutyrat. 1,25 mMol und 2,5 mMol bewirkten jeweils eine Proliferationssenkung auf 96 % ( $p<0,0002$ ), unter 5,0 mMol kam es zu einer Minderung auf 81 % ( $p<0,001$ ).

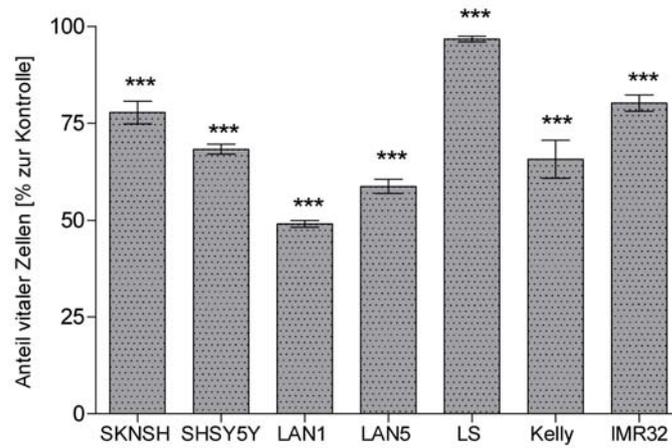
SHSY5Y-Zellen reagierten mit einer Abnahme der Wachstumsrate auf 18 % unter 5,0 mMol Phenylbutyrat ( $p<0,0001$ ), auf 68 % unter 2,5 mMol ( $p<0,0001$ ) und auf 79 % der Kontrollgruppe unter 1,25 mMol ( $p<0,0001$ ).

Bei SKNSH-Zellen erzielte die Zugabe von 5,0 mMol Phenylbutyrat eine Abnahme des Wachstums auf 50 % ( $p<0,0001$ ), bei 2,5 mMol wurde die Proliferation noch auf 77 % reduziert ( $p<0,0001$ ) und unter 1,25 mMol zeigte sich eine Minderung der Wachstumsrate auf 89 % der Kontrolle ( $p<0,05$ ).

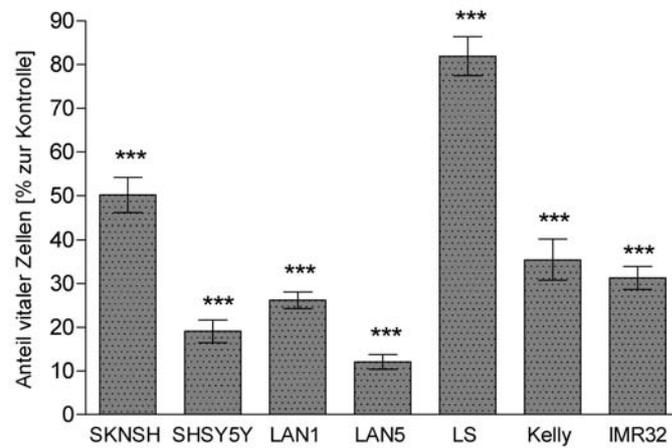


**Abbildung 3.2:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter 1,25 mM 4-PB, Inkubationszeit 48h; MEAN $\pm$  SEM; Signifikante Proliferationshemmung aller Zelllinien, stärkste Suppression bei LAN1-Zellen (auf 65 % der Kontrolle), schwächste Suppression bei LS-Zellen (auf 96 % der Kontrolle), (\*\*\*: $p<0,0001$ , \*\*: $p<0,01$ , \*: $p<0,05$ ).

Bei dem Vergleich der unter 4-PB erzielten antiproliferativen Effekte innerhalb der einzelnen Neuroblastomlinien sieht man, dass die Zellen der Linien Kelly ( $p<0,001$ ), SKNSH ( $p<0,01$ ), SHSY5Y ( $p<0,01$ ), LAN5 ( $p<0,01$ ) und IMR32 ( $p<0,0001$ ) durch 5 mMol 4-PB signifikant stärker gehemmt wurden als durch 1,25 mMol 4-PB. Zwischen der Wachstumsinhibition unter 5 mMol und 2,5 mMol 4-PB zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei den Zellen der Linien SHSY5Y ( $p<0,05$ ) und IMR32 ( $p<0,01$ ). Das



**Abbildung 3.3:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **2,5 mM 4-PB**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Signifikante Proliferationsminderung aller Zelllinien, stärkste Suppression bei LAN1-Zellen (auf 48 % der Kontrolle), schwächste Suppression bei LS-Zellen (auf 96 % der Kontrolle), (\*\*\*:p<0,0001).



**Abbildung 3.4:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **5,0 mM 4-PB**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Signifikante Proliferationshemmung aller Zelllinien, stärkste Suppression bei LAN5-Zellen (auf 11 % der Kontrolle), schwächste Suppression bei LS-Zellen (auf 81 % der Kontrolle), (\*\*\*:p<0,0001).

geminderte Proliferationsverhalten der LAN1- und LS-Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen von 4- PB.

Stellt man die verschiedenen Zelllinien in ihren jeweiligen Konzentrationen einander gegenüber so zeigt sich, dass zwischen SKNSH, SHSY5Y, LAN1, LAN5, IMR32 und Kelly keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf 4-PB bestehen ( $p > 0,05$ ).

Der antiproliferative Effekt auf die Zellen der Neuroblastomlinie LS war signifikant geringer als bei allen Zelllinien außer bei SKNSH (siehe Tabelle 3.1).

4-PB [mM]	SKNSH	SHSY5Y	LAN1	LAN5	IMR32	Kelly
1.25	ns	ns	*	*	ns	ns
2.5	ns	ns	***	***	ns	*
5.0	ns	***	***	***	***	***

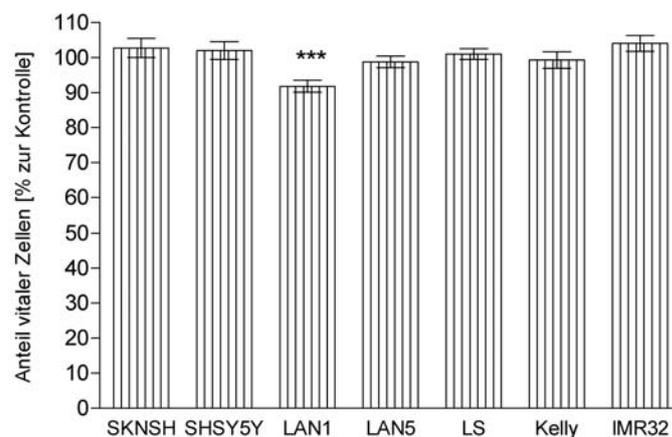
**Tabelle 3.1:** Vergleich der Reaktion der Zellen der Linien LS mit den Reaktionen aller anderen verwendeten Neuroblastomlinien unter 4-PB (ns=nicht signifikant,  $*=p < 0,05$ ,  $***=p < 0,0001$ ).

### Neuroblastomzellen unter 3-Hydroxy-Glutarsäure

Eine zusammenfassende Darstellung der Wirkung von 3-Hydroxy-Glutarsäure auf die jeweiligen Zelllinien ist in Abbildung 3.5 (S.28) gezeigt.

Bei einer Konzentration von 4 mM zeigte 3-Hydroxy-Glutarsäure nur bei den Zellen der Neuroblastomlinie LAN1 eine signifikante ( $p < 0,0001$ ) Wachstumshemmung auf 90 %.

Die Zellen der Linien SKNSH, SHSY5Y, LS und IMR32 reagierten unter 3-Hydroxy-Glutarsäure zwar mit einem leichten Proliferationsanstieg, dieser war allerdings nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Bei den LAN5- und Kelly-Zellen bewirkte die Inkubation mit 3-Hydroxy-Glutarsäure keine signifikanten Wachstumsverhaltensänderungen.



**Abbildung 3.5:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter 4,0 mM 3-OH-GA, Inkubationszeit 48h; MEAN $\pm$  SEM; Signifikante Proliferationsminderung bei LAN1-Zellen (auf 90 % der Kontrolle), (\*\*\*: $p < 0,0001$ ). Keine signifikanten Veränderungen des Wachstums der anderen sechs Zelllinien.

### Neuroblastome unter Leucin

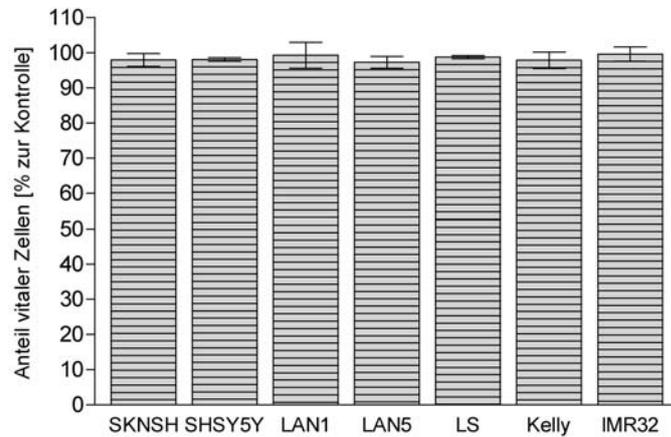
Die zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Leucin auf die Zellen der sieben Neuroblastomlinien wird in Abbildung 3.6 und 3.7 (S.29) gezeigt.

Die Zellen aller Neuroblastomlinien zeigten unter 0,4 mMol Leucin eine leichte Wachstums- minderung, diese war allerdings nicht statistisch signifikant.

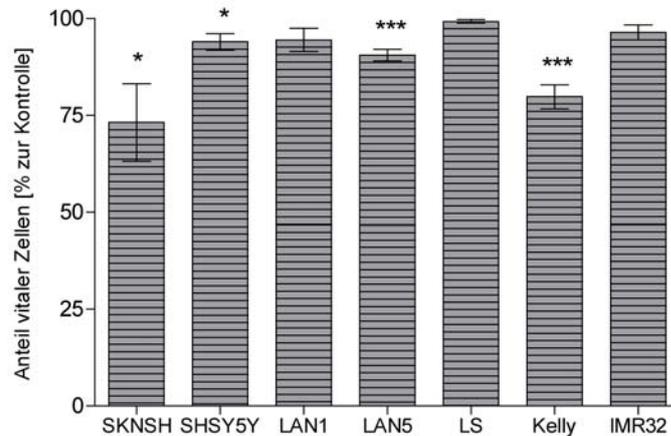
Unter 4,0 mMol Leucin reagierten SKNSH-Zellen mit einem Abfall der Proliferations- rate auf 73 % der Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Die Wachstumsrate von SHSY5Y-Zellen sank unter 4 mMol Leucin auf 93 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Bei LAN5-Zellen sah man ein Absinken auf 90 % der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) und die Zellen der Linie Kelly reagierte mit einem Wachstumsabfall auf 80 % ( $p < 0,0001$ ).

LAN1-, LS- und IMR32-Zellen zeigten unter der gleichen Konzentration keine wesent- lichen Veränderungen des Proliferationsverhaltens ( $p > 0,05$ ).

Stellt man die signifikanten Ergebnisse der *students-t*-Test Auswertung einander ge- genüber, zeigt sich die maximal wachstumshemmende Wirkung von Leucin unter einer Konzentration von 4 mMol bei den Zellen der Linie Kelly. Der antiproliferative Effekt war allerdings nicht signifikant stärker als bei den Neuroblastomzellen der Linien SKNSH, SHSY5Y und LAN5 ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 3.6:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **0,4 mM Leucin**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Keine signifikanten Veränderungen der Proliferation der getesteten Zelllinien.



**Abbildung 3.7:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **4,0 mM Leucin**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Signifikante Proliferationsminderung bei SKNSH-Zellen (auf 73 % der Kontrolle), SHSY5Y-Zellen (auf 93 % der Kontrolle, LAN5-Zellen (auf 90 % der Kontrolle) und Kelly-Zellen (auf 80 % der Kontrolle), (\*\*\*: $p < 0,0001$ , \*: $p < 0,05$ ). Keine signifikanten Reaktionen der Zellen der Linien LAN1, LS und IMR32.

### Neuroblastome unter Leukotrien C<sub>4</sub>

In Abbildungen 3.8 (S.31), 3.9 (S.31) und 3.10 (S.32) werden die Wirkung des Leukotriens C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) in den einzelnen Konzentrationen auf die Neuroblastomzellen zusammenfassend gezeigt.

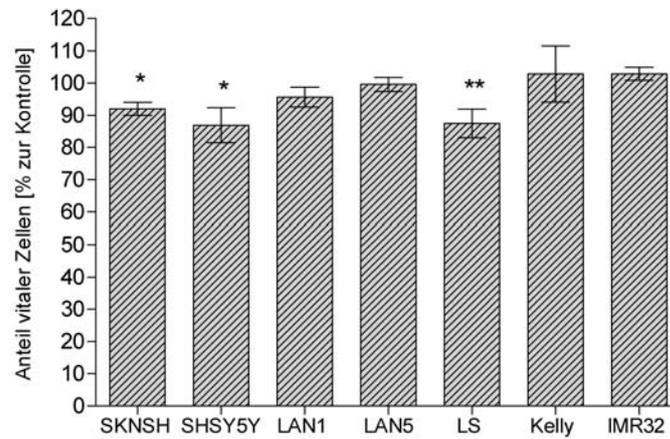
Unter allen drei Konzentrationen - 0,2/2,0/20,0 mMol LTC<sub>4</sub> - zeigten LAN5-Zellen keine Veränderung des Proliferationsverhaltens.

SKNSH-, LS- und SHSY5Y-Zellen reagierten unter der niedrigsten Konzentration 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> mit einer Wachstumsminderung. Die Proliferation von SKNSH-Zellen fiel auf 91 % ( $p < 0,05$ ), die von LS-Zellen auf 87 % ( $p < 0,01$ ) und die von SHSY5Y-Zellen auf 86 % ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentrationen 2,0 mMol und 20,0 mMol verursachten dagegen keine Änderung der Vermehrung bei den drei Zelllinien.

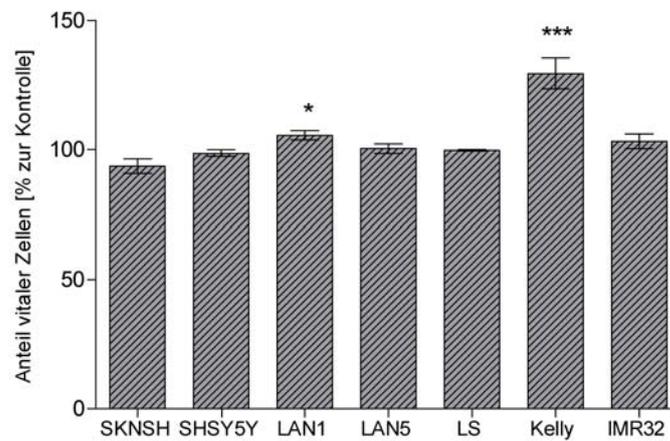
Kelly-, IMR32- und LAN1-Zellen zeigten unter LTC<sub>4</sub> eher eine Wachstumssteigerung. Um 29 % ( $p < 0,001$ ) bzw. 31 % ( $p < 0,0001$ ) nahm die Vermehrung der Zellen der Linie Kelly unter 2 mMol bzw. 20 mMol LTC<sub>4</sub> zu. Unter 0,2 mMol zeigte sich keine Veränderung des Proliferationsverhaltens. Bei IMR32-Zellen stieg unter 20,0 mMol LTC<sub>4</sub> die Wachstumsrate um 5 % ( $p < 0,05$ ), bei LAN1-Zellen zeigte sich unter 2,0 mMol LTC<sub>4</sub> die Vermehrungssteigerung um 5 % ( $p < 0,05$ ).

Vergleicht man die wachstumssteigernde Wirkung von LTC<sub>4</sub> in den verschiedenen Konzentrationen auf Kelly-, IMR32- und LAN1-Zellen, so sieht man keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) sowohl zwischen den Zelllinien als auch in einer Linie zwischen den einzelnen Konzentrationen.

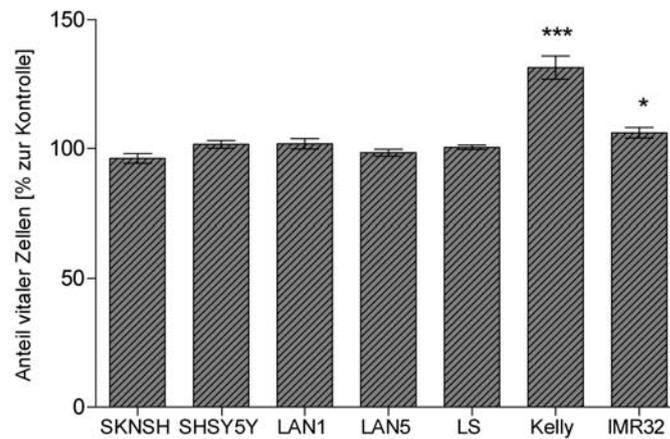
Auch die antiproliferativen Effekte von 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> auf SKNSH-, SHSY5Y- und LS-Zellen zeigen im Vergleich untereinander keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 3.8:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **0,2 mM LTC<sub>4</sub>**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Signifikante Proliferationsminderung bei SKNSH-Zellen (auf 91 % der Kontrolle), LS-Zellen (auf 87 % der Kontrolle) und SHSY5Y-Zellen (auf 86 % der Kontrolle), (\*\*:p<0,01, \*:p<0,05). Keine signifikante Änderung der Wachstumsrate bei den Zellen der Linien LAN1, LAN5, Kelly und IMR32.



**Abbildung 3.9:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **2,0 mM LTC<sub>4</sub>**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Signifikante Proliferationssteigerung der Zellen der Linien LAN1 (auf 105 % der Kontrolle) und Kelly (auf 129 % der Kontrolle), (\*\*\*:p<0,0001, \*:p<0,05). Keine signifikanten Proliferationsveränderungen der anderen Zelllinien.



**Abbildung 3.10:** Proliferationsassay der verschiedenen Neuroblastomzellen unter **20,0 mM LTC<sub>4</sub>**, Inkubationszeit 48h; MEAN± SEM; Signifikante Proliferationssteigerung bei Kelly-Zellen (auf 131 % der Kontrolle) und IMR32-Zellen (auf 105 % der Kontrolle), (\*\*\*:p<0,0001, \*:p<0,05). Keine signifikanten Proliferationsveränderungen der anderen Zelllinien.

### 3.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Zelllinien

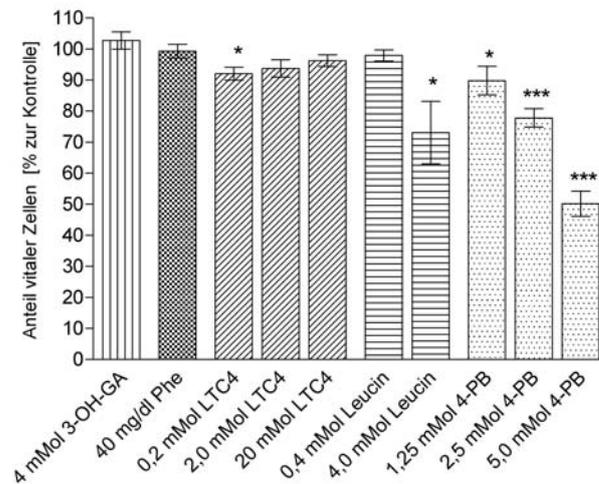
Um die unterschiedlichen Reaktionen der Neuroblastomzellen zu verdeutlichen, werden im weiteren Verlauf die einzelnen Zelllinien und ihr Wachstumsverhalten unter den zugegebenen Metaboliten gesondert betrachtet.

### SKNSH-Neuroblastomzellen

In Abbildung 3.11 wird die Wirkung der fünf getesteten Substanzen auf die Neuroblastomzellen SKNSH zusammenfassend dargestellt.

Diese Zellen zeigten unter Phenylbutyrat in ansteigender Konzentration ein Abfall der Proliferation bis auf 50 % der Kontrolle.

Auch auf 4,0 mMol Leucin und 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> reagierten SKNSH-Zellen mit einer signifikanten Minderung des Wachstums auf 72 % bzw. 91 %. Dagegen sah man unter Zugabe von Phenylalanin, 3-Hydroxy-Glutarsäure, 0,4 mMol Leucin, 2,0 bzw. 20 mMol LTC<sub>4</sub> keinerlei signifikanten Veränderungen.



**Abbildung 3.11: SKNSH-Neuroblastomzellen** unter 3-OH-GA, Phe, LTC<sub>4</sub>, Leucin und 4-PB, MEAN± SEM; unter 4-PB signifikanter, konzentrationsabhängiger Proliferationsabfall, unter 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> und 4,0 mMol Leucin signifikante Wachstumsinderungen (auf 91 % bzw. 72 % der Kontrolle), hingegen unter 2,0 mMol LTC<sub>4</sub>, 20,0 mMol LTC<sub>4</sub>, 0,4 mMol Leucin, 3-OH-GA und Phe keine signifikante Änderung des Wachstums; (\*\*\*:p<0,0001, \*:p<0,05).

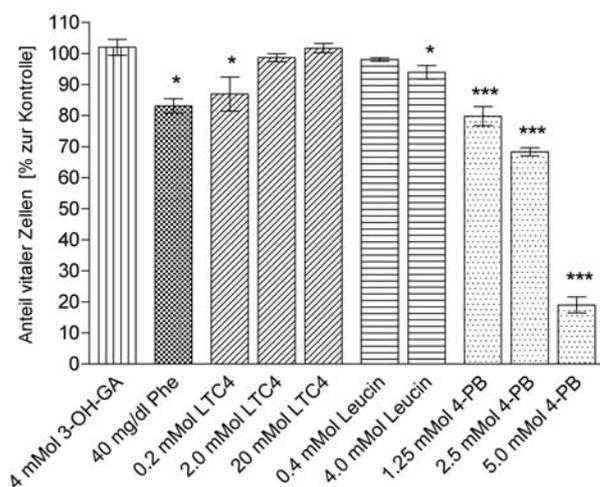
### SHSY5Y-Neuroblastomzellen

Die zusammenfassende Darstellung der Metabolitenwirkung auf SHSY5Y-Zellen im Vergleich wird in Abbildung 3.12 gezeigt.

SHSY5Y-Zellen reagierten ähnlich der Zellen ihrer Mutterlinie SKNSH. Unter Phenylbutyrat stellte sich je nach Konzentration eine signifikante Wachstumsmin- derung auf bis zu 20 % der Kontrolle ein.

Unter 4,0 mMol Leucin reagierten SHSY5Y-Zellen mit einer Proliferationsmin- derung auf 93 %, unter 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> zeigte sich ein Abfall des Wachstums auf 86 % der Kontrolle. Zusätzlich dazu sah man unter Phenylalanin eine auf 82 % verringerte Proli- ferationsrate der Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Bei Zugabe von 3-Hydroxy-Glutarsäure, 0,4 mMol Leucin und 2,0 bzw. 20 mMol LTC<sub>4</sub> zeigte sich wiederum keine signifikante Änderung des Wachstumsverhaltens von SHSY5Y- Zellen.

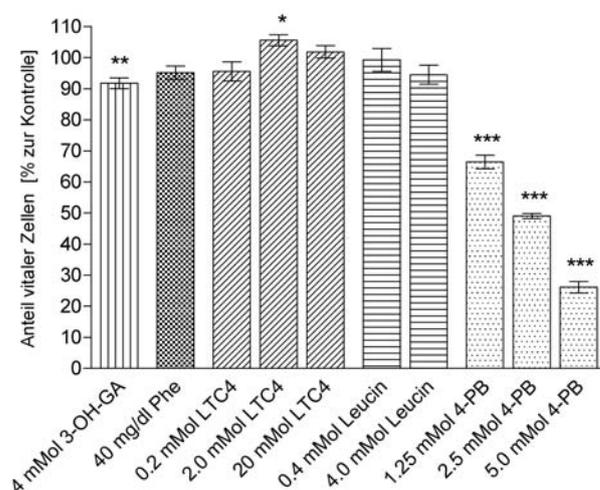


**Abbildung 3.12:** SHSY5Y-Neuroblastomzellen unter 3-OH-GA, Phe, LTC<sub>4</sub>, Leucin und 4-PB, MEAN± SEM; unter 4-PB signifikanter, konzentrationsabhängiger Proliferationsabfall, unter 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> und 4,0 mMol Leucin signifikante Wachstumsmin- derungen (auf 86 % bzw. 93 % der Kontrolle), zusätzlich unter Phe signifikante Proliferations- minderung (auf 82 % der Kontrolle). Unter 3-OH-GA, 2,0 mMol und 20,0 mMol LTC<sub>4</sub> und 0,4 mMol Leucin keine signifikanten Veränderungen des Proliferationsverhaltens; (\*\*\*:p<0,0001, \*:p<0,05).

### LAN1-Neuroblastomzellen

Die Reaktion LAN1-Zellen auf die jeweilige Substanz ist zusammenfassend in Abbildung 3.13 dargestellt.

Auch LAN1-Zellen reagierten unter zunehmenden Phenylbutyrat-Konzentrationen mit einem signifikanten Abfall der Proliferationsrate auf bis zu 25 %. Bei Zugabe von 3-Hydroxy-Glutarsäure zeigten LAN1-Zellen als einzige Zellen eine signifikante Wachstumsminde- rung auf 90 %. Auch unter Leucin blieb die Proliferation von LAN1-Zellen konstant. Mit einer Zunahme des Wachstum um 5 % reagierten die Zellen der Linie LAN1 auf 2,0 mMol LTC<sub>4</sub>, auf 0,2 bzw. 20 mMol LTC<sub>4</sub> hingegen zeigt sich keine Reaktion.



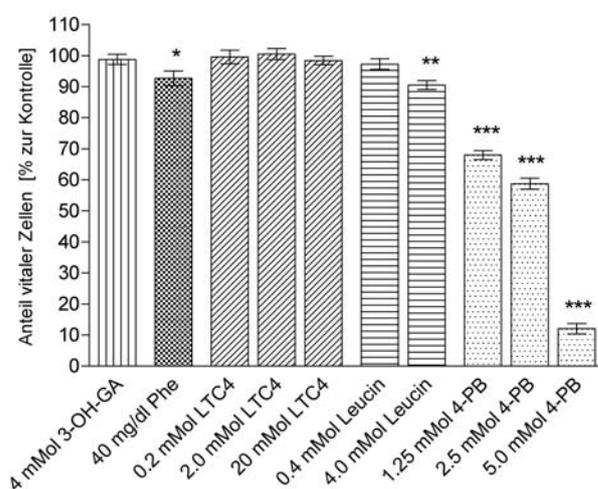
**Abbildung 3.13:** LAN1-Neuroblastomzellen unter 3-OH-GA, Phe, LTC<sub>4</sub>, Leucin und 4-PB, MEAN± SEM; unter 4-PB signifikanter, konzentrationsabhängiger Proliferationsabfall, unter 2,0 mMol LTC<sub>4</sub> signifikante Zunahme der Proliferationsrate (auf 105 % der Kontrolle), unter 3-OH-GA signifikante Wachstumsminde- rung (auf 90 % der Kontrolle); (\*\*:p<0,01, \*:p<0,05). Keine Änderung des Proliferationsverhaltens unter Phe, Leucin und 0,2 bzw. 20,0 mMol LTC<sub>4</sub>.

### LAN5-Neuroblastomzellen

Die zusammenfassende Darstellung der Reaktion der Zellen der Linie LAN5 auf die getesteten Wirkstoffe wird in Abbildung 3.14 gezeigt.

Unter Leukotrien C<sub>4</sub> und 3-Hydroxy-Glutarsäure kam es nicht zu einer Änderung des Proliferationsverhaltens von LAN5-Zellen.

Durch Zugabe von 40 mg/dl Phenylalanin hingegen ließ sich eine signifikante Minderung des Wachstums auf 92 % hervorrufen. Unter Leucin kam es bei einer Konzentration von 4,0 mMol zu einer Senkung der Proliferation auf 90 %, bei einer Konzentration von 0,4 mMol zeigten sich keine Veränderungen. Phenylbutyrat löste, wie bei allen anderen Zelllinien auch, eine eindrucksvolle Proliferationsminderung aus. Bei 1,25 mMol erreichten LAN5-Zellen noch 67 %, bei 2,5 mMol noch 58 % und bei 5,0 mMol nur noch 11 % der Kontrolle.



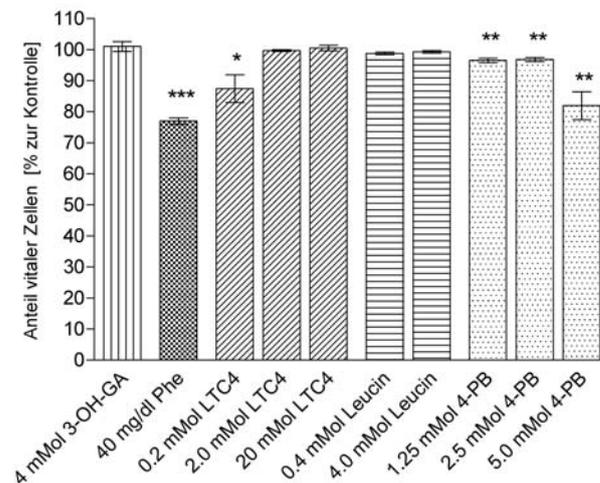
**Abbildung 3.14:** LAN5-Neuroblastomzellen unter 3-OH-GA, Phe, LTC<sub>4</sub>, Leucin und 4-PB, MEAN± SEM; unter 4-PB signifikanter, konzentrationsabhängiger Proliferationsabfall, zusätzlich signifikante Minderung des Wachstums unter Phe (auf 92 % der Kontrolle) und unter 4,0 mMol Leucin (auf 90 % der Kontrolle); (\*\*\*:p<0,0001, \*\*:p<0,01, \*:p<0,05). Unter 3-OH-GA, LTC<sub>4</sub> und 0,4 mMol Leucin keine signifikanten Proliferationsveränderungen.

### LS-Neuroblastomzellen

In Abbildung 3.15 wird die Reaktion der Neuroblastonzellen LS auf die einzelnen Substanzen zusammenfassend dargestellt.

Mit 3-Hydroxy-Glutarsäure und Leucin ließen sich keine Proliferationsänderungen hervorgerufen.

Auf Phenylalanin reagierten LS-Zellen mit einer Wachstumsminderung auf 76 % der Kontrolle. Auch unter Phenylbutyrat stellte sich eine Senkung der Proliferationsrate ein, allerdings nur in geringerem Maße: 1,25 bzw. 2,5 mMol bewirkten eine Senkung auf 96 %, 5,0 mMol eine Senkung auf 81 % im Vergleich zur Kontrolle. Wie auch bei den Zellen der Linien SKNSH und SHSY5Y kam es unter 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> zu einer Abnahme des Zellproliferation, in diesem Fall auf 87 %. Die Konzentrationen 2,0 bzw. 20,0 mMol LTC<sub>4</sub> erzielten wiederum keine signifikanten Verhaltensänderungen.



**Abbildung 3.15: LS-Neuroblastomzellen** unter 3-OH-GA, Phe, LTC<sub>4</sub>, Leucin und 4-PB, MEAN±SEM; unter 4-PB signifikante Proliferationsminderung (unter 1,25 bzw. 2,5 mMol auf 96 % und unter 5,0 mMol auf 81 % der Kontrolle), unter Phe Abfall des Wachstums (auf 76 % der Kontrolle) und unter 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> Minderung des Wachstums (auf 87 % der Kontrolle); (\*\*\*:p<0,0001, \*\*:p<0,01, \*:p<0,05). Unter 3-OH-GA und Leucin keine Proliferationsänderungen.

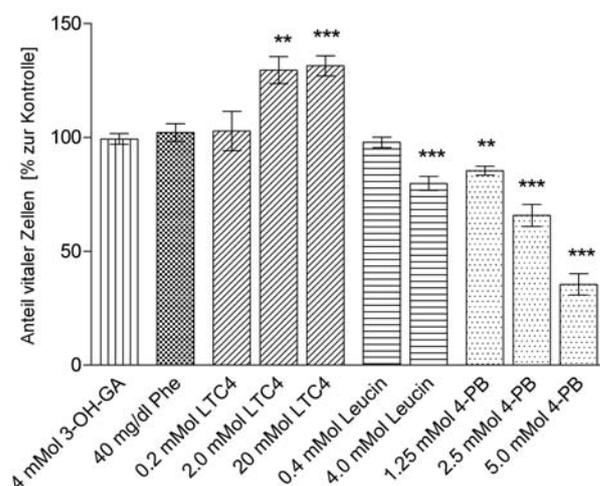
### Kelly-Neuroblastomzellen

Die zusammenfassende Darstellung der Reaktion der Neuroblastomzellen der Linie Kelly wird in Abbildung 3.16 gezeigt.

Unter Phe und 3-OH-GA zeigten Kelly-Zellen keine statistisch signifikanten Änderungen des Wachstumsverhaltens.

Mit 4,0 mMol Leucin ließ sich die Proliferationsrate auf 80 % im Vergleich zur Kontrolle senken, mit 0,4 mMol Leucin wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt. Ein gesteigertes Wachstum stellte sich unter 2,0 mMol (130 % im Vergleich zur Kontrolle) und 20 mMol (131 % im Vergleich zur Kontrolle) LTC<sub>4</sub> ein. 0,2 mMol LTC<sub>4</sub> hatte dagegen keine Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten.

Unter 4-PB kam es wieder zu einer dosisabhängigen Minderung der Proliferation, auf 85 % bei 1,25 mMol, auf 65 % bei 2,5 mMol und auf 35 % der Kontrolle bei 5,0 mMol.



**Abbildung 3.16: Kelly-Neuroblastomzellen** unter 3-OH-GA, Phe, LTC<sub>4</sub>, Leucin und 4-PB, MEAN± SEM; unter 4-PB signifikanter, konzentrationsabhängiger Proliferationsabfall, unter 2,0 bzw. 20,0 mMol LTC<sub>4</sub> signifikante Wachstumszunahme (auf 130 % bzw. 131 % der Kontrolle), unter 4,0 mMol Leucin Abnahme der Proliferation (auf 80 % der Kontrolle);(\*\*\*:p<0,0001, \*\*:p<0,01, \*:p<0,05). Unter Phe und 3-OH-GA keine signifikanten Änderungen des Wachstumsverhaltens.

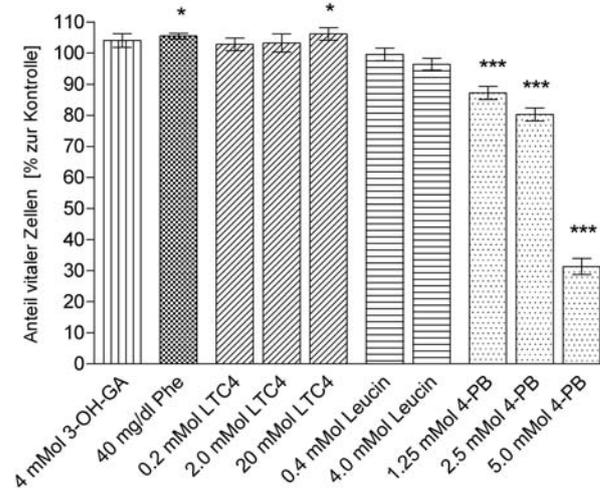
**IMR32-Neuroblastomzellen**

In Abbildung 3.17 wird das Verhalten von IMR 32-Zellen unter den verschiedenen Wirkstoffen zusammenfassend dargestellt.

3-OH-GA und Leu bewirkten keine signifikante Veränderung des Wachstumsverhaltens der Zellen dieser Neuroblastomlinie.

Unter 20 mMol LTC<sub>4</sub> und 40 mg/dl Phe kam es jeweils zu einer minimalen Proliferationssteigerung um 5 % zur Kontrolle. Unter 0,2 mMol und 2,0 mMol LTC<sub>4</sub> hingegen sah man keine signifikante Veränderung.

4-PB ließ die Wachstumsrate von IMR32-Zellen auf 86 % (1,25 mMol), 79 % (2,5 mMol) bzw. 30 % (5,0 mMol) sinken.

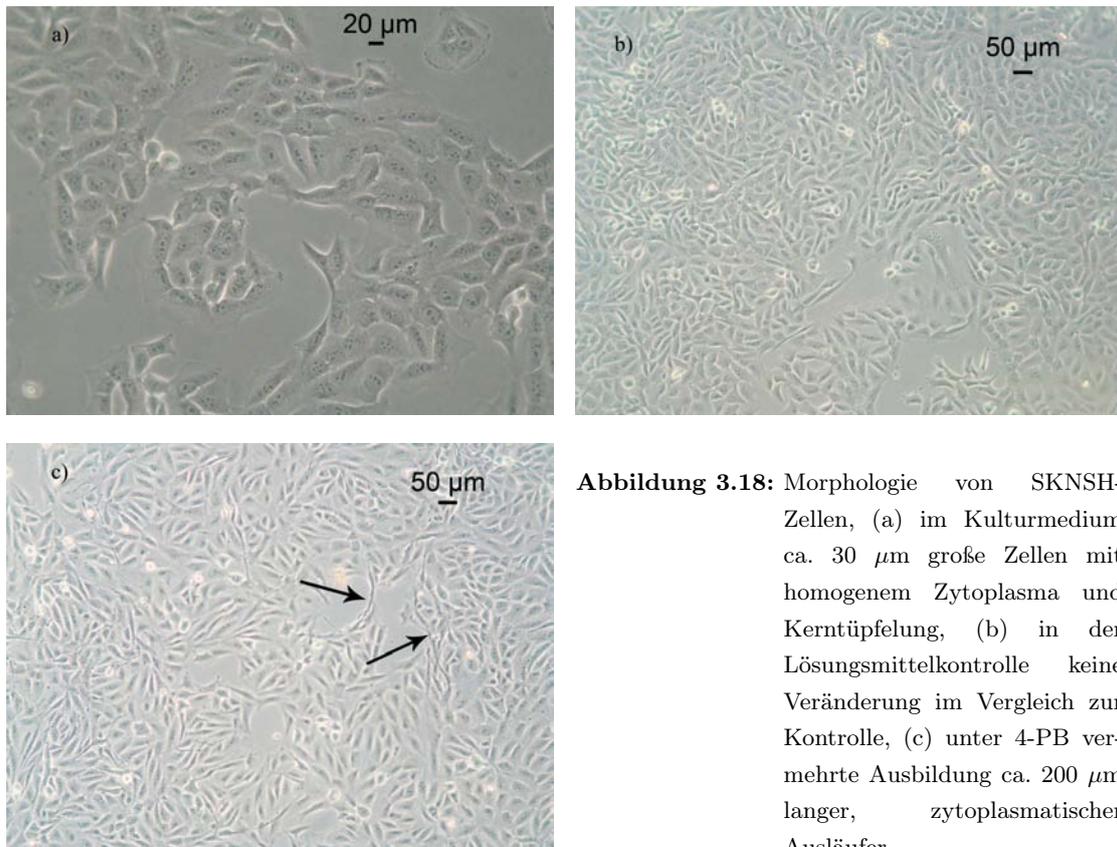


**Abbildung 3.17: IMR32-Neuroblastomzellen** unter 3-OH-GA, Phe, LTC<sub>4</sub>, Leucin und 4-PB, MEAN± SEM; unter 4-PB signifikanter, konzentrationsabhängiger Proliferationsabfall, unter 20,0 mMol LTC<sub>4</sub> und 40 mg/dl Phe kam es jeweils zu einer leichten Proliferationssteigerung (auf 105 % der Kontrolle), unter 0,2 mMol und 2,0 mMol LTC<sub>4</sub>, 3-OH-GA und Leucin hingegen keine signifikante Veränderung; (\*\*\*:p<0,0001, \*\*:p<0,01, \*:p<0,05).

### 3.2 Morphologische Veränderungen unter 4-Phenylbutyrat

Da Phenylbutyrat als einzige der getesteten Substanzen auf alle Zelllinien eine konzentrationsabhängige, signifikant wachstumsmindernde Wirkung entfaltete, wurden alle Neuroblastomzellen gesondert unter 2,5 mM 4-PB inkubiert und mit der Laser Scanning Cytometrie auf Veränderungen des Zellzyklus untersucht. Während der Vorbereitung der Neuroblastomzelllinien auf diese Versuche fiel eine Veränderung der Zellmorphologie auf. Deswegen wurden die Zellen unter 2,5 mM Phenylbutyrat, die Kontrolle und die Lösungsmittelkontrolle zusätzlich fotografiert und verglichen.

## 3.2.1 SKNSH-Zellen



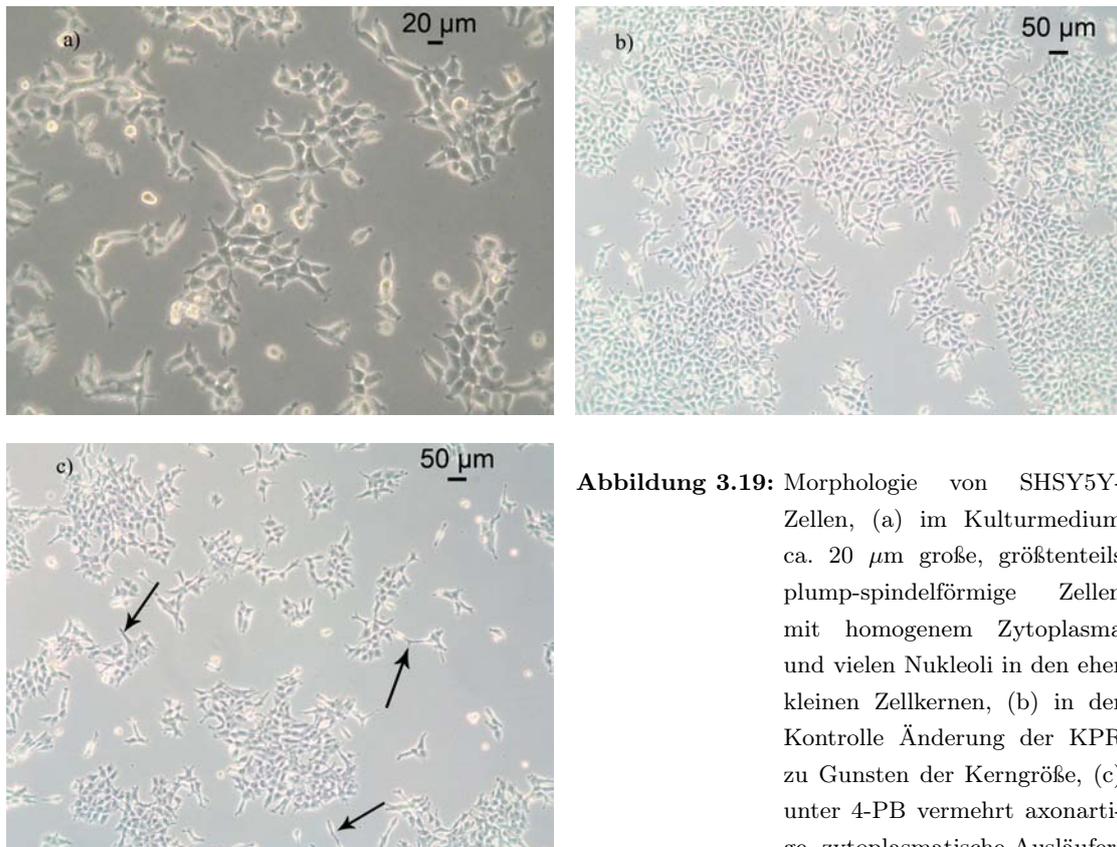
**Abbildung 3.18:** Morphologie von SKNSH-Zellen, (a) im Kulturmedium ca. 30 µm große Zellen mit homogenem Zytoplasma und Kerntüpfelung, (b) in der Lösungsmittelkontrolle keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle, (c) unter 4-PB vermehrte Ausbildung ca. 200 µm langer, zytoplasmatischer Ausläufer.

Unter Standardbedingungen stellten sich SKNSH-Zellen als in flachen Zellverbänden wachsende, im Durchschnitt etwa 30 µm große Zellen dar. Sie zeigten ein homogen wirkendes Zytoplasma um relativ große, deutlich getüpfelte Kerne (siehe Abb.3.18a)).

Auch unter der Lösungsmittelkontrolle wuchsen SKNSH-Zellen in Verbänden und präsentierten die oben beschriebene Tüpfelung der Kerne und ein einheitliches Zytoplasma (siehe Abb.3.18b)). Weder in der Kultur ohne jegliche Zusätze noch in der Lösungsmittelkontrolle konnten dendritische oder axonartige Ausläufer gefunden werden.

Im Gegensatz dazu wiesen die Neuroblastomzellen nach der Inkubation für 48 Stunden mit 2,5 mMol 4-PB bis zu 200 µm lange zytoplasmatische Ausläufer auf. An dem gruppierten Wachstum und dem Erscheinungsbild der Kerne veränderte sich unter 4-PB nichts (siehe Abb.3.18c)).

## 3.2.2 SHSY5Y-Zellen



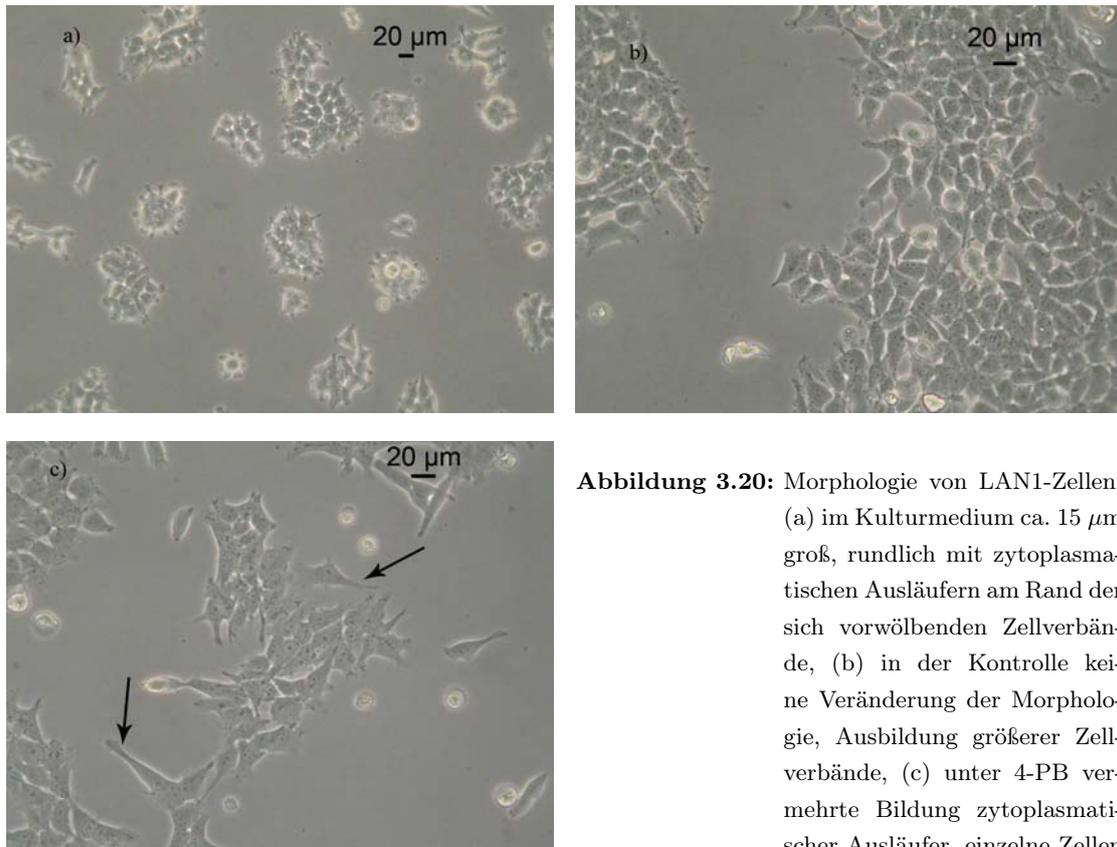
**Abbildung 3.19:** Morphologie von SHSY5Y-Zellen, (a) im Kulturmedium ca. 20  $\mu\text{m}$  große, größtenteils plump-spindelförmige Zellen mit homogenem Zytoplasma und vielen Nukleoli in den eher kleinen Zellkernen, (b) in der Kontrolle Änderung der KPR zu Gunsten der Kerngröße, (c) unter 4-PB vermehrt axonartige, zytoplasmatische Ausläufer, KPR ähnlich der Kontrolle.

Die Zellen stellten sich in normalem Kulturmedium als ca. 20  $\mu\text{m}$  große, zum größten Teil plump-spindelförmige, in dichten Verbänden wachsende Kultur dar. Die Kerne waren eher klein, zeigten aber, ähnlich der Linie SKNSH, viele Nukleoli. Das Zytoplasma wirkte homogen (siehe Abb.3.19a)).

Unter der Lösungsmittelkontrolle sah man, außer einer gewandelten Kern-Plasma-Relation (KPR), die sich zu Gunsten der Kerngröße verschob, keine Veränderungen (siehe Abb.3.19b)).

Unter 4-PB wiesen SHSY5Y-Zellen vermehrt axonartige, zytoplasmatische Ausläufer auf. Die Zellen waren immer noch ca. 20  $\mu\text{m}$  groß, die KPR unter 4-PB war mit der KPR unter der Lösungsmittelkontrolle vergleichbar (siehe Abb.3.19c)).

## 3.2.3 LAN1-Zellen



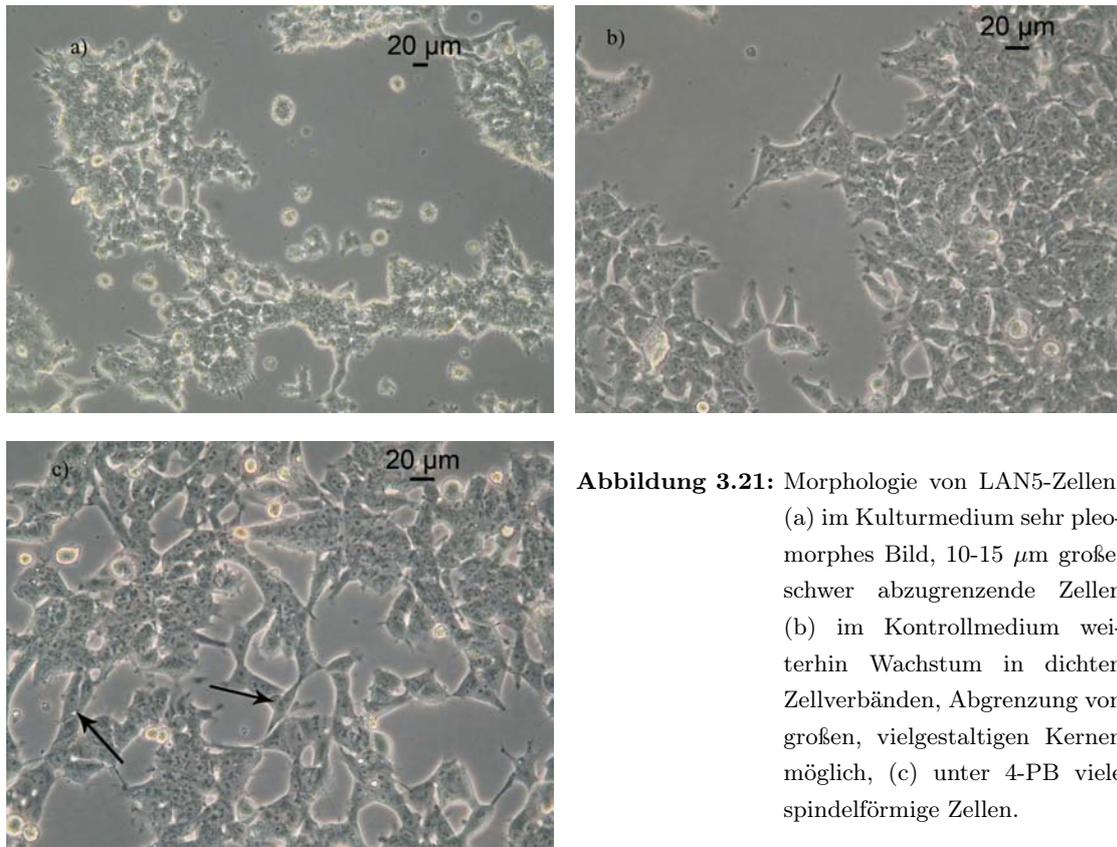
**Abbildung 3.20:** Morphologie von LAN1-Zellen, (a) im Kulturmedium ca.  $15\ \mu\text{m}$  groß, rundlich mit zytoplasmatischen Ausläufern am Rand der sich vorwölbenden Zellverbände, (b) in der Kontrolle keine Veränderung der Morphologie, Ausbildung größerer Zellverbände, (c) unter 4-PB vermehrte Bildung zytoplasmatischer Ausläufer, einzelne Zellen spindelförmig konfiguriert.

In normalem Kulturmedium wuchsen LAN1-Zellen in dichten, sich vorwölbenden Zellverbänden. Die Zellen selbst waren durchschnittlich  $15\ \mu\text{m}$  groß und eher rundlich geformt, am Rand der Verbände bildeten sie zum Teil pseudopodienartige oder axonähnliche zytoplasmatische Ausläufer. Die KPR war zu Gunsten des Kerns verschoben, die Zellkerne erschienen nukleolireich und die Zellen insgesamt zytoplasmaarm (siehe Abb.3.20a)).

Auch unter der Lösungsmittelkontrolle wuchsen die Zellen in dichten Gruppen, allerdings wölbten sie sich im Vergleich zu den Zellen in normalem Kulturmedium nicht mehr so prägnant hervor. In Zellgröße, KPR und Morphologie unterschieden sich die Lösungsmittelkontroll-Zellen nicht von den Kulturmedium-Zellen (siehe Abb.3.20b)).

Die Inkubation mit  $2,5\ \text{mMol}$  4-PB bewirkte auch hier eine vermehrte Bildung zytoplasmatischer Ausläufer. Einzelne liegende Zellen zeigten ein spindelartiges Aussehen. Die Zellgröße, die KPR und das Erscheinungsbild des Zytoplasmas ließen sich nicht von den Zellen der Kontrollen abgrenzen (siehe Abb.3.20c)).

## 3.2.4 LAN5-Zellen



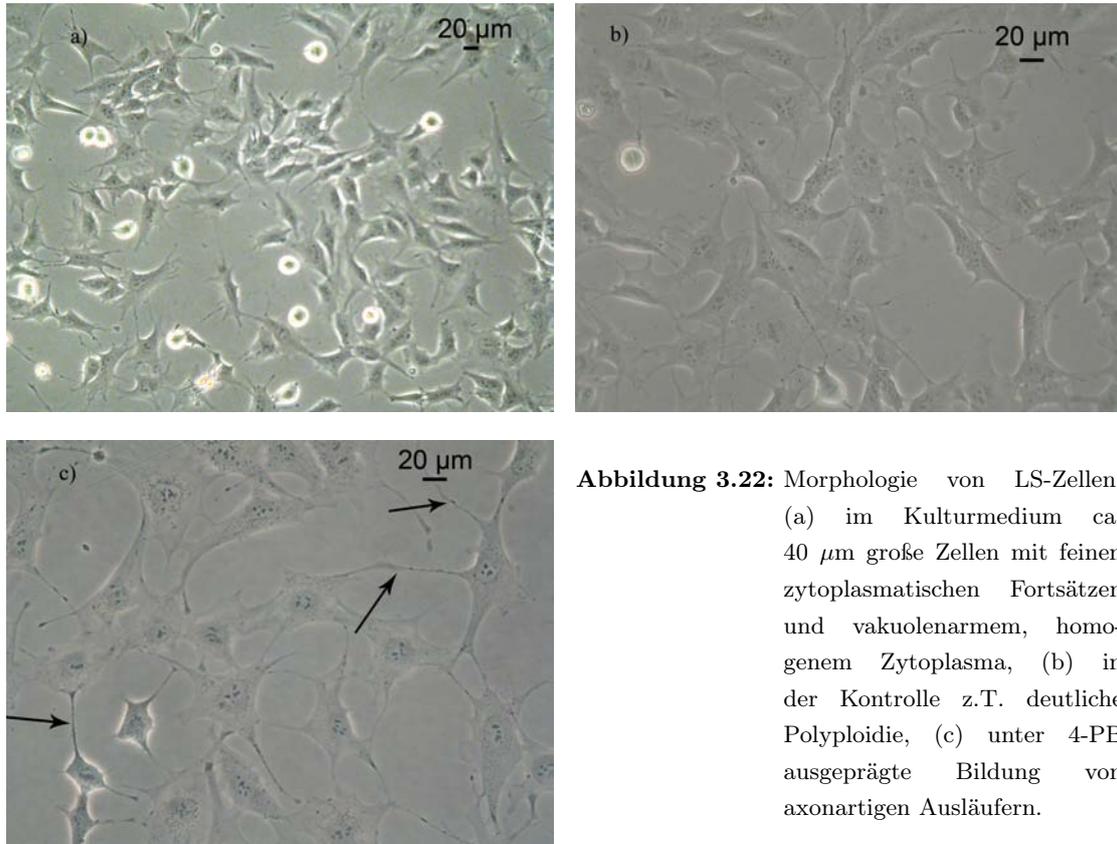
**Abbildung 3.21:** Morphologie von LAN5-Zellen, (a) im Kulturmedium sehr pleomorphes Bild, 10-15  $\mu\text{m}$  große, schwer abzugrenzende Zellen (b) im Kontrollmedium weiterhin Wachstum in dichten Zellverbänden, Abgrenzung von großen, vielgestaltigen Kernen möglich, (c) unter 4-PB viele spindelförmige Zellen.

Diese Neuroblastomzellen zeigte ein sehr pleomorphes Bild in normalem Kulturmedium. Im nativen Präparat waren die 10-15  $\mu\text{m}$  großen, rundlichen Zellen sehr schlecht voneinander abzugrenzen, da sie in sehr dichten, gedrängten Gruppen wuchsen. Das Zytoplasma der Zellen erschien inhomogen, die Zellkerne waren kaum zu beurteilen. Am Rande der Zellverbände bildeten sich vereinzelt kurze, axonartige zytoplasmatische Ausläufer. Die Zellteilung erfolgte zum Teil ohne weitere Anheftung der Zellen am Kulturflaschenboden, so dass vermehrt Zellen im Kulturmedium schwammen (siehe Abb.3.21a)).

Unter der Lösungsmittelkontrolle wuchsen LAN5-Zellen weiterhin in dichten Zellverbänden. Auch hier zeichneten sich die Zellen durch ein ungleichmäßiges Zytoplasma aus. Es waren große, vielgestaltige Kerne abzugrenzen (siehe Abb.3.21b)).

Nach der 48 stündigen Inkubation der Zellen mit 2,5 mMol 4-PB zeigte sich eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie, man konnte viele spindelförmige Zellen ausmachen. Die KPR und die Inhomogenität des Zytoplasmas blieben allerdings gleich (siehe Abb.3.21c)).

## 3.2.5 LS-Zellen



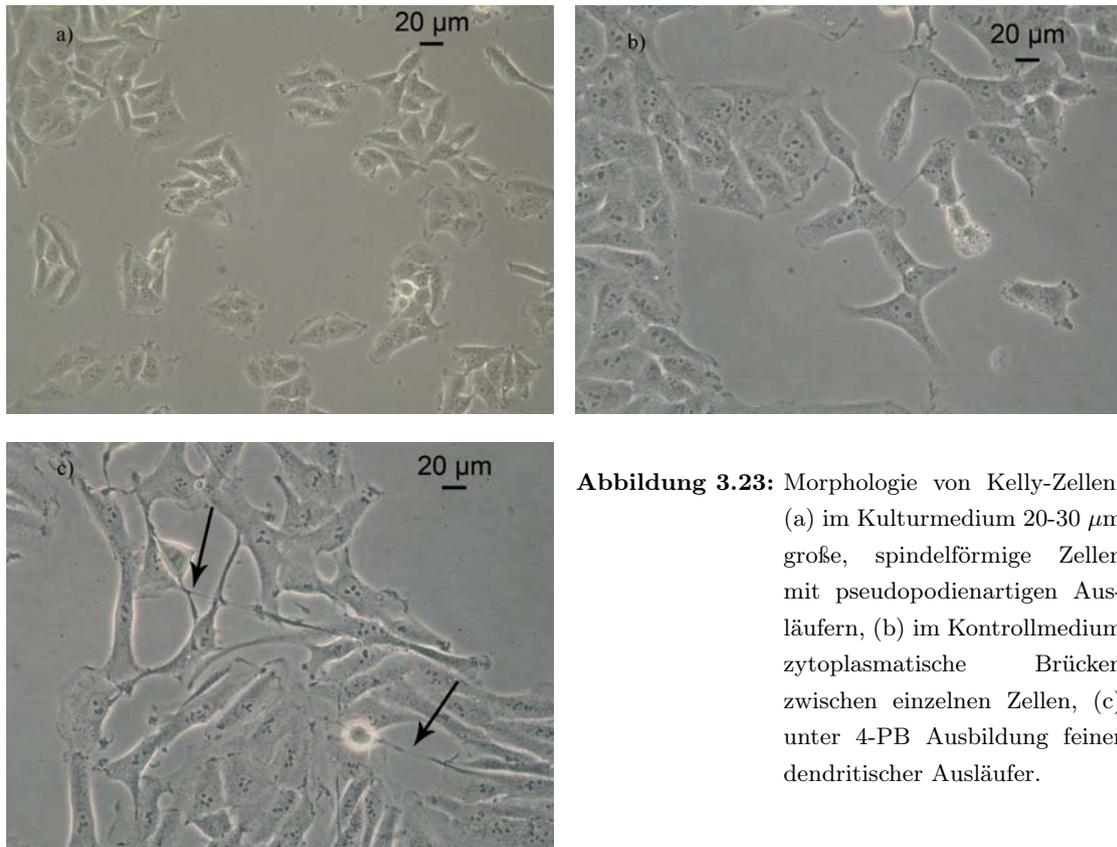
**Abbildung 3.22:** Morphologie von LS-Zellen, (a) im Kulturmedium ca.  $40\ \mu\text{m}$  große Zellen mit feinen zytoplasmatischen Fortsätzen und vakuolenarmem, homogenem Zytoplasma, (b) in der Kontrolle z.T. deutliche Polyploidie, (c) unter 4-PB ausgeprägte Bildung von axonartigen Ausläufern.

LS-Zellen waren im normalen Medium ca.  $40\ \mu\text{m}$  große, mit feinen zytoplasmatischen Fortsätzen bestückte Zellen. Die Kerne waren im Verhältnis zur Zellgröße relativ klein, das Zytoplasma stellte sich als homogen und vakuolenarm dar (siehe Abb.3.22a)).

Unter der Lösungsmittelkontrolle zeigten LS-Zellen eine ähnliche Morphologie. Zum Teil konnte man mehrere Kerne in einer Zelle sehen (siehe Abb.3.22b)).

Nach der Inkubation mit 4-PB sah man noch ausgeprägter axonartige Ausläufer als in der Kontrolle (siehe Abb.3.22c)).

## 3.2.6 Kelly-Zellen



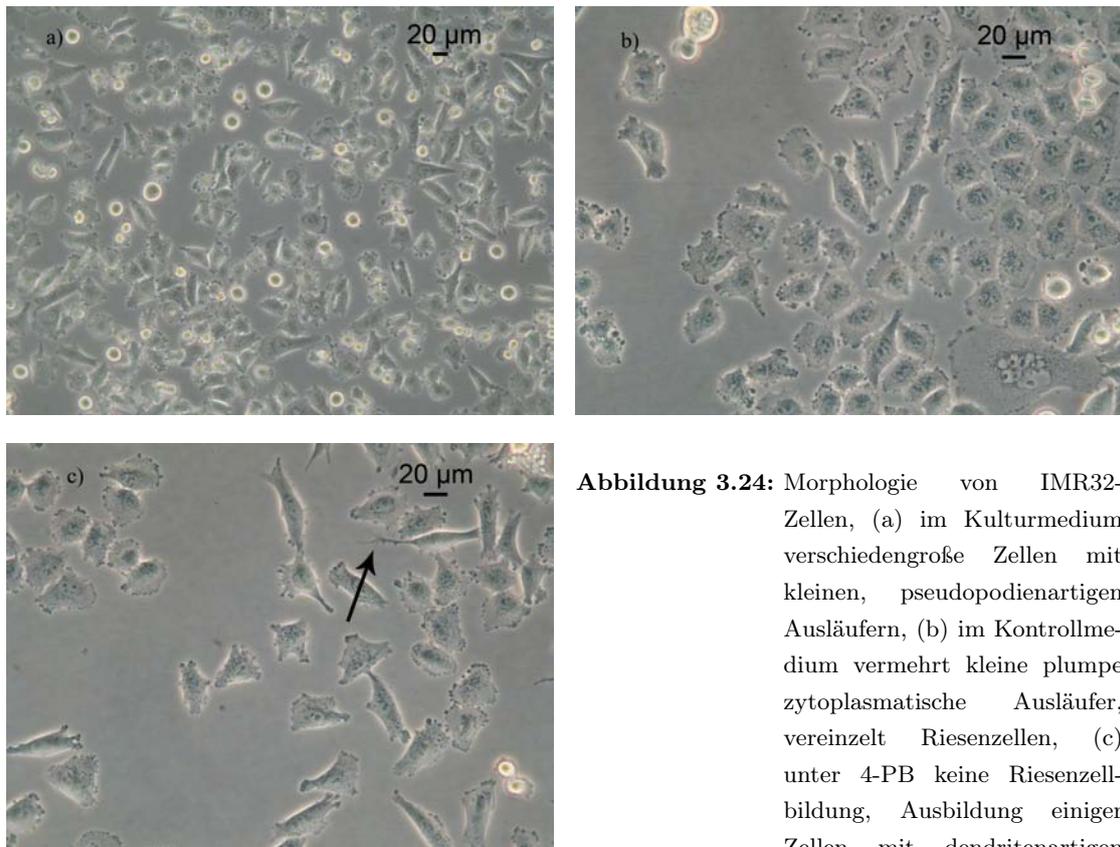
**Abbildung 3.23:** Morphologie von Kelly-Zellen, (a) im Kulturmedium 20-30 µm große, spindelförmige Zellen mit pseudopodienartigen Ausläufern, (b) im Kontrollmedium zytoplasmatische Brücken zwischen einzelnen Zellen, (c) unter 4-PB Ausbildung feiner dendritischer Ausläufer.

Ohne jegliche Behandlung zeigten Kelly-Zellen eine spindelförmige Morphologie mit pseudopodienartigen Ausläufern. Die 20-30 µm großen Zellen wuchsen in lockeren Verbänden. Das Zytoplasma war Vakuolen-arm, die Kerne waren groß und Nukleoli-reich (siehe Abb.3.23a).

Nach Zugabe der Lösungsmittelkontrolle veränderte sich das Bild nicht stark. Man konnte allerdings die Bildung von zytoplasmatische Brücken zwischen einigen Zellen beobachten (siehe Abb.3.23b).

Unter der Behandlung mit 4-PB bildeten die nun sehr spindeligen Zellen der Linie Kelly zusätzlich feine dendritische Ausläufer. Zum Teil traten die Zellkerne deutlich aus der Ebene des Zytoplasmas hervor (siehe Abb.3.23c).

## 3.2.7 IMR32-Zellen



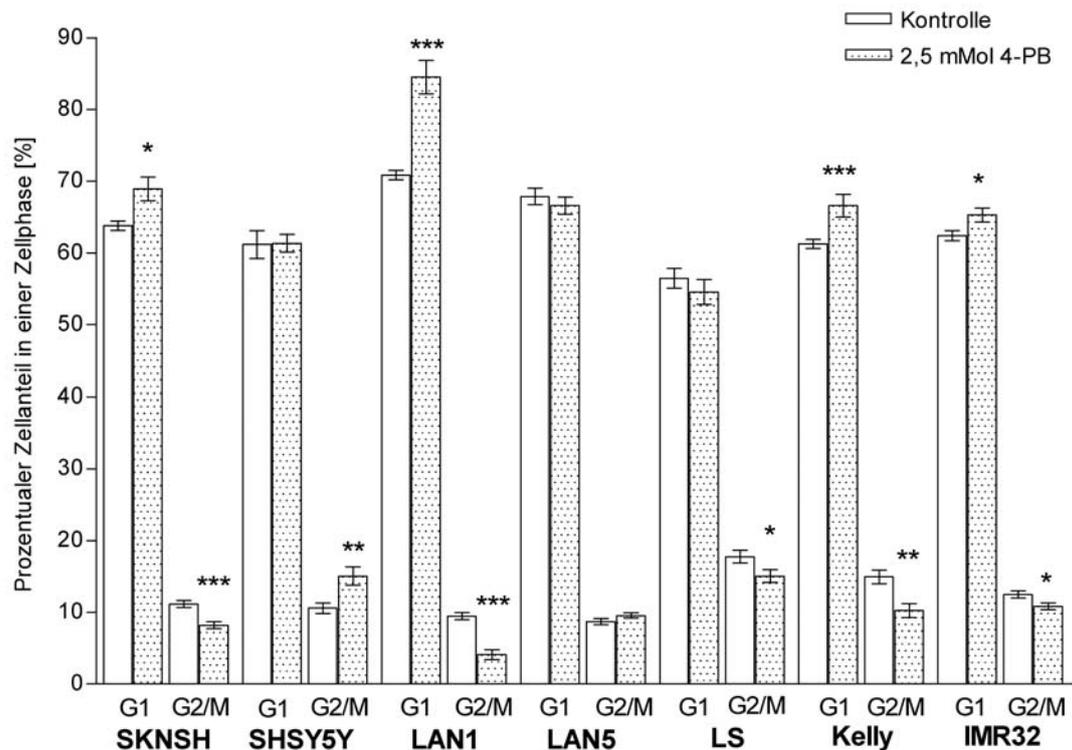
**Abbildung 3.24:** Morphologie von IMR32-Zellen, (a) im Kulturmedium verschieden große Zellen mit kleinen, pseudopodienartigen Ausläufern, (b) im Kontrollmedium vermehrt kleine plumpe zytoplasmatische Ausläufer, vereinzelt Riesenzellen, (c) unter 4-PB keine Riesenzellbildung, Ausbildung einiger Zellen mit dendritenartigen Fortsätzen.

Im Kulturmedium gehalten stellten sich IMR32 sehr pleomorph dar. Es waren neben ca.  $40\ \mu\text{m}$  langen, spindelförmig konfigurierten Zellen auch eher  $20\ \mu\text{m}$  große, runde Zellen zu sehen. Die Kerngröße variierte stark. Alle Zellen bildeten kleine pseudopodienartige Ausläufer und besaßen ein stark vakuolisiertes Zytoplasma (siehe Abb.3.24a)).

Mit der Lösungsmittelkontrolle bildeten IMR32-Neuroblastomzellen vermehrt kleine plumpe zytoplasmatische Ausläufer. Das Zytoplasma war weiterhin stark vakuolisiert. Es fielen vereinzelt Riesenzellen auf (siehe Abb.3.24b)).

Unter 4-PB waren keine Riesenzellen zu finden. Viele Zellen sahen den Kontrollen sehr ähnlich. Einige Zellen nahmen dendritische Formen an. Die Kerne wirkten sehr kondensiert und traten aus der Ebene des Zytoplasma hervor (siehe Abb.3.24c)).

### 3.3 Laser Scanning Cytometrie

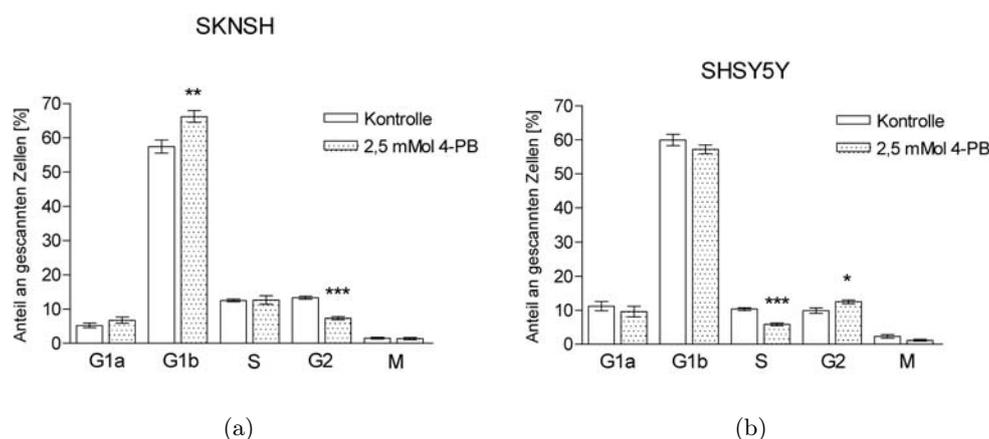


**Abbildung 3.25:** Prozentualer Anteil der Neuroblastomzellen in den Zellzyklusphasen G1 und G2/M mit und ohne Inkubation mit 2,5 mMol 4-PB; Mean  $\pm$  SEM; \*\*\*:  $p < 0,0001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

In Abbildung 3.25 sind die prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen der jeweiligen Neuroblastomzelllinien unter 2,5 mMol 4-PB im Vergleich zur Kontrolle zusammenfassend dargestellt.

An jeweils acht Cytospins jeder Zelllinie (vier aus der Kontrolle und vier unter 4 - PB) wurden die gewonnenen Daten weiter aufgearbeitet, um die Zellzyklusphasen noch genauer darzustellen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der ersten Auswertung mit den Ergebnissen der spezifischen Aufschlüsselung der Zellzyklusphasen verglichen.



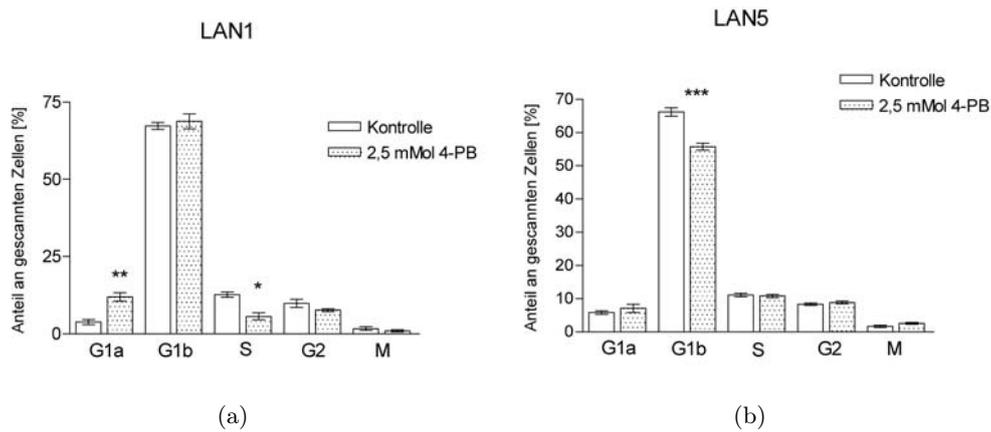
**Abbildung 3.26:** Zellzyklusanalyse; a) SKNSH-Zellen unter 4-PB. Man erkennt einen G1-Arrest mit signifikanter Zunahme der Zellen in der G1b-Phase und einen signifikanten Abfall in der G2-Phase; b) SHSY5Y-Zellen unter 4-PB. Man kann eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase und einen signifikanten Anstieg des Zellanteils in der G2-Phase erkennen; Mean±SEM \*\*\*:p<0,0001, \*\*:p<0,01, \*:p<0,05.

Die Zellen der Linie **SKNSH** reagierten unter 4-PB mit einem G1-Arrest. Während sich in der Kontrolle 64 % der Zellen in der G1-Phase befanden, waren es unter 4-PB 69 % aller gescannten Zellen (p<0,05). Gleichzeitig nahm die Zahl der Zellen in der G2/M-Phase unter 4-PB signifikant ab (von 11 % in der Kontrolle auf 8 % mit 4-PB; p<0,001) (siehe Abb.3.25 (S.48)).

Auch in der aufgeschlüsselten Auswertung konnte bei den SKNSH-Zellen ein G1-Arrest unter 2,5 mMol 4-PB festgestellt werden. Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil in der G2-Phase abnahm (Kontrolle 13 %, 4-PB 7 %; p<0,0001) und dass die Zellen, die mit 4-PB behandelt wurden, sich eher in der G1b-Phase des Zellzyklus befanden (Kontrolle 57 %, 4-PB 66 %; p<0,01) (siehe Abb.3.26(a)).

Die Zelllinie **SHSY5Y** zeigte keine signifikanten Unterschiede in der G1-Phase. Wohl aber sah man unter 4-PB einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils der Zellen in der G2/M-Phase (von 10 % in der Kontrolle auf 15 % unter 4-PB; p<0,01) (siehe Abb.3.25 (S.48)).

Bei spezieller Auswertung der Daten der Zelllinie SHSY5Y sah man, dass der Anteil der Zellen unter 4-PB in der S-Phase abnahm (Kontrolle 10 %, 4-PB 5 %; p<0,0001), dafür aber in der G2-Phase zunahm (Kontrolle 9 %, 4-PB 12 %; p<0,05) (siehe Abb.3.26(b)).

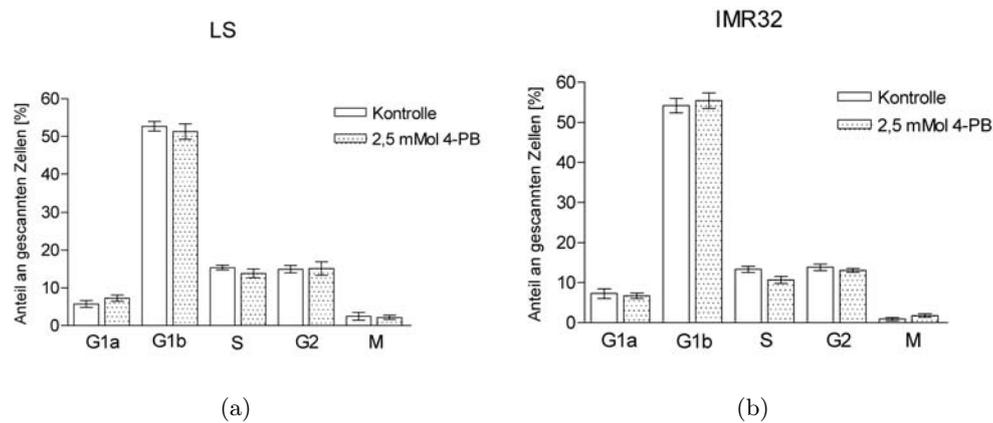


**Abbildung 3.27:** Zellzyklusanalyse; a) LAN1-Zellen unter 4-PB. Man kann einen signifikanten Abfall des Zellanteils in der S-Phase und eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils in der G1a-Phase erkennen; b) LAN5-Zellen unter 4-PB. Man erkennt einen signifikanten Abfall des Zellanteils in der G1b-Phase; Mean±SEM; \*\*\*:p<0,0001, \*\*:p<0,01, \*:p<0,05.

Bei den Zellen der Neuroblastomlinie **LAN1** wurde wieder ein G1-Arrest deutlich. Der Anteil der gescannten Zellen in der G1-Phase betrug in der Kontrolle 70 %, unter 4-PB betrug er 84 % (p<0,0001). In der G2/M-Phase verringerte sich der prozentuale Anteil der gemessenen Zellen von 9 % in der Kontrolle auf 4 % unter 4-PB (p<0,0001) (siehe Abb.3.25 (S.48)).

Die Aufschlüsselung der Werte der LAN1-Zellen ergaben eine Abnahme des prozentualen Anteils in der S-Phase von 12 % der Kontrolle auf 5 % unter 4-PB (p<0,01). In der G1a-Phase dagegen nahm der Anteil der Zellen nach Behandlung mit 4-PB zu (Kontrolle 4 %, 4-PB 12 %; p<0,01) (siehe Abb.3.27(a)).

Bei **LAN5** sah man in der ersten Auswertung keine signifikanten Veränderungen. (siehe Abb.3.25 (S.48)) In der spezifische Aufschlüsselung der Zyklusphasen zeigte sich eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen in der G1b-Phase (Kontrolle 67 %, 4-PB 58 %; p<0,0001), es war jedoch keine signifikante Zunahme in einer der anderen Zellphasen zu sehen (siehe Abb.3.27(b)).



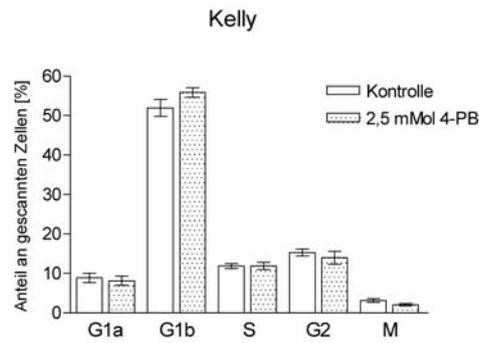
**Abbildung 3.28:** Zellzyklusanalyse; a) LS-Zellen und b) IMR32-Zellen unter 4-PB; Es sind keine signifikanten Änderungen des Zellzyklus zu erkennen; Mean±SEM.

Die Zellen der Linie **LS** zeigen unter 4-PB einen signifikanten Abfall in der G2/M-Phase. Im Vergleich zu der Kontrolle (18 %) sank der Anteil der gescannten Zellen auf 15 % ( $p < 0,05$ ). In der G1-Phase war kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und mit 4-PB behandelten Zellen zu erkennen (siehe Abb.3.25 (S.48)).

In der weiteren Aufschlüsselung konnte keine signifikante Veränderung der Zellzyklusphasen unter 4-PB festgestellt werden (siehe Abb.3.28(a)).

Auch die Zellen der Linie **IMR32** reagierten auf 4-PB mit einer Verschiebung des Zellzyklus von G2/M nach G1. Die Kontrolle wies einen Anteil von 62 % der gescannten Zellen in der G1-Phase auf, in der G2/M-Phase waren es 12 %. Unter 4-PB kam es zu einem Anstieg auf 65 % ( $p < 0,05$ ) in der G1-Phase und gleichzeitig zu einem Abfall in der G2/M-Phase auf 10 % ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb.3.25 (S.48)).

Die spezifische Auswertung ergab wiederum keine signifikanten Zellzyklusänderungen (siehe Abb.3.28(b)).



**Abbildung 3.29:** Kelly-Zellen unter 4-PB, Zellzyklusanalyse, Mean $\pm$ SEM; Man kann eine Tendenz zum G1b-Arrest mit Erhöhung des Anteils in der G1b-Phase erkennen, es besteht jedoch keine Signifikanz.

**Kelly**-Zellen reagierten unter 4-PB mit einer Verschiebung des prozentualen Anteils der gescannten Zellen von der G2/M-Phase in die G1-Phase. Die Kontrolle zeigte 61 % der Zellen in der G1-Phase und 15 % in der G2/M-Phase, unter 4-PB waren es 66 % in der G1-Phase ( $p < 0,01$ ) und 10 % in der G2/M-Phase ( $p < 0,01$ ) (siehe Abb.3.25 (S.48)).

Die spezifische Auswertung der Daten der Kelly-Zellen zeigte einen G1b-Arrest, der zu dem oben beschriebenen Ergebniss passt. Allerdings konnte man hier nur eine Tendenz aber keine signifikanten Werte feststellen (siehe Abb.3.29).

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Proliferationsverhalten von humanen Neuroblastomzellen als Modell für Neuroblasten unter verschiedenen niedermolekularen Metaboliten und deren Analoga analysiert. Die Forschung an humanen Neuroblasten ist aus ethischen Gründen problematisch, da sie aus embryonalem Gewebe gewonnen werden müssten. Ein weiterer Grund, der gegen die Verwendung von humanen Neuroblasten in der Kultur spricht ist, dass sich die Zellen schwierig halten lassen und nicht in der für die Versuche nötige Menge anzüchtbar sind. Aus diesem Grunde wurden stattdessen eine Auswahl von humanen Neuroblastomzelllinien, die in Kapitel 1.8.1 (S.13) vorgestellt werden, verwendet. Neuroblastomzelllinien lassen sich gut in der Zellkultur anzüchten und die Möglichkeit zur Ausdifferenzierung ist gegeben.

In der neurobiologischen Forschung werden vergleichbare Modelle eingesetzt: Koizumi *et al.* (1999) sowie Greene und Tischler (1976) setzten z. B. die noradrenerge klonale Phaeochromozytomzelllinie PC12 von Ratten als Ersatz für Neuronen ein. Auch Kasinski *et al.* (2004) verwendete die PC12-Zellen, um einen neurotoxischen Effekt von Leucin zu demonstrieren.

Anders (2004) verglich, unter der Fragestellung eines möglichen Neuronenmodells, anhand von Lipoproteinrezeptoren die humane Neuroblastomzelllinie LAN5 und die Mausneuroblastomzelllinie Neuro2A mit einer Mauscortexneuronenkultur. Dabei stellte er fest, dass sich Neuroblastomzellen funktionell ähnlich zu Neuronen verhalten, sich ihre Morphologie aber stark unterscheidet. Daher eignen sich Neuroblastomzelllinien zwar gut als Neuronenmodell für funktionelle Versuche wie z. B. metabolische Assays, für direkte morphologische Vergleiche können sie allerdings nicht herangezogen werden.

Bei Schlußfolgerungen, die aus den durchgeführten Versuchen gezogen werden können, muss man jedoch immer beachten, dass es sich bei den Neuroblastomenlinien um maligne Zellen handelt. Die später beschriebenen, teilweise sehr heterogenen Reaktionen der Zellen der verschiedenen Linien auf die niedermolekularen Metabolite könnten auf den malignen Charakter der Zellen zurückzuführen sein. In einigen Neuroblastomzelllinien liegt z. B. eine Amplifikation des *N-myc*-Onkogens vor. Um einen möglichen Zusammen-

Zelllinien	<i>N-myc</i> -Status	Phe	4-PB	3-OH-GA	Leucin	LTC <sub>4</sub>
SKNSH	neg.**	-	↓	-	↓	↓*
SHSY5Y	n.d.	↓	↓	-	↓	↓*
LAN1	pos.	-	↓	↓	-	↑
LAN5	n.d.	↓	↓	-	↓	-
LS	pos.	↓	↓	-	-	↓*
Kelly	pos.	-	↓	-	↓	↑
IMR32	pos.	-	↓	-	-	↑

**Tabelle 4.1:** Übersicht über die Neuroblastomzelllinien und ihre Proliferationsverhalten unter verschiedenen niedermolekularen Substanzen, -: keine signifikanten Änderungen; ↓: signifikante Abnahme der Proliferation; ↑: signifikante Zunahme der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle; \* nur bei 0,2 mM LTC<sub>4</sub>; \*\*: keine Amplifikation der *N-myc*-Sequenz aber Expression von *N-myc*; n.d.: kein *N-myc*-Status beschrieben

hang zwischen dem *N-myc*-Status und den Reaktionen auf die niedermolekularen Substanzen aufzuklären, wurden die Resultate mit den bekannten *N-myc*-Amplifikationen der Zelllinien verglichen (siehe Tabelle 4.1). Dabei konnte allerdings kein direkter Zusammenhang zwischen *N-myc*-Amplifikationen und deren Reaktion auf die getesteten Substanzen festgestellt werden.

Wie oben aufgeführt kann dieses Modell wertvolle Hinweise auf die möglichen Vorgänge der einzelnen Erkrankungen liefern und zur Aufklärung der Pathomechanismen beitragen, zumal die Onkogenexpression keinen systemischen Einfluß auf die Untersuchungsergebnisse hat.

In den nächsten Abschnitten sollen nun die einzelnen getesteten Substanzen mit ihrer Wirkung auf das Wachstumsverhalten der Neuroblastomzelllinien diskutiert werden.

Bei Patienten mit Phenylketonurie kommt es, wie aus Studien an Autopsiematerial hervorgegangen ist, ohne Therapie zu pathologischen Veränderungen von Neuronen und Gliazellen im Gehirn (Bauman und Kemper, 1982).

Da sowohl Neuronen als auch Gliazellen aus Neuroblasten hervorgehen, ist es wahrscheinlich, dass die Differenzierung und Proliferation der Neuroblasten - als Vorläuferzellen sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen - durch die Erkrankung beeinflusst wird. Ende der 50er Jahre erkannte man, dass durch eine phenylalaninarme Diät der

klinische Verlauf mit der Entwicklung einer Demenz verhindert werden kann (Muntau *et al.*, 2000). Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass der hohe Blutspiegel von Phenylalanin (Phe) eine wichtige Rolle bei der Entstehung der neurologischen Symptome der Stoffwechselerkrankung spielt (Huttenlocher, 2000).

Um dieses weiter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Phenylalanin in einer Konzentration, wie sie bei der Phenylketonurie im Liquor gefunden wird (40 mg/ml), *in vitro* auf sieben humane Neuroblastomzelllinien getestet.

Die Effekte von Phe auf die Zellen waren sehr heterogen: Zellen von drei der Linien reagierten mit einer signifikanten Minderung ihrer Proliferationsrate: SHSY5Y sank auf 83% der Kontrolle ( $p < 0,05$ ), LS auf 77% der Kontrolle ( $p < 0,0001$ ) und LAN5 auf 92% der Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Die Zellen der Linien LAN1, SKNSH und Kelly zeigte keine signifikante Änderung im Wachstumsverhalten unter 40mg/ml Phe. Bei IMR32 stieg die Proliferation unter Phe um 5%, im Vergleich mit den Zelllinien LAN1, SKNSH und SHSY5Y liess sich aber keine statistische Signifikanz darstellen.

Es konnte keine Korrelation zwischen dem *N-myc*-Status und der proliferationsmindernden Wirkung von Phe auf die Neuroblastomzellen beobachtet werden (siehe Tabelle 4.1 (S.54)).

Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der Arbeitsgruppe Schumacher (2006, persönliche Mitteilung) überein. Auch hier wurde eine signifikante, dosisabhängige Minderung der Wachstumsrate von einigen Neuroblastomzellen ab einer Konzentration von 10 mg/dl Phe beobachtet. Die *in vitro* Studien decken sich mit der Klinik, Patienten mit einer milden Phenylketonurie (PKU) und Konzentrationen unter 10 mg/dl Phe entwickeln keine neurologischen Symptome (Weglage *et al.*, 1997). Die Proliferationsminderung der Neuroblasten, hervorgerufen durch die Hyperphenylalaninämie, könnte zumindest unter anderem das verminderte Hirngewicht auf 80%, das bei den erkrankten Patienten gefunden wurde (Jervis, 1963), erklären.

Weitere immunhistochemische Analysen ergaben eine Aktivierung des PPAR $\gamma$ -Rezeptors durch hohe Konzentrationen von Phe (Schumacher *et al.*, 2006, persönliche Mitteilung). Eine Proliferationsminderung von Neuroblastomzellen als Reaktion auf eine Aktivierung des PPAR $\gamma$ -Rezeptors wurde auch von Valentiner *et al.* (2005) festgestellt. Die Arbeit konnte durch andere Liganden des PPAR $\gamma$ -Rezeptors (Rosiglitazone) eine Reduktion des Wachstums von Neuroblastomzellen erreichen.

Der derzeitige Forschungsstand deutet darauf hin, dass die erhöhte Konzentration der niedermolekularen Substanz Phenylalanin im Liquor der PKU-Erkrankten die Aktivierung des PPAR $\gamma$ -Rezeptors bewirkt und dadurch eine physiologische Differenzierung der

Neuroblasten verhindert wird. Daraus resultieren die schweren neurologischen Symptome. Weitere Effekte des Phenylalanin auf andere Systeme sind wahrscheinlich, sollen aber hier nicht weiter diskutiert werden.

Phenylbutyrat (4-PB) ist eine niedermolekulare Substanz, die als Chemotherapeutikum und bei Harnstoffzyklusstörungen therapeutisch eingesetzt wird (Brusilow *et al.*, 1984; Gilbert *et al.*, 2001; Gore und Carducci, 2000; Gore *et al.*, 2002; Warrell *et al.*, 1998). Pelidis *et al.* (1998) konnten zeigen, dass 4-PB auf einige andere humane Neuroblastomzelllinien einen proliferationsmindernden Effekt hat. Deswegen, und weil es dem Phenylalanin in der Struktur sehr ähnlich ist, wurde 4-PB in dieser Arbeit untersucht und die Effekte mit der Wirkung von Phe verglichen.

Alle Neuroblastomzelllinien zeigten unter 4-PB eine dosisabhängige Proliferationsminderung unabhängig vom *N-myc*-Status (siehe Tabelle 4.1 (S.54)). Dabei reagierten die Zellen der Linie LAN5 mit einer Wachstumsminde rung auf 11% der Kontrolle unter 5,0 mM 4-PB am stärksten ( $p < 0,0001$ ). Am schwächsten reagierte die Zellen der Neuroblastomlinie LS mit einer Proliferationssenkung auf 81 % der Kontrolle unter 5,0 mM 4-PB ( $p < 0,001$ ).

Diese einheitliche Reaktion der Neuroblastomzellen in den Proliferationsassays decken sich mit den Ergebnissen von Pelidis *et al.* (1998). Auch hier wurde eine dosisabhängige Minderung der Wachstumsrate der humanen Neuroblastomzelllinien NB3, NB12, PCL 1709, NBL5, SKNSH und IMR32 unter 4-PB unabhängig von dem *N-myc*-Status der Zellen gezeigt. Dieses widerspricht den Ergebnissen von Inden *et al.* (2007), die einen neuroprotektiven Effekt von 4-PB beschrieben.

Auch verschiedene andere humane maligne Tumoren reagieren unter 4-PB mit einer Differenzierung und einem verminderten Wachstum: Huang und Waxman (1998) wiesen eine antiproliferative Wirkung auf Kolonkarzinomzellen nach, Liu *et al.* (1994) beschrieben eine Wachstumsminde rung von humanen Melanomzellen unter 4-PB und Li *et al.* (2004) konnten einen antiproliferativen und differenzierenden Effekt auf humane Medulloblastomzellen aufzeigen.

Der Mechanismus, der hinter dieser wachstumsmindernden Wirkung steckt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Li *et al.* (2004) vermuten eine Hyperacetylierung des Histons H4. Diese Theorie wird durch mehrere Studien unterstützt, die 4-PB als einen Histon-Acetylase-Inhibitor beschrieben (Lea und Tulsyan, 1995; Lea und Randolph, 1998; Lea *et al.*, 1999; Warrell *et al.*, 1998). Pineau *et al.* (1996) und Samid *et al.* (2000)

wiesen bei 4-PB eine Aktivität als *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)  $\gamma$ -Ligand nach. Nach Altiook *et al.* (1997) kommt es durch den aktivierten PPAR $\gamma$  zu einer verminderten Bindung von E2F, einem Transaktivator von Genen, die den Übergang von einer in die andere Zellzyklusphase regulieren, an die DNA.

Bei dem Vergleich der beiden niedermolekularen Substanzen zeigt 4-PB im Gegensatz zu Phe eine konstante Inhibition des Wachstums bei allen getesteten Zelllinien.

Die unterschiedlichen Reaktionen auf Phe bzw. 4-PB könnten unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass der Wirkmechanismus der beiden Substanzen zwar der gleiche ist, die Zellen aber unterschiedliche Konzentrationsschwellen haben, auf die sie mit einer Proliferationsminderung reagieren.

Sowohl für 4-PB (Pineau *et al.*, 1996; Samid *et al.*, 2000) als auch für Phe (Schumacher *et al.*, 2006, persönliche Mitteilung) ist eine Wirkung über den PPAR $\gamma$  beschrieben. Die wachstumshemmende Wirkung könnte über diesen Mechanismus vermittelt werden.

Dass die Neuroblastomzellen unter Phe und 4-PB so unterschiedlich reagieren, könnte weiterhin auch darauf hindeuten, dass verschiedene Mechanismen für die Proliferationsminderung verantwortlich sind. 4-PB könnte über einen Rezeptor wirken, der auf allen sieben Neuroblastomzelllinien exprimiert wird, Phe dagegen über einen Stoffwechselweg, den nicht jede Zelllinie besitzt.

Eine weiterführende Untersuchung auf Veränderungen des Zellzyklus unter 2,5 mM 4-PB mit der Laser Scanning Cytometry (LSC) zeigte für die Zelllinien LAN1, SKNSH, Kelly und IMR32 einen sogenannten G1-Arrest unter 4-PB (siehe Kapitel 3.3 (S.48)). Der Anteil der Zellen, der sich in der G1-Phase des Zellzyklus befanden nahm signifikant zu, während sich der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase signifikant verringerte.

Die Neuroblastomlinie SHSY5Y dagegen reagierte mit einem prozentualen Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase, in der G1-Phase gab es keine signifikanten Veränderungen. Die Zellen von LAN5 wiesen keinerlei signifikanten Änderungen in der Zellzyklusanalyse im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Linie LS zeigte unter 4-PB einen signifikanten Abfall der Zellen in der G2/M-Phase während in der G1-Phase keine Änderung auszumachen war.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der LSC weisen eher auf verschiedene Abläufe hin. McGrath-Morrow und Stahl (2000) berichten über die Regulation des p21-pathway (Waf1/Cip1/Sdi1) durch 4-PB, die in einen G1-Phase-Arrest mündet. Dieser Mechanismus könnte bei den Zelllinien LAN1, SKNSH, Kelly und IMR32, bei denen unter 4-PB ein G1-Arrest beobachtet wurde, eine Rolle spielen. Zwischen der wachstumshemmenden Wirkung und der Veränderung des Zellzyklus konnte keine Korrelation gefunden wer-

den. Bei den Zelllinien, die sich unter 2,5 mM 4-PB in einem G1-Phase-Arrest befanden (LAN1, SKNSH, Kelly, IMR32), schwankte die Proliferationsminderung zwischen 48% (LAN1) und 80% (IMR32) der Kontrolle. Die Zellen von SHSY5Y reagierten, ähnlich wie die Neuroblastomzellen SKNSH (70%), Kelly (65%) oder LAN5 (58%), mit einem Abfall des Wachstums auf 68%, zeigten aber als einzige einen Arrest in der G2/M-Phase.

Die Zellen der Linie LS reagierte unter 2,5 mM 4-PB mit einem Abfall der Proliferation auf 96% am schwächsten und zeigte einen Verlust an Zellen in der G2/M-Phase.

Während der Vorbereitungen auf die Versuche fielen in der Zellkultur morphologische Veränderungen bei den Zellen auf, die mit 4-PB behandelt worden waren. Um diesen Eindruck zu objektivieren wurden die Zellen der Kontrolle, der Lösungsmittelkontrolle und der Phenylbutyrat-Gruppe photographiert und miteinander verglichen.

Es zeigten sich in allen Neuroblastomzelllinien morphologische Zeichen der Ausdifferenzierung wie die Ausbildung von zytoplasmatischen, axonartigen Ausläufern. Einige Zellen, z.B. LAN5, zeigten, bei eigentlich rundlicher Konfiguration, unter 4-PB eine eher spindelige Form. Bei IMR32-Zellen konnte man eine Veränderung der Zellkerne erkennen: im Gegensatz zur Kontrolle, in der sie ein sehr pleomorphes Bild zeigten, stellten sie sich unter 2,5 mM 4-PB sehr kondensiert dar.

In dieser Arbeit konnte jedoch keine Korrelation zwischen den morphologischen Veränderungen und dem antiproliferativen Effekten durch 4-PB nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Aussage von Anders (2004), der in seiner Arbeit feststellte, dass man Neuroblastomzellen zwar gut für funktionelle Versuche als Neuronenmodell einsetzen kann, morphologische Veränderungen aber nicht übertragen werden können, womit die fehlende Korrelation der Ergebnisse erklärt werden könnte.

Die Glutaracidurie Typ I zeichnet sich unter anderem durch eine Anreicherung von 3-Hydroxyglutarsäure (3-OH-GA) im Blut der Patienten aus (Goodman *et al.*, 1975; Goodman und Frerman, 1995; Hoffmann *et al.*, 1996). Gleichzeitig kommt es zu encephalopathischen Krisen mit Dyskinesien und Dystonien, die z. B. durch banale Infekte oder Impfungen ausgelöst werden können (Kyllerman und Steen, 1980). Langfristig zeigen sich Veränderungen der Hirnstruktur (Amir *et al.*, 1989; Bennett *et al.*, 1986; Bergman *et al.*, 1989; Goodman *et al.*, 1977, 1987; Hoffmann und Zschocke, 1999; Iafolla und Kahler, 1989; Yamaguchi *et al.*, 1987) und eine mentale Retardation (Dunger und Snodgrass, 1984; Gregersen *et al.*, 1977) bei den betroffenen Patienten. Etwa 90 bis 100 % der betroffenen Kinder zeigen erste klinische Symptome vor Vollendung des zweiten Lebensjahres.

Das Auftreten von encephalopathischen Krisen nach dem Alter von sechs Jahren ist bis jetzt noch nicht beschrieben. Das deutet darauf hin, dass während der Hirnentwicklung ein vulnerables Fenster für die vorbeschriebenen Schädigungen besteht (Hoffmann *et al.*, 1996; Strauss *et al.*, 2003).

In zahlreichen Arbeiten wird die neurotoxische Wirkung von 3-Hydroxyglutarsäure beschrieben: Sowohl in primär dissoziierten Neuronen (telencephalische, striatale, hippocampale und kortikale Neurone) als auch in organotypischen Kulturen aus Ratten- und Hühnerhirn (kortikostriatal und hippocampal) induzierte 3-OH-GA eine Schädigung der neuronalen Zellen (Bjugstad *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2003; Flott-Rahmel *et al.*, 1997; Kölker *et al.*, 2000). Auch eine intrastriatale Injektion in Rattenhirne rief eine Degeneration von Neuronen hervor (DeMello *et al.*, 2001).

In einer zusammenfassenden Darstellung demonstrierten Kölker *et al.* (2004) eine excitotoxische Wirkung von 3-OH-GA über den NMDA-Rezeptor auf neuronale Zellen, die die encephalopathischen Krisen erklären könnte. Gleichzeitig stellten sie aber fest, dass parallel auch andere Faktoren bei der Pathophysiologie der Glutaracidurie Typ I eine Rolle spielen könnten, die zu den neuronalen Schäden, die auch ohne akute Krisen entstehen, führen.

Freudenberg *et al.* (2004) dagegen konnten keinen excitotoxischen, antiproliferativen Effekt von 3-OH-GA auf primäre neuronale Zellen von neonatalen Ratten feststellen.

Um den Mechanismus der GA I weiter zu studieren, wurden die sieben Neuroblastomzelllinien auf ihre Reaktion unter der pathophysiologischen Konzentration 4 mg/dl 3-OH-GA getestet.

Nur die Zellen der Linie LAN1 zeigten eine signifikante Verminderung der Proliferation auf 90% ( $p < 0,001$ ) der Kontrolle unter einer Inkubation mit 3-OH-GA. Bei allen anderen Zelllinien konnte keine signifikante Änderung des Wachstumsverhaltens gesehen werden.

Diese Ergebnisse decken sich initial weder mit der Theorie der excitotoxischen Wirkung von 3-OH-GA noch mit den gegenteiligen Ergebnissen von Freudenberg *et al.* (2004).

Um die Auswahl der möglichen Mechanismen einzuschränken, müssen weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Würde nur bei der Linie LAN1 der NMDA-Rezeptor gefunden werden, spräche das für die excitotoxische Wirkung von 3-OH-GA über eben diesen. Würde bei allen sieben Neuroblastomzelllinien den NMDA-Rezeptor nachgewiesen, würde das eher auf andere, ungeklärte Wirkungsweisen der 3-OH-GA bei der GA I hindeuten.

Bei der Maple Syrup Urine Disease (MSUD) kommt es zu einer Akkumulation von Leucin, Valin und Isoleucin in Blut, Liquor und Urin der Erkrankten (Snyderman, 1988). Besonders während encephalopatischer Krisen, in denen die Patienten akut neurologische Symptome wie epileptische Krämpfe und Koma entwickeln, kommt es zu außerordentlich erhöhten Konzentrationen dieser verzweigtkettigen Aminosäuren (Riviello *et al.*, 1991; Levin *et al.*, 1993). Dabei erreichen Leucin und die korrespondierende  $\alpha$ -Ketosäure KICA Konzentrationen von 3-5 mM im Plasma. Die Plasmaspiegel von Isoleucin und Valin liegen bei 1 mM (Snyderman *et al.*, 1984). Sobald die Konzentrationen durch die Therapie gesenkt werden, bilden sich auch die neurologischen Symptome wieder zurück (Chuang und Shih, 2001).

Bezüglich des Einflusses von Leucin auf die Intelligenz der Patienten gibt es widersprüchliche Aussagen: Hilliges *et al.* (1993) stellten fest, dass erhöhte Plasmaleucinkonzentrationen  $>1$  mmol/l einen negativen Einfluss auf den IQ der Patienten haben. Dagegen steht die Studie von le Roux *et al.* (2006), die keinen Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration von Leucin und dem IQ fand. Vielmehr wurde das Diagnosealter als wichtiger Indikator für die Intelligenz der Patienten beschrieben. Auch Rousson und Guibaud (1984) konnten keine Korrelation zwischen den gemessenen Leucinkonzentrationen im Blut und dem IQ der Patienten aufzeigen. Das neurologische Outcome von erkrankten Kindern scheint nach einer Arbeit von Naughten *et al.* (1982) weder durch den initialen Leucinspiegel, noch durch die Geschwindigkeit, in der die erhöhten Werte gesenkt werden, beeinflusst zu werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden das Proliferationsverhalten der sieben Neuroblastomzellen unter Leucin beobachtet. Dabei wurden zwei Konzentrationen gewählt: 4 mM (im pathophysiologischen Bereich) und zum Vergleich 0,4 mM Leucin.

Die Zellen der Linien LAN5, SKNSH, SHSY5Y und Kelly reagierten auf 4 mM Leucin im Vergleich zur Kontrolle mit einem signifikanten Abfall der Wachstumsrate (LAN5 90%,  $p < 0,001$ ; SKNSH 73%,  $p < 0,05$ ; SHSY5Y 93%,  $p < 0,05$ ; Kelly 80%,  $p < 0,0001$ ). Die Zellen der Linien LAN1, LS und IMR32 zeigten hingegen keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Proliferation. Unter 0,4 mM Leucin zeigte keine der Zelllinien eine signifikanten Wachstumsveränderungen. Es gab keine Korrelation zwischen den Reaktionen und der Amplifikation des N-myc-Onkogens (vergleiche Tabelle 4.1 (S.54)).

Verschiedene Studien zeigen zelltoxische Effekte von Leucin: Jovet *et al.* (2000) konnten eine Apoptose von Glia und Neuronen *in vitro* und *in vivo* demonstrieren, die durch

verzweigt-kettige Amino- und Ketosäuren, die bei der MSUD akkumulieren, getriggert wurden. Dabei schien die Aminosäure Leucin die apoptotische Wirkung ihrer  $\alpha$ -Ketosäure KICA zu potenzieren. In der Arbeit von Funchal *et al.* (2005) wird die toxische Wirkung von Leucin, Valin und Isoleucin auf Astrozyten dargestellt.

Kasinski *et al.* (2004) zeigten anhand eines PC12-Zell-Modells, dass unter den verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin bei einer Konzentration von 25 mM den ausgeprägtesten zelltoxischen Effekt auf neuronale Zellen von Ratten hat. Nach 48 Stunden Inkubation unter 25 mM Leucin wurde ein merklicher Verlust des mitochondrialen Membranpotentials festgestellt. Diese Zeitspanne deckt sich mit der in dieser Arbeit gewählten Inkubationszeit. Die proliferationsmindernde Wirkung von Leucin auf humane Neuroblastomzellen wird bei deutlich geringeren Konzentrationen erreicht als bei Kasinski *et al.* (2004) für tierische neuronale Zellen beschrieben ist.

Der Wirkungsmechanismus der neurotoxischen Effekte ist noch nicht hinreichend geklärt. In der Literatur sind verschiedene Ansätze zu finden:

Durch eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktionen von Neuronen und/oder Gliazellen könnte die physiologische Entwicklung und Funktion der Nervenzellen eingeschränkt werden. Hierzu würden die Resultate von Kasinski *et al.* (2004) passen, die einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials unter Leucin feststellten.

Da die Aminogruppen von Glutamin und Glutamat größten Teils aus Leucin stammen, vermuten Huang *et al.* (1996) eine Störung des Glutamin-Glutamat-Stoffwechsels durch hohe Leucinkonzentrationen. Dieses könnte zu einer veränderten Synthese und Funktion des wichtigsten excitatorischen Neurotransmitters GABA führen. Tavares *et al.* (2000) zeigten in ihrer Arbeit eine starke, wahrscheinlich kompetitive Blockade der Glutamat-aufnahme in die synaptischen Vesikel von Neuronen unter anderem durch Leucin. Dabei stellten sie fest, dass die stärkste Blockade durch die Metabolite hervorgerufen wurde, die bei der MSUD am höchsten konzentriert sind. Dieses Phänomen resultiert möglicherweise in einer erhöhten Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt, die potentiell zu excitotoxischen Aktionen führen kann.

Jouvet *et al.* (2000) zeigten in ihrer Studie eine Induktion der Apoptose ohne Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials durch die verzweigt-kettigen Aminosäuren und besonders durch ihre korrespondierenden Ketosäuren, die bei der MSUD akkumulieren, auf.

Die Ergebnisse der Proliferationsassays stärken die Annahme, dass erhöhte Konzentrationen der verzweigt-kettigen Aminosäure Leucin einen Einfluss auf neuronale Zellen nehmen. Dabei reicht für das humane Neuronenmodell eine ca. 6fach geringere Konzen-

tration Leucin als für tierische Neuronenmodelle aus, um einen antiproliferativen Effekt hervorzurufen Kasinski *et al.* (2004). Dass nicht alle Zelllinien mit einer Wachstumsinhibition reagieren, kann auf den malignen Charakter der Zellen zurückzuführen sein.

Bei dem Zellweger Syndrom, einer peroxisomalen Stoffwechselstörung, kommt es unter anderem zu einer Anreicherung von LTC<sub>4</sub> in Blut und Urin der Patienten. Zusätzlich zu den laborchemischen Veränderungen zeigen die erkrankten Kinder Störungen der neuronalen Migration mit Veränderungen des Feinbaus des Gehirns und schweren neurologischen Defiziten (Mayatepek *et al.*, 1993; Gould *et al.*, 2001).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den erhöhten Konzentrationen der Leukotriene bei dem Zellweger Syndrom und den dort auftretenden Veränderungen des ZNS zu untersuchen, wurde das Proliferationsverhalten der Neuroblastomzellen unter LTC<sub>4</sub> betrachtet.

Die einzelnen Zelllinien reagierten unter LTC<sub>4</sub> sehr unterschiedlich: Bei einer Konzentration von 0,2 mM fiel die Proliferation von SKNSH-Zellen auf 91 % ( $p < 0,05$ ), die von LS-Zellen auf 87 % ( $p < 0,01$ ) und die der SHSY5Y-Zellen auf 86 % ( $p < 0,05$ ). Die Konzentrationen 2,0 mMol und 20,0 mMol verursachten dagegen keine Änderung der Vermehrung bei den drei Zelllinien.

Die Zellen der Linien Kelly, IMR32 und LAN1 zeigten unter LTC<sub>4</sub> eher eine Wachstumssteigerung. Um 29 % ( $p < 0,001$ ) bzw. 31 % ( $p < 0,0001$ ) nahm die Vermehrung der Kelly-Zellen unter 2 mMol bzw. 20 mMol LTC<sub>4</sub> zu. Unter 0,2 mMol zeigte sich keine signifikante Veränderung des Proliferationsverhaltens. Bei IMR32-Zellen stieg unter 20,0 mMol LTC<sub>4</sub> die Wachstumsrate auf 105 % ( $p < 0,05$ ), bei LAN1-Zellen zeigte sich unter 2,0 mMol LTC<sub>4</sub> eine Proliferationssteigerung auf 105 % ( $p < 0,05$ ).

Die Reaktionen auf LTC<sub>4</sub> erwiesen sich wiederum als unabhängig vom *N-myc*-Status der Zellen (siehe Tabelle 4.1 (S.54)).

Morelli *et al.* (1989) konnten in ihrer Studie einen proliferationssteigernden Effekt von LTC<sub>4</sub> auf humane Melanozyten zeigen. Die dabei verwendeten Konzentrationen von LTC<sub>4</sub> lagen im nanomolaren Bereich. Weiter konnten Morelli *et al.* (1992) aufgezeigt werden, dass die wachstumssteigernde Reaktion möglicherweise über zyklisches AMP vermittelt wird. Auch humane myeloide Progenitorzellen des Knochenmarks reagieren auf eine Inkubation mit LTC<sub>4</sub> in nanomolaren Konzentrationen mit einer Wachstumssteigerung und einer vermehrten Neigung zur Koloniebildung (Stenke *et al.*, 1993). Leikauf *et al.* (1990) untersuchten den Einfluss von Cysteinyl-Leukotrienen auf humanes Bronchialepithel und

fanden auch hier einen proliferationssteigernden Effekt.

Die Neuroblastomzellen der Linien SKNSH, LS und SHSY5Y reagierten mit einer Minderung des Wachstums unter der niedrigsten Konzentration von LTC<sub>4</sub>. Um sicherzugehen, dass diese heterogenen Reaktionen auf den malignen Charakter der Zellen zurückzuführen ist, sind weitere Versuche nötig.

Die Ergebnisse der verschiedenen Studien sind nur schwierig mit den Resultaten dieser Arbeit zu vergleichen, da ganz unterschiedliche Konzentrationen von LTC<sub>4</sub> verwendet wurden. Dieses lässt sich durch die verschiedenen Intentionen der Studien erklären, die trotzdem alle zu dem gleichen Schluss kommen: Leukotrien C<sub>4</sub> hat eine proliferationssteigernde Wirkung auf unterschiedlichste Zellen. Unklar bleibt, ob der wachstumsvermehrnde Effekt des LTC<sub>4</sub> die Ursache für die neuronalen Veränderungen beim Zellweger Syndrom ist.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Reaktion von Neuroblastomzelllinien auf verschiedene, potentiell neurotoxische Substanzen untersucht. Die Stoffe Phenylalanin, 3-Hydroxy-Glutarsäure, Leucin und Leukotrien C<sub>4</sub> werden als Ursache für neuronale Veränderungen bei einigen Stoffwechselerkrankungen diskutiert. 4-Phenylbutyrat, eine dem Phenylalanin strukturverwandte Substanz, wird als neuroprotektiv beschrieben und als Chemotherapeutikum bei verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt.

Unter den verschiedenen Substanzen zeigten sich sehr heterogene Wachstumsreaktionen der einzelnen Neuroblastomlinien. Nur 4-Phenylbutyrat bewirkte eine konzentrationsabhängige Proliferationsminderung aller Zelllinien. Weiterführende Versuche mit dem Laser Scanning Cytometer zeigten weder eine einheitliche Veränderung des Zellzyklus noch einen Zusammenhang zwischen modifizierten Zellzyklen und der Stärke der Wachstumsinhibition. Während der Versuche festgestellte morphologische Veränderungen der Zelllinien wiesen auf einen differenzierenden Einfluss von 4-Phenylbutyrat hin, doch auch hier zeigten sich keine einheitlichen Reaktionen.

Im Vergleich mit der Literatur stellte sich heraus, dass das Wachstum der getesteten humanen Zelllinien ein guter Indikator für die Neurotoxizität von niedermolekularen Metaboliten ist. Es konnte aber keine Zelllinie gefunden werden, die besonders sensibel auf alle getesteten Substanzen reagierte.

Die Heterogenität der gewonnenen Ergebnisse kann auf den malignen Charakter der Neuroblastomzellen zurückzuführen sein. Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien könnte darauf hindeuten, dass unterschiedliche Mechanismen die Reaktion auf die einzelnen Metabolite steuern. Die Amplifikation des *N-myc*-Onkogens, die häufig eine Rolle bei der Entstehung und Proliferation maligner Zellen spielt, scheint keinen Einfluss auf die Reaktionsweisen der untersuchten Neuroblastomzelllinien auf die Metabolite zu haben. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um die einzelnen Regulationsmechanismen aufzuklären, die zu den unterschiedlichen Wachstumsreaktionen der Zelllinien geführt haben.

# Literaturverzeichnis

- Altiok, S.; Xu, M. und Spiegelman, B. PPAR $\gamma$  induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via downregulation of PP2A. *Genes Dev*, 11:1987–1998, 1997.
- Alvord, E.C.; Stevenson, L.D.; Vogel, F.S. und Engle, R.L. Neuropathological findings in phenyl-pyruvic oligophrenia (phenyl-ketonuria). *J Neuropathol Exp Neurol*, 9:298–310, 1950.
- Amir, N.; Elpeleg, O.N.; Shalev, R.S. und Christensen, E. Glutaric aciduria type I: enzymatic and neuroradiologic investigations of two kindreds. *J Pediatr*, 114:983–989, 1989.
- Anders, P. Die Neuroblastomzelllinien Neuro2A und LAN5 als Neuronenmodellversuch am Beispiel der Darstellung von Lipoproteinrezeptoren. Diplomarbeit, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Molekulare Zellbiologie, 2004.
- Appelgren, L.E. und Hammarström, S. Distribution and metabolism of 3H-labeled leukotriene C3 in the mouse. *J Biol Chem*, 257:531–535, 1982.
- Baric, I.; Wagner, L. und Feyh, P. Sensitivity and specificity of free and total glutaric and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria typ I. *J Inherit Metab Dis*, 22:867–881, 1999.
- Bauman, M.L. und Kemper, T.L. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol (Berl)*, 58:55–63, 1982.
- Bennett, M.J.; Marlow, N.; Pollitt, R.J. und Wales, J.K. Glutaric aciduria type 1: biochemical investigations and postmortem findings. *Eur J Pediatr*, 145:403–405, 1986.
- Bergman, I.; Finegold, D.; Gartner, J.C.; Zitelli, B.J.; Claassen, D.; Scarano, J.; Roe, C.R.; Stanley, C. und Goodman, S.I. Acute profound dystonia in infants with glutaric acidemia. *Pediatrics*, 83:228–234, 1989.
- Biedler, J.L.; Helson, L. und Spengler, B.A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33:2643–2652, 1973.
- Biedler, J.L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M. und Freedman, L.S. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, 38:3751–3757, 1978.

- Bjugstad, K.; Zawada, W.; Goodman, S. und Feed, C. IGF-1 and bFGF reduced glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid toxicity in striatal cultures. *J Inherit Metab Dis*, 24:631–647, 2001.
- Brismar, J.; Aqeel, A.; Brismar, G.; Coates, R.; Gascon, G. und Ozand, P. Maple syrup urine disease: findings on CT and MR scans of the brain in 10 infants. *AJNR Am J Neuroradiol*, 11:1219–1228, 1990.
- Brusilow, S.W.; Danney, M.; Waber, L.J.; Batshaw, M.; Burton, B.; Levitsky, L.; Roth, K.; McKeethren, C. und Ward, J. Treatment of episodic hyperammonemia in children with inborn errors of urea synthesis. *N Engl J Med*, 310:1630–1634, 1984.
- Chuang, D.T. und Shih, V.E. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Band II, Kapitel Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria), 1971–2005. McGraw-Hill, New York, 8th Auflage, 2001.
- Das, A.; Lücke, T. und Ullrich, K. Glutaric aciduria type I: creatine supplementation restores creatine phosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol Gen Metab*, 78:108–111, 2003.
- DeMello, C.; Kölker, S. und Ahlemeyer, B. Intra-striatal administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsion and excitotoxic lesions in rats. *Brain Res*, 916:70–75, 2001.
- DiGiuseppe, J.A.; Weng, L.J.; Yu, K.H.; Fu, S.; Kastan, M.B.; Samid, D. und Gore, S.D. Phenylbutyrate-induced G1 arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells: structure-function analysis. *Leukemia*, 13:1243–1253, 1999.
- Dunger, D.B. und Snodgrass, G.J. Glutaric aciduria type I presenting with hypoglycaemia. *J Inherit Metab Dis*, 7:122–124, 1984.
- Flott-Rahmel, B.; Falter, C. und Schluff, P. Nerve cell lesions caused by 3-hydroxyglutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidemia I. *J Inherit Metab Dis*, 20:387–390, 1997.
- Folling, A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Z Physiol Chem*, 227:169–176, 1934.
- Freudenberg, F.; Lukacs, Z. und Ullrich, K. 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiology of Disease*, 16:581–584, 2004.
- Funchal, C.; Gottfried, C.; de Almeida, L.M.V.; dos Santos, A.Q.; Wajner, M. und Pessoa-Pureur, R. Morphological alterations and cell death provoked by the branched-chain alpha-amino acids accumulating in maple syrup urine disease in astrocytes from rat cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol*, 25:851–867, 2005. doi:10.1007/s10571-005-4938-6.
- Gilbert, J.; Baker, S.D.; Bowling, M.K.; Grochow, L.; Figg, W.D.; Zabelina, Y.; Donehower, R.C. und Carducci, M.A. A phase I dose escalation and bioavailability study of

- oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res*, 7:2292–2300, 2001.
- Goodman, S.I.; Frerman, F.E. und Loehr, J.P. Recent progress in understanding glutaric acidemias. *Enzyme*, 38:76–79, 1987.
- Goodman, S.I.; Markey, S.P.; Moe, P.G.; Miles, B.S. und Teng, C.C. Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med*, 12:12–21, 1975.
- Goodman, S.I.; Norenberg, M.D.; Shikes, R.H.; Breslich, D.J. und Moe, P.G. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr*, 90:746–750, 1977.
- Goodman, S. und Frerman, F. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Kapitel Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia, 1451–1460. New York: McGraw-Hill, 7th Auflage, 1995.
- Gore, S.D. und Carducci, M.A. Modifying histones to tame cancer: clinical development of sodium phenylbutyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, 9:2923–2934, 2000.
- Gore, S.D.; Samid, D. und Weng, L.J. Impact of the putative differentiating agents sodium phenylbutyrate and sodium phenylacetate on proliferation, differentiation, and apoptosis of primary neoplastic myeloid cells. *Clin Cancer Res*, 3:1755–1762, 1997.
- Gore, S.D.; Weng, L.J.; Figg, W.D.; Zhai, S.; Donehower, R.C.; Dover, G.; Grever, M.R.; Griffin, C.; Grochow, L.B.; Hawkins, A.; Burks, K.; Zabelena, Y. und Miller, C.B. Impact of prolonged infusions of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 8:963–970, 2002.
- Gould; Raymond und Valle. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Band II, Kapitel The Peroxisome Biogenesis Disorders, 3181–3217. McGraw-Hill, New York, 8te Auflage, 2001.
- Greene, L.A. und Tischler, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73:2424–2428, 1976.
- Gregersen, N.; Brandt, N.J.; Christensen, E.; Gron, I.; Rasmussen, K. und Brandt, S. Glutaric aciduria: clinical and laboratory findings in two brothers. *J Pediatr*, 90:740–745, 1977.
- Hagmann, W.; Denzlinger, C. und Keppler, D. Role of peptide leukotrienes and their hepatobiliary elimination in endotoxin action. *Circ Shock*, 14:223–235, 1984.
- Hammarström, S. Leukotrienes. *Annu Rev Biochem*, 52:355–377, 1983.

- Hammarström, S.; Bernström, K.; Örning, L.; Dahlen, S.E. und Hedqvist, P. Rapid in vivo metabolism of leukotriene C3 in the monkey *Macaca irus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 101:1109–1115, 1981.
- Hilliges, C.; Awiszus, D. und Wendel, U. Intellectual performance of children with maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr*, 152:144–147, 1993.
- Hoffmann, G.F.; Athanassopoulos, S.; Burlina, A.B.; Duran, M.; de Klerk, J.B.; Lehnert, W.; Leonard, J.V.; Monavari, A.A.; Müller, E.; Muntau, A.C.; Naughten, E.R.; Plecko-Starting, B.; Superti-Furga, A.; Zschocke, J. und Christensen, E. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics*, 27:115–123, 1996.
- Hoffmann, G.F. und Zschocke, J. Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J Inherit Metab Dis*, 22:381–391, 1999.
- Huang, Y. und Waxman, S. Enhanced growth inhibition and differentiation of fluorodeoxyuridine-treated human colon carcinoma cells by phenylbutyrate. *Clin Cancer Res*, 4:2503–2509, 1998.
- Huang, Y.; Zielke, H.R.; Tildon, J.T.; Zielke, C.L. und Baab, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Dev Neurosci*, 18:415–419, 1996.
- Huber, M.; Müller, J.; Leier, I.; Jedlitschky, G.; Ball, H.A.; Moore, K.P.; Taylor, G.W.; Williams, R. und Keppler, D. Metabolism of cysteinyl leukotrienes in monkey and man. *Eur J Biochem*, 194:309–315, 1990.
- Huttenlocher, P.R. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr*, 159 Suppl 2:S102–S106, 2000.
- Iafolla, A.K. und Kahler, S.G. Megalencephaly in the neonatal period as the initial manifestation of glutaric aciduria type I. *J Pediatr*, 114:1004–1006, 1989.
- Inden, M.; Kitamura, Y.; Takeuchi, H.; Yanagida, T.; Takata, K.; Kobayashi, Y.; Taniguchi, T.; Yoshimoto, K.; Kaneko, M.; Taira, T.; Ariga, H. und Shimohama, S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J Neurochem*, Epub ahead of print, 2007.
- Jedlitschky, G.; Huber, M.; Völkl, A.; Müller, M.; Leier, I.; Müller, J.; Lehmann, W.D.; Fahimi, H.D. und Keppler, D. Peroxisomal degradation of leukotrienes by beta-oxidation from the omega-end. *J Biol Chem*, 266:24763–24772, 1991.
- Jervis, G. Genetics of phenylpyruvic oligophrenia (contribution to study of influence of heredity on mental defect). *J Ment Sci*, 85:719–762, 1939.
- Jervis, G. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med*, 82:514–515, 1953.

- Jervis, G. *Phenylketonuria*. Ch C Thomas, Springfield, 1963.
- Jouvet, P.; Rustin, P.; Taylor, D.L.; Pocock, J.M.; Felderhoff-Mueser, U.; Mazarakis, N.D.; Sarraf, C.; Joashi, U.; Kozma, M.; Greenwood, K.; Edwards, A.D. und Mehmet, H. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell*, 11:1919–1932, 2000.
- Kasinski, A.; Doering, C.B. und Danner, D.J. Leucine toxicity in a neuronal cell model with inhibited branched chain amino acid catabolism. *Brain Res Mol Brain Res*, 122:180–187, 2004.
- Keppler, D.; Hagmann, W.; Rapp, S.; Denzlinger, C. und Koch, H.K. The relation of leukotrienes to liver injury. *Hepatology*, 5:883–891, 1985.
- Keppler, D.; Huber, M.; Baumert, T. und Guhlmann, A. Metabolic inactivation of leukotrienes. *Adv Enzyme Regul*, 28:307–319, 1989.
- Koizumi, S.; Bootman, M.D.; Bobanovic, L.K.; Schell, M.J.; Berridge, M.J. und Lipp, P. Characterization of elementary Ca<sup>2+</sup> release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons. *Neuron*, 22:125–137, 1999.
- Kölker, S.; Ahlemeyer, B.; Kriegstein, J. und Hoffmann, G. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acid *in vitro*: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res*, 47:495–503, 2000.
- Kölker, S.; Koeller, D.; Sauer, S.; Hörster, F.; Schwab, M.; Hoffmann, G.; Ullrich, K. und Okun, J. Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 27:805–812, 2004.
- Kyllerman, M. und Steen, G. Glutaric aciduria. A "common" metabolic disorder? *Arch Fr Pediatr*, 37:279, 1980.
- Langenbeck, U. *Pathobiochemical and pathophysiologic analysis of the MSUD phenotype*. In: *Branched Chain Amino and Keto Acids in Health and Disease*, Hrsg. S.A.Adibi, W. Fekl, U. Langenbeck, P. Schauder. Basel: Karger, 1984.
- Lea, M. und Randolph, V. Induction of reporter gene expression by inhibitors of histone deacetylase. *Anticancer Res*, 18:2717–2722, 1998.
- Lea, M.; Randolph, V. und Hodge, S. Induction of histone acetylation and growth regulation in erythroleukemia cells by 4-phenylbutyrate and structural analogs. *Anticancer Res*, 19:1971–1976, 1999.
- Lea, M. und Tulsyan, N. Discordant effects of butyrate analogues on erythroleukemia cell proliferation and histone deacetylase. *Anticancer Res*, 15:879–884, 1995.

- Leikauf, G.D.; Claesson, H.E.; Doupnik, C.A.; Hybbinette, S. und Grafström, R.C. Cysteinyl leukotrienes enhance growth of human airway epithelial cells. *Am J Physiol*, 259:L255–L261, 1990.
- Levin, M.L.; Scheimann, A.; Lewis, R.A. und Beaudet, A.L. Cerebral edema in maple syrup urine disease. *J Pediatr*, 122:167–168, 1993.
- Lewis, R.A. und Austen, K.F. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest*, 73:889–897, 1984.
- Li, X.N.; Parikh, S.; Shu, Q.; Jung, H.L.; Chow, C.W.; Perlaky, L.; Leung, H.C.E.; Su, J.; Blaney, S. und Lau, C.C. Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells. *Clin Cancer Res*, 10:1150–1159, 2004.
- Liu, L.; Shack, S.; Stetler-Stevenson, W.G.; Hudgins, W.R. und Samid, D. Differentiation of cultured human melanoma cells induced by the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *J Invest Dermatol*, 103:335–340, 1994.
- Maltby, N.H.; Taylor, G.W.; Ritter, J.M.; Moore, K.; Fuller, R.W. und Dollery, C.T. Leukotriene C4 elimination and metabolism in man. *J Allergy Clin Immunol*, 85:3–9, 1990.
- Mayatepek, E.; Lehmann, W.D.; Fauler, J.; Tsikas, D.; Frölich, J.C.; Schutgens, R.B.; Wanders, R.J. und Keppler, D. Impaired degradation of leukotrienes in patients with peroxisome deficiency disorders. *J Clin Invest*, 91:881–888, 1993.
- McGrath-Morrow, S. und Stahl, J. G(1) Phase growth arrest and induction of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) in IB3-1 cells treated with 4-sodium phenylbutyrate. *J Pharmacol Exp Ther*, 294:941–947, 2000.
- Morelli, J.G.; Hake, S.S.; Murphy, R.C. und Norris, D.A. Leukotriene B4-induced human melanocyte pigmentation and leukotriene C4-induced human melanocyte growth are inhibited by different isoquinolinesulfonamides. *J Invest Dermatol*, 98:55–58, 1992.
- Morelli, J.G.; Yohn, J.J.; Lyons, M.B.; Murphy, R.C. und Norris, D.A. Leukotrienes C4 and D4 as potent mitogens for cultured human neonatal melanocytes. *J Invest Dermatol*, 93:719–722, 1989.
- Muntau, A.; Beblo, S. und Koletzko, B. Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie. *Monatsschr Kinderheilkd*, 148:179–193, 2000.
- Murphy, R.C.; Hammarström, S. und Samuelsson, B. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76:4275–4279, 1979.
- Naughten, E.R.; Jenkins, J.; Francis, D.E. und Leonard, J.V. Outcome of maple syrup urine disease. *Arch Dis Child*, 57:918–921, 1982.

- Pelidis, M.A.; Carducci, M.A. und Simons, J.W. Cytotoxic effects of sodium phenylbutyrate on human neuroblastoma cell lines. *Int J Oncol*, 12:889–893, 1998.
- Pineau, T.; Hudgins, W.; Liu, L.; Chen, L.; Sher, T.; Gonzalez, F. und Samid, D. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor by the antitumor agent phenylacetate and its analogs. *Biochem Pharmacol*, 52:659–667, 1996.
- Preis, P.N.; Saya, H.; Nadasdi, L.; Hochhaus, G.; Levin, V. und Sadee, W. Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res*, 48:6530–6534, 1988.
- Riviello, J.J.; Rezvani, I.; DiGeorge, A.M. und Foley, C.M. Cerebral edema causing death in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr*, 119:42–45, 1991.
- Rousson, R. und Guibaud, P. Long term outcome of organic acidurias: survey of 105 French cases (1967-1983). *J Inherit Metab Dis*, 7 Suppl 1:10–12, 1984.
- le Roux, C.; Murphy, E.; Hallam, P.; Lilburn, M.; Orłowska, D. und Lee, P. Neuropsychometric outcome predictors for adults with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*, 29:201–202, 2006. doi:10.1007/s10545-006-0223-1.
- Rudolph, G.; Schilbach-Stückle, K.; Handgretinger, R.; Kaiser, P. und Hameister, H. Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Hum Genet*, 86:562–566, 1991.
- Sadler, T.W. *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag, 2003.
- Sala, A.; Voelkel, N.; Maclouf, J. und Murphy, R.C. Leukotriene E4 elimination and metabolism in normal human subjects. *J Biol Chem*, 265:21771–21778, 1990.
- Samid, D.; Wells, M.; Greene, M.; Shen, W.; Palmer, C. und Thibault, A. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  as a novel target in cancer therapy: binding and activation by an aromatic fatty acid with clinical antitumor activity. *Clin Cancer Res*, 6:933–941, 2000.
- Samuelsson, B.; Dahlen, S.E.; Lindgren, J.A.; Rouzer, C.A. und Serhan, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, 237:1171–1176, 1987.
- Schwab, M.; Alitalo, K.; Klempnauer, K.H.; Varmus, H.E.; Bishop, J.M.; Gilbert, F.; Brodeur, G.; Goldstein, M. und Trent, J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 305:245–248, 1983.
- Seeger, R.C.; Danon, Y.L.; Rayner, S.A. und Hoover, F. Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J Immunol*, 128:983–989, 1982.

- Seeger, R.C.; Rayner, S.A.; Banerjee, A.; Chung, H.; Laug, W.E.; Neustein, H.B. und Benedict, W.F. Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res*, 37:1364–1371, 1977.
- Shack, S.; Miller, A.; Liu, L.; Prasanna, P.; Thibault, A. und Samid, D. Vulnerability of multidrug-resistant tumor cells to the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *Clin Cancer Res*, 2:865–872, 1996.
- Snyderman, S.E. Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn*, 30:417–424, 1988.
- Snyderman, S.E.; Goldstein, F.; Sansaricq, C. und Norton, P.M. The relationship between the branched chain amino acids and their alpha-ketoacids in maple syrup urine disease. *Pediatr Res*, 18:851–853, 1984.
- Steinlin, M.; Blaser, S. und Boltshauser, E. Cerebellar involvement in metabolic disorders: a pattern-recognition approach. *Neuroradiology*, 40:347–354, 1998.
- Stenke, L.; Mansour, M.; Reizenstein, P. und Lindgren, J.A. Stimulation of human myelopoiesis by leukotrienes B4 and C4: interactions with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 81:352–356, 1993.
- Strauss, K.; Puffenberger, E.; Robinson, D. und Morton, D. Type I glutaric aciduria, part1: Natural history of 77 patients. *Am J Med Genet*, 121C:38–52, 2003.
- Tavares, R.G.; Santos, C.E.; Tasca, C.I.; Wajner, M.; Souza, D.O. und Dutra-Filho, C.S. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol Sci*, 181:44–49, 2000.
- Thiele, C. *Human Cell Culture*, Band I. Kluwer Academic Publishers, UK, 1998.
- Tumilowicz, J.J.; Nichols, W.W.; Cholon, J.J. und Greene, A.E. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res*, 30:2110–2118, 1970.
- Warrell, R.P.; He, L.Z.; Richon, V.; Calleja, E. und Pandolfi, P.P. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst*, 90:1621–1625, 1998.
- Weglage; Ullrich, K.; Pietsch, M.; Funders, B.; Güttler, F. und Harms, E. Intellectual, neurologic and neuropsychologic outcome in untreated subjects with nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia. German Collaborative Study on Phenylketonuria. *Pediatr Res*, 42:378–384, 1997.
- Welsch, U. *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer, 2003.
- Yamaguchi, S.; Orii, T.; Yasuda, K. und Kohno, Y. A case of glutaric aciduria type I with unique abnormalities in the cerebral CT findings. *Tohoku J Exp Med*, 151:293–299, 1987.

# Dankeschön

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher für die Überlassung des Themas dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für ein immer offenes Ohr.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Klaus Siebert und Frau Renate Gehrcke für die Einarbeitung und immer hilfreiche Unterstützung in der Zellkultur, es hat Spaß gemacht mit euch!

Bei Herrn Reinhard Müller bedanke ich mich für die Einarbeitung und Zusammenarbeit an „Alice“.

Auch dem Rest des Teams gebührt ein großer Dank für die entspannende Atmosphäre in aufregenden Zeiten.

Meiner Familie möchte ich für die immer währende Unterstützung danken, ihr gebt mir den Rückhalt, den ich brauche.

Christoph, ohne Dich stände das Ganze nicht Schwarz auf Weiß. Danke für die vielen Diskussionen, Formatierhilfen und Deine unendliche Geduld.

Dorothea

# Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln als Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.