

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik

**Wirkung des Opioids D,L-Methadon in kindlichen
soliden Tumoren**

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

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

**vorgelegt von
Raible, Ann-Sophie
2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Warmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Zender

Tag der Disputation: 02.12.2020

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Kindliche solide Tumoren	1
1.1.1 Das Rhabdomyosarkom.....	1
1.1.2 Maligne Rhabdoidtumoren	5
1.2 Medikamente.....	9
1.2.1 Das Anthrazyklin-Antibiotikum Doxorubicin	9
1.2.2 Das Opioid D,L-Methadon.....	11
1.2.3. Bisherige Beobachtungen zum Einsatz von D,L-Methadon und anderen μ - Opioidrezeptor-Agonisten im Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen	16
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	20
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2 Geräte.....	21
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.2 Substanzen.....	27
2.2.3 Zellviabilitäts-Assay	27
2.2.4 Durchflusszytometrie	29
2.2.5 Wound Healing Assay.....	34
2.2.6 Colony Forming Assay	35
2.2.7 Western Blot	36
2.2.8 Statistik	44
3 ERGEBNISSE	45
3.1 Veränderungen im Expressionsmuster des μ -Opioidrezeptors (OPRM1) bei Behandlung mit Doxorubicin in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	45
3.1.1 Basis-Expressionsprofil des μ -Opioidrezeptors (OPRM1) auf der Oberfläche von Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien.....	45

3.1.2 Analyse des Effektes von Doxorubicin auf die OPRM1-Expression in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	46
3.2 Zytotoxisches Potential von D,L-Methadon in An- und Abwesenheit von Doxorubicin in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien.....	48
3.2.1 Reduktion der Zellviabilität in Tumorzellen unter Behandlung mit D,L-Methadon und Doxorubicin	48
3.2.2 Apoptose-Induktion in Tumorzellen unter Behandlung von D,L-Methadon und Doxorubicin.....	51
3.3 Auswirkungen von D,L-Methadon und Doxorubicin auf Metastasierung und Koloniebildung in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	54
3.3.1 Inhibition von Zellproliferation und Migration unter Behandlung mit D,L-Methadon und Doxorubicin	54
3.3.2 Induktion des klonogenen Zelltods mit Verlust der Fähigkeit zur Reproduktion und Koloniebildung unter Behandlung mit D,L-Methadon	55
3.4 Molekulare pro-apoptotische Wirkmechanismen von D,L-Methadon allein sowie als Teil der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	57
3.4.1 Gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	58
3.4.2 Erhöhte intrazelluläre Doxorubicin-Wirkspiegel durch verbesserte Doxorubicin-Aufnahme und Reduktion des Doxorubicin-Effluxes in malignen Rhabdoidtumoren	61
3.4.3 Beeinflussung insuffizienter mitochondrialer Apoptose-Signalwege durch Behandlung mit D,L-Methadon	64
4 DISKUSSION.....	67
4.1 Zytotoxische Auswirkungen von D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien (Apoptose und Viabilität).....	68
4.2 Auswirkungen von D,L-Methadon auf Migration und Adhäsion in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien (Migration und CFA)	70
4.3 Wirkmechanismen der Kombinationsbehandlung Doxorubicin und Methadon ...	73
4.4 Klinische Relevanz von D,L-Methadon im Vergleich mit anderen μ -Opioidrezeptor-Agonisten im onkologischen Setting.....	79
4.5 Limitationen.....	81
4.6 Ausblick.....	82
5 ZUSAMMENFASSUNG	85
6 LITERATURVERZEICHNIS	87
7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	100
8 DANKSAGUNG	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekülstrukturen der 4 Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin und Idarubicin (modifiziert nach Simunek et al., 2009)	10
Abbildung 2: Die beiden Enantiomere des D,L-Methadon: das linksdrehende L-Methadon (A) und das rechtsdrehende D-Methadon (B) (modifiziert nach Bouquie et al., 2015).....	12
Abbildung 3: Darstellung des μ -Opioidrezeptors (hier MOR) mit Aktivierung verschiedener Signalwege (modifiziert nach Williams et al., 2013).....	14
Abbildung 4: Reduktion von Tetrazoliumbromid zu Formazan als Merkmal stoffwechselaktiver und vitaler Zellen (Stockert et al., 2012)	28
Abbildung 5: Aufbau der Blotting Kassette.....	41
Abbildung 6: Expressionsprofil des μ -Opioidrezeptors (OPRM1) in Zelllinien kindlicher solider Tumoren	45
Abbildung 7: Zeitabhängige Expression des μ -Opioidrezeptors OPRM1 in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien nach Doxorubicin-Behandlung	47
Abbildung 8: Signifikante Reduktion der Zellviabilität bei Behandlung mit D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	49
Abbildung 9: Auswirkungen von D,L-Methadon in Kombination mit Doxorubicin auf die Zellviabilität in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	50
Abbildung 10: Messung der Zellviabilität in gesunden Skelettmuskelzellen unter Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon.....	51
Abbildung 11: Auswirkungen von D,L-Methadon allein und in Kombination mit Doxorubicin auf die Apoptoserate in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien.....	53
Abbildung 12: Inhibition der Migration durch D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien.....	55
Abbildung 13: Induktion des klonogenen Zelltods mit verminderter Bildung neuer Kolonien bei Behandlung mit D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	57
Abbildung 14: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter Behandlung mit D,L-Methadon in An- und Abwesenheit von Doxorubicin mit konsekutiv erhöhtem oxidativem zellulärem Stress	59
Abbildung 15: Auswirkungen von D,L-Methadon auf den Doxorubicin-Efflux in der Rhabdoid-Zelllinie A204 und den Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH30	62
Abbildung 16: Auswirkungen von D,L-Methadon auf den Doxorubicin-Influx in der Rhabdoid-Zelllinie A204 und den Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH30	63
Abbildung 17: Expressionsanalysen der zwei Bcl-2 Proteine Bcl-xL (anti-apoptotisch) und Bax (pro-apoptotisch) zur Untersuchung intrinsischer Apoptose-Signalwege unter Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon.....	65
Abbildung 18: Auswirkungen von Doxorubicin und D,L-Methadon auf RMS- und MRT-Zellen .	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuche mit dazugehörigen Zellzahlen	26
Tabelle 2: Ansatz für zwei 4%ige Sammelgele (6ml).....	40
Tabelle 3: Ansatz für zwei Trenngele (20ml).....	40
Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper	43

Abkürzungsverzeichnis

ABC Transporter	ATP binding cassette - Transporter
AC	Adenylatzyklase
APAF-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APC	Allophycocyanin
aRMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
AT/RT	atypisch teratoid/rhabdoide Tumoren
Bax	bcl-2-associated X protein
Bcl-2	b-cell lymphoma 2
Bcl-xL	b-cell lymphoma-extra large
bidest.	bidestilliert
BSA	Bovine Serum Albumin +- Albumine Fraktion V
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD99	cluster of differentiation 99
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
CFA	colony forming assay
CT	Computertomographie
d. F.	der Fälle
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
DCFDA	2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat
Doxo	Doxorubicin
ERK 1/2	extracellular signal regulated kinases 1 and 2
eRMS	embryonales Rhabdomyosarkom
ERRT	extrarenale Rhabdoidtumoren
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calv serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	forward side scatter
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H ₂ O	Wasser
HRP	horseradish peroxidase
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IGF-2	insulin-like growth factor 2
JNK 1-3	c-Jun N-terminal kinase
Kir3	inwardly rectifying K ⁺ channel 3
KM	Kontrastmittel
MAP	mitogen activated protein
MDR1	multi drug resistance 1

min	Minuten
Mio.	Million
MP	Milchpulver
MRT	Magnetresonanztomographie
MRT	maligner Rhabdoidtumor
MRTK	malignant rhabdoid tumor of the kidney
MyoD1	myogenic differentiation 1
NRAS	neuroblastoma rat sarkoma
NSCLC	non-small cell lung cancer
NSE	Neuron-spezifische Anolase
p38	Protein 38
p53	Protein 53
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PDE	Phosphodiesterase-Inhibitor
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PKA	Proteinkinase A
PLD2	Phospholipase D2
PS	Phosphatidylserin
RB	Retinoblastom-Protein
RMS	Rhabdomyosarkom
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCLC	small cell lung cancer
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SLC22A16	solute carrier family 22 member 16
SPRY1	protein sprouty homolog 1
SSC	sideward light scatter
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

1 EINLEITUNG

1.1 Kindliche solide Tumoren

1.1.1 Das Rhabdomyosarkom

1.1.1.1 Epidemiologie und Einteilung

Weichteilsarkome sind nach ZNS-Tumoren, Lymphomen und Neuroblastomen die vierthäufigsten soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter. Mit einer Prävalenz von 61 % aller Weichteilsarkome ist das hochmaligne Rhabdomyosarkom (RMS) der wichtigste Vertreter aus dieser Gruppe und stellt insgesamt 7 % aller malignen, pädiatrischen Tumorerkrankungen dar (Mertens et al., 2009). Die Inzidenz von Rhabdomyosarkomen beträgt insgesamt 4.5 pro 1 Mio. bei < 20-Jährigen, wobei die Erkrankung in 50 % d. F. innerhalb der ersten 10 Lebensjahre auftritt (Ognjanovic et al., 2009). Die Inzidenz ist bei Kleinkindern (1-4 Jahre) am höchsten und fällt dann stetig ab, bis sie im Lebensalter von 15-19 Jahren ein relativ konstantes Level erreicht hat und schließlich im Erwachsenenalter nur noch äußerst selten auftritt (McDowell, 2003, Ognjanovic et al., 2009, Egas-Bejar and Huh, 2014). Das Rhabdomyosarkom ist mit circa 40 % am häufigsten in der Kopf- und Halsregion lokalisiert, vorwiegend parameningeal (16 %) und in der Orbita (9 %). In 24 % der Fälle entsteht der Primärtumor im Urogenitaltrakt, zu 19 % an den Extremitäten und bei den restlichen 22 % befindet sich der Tumor in anderen nicht näher definierten Körperregionen (Radzikowska et al., 2015, Maurer et al., 1988, Maurer et al., 1993, Crist et al., 1995).

Rhabdomyosarkome werden in unterschiedliche RMS-Subtypen eingeteilt, die sich über verschiedene histologische Charakteristika definieren (siehe Kapitel 1.1.1.2) und bzgl. Inzidenz, Erkrankungsalter, sowie klinischem Verlauf erheblich variieren: Während das weitaus häufigere embryonale RMS (eRMS) besonders Jungen betrifft (Verhältnis männlich : weiblich = 1.5 : 1) und mit einem Erkrankungsgipfel im Kleinkindalter auftritt, betrifft das alveoläre RMS (aRMS) gleichermaßen Jungen und Mädchen und tritt im gesamten Kindes- und

Jugendalter mit einer konstanten Inzidenz von 1 pro 1 Mio. auf (Ognjanovic et al., 2009).

Das embryonale und alveoläre Rhabdomyosarkom sind die klassischen, dominierenden Subtypen in der Pädiatrie, während Rhabdomyosarkome des erwachsenen Patienten sich meist als pleomorphe RMS-Variante darstellen.

1.1.1.2 Histologische Charakteristika und genetisches Profil

Die beiden pädiatrischen Subtypen, das embryonale und das alveoläre Rhabdomyosarkom, unterscheiden sich sowohl histologisch als auch hinsichtlich ihres genetischen Profils erheblich. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Charakteristika des embryonalen und des alveolären Rhabdomyosarkoms kurz erläutert.

Histologisch zeichnet sich das embryonale RMS durch kleine, runde, spindelförmig ausgezogene Zellen aus, die je nach Differenzierungsgrad in ihrem Wachstumsmuster eine Querstreifung aufweisen können. Beim alveolären RMS dominieren dichte, in Nestern wachsende Tumorzellen, die durch bindegewebige Septen abgegrenzt sind und somit Hohlräume (Pseudoalveolen) zwischen den Zellnestern entstehen.

Auf genetischer Ebene ist das embryonale RMS primär durch einen Allelverlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p15.5) charakterisiert (Xia et al., 2002). Die Region beinhaltet eine große Anzahl an Genen, die genomischer Prägung unterliegen und die bei epigenetischen Modifikationen mit veränderten Expressionsmustern reagieren. So geht man mittlerweile davon aus, dass nicht nur der Verlust der Heterozygotie (LOH = loss of heterozygosity) sondern auch LOI (= loss of imprinting) eine Rolle in der Onkogenese spielt (Anderson et al., 1999). Einige der Gene kodieren für zentrale, regulatorische Proteine des Zellzyklus und des Zellwachstums, wie z.B. das väterlich exprimierte IGF-2 (insulin-like growth factor 2) und der mütterlich exprimierte Kinase-Inhibitor CDKN1C (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C), sodass eine Dysregulation der Genexpression in dieser Region mit gesteigertem Wachstum und Tumor-

Prädispositions-Syndromen (z.B. Beckwith-Wiedemann-Syndrom) in Zusammenhang gebracht wird (Anderson et al., 1999, Smith et al., 2007).

Das alveoläre RMS ist klassischerweise mit einer reziproken Translokation assoziiert, die in circa 70 % der aRMS-Fälle als $t(2;13)(q35;q14)$ unter Beteiligung von Chromosom 2 und 13 auftritt und das Fusionsgen PAX3-FOXO1 bildet (PAX3: Chr. 2; FOXO1: Chr. 13). In 10-15% der Fälle findet die Translokation zwischen Chromosom 1 und 13 als $t(1;13)(p36;q14)$ statt. Dabei entsteht als Fusionsprodukt PAX7-FOXO1 (PAX7: Chr. 1; FOXO1: Chr. 13) (Gallego Melcon and Sanchez de Toledo Codina, 2007). Allerdings finden sich in eRMS ebenso wie in aRMS nicht nur die genannten, spezifischen Mutationen, sondern weitere genetische Veränderungen, welche übliche Zielproteine wie z.B. p53 (Protein 53) und Retinoblastom-Protein (RB) betreffen und deren nachgeschaltete Signalwege beeinflussen (Xia et al., 2002).

Die überwiegende Mehrheit der RMS tritt sporadisch auf, in circa 10-20 % haben die Kinder jedoch eine familiäre Prädisposition in Form eines Tumorsyndroms (Egas-Bejar and Huh, 2014, Radzikowska et al., 2015). Eine Assoziation zu Tumorsyndromen zeigte sich bisher bei Neurofibromatose Typ 1 (Sung et al., 2004), beim Li-Fraumeni Syndrom (Li and Fraumeni, 1969), dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (Steenman et al., 2000), dem Costello Syndrom (Hennekam, 2003), dem Rubinstein-Taybi Syndrom (Milani et al., 2015), dem Noonan Syndrom (Jongmans et al., 2010) und dem Gorlin-Goltz Syndrom (Ganguly et al., 2015).

1.1.1.3 Klinische Aspekte: Symptome, Diagnostik, Therapie und Prognose

Das Rhabdomyosarkom wird meist durch eine schmerzlose Schwellung klinisch apparent und kann je nach Lokalisation mit weiteren Symptomen einhergehen, die allerdings sehr unspezifisch sind. Hierzu gehören z.B. Hämaturie und Pollakisurie bei Manifestation im Urogenitaltrakt, Exophthalmus und Ophthalmoplegie bei Sitz in der Orbita oder eine Obstruktion der Sinus, des Gehörkanals oder der Nasenräume bei parameningealer Ausbreitung (Hayes-Jordan and Andrassy, 2009).

Zur Diagnostik gehört ein apparatives Tumorstaging mithilfe KM-MRT/CT (Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie/Computertomographie), Skelettszintigraphie und PET-MRT/CT (PET= Positronenemissionstomographie), sowie weitere Untersuchungen, abhängig von Tumorlokalisation, wie z.B. Liquorpunktion bei parameningealen Tumoren oder Knochenmarkbiopsie bei G3 Sarkomen. Die histopathologische Diagnose wird durch die Beurteilung der Zellmorphologie sowie über die Existenz bestimmter zellulärer Markerproteine unter Zuhilfenahme verschiedenster immunhistochemischer Färbungen gestellt (z.B. Myogenin, MyoD1 (myogenic differentiation 1), Desmin, Vimentin, Myoglobin, Aktin, NSE (Neuron-spezifische Anolase), CD99-Antigen (cluster of differentiation 99), S-100) (Cullinane, 2003).

Um eine ausreichende lokale und systemische Kontrolle zu gewährleisten kommt neben der Resektion des Tumors zusätzlich Chemotherapie und Radiotherapie zum Einsatz. Sofern eine primäre Tumorsektion möglich ist, wird diese vorgenommen und im Anschluss daran, bzw. bei Inoperabilität direkt, mit einer Chemotherapie begonnen. An dieser Stelle kommen Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin), Alkylanzien (Cyclophosphamid, Ifosfamid), Vincaalkaloide (Vincristin) und Actinomycine (Dactinomycin) in Frage. Bei schlechtem Therapieansprechen können auch Etoposid und Platin-Derivate eingesetzt werden. Strahlentherapie spielt je nach Lokalisation und Resektionsausmaß des Primärtumors eine mehr oder weniger große Rolle: Bei Patienten mit einer primär vollständigen R0 Resektion bei embryonalem RMS wird grundsätzlich keine Strahlentherapie eingesetzt, bei allen anderen Patienten mit RMS ist eine Strahlentherapie indiziert. Bei sehr jungen Patienten wird letztlich immer individuell abgewogen, wie sinnvoll und notwendig die Radiotherapie tatsächlich ist und ob sie die Risiken und Nebenwirkungen, die mit der Therapie einhergehen, rechtfertigt. Sitzt der Tumor parameningeal oder in der Orbita, muss er in jedem Fall bestrahlt werden, da hier die Gefahr einer meningealen Ausbreitung besteht, bzw. der Tumor chirurgisch schwer zu erreichen ist (Leitlinienprogramm der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2017).

Die Prognose beim Rhabdomyosarkom hängt im Wesentlichen vom histologischen Subtyp sowie dem Ausbreitungsstadium des Tumors ab.

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit alveolärem Rhabdomyosarkom liegt aktuell bei ca. 30 %, wohingegen Patienten mit embryonalem Rhabdomyosarkom eine 5-Jahres-Überlebensrate von > 70 % aufweisen (Amer et al., 2019). Insbesondere Patienten mit botryoidem Subtyp eines eRMS haben sehr gute Heilungschancen mit Überlebensraten von bis zu 95 % (Gruessner et al., 2004).

Allgemein ist bei Kindern mit lokalisierter Tumorerkrankung eine vollständige Heilung der Erkrankung mittlerweile kein unrealistisches Ziel mehr, wohingegen die Prognose für Patienten mit metastasiertem Tumorleiden weiterhin ungünstig bleibt (Walterhouse and Watson, 2007).

1.1.2 Maligne Rhabdoidtumoren

1.1.2.1 Epidemiologie und Einteilung

Maligne Rhabdoidtumoren (MRT) stellen eine seltene, äußerst aggressive Tumorentität dar, die typischerweise im Säuglings- und Kleinkindalter auftritt.

Maligne Rhabdoidtumoren können an den verschiedensten Stellen im Körper auftreten und stellen bei Raumforderungen des Gehirns und Rückenmarks, der Nieren, Leber und Weichteilgewebe (typischerweise an Hals, Oberschenkel und Thorax) im Säuglings- bis Schulkindalter eine wichtige Differentialdiagnose dar. Gemäß ihrer Lokalisation werden maligne Rhabdoidtumoren in drei Gruppen unterteilt:

1. Rhabdoidtumoren des ZNS (atypisch teratoid/rhabdoide Tumoren = AT/RT), die bei Kindern ≤ 2 Jahre als häufigste maligne Tumorerkrankung des zentralen Nervensystems auftreten (Woehrer et al., 2010)
2. Rhabdoidtumoren der Niere (malignant rhabdoid tumor of the kidney = MRTK), die mit einer Prävalenz von 2 % aller pädiatrischen Nierentumoren ebenfalls mit Erkrankungsgipfel im frühen Säuglingsalter auftreten (Lowe et al., 2000)

3. Rhabdoidtumoren der Weichteile und der Leber (extrarenal rhabdoid tumor = ERRT)

Der erste als Rhabdoid klassifizierte Tumor, der zur Aufführung der neuen Tumorentität „maligner Rhabdoidtumor“ führte, befand sich in der Niere. Beckwith und Palmer veröffentlichten 1978 die Daten einer Studie zur Histopathologie und Prognose von Wilms Tumoren und beschrieben in diesem Zusammenhang einen Subtyp, der sich durch eine sehr hohe Malignität und Aggressivität auszeichnete und morphologisch Tumoren mit rhabdomyoblastischer Differenzierung ähnelte (Beckwith and Palmer, 1978). Haas et al. identifizierte diese spezielle Art der Nierentumoren, welche zuvor jahrelang als außergewöhnlich aggressive Wilms-Tumoren fehldiagnostiziert worden waren, schließlich als eigene, zuvor noch nicht beschriebene Tumorentität und gab diesen Nierentumoren die Bezeichnung „maligner Rhabdoidtumor der Niere“ (MRTK) (Haas et al., 1981). Im Verlauf zeigte sich, dass maligne Rhabdoidtumoren auch extrarenal in Leber, Thymus und Weichteilgewebe auftreten und 1987 wurde schließlich der erste intrakranielle ZNS Rhabdoidtumor diagnostiziert (Biggs et al., 1987).

Im ersten Lebensjahr beträgt die Inzidenz von Rhabdoidtumoren 5 pro 1 Mio. und nimmt mit zunehmendem Alter ab. Man nimmt jedoch an, dass die Inzidenz in Realität aufgrund von Fehldiagnosen etwas höher ist (Ahmed et al., 2007, Rickert and Paulus, 2001, Vujanic et al., 1996). Das in 48 % der Fälle und somit am häufigsten betroffene Organ ist die Niere, gefolgt von Kopf/Hals-Region/ZNS mit 14 % und der Leber mit 13 %. Die übrigen 25 % der Rhabdoidtumoren verteilen sich auf Körperstamm und obere Extremität (Brennan et al., 2013).

1.1.2.2 Histologische Charakteristika und genetisches Profil

Als embryonale Tumoren entstehen MRT-Tumorzellen während der Organ- und Gewebereifung (Sredni et al., 2017). Der Tumor zeichnet sich durch ein einheitliches Wachstumsmuster mit großen, polygonalen Zellen und klaren Zellgrenzen aus. Die Zellen besitzen ein homogenes, feingranuläres Zytoplasma mit eosinophilen Einschlusskörperchen und einen randständigen Kern mit großem Nukleolus.

In Untersuchungen zum genetischen Profil wurden 1998 erstmals inaktivierende, spezifische (und beide Allele betreffende) Mutationen im SMARCB1-Gen auf Chromosom 22 q11.23 gefunden (Biegel et al., 1999, Versteeg et al., 1998, Kalimuthu and Chetty, 2016). Im Verlauf zeigte sich, dass maligne Rhabdoidtumoren fast durchgehend die SMARCB1-Mutationen (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 = SMARCB1) aufzeigen und diese Genmutationen somit unabhängig von der Tumorlokalisation ein definierendes Charakteristikum darstellen (Frühwald, 2015). Außerdem stellte sich heraus, dass heterozygote Keimbahnmutationen in SMARCB1 die Grundlage des hereditären Rhabdoid-Prädispositions-Syndroms sind, das sich in circa 30 % der Fälle nachweisen lässt (Biegel et al., 1999, Sevenet et al., 1999). Bei circa 70 % findet sich jedoch keine genetische Prädisposition, sodass der Tumor in der überwiegenden Mehrheit sporadisch durch somatisch erworbene, biallelische Inaktivierung von SMARCB1 auftritt (Eaton et al., 2011). Das Tumorsuppressorgen kodiert für das gleichnamige Protein SMARCB1 (auch INI 1), welches eine der insgesamt 10-15 Untereinheiten des Chromatin Remodelling Komplexes SWI/SNF bildet (Kim and Roberts, 2014). SWI/SNF ist ein Multiproteinkomplex, der ATP-abhängig Histon-DNA-Bindungen destabilisieren kann und so den Kondensationszustand der DNA beeinflusst und die Expression bestimmter Gene steuert. Mit SMARCB1 Mutationen in annähernd 100 % aller maligner Rhabdoidtumoren (Biegel et al., 2002) und der damit einhergehenden konstitutiven Aktivierung verschiedenster Signalwege, die u.a. zelluläres Wachstum und Differenzierung betreffen, wird eine schnelle Entstehung äußerst aggressiver Tumoren ermöglicht (Kim and Roberts, 2014).

1.1.2.3 Klinische Aspekte: Symptome, Diagnostik, Therapie und Prognose

Die Beschwerden, die bei Kindern mit Rhabdoidtumoren auftreten und zur Diagnose führen, sind abhängig vom Ort der Manifestation und insgesamt sehr unspezifisch. Säuglinge und Kleinkinder mit AT/RT präsentieren sich oftmals mit Lethargie, Übelkeit und morgendlichem Erbrechen, Kopfschmerzen, Fieber, plötzlich auftretenden Paresen und Gedeihstörungen.

Klassische Beschwerden bei Kindern mit malignem Rhabdoidtumor der Niere sind ein ausladendes, vorgewölbtes Abdomen sowie Hämaturie und Pollakisurie. Seltener kann sich auch eine schmerzlose Schwellung der Weichteilgewebe als Rhabdoidtumor herausstellen.

Diagnostisch stehen zunächst eine hochauflösende Schnittbildgebung mit Kontrastmittel (KM-MRT/CT), Skelettszintigraphie und PET-MRT/CT zum Tumorstaging und je nach Tumorlokalisierung entsprechend weitere Untersuchungen (z.B. Liquordiagnostik, Knochenmarkbiopsie) im Vordergrund. Anschließend können histologische Untersuchungen des Resektats bzw. von Biopsiematerial zur feingeweblichen Beurteilung, ebenso wie genetische Analysen zur endgültigen Diagnosestellung notwendig sein. Mittels Immunhistochemie kann ein Verlust des Tumorsuppressorproteins INI 1 nachgewiesen werden, während sich in genetischen Analysen die Mutation im entsprechenden Gen SMARCB1 nachweisen lässt (Hoot et al., 2004).

Lange Zeit existierten keine standardisierten und fest etablierten Behandlungskonzepte für maligne Rhabdoidtumoren und es gibt bis heute nur wenige Studien zur Therapieoptimierung oder Untersuchungen zu neuen Therapieansätzen (Brennan et al., 2013). Allerdings gibt es seit 2007 ein einheitliches Konzept zur Behandlung maligner Rhabdoidtumoren jeglicher Lokalisation, da sich in Zellkulturexperimenten und in einzelnen Fallbeschreibungen einige Chemotherapeutika als besonders effektiv erwiesen haben: Hierzu zählen v.a. die Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin), Alkylantien (Cyclophosphamid, Ifosfamid), Vincaalkaloide (Vincristin, Vinorelbine) und Topoisomerase-Inhibitoren (Etoposid, Topotecan, Irinotecan) (Frühwald and Graf, 2006).

Leichte Abweichungen in den Therapiekonzepten finden sich jedoch trotzdem: Die Schwierigkeit bei malignen Rhabdoidtumoren im Kopf/Hals Bereich besteht beispielsweise darin, dass der Einsatz von Radiotherapie in diesem Bereich generell erst ab einem Alter von drei Jahren möglich ist, bedingt durch die hohe Strahlenempfindlichkeit des Gehirns von Kindern unter drei Jahren, sodass die Nebenwirkungen - insbesondere die Spätschäden - einer Bestrahlung zu stark

wären. Die momentan erfolgreichste Therapiestrategie wurde 2008 von Chi et al. veröffentlicht und stellt eine multimodale Therapie dar, die Chirurgie, Radio- und Chemotherapie beinhaltet und bei Kindern mit AT/RT angewendet und im Verlauf evaluiert wurde (Chi et al., 2009). Hierbei erhalten die Kinder initial - neben einer zeitnahen, möglichst radikalen Resektion des Tumors - eine Hochdosis-Chemotherapie (intravenös und intrathekal) auf Basis von Anthrazyklinen, die aufgrund der gestörten Blut-Hirn-Schranke von Tumorzellen, trotz normalerweise schlechter ZNS-Gängigkeit, an den Tumor gelangen. Außerdem erfolgt je nach Alter eine frühe Radiotherapie zur lokalen Tumorkontrolle und später eine Erhaltungstherapie mit Temozolomid und Actinomycin-D. Hierunter zeigte sich ein 2-Jahres-Überleben von $70 \pm 10 \%$ bzw. ein ereignisfreies Überleben (event-free-survival) von $53 \pm 13 \%$ (Chi et al., 2009).

Die größten Hindernisse in der Behandlung von Kindern mit einem malignen Rhabdoidtumor sind das frühe Erkrankungsalter, eingeschränkte Resektionsmöglichkeiten bzw. Inoperabilität aufgrund von ungünstiger Tumorlokalisierung, sowie Metastasen (bei renalen und extrarenalen MRT in 40 % d. F., bei AT/RT in bis zu 20 % d.F.) (Frühwald and Graf, 2006).

Trotz maximal aggressiver Therapie ist die Prognose besonders bei Vorliegen von den genannten Risikofaktoren äußerst ungünstig, das 5-Jahres Überleben von Kindern mit malignem Rhabdoidtumor liegt bei $33 \pm 3.4 \%$ (Sultan et al., 2010).

1.2 Medikamente

1.2.1 Das Anthrazyklin-Antibiotikum Doxorubicin

1.2.1.1 Struktureller Aufbau und Bedeutung im klinischen Alltag

Einer der Haupterfolge in der Behandlung onkologischer Erkrankungen war die Einführung der Anthrazyklin-Antibiotika. Es handelt sich dabei um eine Gruppe antineoplastisch wirksamer Verbindungen, die aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* gewonnen werden und zu deren Hauptvertreter Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin und Idarubicin zählen.

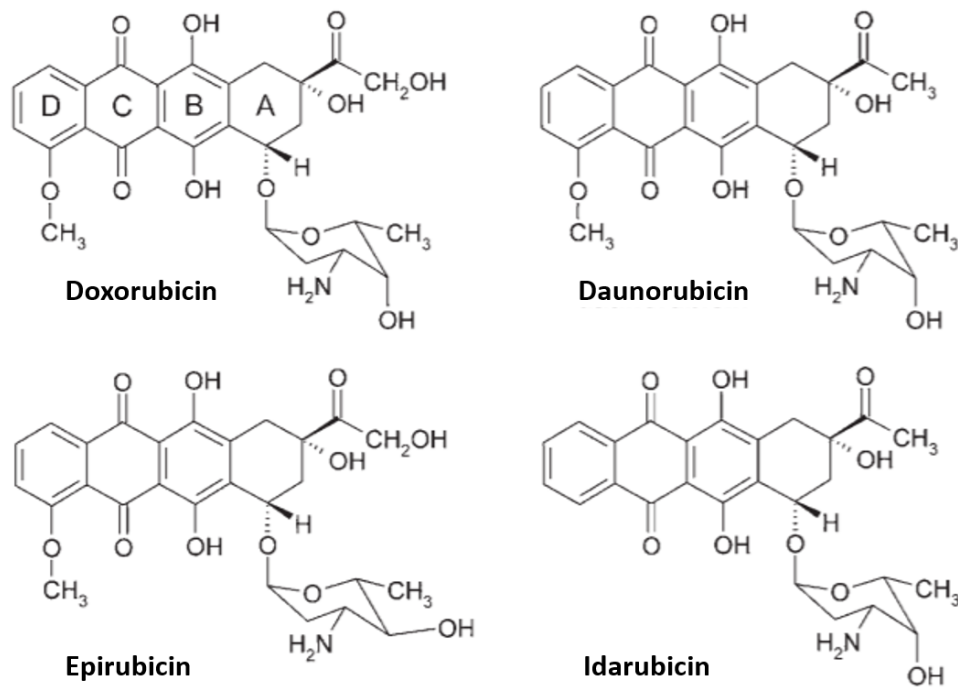


Abbildung 1: Molekülstrukturen der 4 Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin und Idarubicin (modifiziert nach Simunek et al., 2009)

Die Anthrazykline weisen allgemein ein außergewöhnlich breites Wirkspektrum auf, nur wenige Tumorentitäten (z.B. Kolon-Karzinom) sprechen nicht auf eine Anthrazyklin-Therapie an (Weiss, 1992). Zur ersten Generation der Anthrazykline, die in den 1960er Jahren entwickelt wurden, zählen Daunorubicin und Doxorubicin, welche sich strukturell nur durch eine einzelne Hydroxylgruppe unterscheiden. Während Daunorubicin hauptsächlich in der Therapie der akuten lymphatischen und myeloischen Leukämie gute Effekte zeigt, weist Doxorubicin ein breiteres Wirkspektrum auf und wird sowohl bei soliden Tumoren des Erwachsenenalters (z.B. Mammakarzinom, Weichteiltumoren, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom, Harnblasenkarzinom, Ewing-Sarkom, Endometriumkarzinom) und des Kindesalters (z.B. Rhabdomyosarkom, maligner Rhabdoidtumor, Wilms Tumor, Neuroblastom), als auch bei verschiedenen Leukämien (z.B. Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen) eingesetzt (Fachinformation: DOXO-cell®, Kufe et al., 2003). Besonders in der pädiatrischen Onkologie konnte die 5-Jahres-Überlebensrate von 30 % in den 1960ern auf heutzutage 70-80 % angehoben werden. 50 % dieser Kinder wurden

dabei mit Anthrazyklinen behandelt (Gatta et al., 2002, Jemal et al., 2006, Krischer et al., 1997).

1.2.1.2 Pharmakologie: Zytotoxizität unter Doxorubicin

Obwohl Anthrazykline seit mittlerweile 40 Jahren großflächig im klinischen Alltag eingesetzt werden, sind die molekularen Wirkmechanismen noch nicht in allen Aspekten vollständig bekannt. Es sind mehrere Mechanismen beschrieben und untersucht, die die zytotoxischen Effekte von Anthrazyklinen auf Tumorzellen erklären. Man geht davon aus, dass die wichtigste Zielstruktur von Doxorubicin die Topoisomerase II ist (Binaschi et al., 2001). Hierbei bindet und spaltet Doxorubicin das Enzym und verursacht eine Inhibition der Replikation und Proteinbiosynthese, insbesondere in schnell-proliferierendem Gewebe. Weitere Wirkmechanismen sind die Interkalation zwischen Basenpaaren der DNA, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit konsekutiver Einleitung apoptotischer Signalwege, sowie die Beeinflussung der zytoskelettalen Stabilität über die Reorganisation von Aktin (Finn et al., 2011, Gewirtz, 1999, Lee et al., 2017).

Doxorubicin vereint verschiedenste zytotoxische Wirkmechanismen, was einerseits die hohe Effizienz des Medikaments erklärt, gleichzeitig aber auch das ungünstige Nebenwirkungsprofil bedingt. Patienten leiden u.a. unter Knochenmarkdepression mit Blutbildveränderungen, Übelkeit und Erbrechen, Exanthemen, Alopezie und Kardiomyopathie (Fachinformation: DOXO-cell®).

1.2.2 Das Opioid D,L-Methadon

1.2.2.1 Struktureller Aufbau und Bedeutung im klinischen Alltag

Methadon ist ein hochpotentes, vollsynthetisch hergestelltes Opioid-Analgetikum. Die Chiralität der Moleküle bedingt, dass Methadon als Racemat aus den beiden Enantiomere Levomethadon (L-Methadon) und Dextromethadon (D-Methadon) in äquimolarer Mischung vorliegt. In Untersuchungen mit Patientenblut und Speichelproben konnte allerdings gezeigt werden, dass es im

Körper zu einer Verschiebung der Komponenten mit wesentlich höheren Spiegeln an D-Methadon kommt (George et al., 2016).

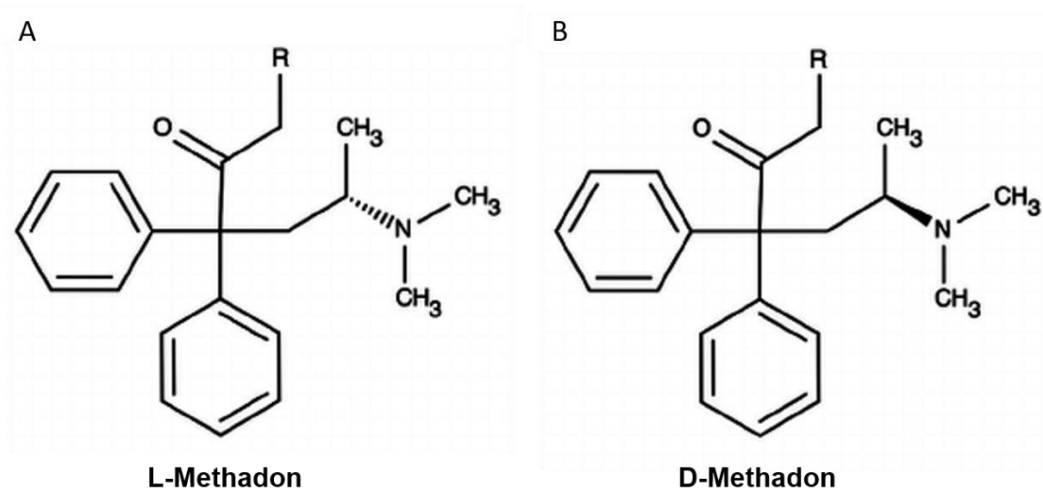


Abbildung 2: Die beiden Enantiomere des D,L-Methadon: das linksdrehende L-Methadon (A) und das rechtsdrehende D-Methadon (B) (modifiziert nach Bouquie et al., 2015)

Nach jahrzehntelanger Forschung wurde D,L-Methadon erstmals 1937 von Gustav Ehrhart und Max Bockmühl, zweier Mitarbeiter des Chemie- und Pharmaunternehmens I.G. Farbenindustrie AG, in Deutschland entwickelt. Im Jahr 1947 gelangte das Medikament zunächst als starkes Analgetikum durch den amerikanischen Konzern Eli Lilly auf den pharmazeutischen Markt. Seit den 1960er Jahren wird es auch in der Behandlung von heroinabhängigen Patienten eingesetzt. In der jüngeren Vergangenheit wird Methadon auch als Analgetikum bei onkologischen Patienten, aber auch bei verschiedensten anderen Grunderkrankungen, im Falle von schwer beherrschbaren Schmerzzuständen, eingesetzt (George et al., 2016).

D,L-Methadon zählt zu den starken Opioiden und wird gemäß WHO Stufenschema als Stufe-III-Opioid der ersten oder späteren Wahl verwendet (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2017, Leitlinienprogramm Schmerzmedizin (Deutsche Schmerzgesellschaft, 2015). In der Psychiatrie wird Methadon als Substitutionspräparat in der Behandlung heroinabhängiger Patienten zur Reduktion körperlicher Entzugserscheinungen eingesetzt (Leitlinienprogramm Psychiatrie (Bayerische Akademie für Sucht- und

Gesundheitsfragen), 2010). Allerdings ist der Einsatz von Methadon im klinischen Alltag aufgrund des sehr schmalen therapeutischen Fensters und starker inter- und intraindividuelle Unterschiede bzgl. des Therapieansprechens häufig schwierig und erfordert einige Erfahrung (George et al., 2016). Methadon hat eine äußerst lange und schwer vorhersehbare Halbwertszeit, was eine sorgfältige, zeitintensive DosisEinstellung erfordert (Nauck et al., 2001). Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen unter Methadon-Behandlung können eine allgemeine Beeinträchtigung der psychomotorischen und kognitiven Funktionen, Atemdepression bei fehlender Toleranzentwicklung, QT-Zeit Verlängerung, Obstipation, Schlafstörungen und eine eingeschränkte Libido und Potenz auftreten (Leitlinienprogramm Psychiatrie (Bayerische Akademie für Sucht- und Gesundheitsfragen), 2010).

1.2.2.2 Pharmakologie: Agonismus am μ -Opioidrezeptor

Opioidrezeptoren umfassen eine Gruppe membrangebundener, G-Proteingekoppelter Rezeptoren (GPCR), die intrazellulär an eine $G\alpha_{i/o}$ - und eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit gebunden sind und hierüber bei Aktivierung entsprechende Signale in die Zelle weiterleiten. Es werden vier verschiedene Rezeptorklassen unterschieden: μ -, κ - und δ -Opioidrezeptoren, sowie Opioid Receptor like-1 (ORL1) (Al-Hasani and Bruchas, 2011). Der μ -Opioidrezeptor wird insbesondere im Zentralnervensystem, aber auch in den Spinalganglien und in peripheren Geweben wie in Pankreas, Dünndarm, Hoden, Schilddrüse und den Nebennieren exprimiert (Peng et al., 2012).

Außerdem findet sich der Rezeptor auf der Oberfläche von Immunzellen und Tumorzellen (Bohn et al., 1998, Brar and Lowry, 1999, Chatikhine et al., 1994, Maneckjee et al., 1990, Nylund et al., 2008, Roth and Barchas, 1986). D,L-Methadon bindet hochaffin und stereotypisch am μ -Opioidrezeptor (OPRM1), wobei L-Methadon mit wesentlich höherer Potenz ($16.5 \times \uparrow$) als D-Methadon bindet (Matsui and Williams, 2010). Bei Bindung eines Vollagonisten, wie z.B. D,L-Methadon, wird GDP, das im inaktiven Zustand an die $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit gebunden ist, durch GTP ersetzt, was zur Dissoziation der $G\alpha_{i/o}$ - und $G\beta\gamma$ -

Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins führt. Anschließend kommt es zur Aktivierung mehrerer Signalwege, die in Abb. 3 dargestellt sind.

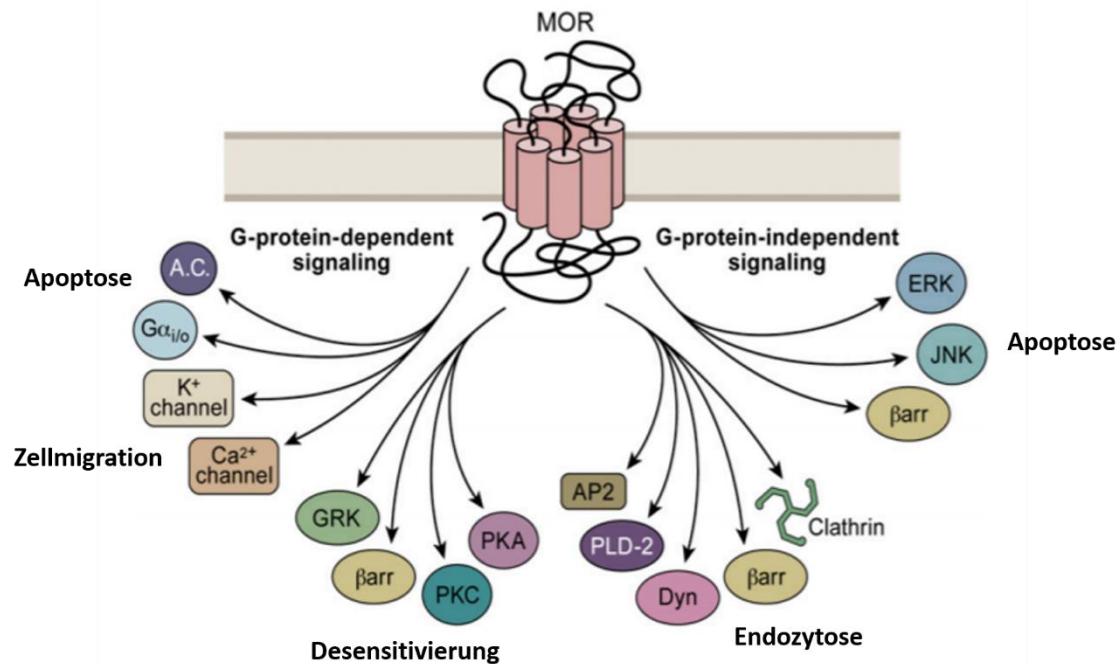


Abbildung 3: Darstellung des μ -Opioidrezeptors (hier MOR) mit Aktivierung verschiedener Signalwege (modifiziert nach Williams et al., 2013)

Im Rahmen einer Aktivierung des OPRM1 durch D,L-Methadon spielen v.a. die im Folgenden aufgeführten Signalwege eine wichtige Rolle.

Zunächst kommt es durch die GTP-Gα_{i/o}-Untereinheit zur Inhibition der Adenylatzyklase (AC). Das membrangebundene Enzym setzt im aktiven Zustand ATP (Adenosintriphosphat) zu cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) um, folglich kommt es bei Enzyminhibition zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel mit entsprechenden Auswirkungen in den nachgeschalteten Signalwegen. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist u.a. der Einfluss niedriger cAMP-Spiegel auf die mitochondrialen Apoptose-Signalwege. Der intrinsische Signalweg ist durch einen Ausstrom von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum mit anschließender Bindung an APAF-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) gekennzeichnet. APAF-1 erfährt hierdurch eine Konformationsänderung mit Freigabe der Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne), die als Bindungsstelle für die Procaspase 9 dient. Der vorliegende Komplex wird als Apoptosom bezeichnet

und ist essentiell für die Initiierung der Caspasen-Signalkaskade über Caspase 9 und Caspase 3. Die durch cAMP stimulierte Proteinkinase A (PKA) inhibiert die Assoziation von Procaspase 9 und APAF-1 und unterdrückt damit die Bildung des Apoptosoms (Martin et al., 2005). Hohe cAMP-Spiegel mit aktiver PKA wirken somit protektiv vor Apoptose.

Des Weiteren kommt es zu Interaktionen mit Ionenkanälen und einer damit einhergehenden Modulation des transmembranären Potentials. Insbesondere die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aber auch die G_{α_i} -Untereinheit interagiert mit dem einwärtsgerichteten Kalium-Kanal Kir3 (inwardly rectifying K^+ channel 3). Der G-Protein-gekoppelte- $K^{(+)}$ -Kanal bindet selektiv inhibitorische G-Proteine (Dascal and Kahanovitch, 2015). Bei Aktivierung eines zugehörigen G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) wird der Kir3-Kanal durch direkte Bindung der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit an der zytosolischen Domäne aktiviert und es kommt gemäß dem elektrochemischen Gradienten an der Membran zu einem Ausstrom an Kalium-Kationen (Peleg et al., 2002). Die Zelle wird hyperpolarisiert und die Erregbarkeit wird dementsprechend herabgesetzt (Al-Hasani and Bruchas, 2011). Auch die $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheit bewirkt über die Inhibition des AC-cAMP-PKA-Signalwegs eine Änderung des Membranpotentials. Über die Inhibition von T-, L- und N-Typ Calciumkanälen durch die PKA kommt es zu einer Reduktion des transmembranären Calcium-Stroms mit konsekutiver Hyperpolarisation der Zelle (Sesena et al., 2014). Dies ist im Zusammenhang mit Tumorzellen, die ein pathologisches Migrations- und Metastasierungsverhalten mit aufgehobenen Regulationsmechanismen aufweisen von Bedeutung, da Calcium über die Neu- und Umverteilung des Zytoskeletts und die Verlagerung von Adhäsionsmolekülen wesentlich an Prozessen der Zellmobilität und Migration beteiligt ist und insofern einen Ansatzpunkt für die Inhibition von migrierenden Zellen darstellt (Phan et al., 2017, Wei et al., 2009, Zhu et al., 2017).

Bei chronischer Opioid-Behandlung und hohen Wirkspiegeln kommt es an der Zelloberfläche zu einer Agonisten-vermittelten Desensitivierung des μ -Opioidrezeptors mit Rezeptor-Phosphorylierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase 2/3 und nachfolgender Rezeptor-Internalisation über β -Arrestin-

2 (Bohn et al., 2000). Dies ist hinsichtlich der vorliegenden Arbeit mit dem Agonisten D,L-Methadon von besonderem Interesse, da es Hinweise dafür gibt, dass D,L-Methadon im Sinne einer funktionellen Selektivität besonders den β -Arrestin-2 Signalweg aktiviert (siehe Abb. 3) (Doi et al., 2016). Im Verlauf der letzten Jahre zeigte sich, dass der phosphorylierte, β -Arrestin gebundene GPCR-Komplex keineswegs inaktiv ist, sondern β -Arrestin durch die Interaktion mit GPCR in einen aktivierten Zustand versetzt wird und als eigenständiges Signalmolekül nachgeschaltete Prozesse beeinflusst (siehe Abb. 3) (Nuber et al., 2016). Hierzu zählt die Regulation zahlreicher MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinase = MAPK), die über entsprechenden Signalwege Proliferation und Apoptose, sowie Zellzyklus und Differenzierung kontrollieren und beeinflussen (Lefkowitz and Shenoy, 2005). An dieser Stelle sind besonders ERK 1/2 (extracellular signal regulated kinases 1 and 2), JNK 1-3 (c-Jun N-terminal kinase) und die p38-Proteinkinase ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) hervorzuheben (Al-Hasani and Bruchas, 2011).

1.2.3. Bisherige Beobachtungen zum Einsatz von D,L-Methadon und anderen μ -Opioidrezeptor-Agonisten im Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen

Anthrazykline befinden sich unter den potentesten Chemotherapeutika mit außergewöhnlich hoher zytotoxischer Wirkung. Sie werden großflächig in der Behandlung solider Tumoren und hämatologischen Tumorerkrankungen sowohl bei pädiatrischen Patienten (z.B. bei Leukämie, Rhabdomyosarkom, maligner Rhabdoidtumor, Wilms Tumor, Neuroblastom) wie auch bei Erwachsenen (z.B. Mammakarzinom, Weichteiltumore, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom, Harnblasenkarzinom, Ewing-Sarkom, Endometriumkarzinom, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen) eingesetzt (Fachinformation: DOXO-cell®, Kufe et al., 2003). Sie verlieren auch in Zeiten individueller, zielgerichteter Therapien nicht an Bedeutung, sondern werden häufig mit einer Immuntherapie kombiniert verabreicht (Cortes-Funes and Coronado, 2007). Doch nach wie vor sind die unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter Doxorubicin-Therapie eine Herausforderung für Patienten und behandelnde Ärzte. Eine mögliche Lösung

stellt die Kombination von Doxorubicin mit anderen zytotoxisch wirksamen Substanzen dar, was eine Dosisreduktion von Doxorubicin erlauben würde, ohne einen Wirkverlust der Therapie zu riskieren.

In den letzten Jahren ist diesbezüglich der μ -Opioidrezeptor-Agonist D,L-Methadon in den Fokus geraten. Friesen et al. konnte 2008 an Leukämiezellen *in vitro* zeigen, dass D,L-Methadon die Zellproliferation hemmt und es zu einer Induktion apoptotischer Signalwege kommt. Unter Behandlung mit D,L-Methadon kam es zu einer Reaktivierung insuffizienter Apoptose-Signalwege: Es zeigte sich eine Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9, eine Reduktion von Bcl-xL und XIAP sowie die vermehrte Spaltung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase). Diese pro-apoptische Aktivierung der Mitochondrien konnte zudem auch in chemoresistenten Tumorzellen nachgewiesen werden, die auf konventionelle Chemotherapie nicht oder nur in sehr geringem Maße ansprechen, nicht jedoch in gesunden peripheren Lymphozyten (Friesen et al., 2008).

Weitere Zellversuche an Glioblastom-Zelllinien zeigten ähnliche Ergebnisse mit gesteigerten Apoptoseraten unter Kombinationstherapie. Zudem lieferten sie Hinweise auf eine gegenseitige Wirkverstärkung von Doxorubicin und D,L-Methadon: Einerseits zeigte sich unter Behandlung mit D,L-Methadon eine verbesserte Doxorubicin-Aufnahme sowie ein verminderter Doxorubicin-Efflux. Beide Mechanismen tragen im Wesentlichen zum Aufbau höherer intrazellulärer Doxorubicin-Wirkspiegel bei. Andererseits wurde untersucht, inwiefern Doxorubicin die μ -Opioidrezeptor-Expression beeinflusst und es zeigte sich, dass es zur Hochregulation der Rezeptoren kommt, über die D,L-Methadon primär seine Wirkung entfaltet (Friesen et al., 2014, Matsui and Williams, 2010). *In vivo*-Untersuchungen bestätigten, dass D,L-Methadon das Tumorstadium auch im Maus-Modell signifikant hemmt (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013).

Bisher konnten diese Effekte auf Tumorzellen allerdings nur bei D,L-Methadon zuverlässig gezeigt werden. Aus Untersuchungen der letzten Jahre ist ersichtlich, dass verschiedenste körpereigene und synthetische Opioiden Einfluss auf Proliferation und Tumorstadium, sowie Apoptose, Angiogenese und

Metastasierung nehmen, aber nur D,L-Methadon zeigte bisher ausnahmslos die gewünschten inhibitorischen Effekte auf Tumorzellen. Morphin, β -Endorphin, DAMGO und andere Opiode, die zum Einsatz kamen, führten je nach Behandlungsdauer, Wirkstoffkonzentration und Versuchsaufbau (*in vitro* vs. *in vivo*) zu unterschiedlichen, teilweise vollkommen konträren Ergebnissen mit Förderung von Tumorprogression und -proliferation auf der einen Seite und Apoptose-Induktion und eine Reduktion der Tumorgröße auf der anderen Seite (Beagles et al., 2004, Harimaya et al., 2002, Hatzoglou et al., 1996, Hu et al., 2000, Hu et al., 2002, Ishikawa et al., 1993, Kampa et al., 1997, Kampa et al., 2001, Kawase et al., 2002, Maneckjee et al., 1990, Maneckjee and Minna, 1990, Maneckjee and Minna, 1994, Page et al., 1993, Roy et al., 2004, Sasamura et al., 2002, Sueoka et al., 1998, Sueoka et al., 1996, Tegeder and Geisslinger, 2004, Tegeder et al., 2003, Wang et al., 2002, Yeager and Colacchio, 1991, Yeager et al., 2002, Yin et al., 1997).

Aufgrund der ungewöhnlich stark voneinander abweichenden und inhomogenen Resultate gelangten Opiode, insbesondere D,L-Methadon, und ihr Einsatz in der Behandlung onkologischer Patienten zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Therapie beim Rhabdomyosarkom sowie bei malignen Rhabdoidtumoren ist nach wie vor eine Herausforderung: Betroffene Kinder werden nach multimodalen Therapieschemata behandelt, die teilweise nur mäßig erfolgreich sind und v.a. bei Patienten im Kleinkindalter schwere Nebenwirkungen aufweisen können (Frühwald and Graf, 2006, Leitlinienprogramm der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2017). Insbesondere bei malignen Rhabdoidtumoren sowie bei bestimmten RMS-Risikokonstellationen, z.B. dem aggressiven alveolären RMS-Subtyp, fortgeschrittener lokaler Tumorausbreitung oder bereits vorhandenen Fernmetastasen besteht Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten, mit dem Ziel die maligne Grunderkrankung erfolgreich zu

behandeln sowie gleichzeitig akute Nebenwirkungen und Spätschäden zu minimieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, RMS- und MRT-Tumorzelllinien zunächst auf das Vorhandensein von μ -Opioid-Rezeptoren und anschließend die Interaktion mit seinem Liganden D,L-Methadon zu untersuchen und durch tieferegehende Analysen neue Erkenntnisse über die molekularen Wirkmechanismen zu gewinnen.

Schlussendlich sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis über die Wirkung von D,L-Methadon auf RMS- und MRT-Tumorzellen führen und als Grundlage für einen möglichen Einsatz von D,L-Methadon als therapeutische Option in der Klinik dienen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die Bezeichnungen spezieller Materialien sind in den entsprechenden Methodenbeschreibungen vermerkt, alle anderen allgemein genutzten Verbrauchsmaterialien und Geräte sind nachfolgend aufgeführt.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Desinfektionsspray Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Einwegpinzetten, steril	Servoprax GmbH, Wesel
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim
Handschuhe nitrile, powder-free	Abena GmbH, Zörbig
Handschuhe Peha-soft nitrile GUARD	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Pasteur-Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (Falcon Serologische Pipette) (2, 5, 10, 5ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen (0,5 – 20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10-200 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (0,5-10, 10-100,100-1500 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0,5ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 1,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Taschenrechner (Sharp EL-243S)	Sharp Devices Europe GmbH, München
Zellkulturplatte (6-, 12-, 96-Well, TC-Treated)	Corning Incorporated, New York, USA
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (15ml/50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zytostatika-Schutzmatte (56cmx41cm)	Berner International GmbH, Elmshorn

2.1.2 Geräte

Eismaschine	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Multipipette (Multipette Xstream)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu Integra	Bioscience AG, Chur, Schweiz
Sterilbank (Msc-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank CryoSystem 4000 Chart	MVE BioMedical, Ball Ground, USA
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Vakuumpumpe EcoVac	Schuett-biotec GmbH, Göttingen
Vortex-Schüttler VF2	Janke & Kunkel, Labortechnik, Staufen
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

Alle Zellexperimente wurden mit 3 definierten Zelllinien durchgeführt, den zwei Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH30 (RMS) und der Rhabdoid-Zelllinie A204 (MRT). Die MTT-Analysen zu Beginn der Untersuchungen wurden zusätzlich mit der Skelettmuskel-Zelllinie SKMC durchgeführt, um anhand von Beobachtungen der Zellviabilität zu überprüfen, ob die Behandlung mit D,L-Methadon auch Effekte auf gesunde Körperzellen hat.

RH30: Die RMS-Zelllinie RH30 wurde ursprünglich aus der Knochenmetastase eines 16-jährigen Jungen mit Primärtumor in der hinteren Schädelgrube isoliert. Histologisch handelt es sich dabei um Zellen eines undifferenzierten, alveolären Rhabdomyosarkoms. Die Biopsie und Zellentnahme fand zum Zeitpunkt der Diagnosestellung statt, der Junge war also noch nicht vortherapiert. RH30 Zellen sind positiv für die Translokation $t(2;13)(q35;q14)$, welche die Bildung des Fusionsproteins PAX3/FOXO1 bedingt, molekulargenetisch finden sich außerdem hohe Expressionsmuster von Myogenin und MyoD, zweier

muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myoblasten sind.

Zudem hatte der ursprüngliche Xenograft zwar noch das p53 Wildtyp Allel, aber bei den etablierten Rhabdomyosarkomzellen ist p53 mittlerweile in 60 % der Fälle mutiert (Hinson et al., 2013, Rodriguez-Perales et al., 2004, Taylor et al., 2000).

RD: Die RMS-Zelllinie RD wurde aus Biopsiematerial des Beckenkamms eines 7-jährigen kaukasischen Mädchens mit embryonalem Rhabdomyosarkom-Rezidiv etabliert. Zum Zeitpunkt der Biopsie war das Mädchen bereits mit Cyclophosphamid und Radiotherapie behandelt worden. Die Zellen weisen im Karyogramm eine ausgeprägte Polyploidie auf, molekulargenetisch zeigt sich eine Myc-Amplifikation, sowie in ca. 50 % der Fälle eine NRAS-Mutation (neuroblastoma rat sarkoma) mit Überexpression von SPRY1 (protein sprouty homolog 1) (Felix et al., 1992, Hinson et al., 2013, McAllister et al., 1969, Schaaf et al., 2010).

A204: Die MRT-Zelllinie A204 wurde aus Muskelgewebe eines einjährigen Mädchens isoliert und zunächst fälschlicherweise als RMS-Zelllinie aufgeführt. 1998 konnten Morton and Potter (1998) jedoch zeigen, dass den Zellen sowohl Myogenin und MyoD als auch Desmin fehlte, 3 Merkmale, die für RMS-Zellen normalerweise bezeichnend sind, und 2002 konnte eine Mutation im Tumorsuppressorgen SMARCB1 gefunden werden, was die Klassifikation der A204-Zelllinie als maligner Rhabdoidtumor festigte (Betz et al., 2002, Hinson et al., 2013). Zudem zeigt sich im Karyogramm eine ausgeprägte Di- und Tetrapoliploidie (Fogh et al., 1977, Giard et al., 1973).

SKMC: Die Skelettmuskel-Zelllinie SKMC wird aus gesunden, humanen Skelettmuskeln (z.B. M. pectoralis major oder M. gluteus maximus) erwachsener Spender gewonnen. Die Zellen sind Myosin positiv (Markerprotein für quergestreifte Skelettmuskulatur) und α -Aktin negativ (spezifischer Marker für glatte Muskulatur) (Bouche et al., 2000).

2.2.1.2 Subkultivierung

Um eine saubere und keimfreie Umgebung zu gewährleisten, wurden alle Arbeiten unter einer Laminar-Flow-Sterilbank durchgeführt, deren Arbeitsfläche vor und nach den Arbeiten desinfiziert wurde.

Alle benötigten Materialien und Hilfsmittel waren entweder steril verpackt, autoklaviert oder wurden vor Verwendung gründlich desinfiziert. Außerdem wurde ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet. Alle Reagenzien, die in Kontakt mit den Zellen kamen, mit Ausnahme von Enzymen und Antikörpern, wurden zuvor bei 37° C im Wasserbad erwärmt.

Brutschrank BBD 6220
Wasserbad Typ 1003

Heraeus Holding GmbH, Hanau
Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Für die Routinekultur wurden die RMS- und Rhabdoidzellen in einem DMEM-Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium; w 3,7 g/l NaHCO₃, w 4,5 g/l D-Glucose, w/o Na-Pyruvate) mit den Zusätzen FCS (fetal calf serum), L-Glutamin und Antibiotika (Penicillin + Streptomycin) in Zellkulturflaschen in einem Luftgemisch mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C kultiviert.

Zellkulturmedium:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| • 88 % DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose | Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim |
| • 10 % FCS (fetales Kälberserum) | Biochrom GmbH, Berlin |
| • 1 % L-Glutamin (200 mM) | Biochrom GmbH, Berlin |
| • 1 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml) | Biochrom GmbH, Berlin |
-

Täglich wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und die Konfluenz des Zellrasens beurteilt, um die Zellen rechtzeitig zu passagieren und so eine Kontakthemmung, Veränderungen der Zellform oder Mutationen durch zu enge Zell-Zell-Kontakte zu vermeiden. Die Zellpassage erfolgte abhängig von der Teilungsrate und Zelllinie bei einer Konfluenz von etwa 80 % im Verhältnis

1:10-1:20. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Zur enzymatischen Ablösung der adhären wachsenden Zellen wurde Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben und die Zellen solange bei 37 °C inkubiert, bis sie sich durch vorsichtiges Klopfen vollständig vom Flaschenboden lösen ließen. EDTA dient hierbei als Komplexbildner der Bindung von Magnesium und Kalzium und bewirkt infolgedessen eine Lockerung der Zell-Zell-Kontakte, während Trypsin als Protease Peptidbindungen aufbricht und die Zellen vom Flaschenboden löst. Durch Zugabe von frischem Medium wurde die Reaktion durch Inaktivierung von Trypsin gestoppt und die Zellen in Suspension gebracht. Nach sorgfältigem resuspendieren wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis verdünnt und anschließend die Zellkulturflasche mit frischem Medium aufgefüllt und im Brutschrank weiter kultiviert.

10x-PBS (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x-PBS (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Leica DMI1	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Trypsin (Trypsin/EDTA, 0.05%, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (Cellstar 75cm ² , 125cm ² , 175cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25cm ²	Corning incorporated, New York, USA

2.2.1.3 Auftauen und Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen gezählt und in einer definierten Verdünnung in Einfriermedium sorgfältig resuspendiert. Mit je einem Gesamtvolumen von 1,5 ml pro Kryoröhrchen wurde die Zellsuspension aliquotiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Gefrierbehälter um ca. - 1 °C/min in 24 h auf - 80 °C gekühlt und im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei - 96 °C eingelagert.

Das Erwärmen der in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Sobald sie etwas angetaut waren, wurden sie sofort in warmem Zellkulturmedium resuspendiert und für 5 min zentrifugiert (1500 rpm/RT) und pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, in eine T-75 Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C inkubiert, bis nach 24 h der erste Mediumwechsel erfolgte. Bis die Zellen vollständig regeneriert waren und für Experimente zum Einsatz kamen, wurden circa 2-3 Passagen abgewartet.

Gefrierbehälter (5100 Cryo „Mr.Frosty“)
Kryoröhrchen Cryo's

Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen

Einfriermedium:

- 90 % FCS (fetales Kälberserum)
- 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

Biochrom GmbH, Berlin
AppliChem GmbH, Darmstadt

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und in einem C-Chip Zählkammer System gezählt. Hierzu wurden 10 µl Zellsuspension und 10 µl des Vitalfarbstoffes Trypanblau gemischt und anschließend unter das Deckglas pipettiert. Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, der spezifisch tote Zellen, die aufgrund einer geschädigten, durchlässigen Membran den Farbstoff aufnehmen können, tiefblau anfärbt. Vitale Zellen hingegen bleiben dank ihrer intakten Membran ungefärbt und heben sich hell gegen den Hintergrund ab. Bei entsprechender Vergrößerung wurden die vitalen Zellen in den vier Eckquadranten einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert der vier Quadranten errechnet. Zur Berechnung des benötigten Volumens für eine entsprechend definierte Zellverdünnung wurde dieser Wert in die folgende Formel eingesetzt:

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

Dabei ist:

- S = Anzahl aller gezählten Zellen
V = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension mit Trypanblau
(Verhältnis 1:1, d.h. V=2)
 10^4 = Volumenfaktor eines Eckquadrates
4 = Anzahl der Eckquadranten
ml = Gesamtvolumen der Zellsuspension

Abschließend wurde die Zellsuspension pelletiert und die gezählten Zellen mit dem entsprechenden Volumen Medium auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt.

Neubauer-Zählkammer DHC-N01 (C-Chip)
Trypanblau (0,4%)

NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Lonza Group AG, Basel,
Schweiz

In den Versuchen wurden je nach Zelllinie und Behandlungsdauer festgelegte Zellzahlen eingesetzt, die im Folgenden tabellarisch aufgeführt sind.

Tabelle 1: Versuche mit dazugehörigen Zellzahlen

Versuch	Mikrotiterplatte	RH30	RD	A204
MTT 72 h	96 Well Platte	8×10^3	10×10^3	9×10^3
FACS Apoptose 72 h	12 Well Platte	8×10^4	8×10^4	8×10^4
FACS ROS 24 h	12 Well Platte	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
FACS Doxo Efflux/Influx 2-48 h	12 Well Platte	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
FACS Zellzyklus 48 h	12 Well Platte	8×10^4	8×10^4	8×10^4
Wound Healing Assay 24 h	6 Well Platte	$5,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$
Western Blot Apoptose 48 h	6 Well Platte	3×10^5	3×10^5	3×10^5
Western Blot OPRM1 72 h	T 25 Flaschen	$6,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$
Colony Forming Assay (CFA)	6 Well Platte	$7,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$

2.2.2 Substanzen

2.2.2.1. Doxorubicin

Die Zellkulturversuche wurden mit Doxorubicinhydrochlorid durchgeführt. Es handelte sich um das Präparat von Stada (= Stammlösung mit Konzentration von 2 mg/ml), das von der Apotheke des Universitätsklinikums für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen bezogen wurde. Das Medikament wurde bei 4 °C im Kühlschrank, lichtgeschützt aufbewahrt und nach max. 1 Woche verworfen. Die Verdünnung der Stammlösung für die Behandlungsansätze erfolgte mit DMEM (Fachinformation: DOXO-cell®).

2.2.2.2 D,L-Methadon

Für die Behandlung mit D,L-Methadon wurde eine Stammlösung von 1 mg/ml verwendet, in welcher D,L-Methadon in Methanol gelöst war. Zur Lösungsmittelkontrolle wurde bei jedem Versuch eine Behandlung mit Methanol durchgeführt. Die Stammlösung wurde bei - 20 °C aufbewahrt. Um entsprechend dem Behandlungsschema die gewünschte Endkonzentration zu erreichen wurde die Stammlösung mit DMEM verdünnt.

Doxorubicinhydrochlorid [2 mg/ml]

Stada Arzneimittel AG, Bad

Vilbel

(±)-Methadon-Solution C-C-II [1 mg/ml in Methanol]

Sigma Aldrich Chemie GmbH,

Steinheim

2.2.3 Zellviabilitäts-Assay

Hintergrund

Um die Zellviabilität unter Behandlung eines Medikaments zu ermitteln, wurde der MTT-Assay eingesetzt. Die kolorimetrische Nachweismethode basiert auf der NADPH-abhängigen Umsetzung des wasserlöslichen gelben Farbstoffs MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide in das unlösliche, blauviolette Formazan. Die Reaktion wird durch mitochondriale Reduktasen katalysiert, deren Aktivität mit der Stoffwechselaktivität und somit auch mit der

Viabilität einer Zelle korreliert. Mithilfe eines Plattenspektralphotometers wird bei einer Wellenlänge von 560 nm die Lichtabsorption durch die Zellen gemessen und ermittelt, in welchem Umfang die violetten Formazankristalle vorhanden sind (Gerlier and Thomasset, 1986, Hansen et al., 1989, Mosmann, 1983).

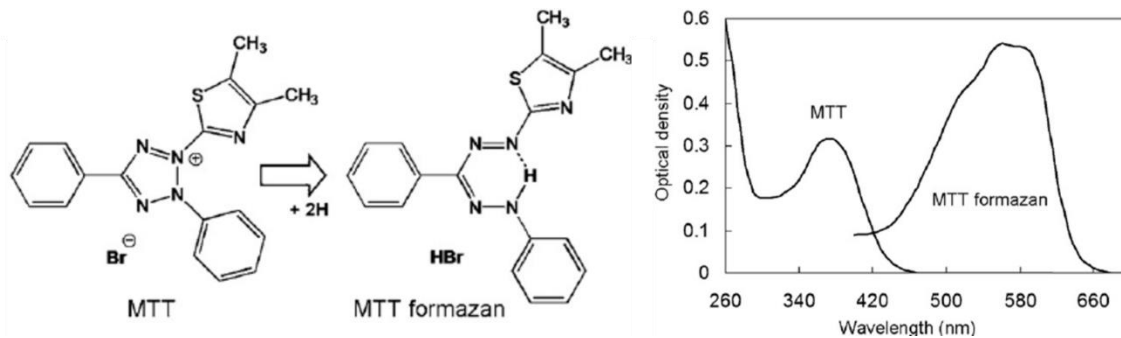


Abbildung 4: Reduktion von Tetrazoliumbromid zu Formazan als Merkmal stoffwechselaktiver und vitaler Zellen (Stockert et al., 2012)

Durchführung

Nach der Zellzählung und Herstellung einer entsprechenden Zellverdünnung wurden je nach Zelllinie eine definierte Zellzahl (siehe Tabelle 1) in 100 µl DMEM in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen in einer Titrationsreihe gemäß dem Behandlungsschema mit Doxorubicin und D,L-Methadon behandelt und bei 37° C inkubiert. Nach Ablauf von 72 h wurden 25 µl einer MTT Reagenzlösung (5 µg/ml, in PBS gelöst) in jede Vertiefung pipettiert und inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit (2 h, 37° C) wurde das Medium verworfen und 100 µl Lysepuffer in die Vertiefungen pipettiert. Um die Formazankristalle zu lösen wurde die Suspension auf einem Plattenschüttler durchmischt. Im Anschluss folgte die Messung der Lichtabsorption mithilfe des Plattenspektralphotometers bei 560 nm. Aus den drei Ergebnissen wurde anschließend ein Mittelwert errechnet.

Plattenspektralphotometer ELx 800

Plattformschüttler Titramax 100

Präzisionswaage LP2200

Sterilfilter (Millex-GS, 0,22 µm)

BioTek Instruments, Bad Friedrichshall

Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach

Sartorius, Göttingen

Millipore Ltd., Tullagreen, Irland

MTT-Reagenz (für 50 ml Stocklösung [5mg/ml])

- 250 mg MTT (=Thiazolylblau; Tetrazoliumbromid) AppliChem GmbH, Darmstadt
- 50 ml 1x-PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Lysepuffer (für 10 ml Stocklösung)

- 9,94 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
 - 0,006 ml Essigsäure Carl Roth, Karlsruhe
 - 1 g SDS (Natriumlaurylsulfat in Pelletform) Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
-

2.2.4 Durchflusszytometrie

Hintergrund

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen und funktionellen Analyse von Einzelzellen in einer Zellsuspension. Sie ermöglicht durch die hohe Messrate in relativ kurzer Zeit eine repräsentative Stichprobe aus einer Zellpopulation zu erheben und zu untersuchen. Die Messung beruht auf den individuell unterschiedlichen Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen unter Bestrahlung mit Licht.

Über einen starken Unterdruck wird die zu untersuchende Zellsuspension aus dem Proberöhrchen in eine Kapillare gesogen, in der sie von einer isotonen Pufferlösung umgeben ist. Durch die hohe Flussgeschwindigkeit der Trägerlösung (sheath fluid) werden die Zellen derart mitgerissen, dass sie noch vor dem ersten Messpunkt in vereinzelter Form vorliegen. Dieses Phänomen bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung: Die Zellen fließen wie an einer Perlenschnur aufgereiht durch die Kapillare und an den Messbereichen, in denen sich die Laserstrahlen befinden, vorbei und können so einzeln gemessen werden. Bei Kontakt der Zellen mit dem einfallenden Laserstrahl wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut und von Detektoren registriert. Die Streulichteigenschaften einer Zelle sind abhängig von Zellgröße, strukturellen Membraneigenschaften und intrazellulären Bestandteilen. Das Vorwärtsstreulicht (forward side scatter, FSC) welches den größten Anteil des Streulichts darstellt, dient als ein Maß für die Zellgröße, während das im rechten

Winkel zur Lichtquelle gestreute Seitwärtslicht (sideward light scatter, SSC) mit der Granularität von Zellen korreliert. Mithilfe dieser physikalischen Parameter ist zunächst eine grobe Einteilung der Zellen nach morphologischen Kriterien möglich.

Neben der Detektion des Streulichts werden auch von der Zelle ausgehende Fluoreszenzsignale gemessen. Mithilfe von fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome), die an spezifische monoklonale Antikörper gekoppelt sind, können Zellen mit bestimmten Eigenschaften markiert werden, z.B. über bestimmte Oberflächenantigene oder intrazelluläre Proteine. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) verwendet. Das zellulär gebundene Fluorochrom wird mit Licht einer definierten Wellenlänge (monochromatischer Laser) bestrahlt und durch kurzfristige Absorption der Lichtenergie angeregt. Im Anschluss daran sendet es - bei Rückkehr der Elektronen in ihren Grundzustand - selbst Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, welches über Spiegel- und Filtersysteme auf Photoverstärkerröhren geleitet und anschließend von Detektoren gemessen wird. Häufig können Farbstoffe über Licht der gleichen Wellenlänge angeregt werden, unterscheiden sich jedoch in ihren Emissionsspektren und können so gleichzeitig eingesetzt werden. Der Einsatz von Fluorochromen ermöglicht multiparametrische Messungen, die differenziertere Aussagen über die Morphologie ebenso wie funktionelle Analysen von Zellen zulassen (Hawley T.S. and Hawley R.G., 2004).

Cell WASH solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Canto II (3 Laser: blau=488nm, rot=633nm und violet=405nm)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSCanto II System Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSDiva Software Version 8.0	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5 ml Rundboden)	Corning Incorporated, New York, USA
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg

Nachweis von Zelltod mittels Apoptose/Nekrose Assay

Hintergrund

Der Nachweis von Zelltod und die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nach Behandlung erfolgte mithilfe Annexin V und Propidiumjodid (PI) in der FACS-Analyse (FACS = fluorescence-activated cell sorting). Annexin V ist ein zelluläres Protein aus der Gruppe der Annexine, welches in der Lage ist calciumabhängig hochaffin das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) zu binden. PS ist am Aufbau der Zellmembran beteiligt und physiologisch in der dem Zytosol zugewandten Schicht vorzufinden, in die es zum Erhalt der Membranasymmetrie aktiv von sog. Flippasen (ATP abhängige Transportproteine) aus der äußeren Schicht verschoben wird. Befindet sich eine Zelle in einer frühen Phase der Apoptose geht diese asymmetrische Verteilung jedoch verloren und es findet eine Externalisierung von PS statt. PS ist somit als Bestandteil der äußeren Membranschicht apoptotischer Zellen für Annexin V zugänglich, was fluoreszenzkonjugiertes Annexin V als spezifischen Apoptose-Marker qualifiziert (Koopman et al., 1994, Vermes et al., 1995).

Im Gegensatz zur Apoptose, die über veränderte Expressionsmuster auf Genebene kontrolliert und gesteuert wird, stellt die Nekrose den unkontrollierten Untergang geschädigter Zellen dar, der besonders durch den Verlust der Plasmamembranintegrität gekennzeichnet ist. Infolgedessen kommt es zum unkontrollierten Austritt intrazellulärer Inhalte, was die begleitende Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes bedingt. Als Marker für nekrotische Zellen diente in der FACS-Analyse Propidiumjodid, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Doppelhelix interkaliert. Unter normalen Umständen – ohne Vorbehandlung der Zellen – ist PI nicht membrangängig und kann die DNA intakter Zellen im Zellkern nicht erreichen. Nekrotische Zellen hingegen färben sich durch die Gabe von PI spezifisch an, da deren Membran für PI durchlässig ist und intrazelluläre DNA gebunden werden kann.

Durchführung

Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 8×10^4 Zellen/Well in Zellkulturplatten (siehe auch Tabelle 1). Nachdem die Zellen bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden, um anwachsen zu können, erfolgte am nächsten Tag – jeweils einzeln und in Kombination – die Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon. Nach Ablauf der Behandlungsdauer von 72 h wurden die adhärennten Zellen abgelöst und einschließlich des Überstandes und des zum Waschen verwendeten PBS in FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert (1500 rpm, 5 min., RT) und mit Annexin-Binding-Puffer (1:10) einmalig gewaschen. Im darauffolgenden Schritt wurde Annexin V und PI zugegeben (je 3.5 µl für 50 µl Zellsuspension) und die FACS-Röhrchen im Dunkeln inkubiert (30 min, RT). Abschließend wurde jedes FACS Röhrchen mit 100 µl Annexin-Binding-Puffer versetzt und daraufhin die durchflusszytometrische Messung über die Kanäle PE (PI positive Zellen) und APC (Annexin V positive Zellen) durchgeführt.

Annexin Binding Buffer

ImmunoTools, Friesoythe

Annexin V APC-conjugated

ImmunoTools, Friesoythe

Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Hintergrund

ROS (reactive oxygen species) sind aus molekularem Sauerstoff gebildete toxische Sauerstoffverbindungen, die eine hohe Reaktivität aufweisen und in einem Ausmaß, das die physiologische Menge überschreitet, zellulären oxidativen Stress auslösen können. Als indirekter Marker für ROS diente das membrangängige, chemisch reduzierte 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat (DCFDA), welches nach Zugabe auf Zellen in einem ersten Schritt von intrazellulären Esterasen deacetyliert und anschließend in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies in das stark fluoreszierende 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) umgewandelt wird. Die Eigenfluoreszenz von DCF kann daraufhin über den FITC Kanal durchflusszytometrisch gemessen und darüber der zelluläre DCF-Gehalt quantitativ erfasst werden (Lin et al., 2012).

Durchführung

Mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden Zellen in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät, über Nacht bei 37 °C inkubiert und am Folgetag mit Doxorubicin und D,L-Methadon behandelt. Nach 24 h erfolgte die Färbung mit 1 µl DCFDA (aus einer 10 µl Stocklösung \cong 5 nM) mit anschließender Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C. Daraufhin wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert (1500 rpm, 5 min., RT), das Pellet in 100 µl frischem DMEM aufgenommen und die Proben anschließend im FITC Kanal gemessen.

2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Messung von Doxorubicin-Influx und -Efflux

Hintergrund

Die Wirkung und Effizienz einer Chemotherapie mit Doxorubicin hängt maßgeblich davon ab, wie gut das Medikament von Tumorzellen aufgenommen wird und wie lange es intrazellulär verbleibt, bis es durch verschiedene Mechanismen wieder aus der Zelle geschleust oder abgebaut wird. Doxorubicin besitzt bei Anregung mit einer Wellenlänge von ca. 480 nm eine Eigenfluoreszenz, die wiederum im Bereich von 560-590 nm liegt und im PE-Kanal gemessen wird (de Lange et al., 1992). Zellen, die intrazellulär Doxorubicin enthalten, weisen folglich eine Eigenfluoreszenz auf und es konnten ohne weitere FACS-Färbung quantitative Analysen zur Pharmakokinetik von Doxorubicin durchgeführt werden.

Durchführung

Mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden Zellen in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät und für ca. 16 h (über Nacht) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde frisches Medium mit der entsprechenden Doxorubicin/D,L-Methadon-Konzentration auf die Zellen gegeben. Für die Influx-Messungen wurden die Zellen mit Doxorubicin mit bzw. ohne D,L-Methadon behandelt und untersucht, ob die Kombinationsbehandlung einen Effekt auf die Doxorubicin-

Aufnahme hat. Hierzu wurde vor Behandlung der Zellen eine Messung zur Kontrolle durchgeführt und im Verlauf an zwei weiteren Zeitpunkten gemessen, ob sich die Zellen bezüglich ihres intrazellulären Gehalts an Doxorubicin unterscheiden. Für die Efflux-Messungen wurden die Zellen zunächst mit Doxorubicin behandelt und ca. 12 h inkubiert, um ein möglichst hohes Maß an intrazellulärer Akkumulation zu erreichen, welches in der 0 h - Kontrolle gemessen und auf 100 % normiert wurde. Danach wurde die Behandlung gewechselt und frisches Medium mit bzw. ohne D,L-Methadon auf die Zellen gegeben. Zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h nach Behandlungswechsel wurden die Proben gemessen und analysiert, welche Wirkung D,L-Methadon auf den Doxorubicin-Efflux der Tumorzellen hat. Die Eigenfluoreszenz von Doxorubicin erlaubt eine Messung ohne spezifische Färbung, d.h. die adhären Zellen wurden gelöst, mit jeweils einmal PBS und CellWash gewaschen und anschließend im PE Kanal gemessen. Der Doxorubicin-Influx und -Efflux lässt sich durch die Verschiebung der Zellen aus dem Bezugsgate, das in der 0 h - Messung um die Zellpopulation gelegt wurde, beschreiben.

2.2.5 Wound Healing Assay

Hintergrund

Der Wound Healing Assay ist eine Methode zur Untersuchung des Migrationsverhalten von Zellen *in vitro*, die allerdings einige Aspekte der Zellmigration *in vivo* nachahmen kann. Hierzu wird einem konfluenten Zellrasen mechanisch ein Defekt zugefügt und anschließend das Migrationsverhalten in den Spalt beobachtet. Die Defektheilung *in vitro* ist ein komplexer Prozess, der den Umbau sowohl der Zell-Matrix-Kontakte, als auch von Zell-Zell-Kontakten erfordert. An den Defekträndern kommt es im Zuge der Umwandlung vom ruhenden Zellphänotyp zur migrierenden Zelle zu einer vollständigen Reorganisation verschiedenster Adhäsionsmoleküle, welche zelluläre Interaktionen steuern und eine Schließung des Spaltes ermöglichen (Liang et al., 2007, Rodriguez et al., 2005).

Durchführung

24 h vor Behandlung wurden Zellen in definierten Zellzahlen (siehe Tabelle 1) in 6 Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde in den einschichtigen Zellrasen aus adhären Zellen mit einer Pipettenspitze ein Defekt von ca. 1 mm Breite zugefügt. Um zu verhindern, dass sich die gelösten Zellen direkt wieder am Boden anheften, wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen, daraufhin behandelt und direkt im Anschluss als 0 h - Kontrolle fotodokumentiert. Nach Ablauf von 24 h wurden die Zellen wieder fotografiert und mit Hilfe der AxioVision Software von Zeiss ausgewertet, in welchem Ausmaß sich die Spaltbreite nach 24 h im Vergleich zur 0 h - Kontrolle verkleinert hatte. Hierzu wurden jeweils die Mittelwerte von 3 Fotos/Well, errechnet und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

AxioVision 3.1	Carl Zeiss, Oberkochen
AxioVision Viewer 3.0	Carl Zeiss, Oberkochen
EOS Utility	Canon GmbH, Krefeld
Inverses Mikroskop, Axiovert 135	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera Axio Cam MR colour	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera Canon EOS 550D	Canon GmbH, Krefeld

2.2.6 Colony Forming Assay

Hintergrund

Mithilfe des Koloniebildungstests lässt sich die klonogene Wachstumsfraktion einer Tumorzellpopulation unter Therapie untersuchen. Es handelt sich hierbei um einen indirekten Test des klonogenen bzw. reproduktiven Zelltods. Dabei wird eine Zellpopulation einer bestimmten Größe in solcher Weise behandelt, dass überlebende Zellen nach Abbruch der Behandlung möglichst vereinzelt vorliegen. Ab diesem Zeitpunkt wird beobachtet, in welchem Maße sich einzelne Zellen noch teilen und Kolonien bilden können. Durch den Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle kann der Test zur Evaluation der Wirkungsweise und Effektivität einer Behandlung beitragen (Franken et al., 2006).

Durchführung

Hierfür wurden die Tumorzellen zunächst in einer definierten Zelldichte (siehe Tabelle 1) in Zellkulturschalen angelegt, über Nacht inkubiert und anschließend mit D,L-Methadon in aufsteigender Konzentration (3, 5, 7.5 und 10 µg/ml) behandelt. Die Behandlung wurde beendet, indem die Zellen 1 x mit PBS gewaschen wurden und frisches Medium aufgegeben wurde. Nachfolgend wurden die Zellen inkubiert und in regelmäßigen Abständen die Ausbildung neuer Kolonien kontrolliert. Nach ca. 2 - wöchiger Kultivierung der Zellen wurden die Kolonien mit eiskaltem Methanol fixiert und mit 1 % - Kristallviolett angefärbt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung des Koloniebildungstests durch Auszählen der Kolonien und dem Vergleich mit einem unbehandelten Kontrollversuch.

CELLSTAR® Zellkultur Schalen 35x10 mm
Methanol

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
VWR International GmbH, Darmstadt

1% Kristallviolett-Lösung:

- 1 g Kristallviolett-pulver
- mit bidest. H₂O auf 100 ml auffüllen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2.7 Western Blot

Hintergrund

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Analyseverfahren, welches die qualitative und semiquantitative Bestimmung von einzelnen Proteinen in einem Proteingemisch aller zellulären Proteine erlaubt. Über Gelelektrophorese werden die Proteine in einem Polyacrylamidgel durch die - abhängig von Molekulargewicht, Ladung und Porengröße des Gels - unterschiedliche Wandergeschwindigkeit der Proteine bei Anlegen einer Spannung in Proteinbanden aufgetrennt. Im Anschluss werden die Proteine durch Blotting auf eine feste Trägermembran, z.B. Nitrozellulose, übertragen, wobei das ursprünglich im Gel entstandene Bandenmuster erhalten bleibt. Durch den Transfer sind die Proteine für weitere Methoden wie Immundetektion und ELISA

zugänglich, die durch den Einsatz von Antikörpern das gezielte Aufsuchen und Identifizieren von bestimmten Proteinen ermöglichen.

Durchführung

Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden je nach Zelllinie definierte Zellzahlen (siehe Tabelle 1) in die Vertiefungen einer 6-Well-Zellkulturplatte für Apoptose-Untersuchungen und in T₂₅ Flaschen zum Nachweis des OPRM1 Rezeptors ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen behandelt und nach Ablauf der entsprechenden Behandlungsdauer geerntet, in Falcons überführt und direkt auf Eis gelegt. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1500 rpm, 5 min., 4 °C), das Pellet in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach zwei weiteren Waschzyklen mit kaltem PBS wurde abhängig von der Pelletgröße eine entsprechende Menge Zell-Lysepuffer (1x) zugegeben, die Zellen darin resuspendiert und für die folgenden 20 min auf Eis inkubiert. Die frisch gewonnenen Proteinlysate wurden anschließend für weitere 20 min zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C) und pelletiert. Der Überstand wurde daraufhin entnommen und in einem neuen Reaktionsgefäß bei - 80 °C bis zur Verwendung eingefroren, das Pellet mit Proteinfragmenten und Deditus wurde verworfen.

Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17

Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Zell-Lysepuffer (10x)

Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

Zentrifuge Biofuge 15R

Heraeus, Hanau

Zell-Lysepuffer (1x):

- 9 ml bidest. H₂O
- 1 ml Lyse Puffer Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
- 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tabletten

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in einer Proteinsuspension wurde der Bradford Assay angewandt. Es handelt sich dabei um ein kolorimetrisches Verfahren zum quantitativen Nachweis von Proteinen und basiert auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 mit Seitenketten von Proteinen. Dabei kommt es je nach Proteinmenge zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Farbumschlag des ursprünglich roten Farbstoffes, da die Proteinbindung die anionische, blau erscheinende Form stabilisiert. Die Bindung und strukturelle Veränderung des Farbstoffes hat außerdem zur Folge, dass sich das maximale Absorptionsspektrum von ca. 470 nm (ungebunden) nach 595 nm (gebunden) verschiebt und sich so durch die Messung der Absorption bei 595 nm Rückschlüsse auf den Proteingehalt ziehen lassen. Zur Proteinmessung wurden jeweils 800 µl bidest. Wasser, 200 µl Bradford-Reagenz und 1 µl des entsprechenden Proteinlysats in eine Küvette gegeben und gründlich vermischt. Anschließend erfolgte bei einer Wellenlänge von 596 nm die Messung der Lichtabsorption durch die Proben in einem Spektralphotometer (Bradford, 1976, Compton and Jones, 1985, Zor and Selinger, 1996). Anhand der Messwerte wurde mithilfe der BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration der Proteinlysate und folglich der erforderliche Proteinanteil für die Elektrophorese-Proben berechnet. Es wurden stets 30 µg Protein/Tasche für die Elektrophorese verwendet, sodass ein Volumen von 35 µl für jede Probe angesetzt wurde.

Protein Assay Farbstoffkonzentrat (Bradford-Reagenz)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Photometer (BioPhotometer D30)

Eppendorf AG, Hamburg

Küvetten (10 x 4 x 45 mm)

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Probenvorbereitung für Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Proben wurde zunächst Zell-Lysepuffer (1:10) vorgelegt, welcher anschließend mit der errechneten Menge Protein und einem Protein-Ladepuffer (4x) versetzt wurde. Im Folgenden wurden die Proben erhitzt (5 min., 96 °C) und dabei die Proteine vollständig denaturiert. Anschließend erfolgte die

Zugabe des reduzierenden, SDS-haltigen Protein-Ladepuffers, der für die Entfaltung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine sorgt, gleichzeitig aber die Stabilität der Peptidbindungen gewährleistet, sodass die Primärstruktur erhalten bleibt und kein Abbau der Proteine erfolgt. Die hohe negative Ladungsdichte, die die Proteine durch das gebundene SDS aufweisen, maskiert deren ursprüngliche Ladung, sodass die im Zuge der Gelelektrophorese in Richtung Anode laufenden Proteine in Anlehnung an ihr Molekulargewicht in einzelne Banden aufgetrennt werden.

Proteinauftragspuffer Roti®-Load

Carl Roth, Karlsruhe

Thermo-Schüttler PHMT SC20

Grant Instruments, Cambridgeshire, Großbritannien

Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels vertikaler, diskontinuierlicher Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Das entscheidende Merkmal der diskontinuierlichen Gelelektrophorese ist der unterschiedliche pH-Wert der Trenn- und Sammelgele. Der niedrige pH-Wert des Sammelgels zusammen mit dem glycinhaltigen Tris-Puffer sorgt für eine Konzentrierung der Proteine im weitporigen Sammelgel, sowie für eine hohe Auflösung und gute Bandenschärfe bei der Gelelektrophorese.

Zur Herstellung der Gele wurde zunächst je nach Größe der Proteine ein 10 % oder 12 % - Acrylamid - Trenngel angesetzt (siehe Tabelle 3), welches in einen Gießstand gegossen und mit Isopropanol überschichtet wurde, um Lufteinschlüsse im Gel zu vermeiden. Nach ca. 30 min war das Gel vollständig polymerisiert und wurde mit einer Schicht 6%igem Acrylamid-Sammelgel (siehe Tabelle 2) überschichtet und ein Kamm eingesetzt, um Probetaschen für die Proteinproben zu bilden. Nachdem auch die Polymerisation des Sammelgels abgeschlossen war, konnte das Gel in eine Elektrophoreseapparatur eingebaut und die Proteinproben aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V für ca. 90 min, als Laufpuffer diente SDS-Puffer (1x).

Tabelle 2: Ansatz für zwei 4%ige Sammelgele (6ml)

Substanz	Volumen
bidest. H ₂ O	4,1 ml
1,0 M Tris Puffer pH 6.8	0,75 ml
10 % SDS	0,06 ml
Acrylamid Mix (30 %)	1,0 ml
10 % APS	0,06 ml
TEMED	0,006 ml

Tabelle 3: Ansatz für zwei Trenngele (20ml)

Substanz	Volumen (10%ig)	Volumen (12%ig)
bidest. H ₂ O	7,9 ml	6,6 ml
1,5 M Tris Puffer pH 8.8	5,5 ml	5,0 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml
Acrylamid Mix (30 %)	6,7 ml	8,0 ml
10 % APS	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	0,008 ml	0,008 ml

Acrylamid Stammlösung

Ammoniumpersulfat (APS)

Isopropanol

Parafilm "M" 4 IN x 125 FT. Rolle

Polyacrylamidgel-Gießstand

PowerPac Basic Power Supply

Präzisionswischtücher

Protein-Marker IV10 - 170 kDa

Rotiphorese 10x SDS-Page

Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Carl Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

VWR International GmbH, Darmstadt

Bemis Europe, Braine-l'Alleud, Belgien

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Kimberly-Clark Deutschland GmbH,

Mainz

Peqlab, Wilmington, USA

Carl Roth, Karlsruhe

Carl Roth, Karlsruhe

SDS-Laufpuffer (10x) 1L:

- 30.3 g Tris-Base
- 144 g Glycerin
- 10 g SDS (Natriumlaurylsulfat in Pelletform)
- mit bidest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

SDS-Laufpuffer (1x) 1L:

- 100 ml SDS-Laufpuffer (10x)
- mit bidest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

Western Blot

Zur Identifikation und Quantifizierung der gesuchten Zielstrukturen wurden die im Gel in einzelne Banden aufgetrennten Proteine mithilfe eines horizontalen, elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel vorsichtig beidseits von den Glasplatten gelöst und mit einer immobilisierenden Nitrozellulosemembran zwischen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere und Schwämme gelegt und anschließend luftblasenfrei in einer Kassette mit Kontakt zu den Elektroden zu einem Blot zusammengebaut. Die verschlossene Kassette wurde in eine Blot-Kammer gestellt, die mit Eis gekühlt wurde, und mit Transferpuffer überschichtet. Der Aufbau des Blots ist Abb. 5 zu entnehmen.

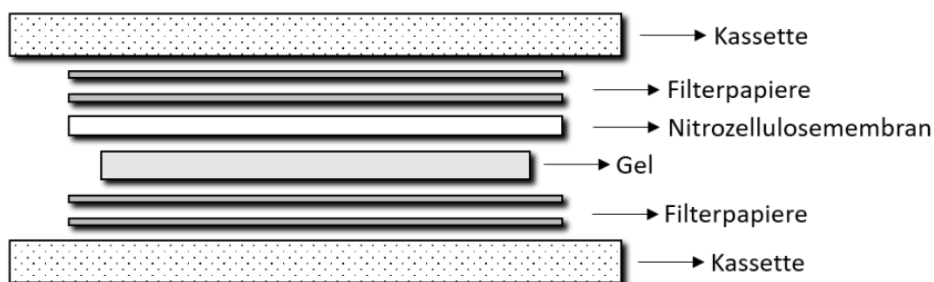


Abbildung 5: Aufbau der Blotting Kassette

Der Western Blot erfolgte bei einer Stromstärke von konstanten 300 mA für 90 min. (OPRM1) bzw. 60 min. (Bcl-xL und Bax) (Burnette, 1981, Towbin et al., 1992).

Nitrocellulose-Membran	Sartorius AG, Göttingen
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wet/Tank Blotting System (Deckel, Faserpolster, Gel-Kassette, Kühlspirale, Platten Anode und Kathode, Pufferbehälter)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Whatman Papier (Chromatography Papier 3 mm)	Whatman, Maidstone, Großbritannien

Transferpuffer (10x) 1L:

- 24 g Tris-Base Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- 173 g Glycin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- mit bidest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

Transferpuffer (1x) 1L:

- 100 ml Transferpuffer (10x)
 - mit bidest. H₂O auf 1000 ml auffüllen
-

Immundetektion/Visualisierung der Zielproteine

Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die Membran vorsichtig aus der Kassette entnommen und für 1 h bei RT in 10 % Milchpulver (in TBS-T) geblockt, um noch freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und so unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit individuell unterschiedlich verdünnten Primärantikörper-Ansätzen. Nach ca. 2 h bei RT wurde die Membran 3x für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen und im Anschluss in einem entsprechenden Zweitantikörper-Ansatz für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen des Blots mit TBS-T erfolgte im letzten Schritt die Detektion der Zielproteine mittels Chemolumineszenz. Hierzu wurde die Membran für einige Minuten mit Luminol-Lösung beträufelt. Bei den verwendeten Sekundärantikörpern handelte es sich um Immunkonjugate, dabei waren die Antikörper an eine Meerrettichperoxidase (HRP = horseradish peroxidase) als Reporterenzym gekoppelt. Als Substrat diente Luminol, ein Stoff, der in

Anwesenheit der Peroxidase oxidiert wird und Energie in Form von bläulichem Licht abgibt, welches dann von einem CCD Kamera System (Odyssey® Fc) detektiert wurde. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mithilfe des Softwareprogramms LI-COR Image Studio durch Intensitätsmessung der Banden durchgeführt.

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
anti-human OPRM1	Hase	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe	1:600 (in 5 % BSA in TBS-T)
anti-human-Bcl-xL	Hase	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:350 (in 5 % BSA in TBS-T)
anti-human-Bax	Hase	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:400 (in 5 % BSA in TBS-T)
anti-human-GAPDH	Hase	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000 (in 5 % BSA in TBS-T)
anti-rabbit-IgG (HRP linked antibody)	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:3000 (in 5 % Magermilch in TBS-T)

Odyssey Fc Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Western Blot Detektionslösung (PREMIUM Chemiluminescent)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Western Sure Pen	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
LI-COR Image Studio Software	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Tris Buffered Saline = TBS (10x) 1L:

- 24.2 g Tris-Base Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- 80 g Natriumchlorid Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- mit bidest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

Tris Buffered Saline mit Tween20 = TBS-T (1x) 1L:

- 100 ml TBS (10x)
- 1 ml Tween-20 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- mit bidest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

10 % Milchpulver (MP) 50ml:

- 5 g MP
- mit TBS-T auf 50 ml auffüllen

Carl Roth, Karlsruhe

5 % Milchpulver (MP) 50ml:

- 2.5 g MP
- mit TBS-T auf 50 ml auffüllen

Carl Roth, Karlsruhe

5 % Bovines Serum Albumin (BSA) 50ml:

- 2.5 g BSA
- mit TBS-T auf 50 ml auffüllen

Carl Roth, Karlsruhe

2.2.8 Statistik

Die Ausarbeitung der vorliegenden Dissertationsschrift erfolgte mit dem Textverarbeitungsprogramm Word. Die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung der Graphen wurde mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 7 durchgeführt. Es erfolgte die deskriptive Statistik der Daten (teilweise auch mithilfe von Windows Excel) und anschließend die statistische Prüfung der Hypothese mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Als Testverfahren wurde i.d.R. die Bonferroni-Methode eingesetzt. Alle Versuche wurden mindestens 3x durchgeführt, die Mittelwerte der Einzelversuche wurden in den Graphen jeweils mit Standardfehler (SEM) angegeben. Als Signifikanzniveau wurde das 95 % Konfidenzniveau gewählt, d.h. alle p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Dabei gilt für die Graphen:

- * = $p < 0,05$
- ** = $p < 0,01$
- *** = $p < 0,001$
- **** = $p < 0,0001$

Adobe Reader, Adobe Photoshop
GraphPad Prism Version 7.0
Office 365 Education Plus

Adobe Systems, München
GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft, Unterschleißheim

3 ERGEBNISSE

3.1 Veränderungen im Expressionsmuster des μ -Opioidrezeptors (OPRM1) bei Behandlung mit Doxorubicin in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

3.1.1 Basis-Expressionsprofil des μ -Opioidrezeptors (OPRM1) auf der Oberfläche von Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen anfänglich Western Blot Analysen zur Erstellung eines Expressionsmusters des OPRM1 auf der Oberfläche der verwendeten Tumorzelllinien. Es ist bereits bekannt, dass Opioidrezeptoren in verschiedensten Tumorzellen vorkommen, u.a. bei Mamma-Karzinom, kleinzelligem Bronchial- Karzinom, Kolon- Karzinom oder Gliomen (Bohn et al., 1998, Brar and Lowry, 1999, Chatikhine et al., 1994, Maneckjee et al., 1990, Nylund et al., 2008, Roth and Barchas, 1986). Doch es existieren noch keine Daten zu kindlichen soliden Tumoren, sodass zunächst ein Profil für die Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD, SRH, RH30 und ZF (RMS) sowie für die Rhabdoid-Zelllinie A204 (MRT) erstellt wurde (Abb. 6).

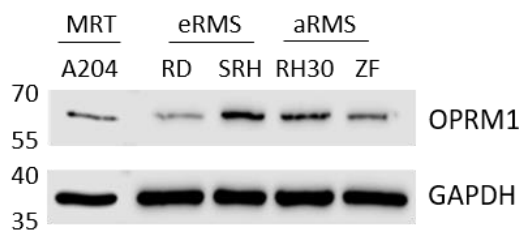


Abbildung 6: Expressionsprofil des μ -Opioidrezeptors (OPRM1) in Zelllinien kindlicher solider Tumoren

Es wurden Proteinlysate von unbehandelten Tumorzellen gewonnen und der μ -Opioidrezeptor (OPRM1) über Western Blot Analyse detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente GAPDH. A204 = maligner Rhabdoidtumor, RD und SRH = embryonales Rhabdomyosarkom (eRMS), RH30 und ZF = alveoläres Rhabdomyosarkom (aRMS).

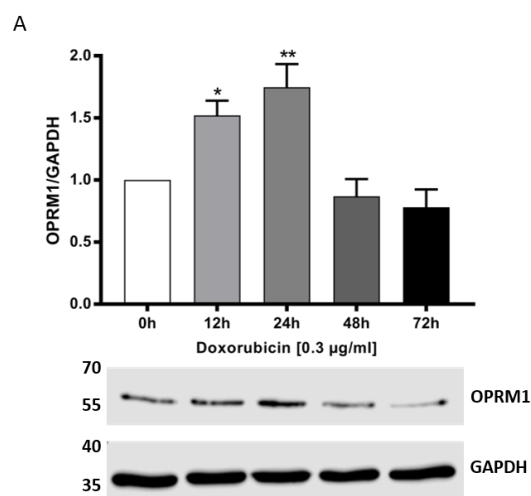
Die Western Blot Analyse ergab, dass der μ -Opioidrezeptor in allen untersuchten Zelllinien in detektierbarer Menge vorkommt, die Expression in ihrer Ausprägung allerdings stark variiert (siehe Abb. 6). Besonders starke Banden mit hoher Rezeptor-Expression weisen die Rhabdomyosarkom-Zelllinien SRH (eRMS) und

RH30 (aRMS) auf, gefolgt von der Rhabdoid-Zelllinie A204 und den beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien ZF (aRMS) und RD (eRMS).

Die Experimente, die im Folgenden beschrieben sind, wurden mit der Rhabdoid-Zelllinie A204 sowie den zwei Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH30 durchgeführt. Dabei wurde die RD als eRMS-Zelllinie mit tendenziell schwächerer OPRM1 Expression ausgesucht sowie als Gegenpol hierzu RH30 (aRMS), mit in der Vergleichsgruppe deutlich ausgeprägterer OPRM1 Expression.

3.1.2 Analyse des Effektes von Doxorubicin auf die OPRM1-Expression in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Unter längerer Exposition mit Doxorubicin kommt es in Tumorzellen zu einer erhöhten Expression des μ -Opioidrezeptors (OPRM1) an der Zelloberfläche. Dies konnte bisher für Leukämie- und Glioblastomzellen gezeigt werden (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013). Um zu überprüfen, ob dies auch in den von uns verwendeten Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien der Fall ist, wurden Western Blot Analysen zur semiquantitativen Analyse der OPRM1-Expression durchgeführt, wobei das Expressionsprofil von Tumorzellen, die über einen bestimmten Zeitraum mit 0.3 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin behandelt worden waren, mit dem unbehandelten Kontrollen verglichen wurde (siehe Abb. 7).



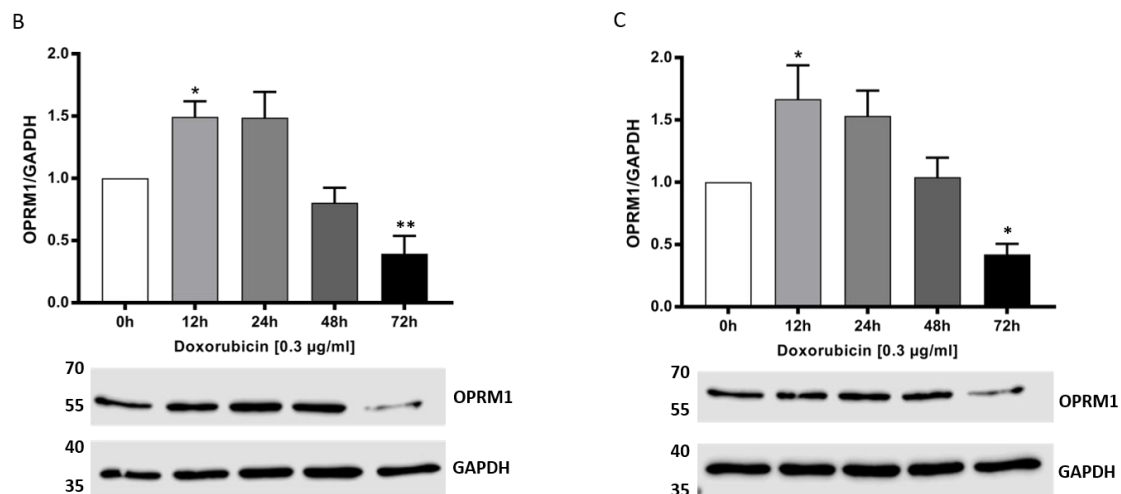


Abbildung 7: Zeitabhängige Expression des μ -Opioidrezeptors OPRM1 in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien nach Doxorubicin-Behandlung

Zur Western Blot Analyse des OPRM1-Expressionsmusters der MRT-Zelllinie A204 (A) und der RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) erfolgte eine Behandlung mit 0.3 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin mit anschließender Herstellung von Proteinlysaten nach 0 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h. Als housekeeping gene diente GAPDH. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 5 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Wie in Abb. 7 gezeigt, führt eine zeitabhängige Behandlung mit Doxorubicin in den Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien A204, RD und RH30 zu einer signifikanten Steigerung der OPRM1-Expression um 50-75 %. Hierdurch kommt es in der Folge zu einer erhöhten Sensibilität der Zelle für D,L-Methadon. Nach 12 h in RD und RH30 bzw. 24 h in A204 ist eine maximale Rezeptorexpression unter den gegebenen Bedingungen erreicht.

Nach 48 h erreicht die Konzentration an OPRM1 gegenüber der unbehandelten Kontrolle wieder das Basislevel. Überraschenderweise führt eine Behandlung mit Doxorubicin in RD und RH30 nach 72 h zu einer signifikant verminderten OPRM1-Expression. Im Wesentlichen konnte der Versuch zeigen, dass Doxorubicin die OPRM1-Rezeptorexpression abhängig von der Behandlungszeit beeinflusst und es insofern einen Zusammenhang zwischen Doxorubicin und dem Wirkungsgrad von D,L-Methadon in einer Kombinationsbehandlung gibt.

3.2 Zytotoxisches Potential von D,L-Methadon in An- und Abwesenheit von Doxorubicin in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Zur Beurteilung der Zytotoxizität von D,L-Methadon und Doxorubicin in den drei Zelllinien A204, RD und RH30 wurden zweierlei Methoden eingesetzt:

1. Ein Zellviabilitäts-Assay mit Fokus auf die Stoffwechselaktivität der Zellpopulation: Die gewonnenen Daten sollen Aufschluss auf die Auswirkungen von D,L-Methadon und Doxorubicin auf zelluläre metabolische Prozesse in relativen Abstufungen von 0-100 % geben (mit 100 % Stoffwechselaktivität = Kontrollpopulation).
2. Durchflusszytometrische Apoptose/Nekrose-Messungen über Annexin V und Propidiumiodid (PI): Die gewonnenen Daten sollen aufzeigen, welche Auswirkungen D,L-Methadon und Doxorubicin auf den Zelltod haben und teilen die Zellpopulation hinsichtlich ihres Zustands in die Subgruppen „lebend“, „frühe/späte Apoptose“ und „Nekrose“ ein.

3.2.1 Reduktion der Zellviabilität in Tumorzellen unter Behandlung mit D,L-Methadon und Doxorubicin

Im Rahmen der Charakterisierung und Evaluation eines Wirkstoffs beispielsweise im Kontext der Etablierung einer neuen Behandlung *in vitro*, ist oftmals der erste Schritt ein Toxizitäts-Assay in Form eines Zellviabilität-Assays, um Dosis-Wirkungs-Kurven zu erhalten und den Wirkstoff und seine Effekte auf die verwendeten Zelllinien einschätzen zu können. Aus diesem Grund wurden zunächst mittels MTT-Assay die Auswirkungen von D,L-Methadon als Einzelbehandlung als auch in Kombination mit Doxorubicin auf die Zellviabilität untersucht. Die nachfolgende Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der Behandlung von RMS- und MRT-Zelllinien mit D,L-Methadon in aufsteigender Konzentration.

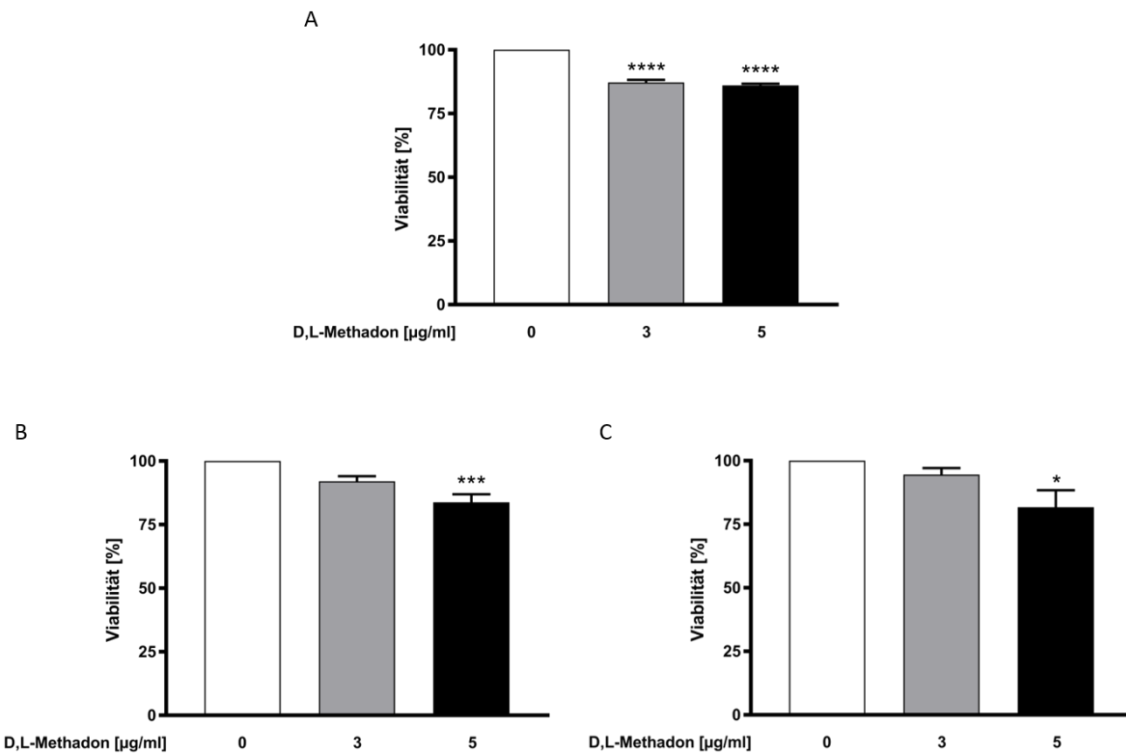


Abbildung 8: Signifikante Reduktion der Zellviabilität bei Behandlung mit D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Analyse erfolgte mittels MTT-Assay. Die MRT-Zelllinie A204 (A) und die RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) wurden mit D,L-Methadon in aufsteigender Konzentration (0,3 und 5 µg/ml) für 72 h behandelt und die Zellviabilität anschließend spektralphotometrisch gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 6 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Dabei zeigte sich, dass die Zellviabilität durch die Einzelbehandlung mit 5 µg/ml D,L-Methadon in allen Zelllinien signifikant auf ca. 80 % reduziert werden konnte (siehe Abb. 8). Besonders ausgeprägt ist der Effekt in der MRT-Zelllinie A204 zu beobachten, hier führte schon eine Behandlung mit 3 µg/ml D,L-Methadon zu einer hochsignifikanten Reduktion der Zellviabilität.

Nachfolgend wurden Versuche mit Zellen unter Kombinationsbehandlung von D,L-Methadon und je zwei Doxorubicin-Konzentrationen (5 µg/ml D,L-Methadon und 0.0125, 0.05 oder 0.2 µg/ml Doxorubicin) durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 9 dargestellt sind:

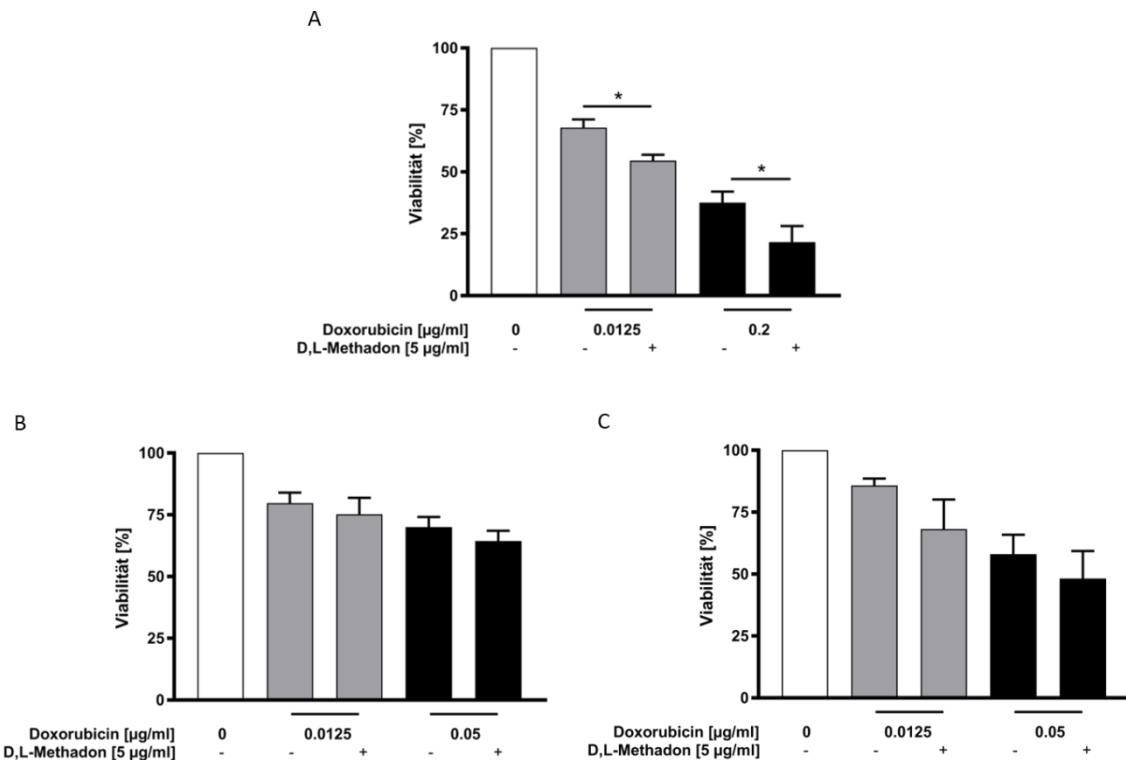


Abbildung 9: Auswirkungen von D,L-Methadon in Kombination mit Doxorubicin auf die Zellviabilität in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Analyse erfolgte mittels MTT-Assay. Die MRT-Zelllinie A204 (A) und die RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) wurden mit 0.0125, 0.05 oder 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin und 5 $\mu\text{g/ml}$ D,L-Methadon für 72 h behandelt und die Zellviabilität anschließend spektralphotometrisch gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 6 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), * $p < 0.05$.

Die Daten in Abb. 9 deuten darauf hin, dass die Stoffwechselaktivität in den Tumorzellen bei Ergänzung der Doxorubicin-Basisbehandlung durch D,L-Methadon zusätzlich gesenkt werden kann. Insbesondere in den A204 Zellen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Zellviabilität mit signifikanten Differenzen zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung von ca. 15-20 %. In RD und RH30 zeigen sich nur leichte Tendenzen der Wirkverstärkung von Doxorubicin durch D,L-Methadon.

Des Weiteren wurden Messungen an gesunden Skelettmuskelzellen durchgeführt, um zu überprüfen, ob D,L-Methadon, abgesehen von seinen Auswirkungen auf Tumorzellen, auch gesunde Körperzellen beeinträchtigt und theoretisch zu zusätzlichen Nebenwirkungen führen könnte. Die Ergebnisse dieser Zellviabilitäts-Analysen sind Abb. 10 zu entnehmen.

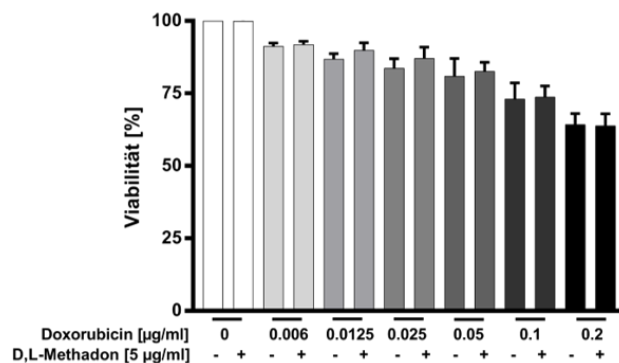


Abbildung 10: Messung der Zellviabilität in gesunden Skelettmuskelzellen unter Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon

Die Analyse erfolgte mittels MTT-Assay. Gesunde Skelettmuskelzellen der Zelllinie SKMC wurden mit Doxorubicin in aufsteigender Konzentration und 5 µg/ml D,L-Methadon für 72 h behandelt und die Zellviabilität anschließend spektralphotometrisch gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 5 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA).

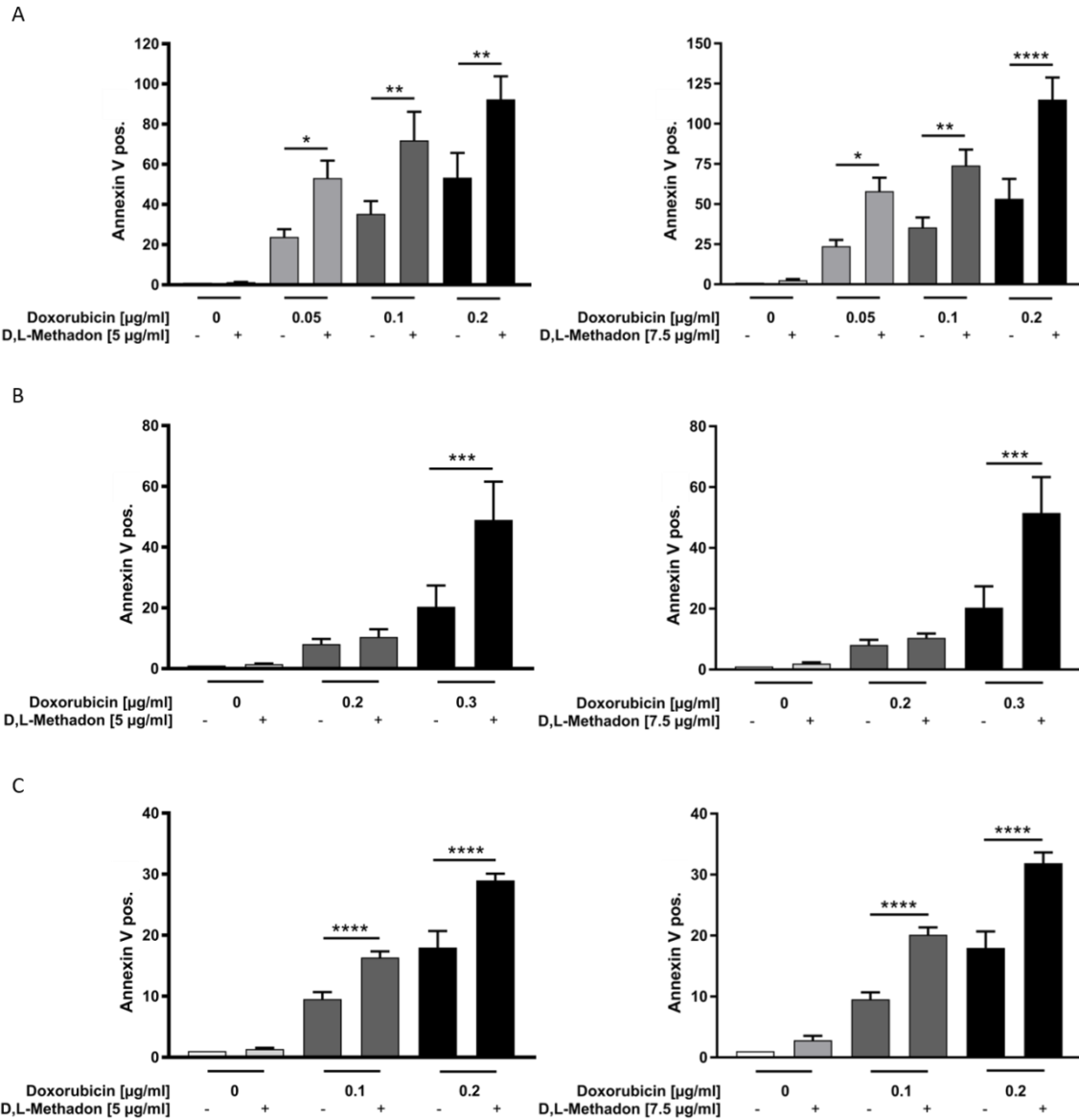
Aus Abb. 10 ist ersichtlich, dass es unter Doxorubicin-Behandlung in Korrelation zur Wirkstoffkonzentration zu einer Reduktion der Zellviabilität mit Abfall der Stoffwechsellistung kommt. Beim Vergleich dieser Werte mit den Ergebnissen der Kombinationsbehandlung zeigte sich allerdings, anders als bei den verwendeten Tumorzelllinien, dass es unter Kombinationsbehandlung mit D,L-Methadon zu keiner Steigerung des zytotoxischen Effektes auf die Skelettmuskelzellen kommt. Auch eine Einzelbehandlung mit D,L-Methadon zeigte bei unveränderter Zellviabilität verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nicht die Effekte, die in Tumorzellen beobachtet wurden (siehe Abb. 10).

3.2.2 Apoptose-Induktion in Tumorzellen unter Behandlung von D,L-Methadon und Doxorubicin

Das Konzept jeder Art von Chemotherapie ist die gezielte und gleichzeitig kontrollierte Zerstörung von Tumorzellen über die Apoptose (Friesen et al., 1996, Kroemer et al., 2009).

Aufbauend auf den Zellviabilitäts-Analysen (siehe Kapitel 3.2.1) wurden zur Quantifizierung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen FACS-Analysen durchgeführt, um einen differenzierteren Einblick auf die zytotoxische Wirkung von D,L-Methadon zu gewinnen. Die erhobenen Daten sind Abb. 11 zu entnehmen, wobei den Graphen mit Darstellung der ausgewerteten Daten (A, B

und C) in D zusätzlich die Zytophotogramme und Histogramme einer Einzelmessung mit A204 Zellen beigefügt sind.



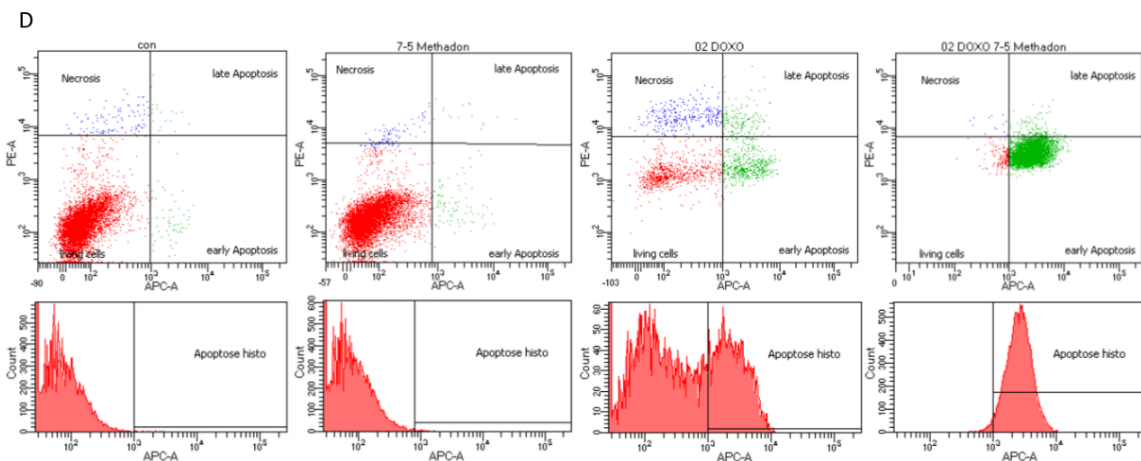


Abbildung 11: Auswirkungen von D,L-Methadon allein und in Kombination mit Doxorubicin auf die Apoptoserate in Rhabdoid- und Rhabdomyosarcom-Zelllinien

Es erfolgte die Behandlung der MRT-Zelllinie A204 (A) und der RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) mit D,L-Methadon (5 und 7.5 µg/ml) für 72 h mit anschließender durchflusszytometrischer Messung. Die Messwerte der unbehandelten Kontrollen wurden jeweils auf 1 normiert. Die Messwerte für die verschiedenen Behandlungsansätze wurden anschließend zur Kontrolle in Relation gesetzt. D zeigt exemplarisch die Zytogramme und Histogramme einer Messung der MRT-Zelllinie A204. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 6 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Aus Abb. 11 geht hervor, dass D,L-Methadon in Kombination mit Doxorubicin die Apoptoserate in allen Zelllinien durchgehend hochsignifikant um bis zu 50 % steigern kann. Mit Ausnahme der RD Zellen, die bei Einsatz von 5 und 7.5 µg/ml D,L-Methadon in der Kombinationsbehandlung sehr ähnlich reagieren, ist bei A204 und RH30 zu erkennen, dass der Faktor, um den die Apoptoserate angehoben wird, sich mit Steigerung der D,L-Methadon-Konzentration erhöht: So wird beispielsweise die Apoptoserate bei 0.2 µg/ml Doxorubicin und 5 µg/ml D,L-Methadon um den Faktor 1.7 erhöht, wohingegen eine Kombination von 0.2 µg/ml Doxorubicin mit 7.5 µg/ml D,L-Methadon zu einer Steigerung der Apoptose um den Faktor 2.2 führte.

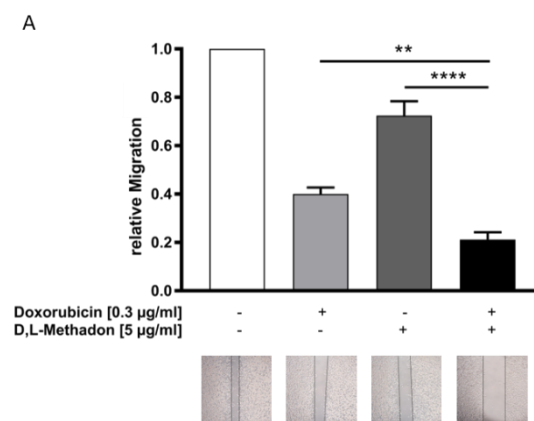
Des Weiteren erwies sich die Nekroserate - unverändert zur Kontrolle - als minimal (Daten nicht gezeigt). Die Daten zeigen eindrücklich, dass D,L-Methadon durch das erkennbar hohe zytotoxische, pro-apoptotische Potential in Tumorzellen wesentlich zu einer Effektivitätssteigerung von Doxorubicin beitragen kann.

3.3 Auswirkungen von D,L-Methadon und Doxorubicin auf Metastasierung und Koloniebildung in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

3.3.1 Inhibition von Zellproliferation und Migration unter Behandlung mit D,L-Methadon und Doxorubicin

Aufbauend auf den Beobachtungen aus Kapitel 3.2 zu D,L-Methadon-induzierter Zytotoxizität stellt sich weiterführend die Frage, inwiefern auch Proliferation und damit einhergehend die Migration der Zellen beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass Doxorubicin zu Veränderungen im Aktin-Zytoskelett führt und über diesen Mechanismus die zelluläre Migration inhibiert (Lee et al., 2017, Pichot et al., 2009, Putri et al., 2016, Croft et al., 2011).

Auf Grundlage dessen wurden Analysen durchgeführt, um zu überprüfen, ob auch diesbezüglich eine Kombinationsbehandlung die Effektivität von Doxorubicin steigern kann. Hierzu wurden Wound-Healing-Assays durchgeführt, eine Methode, die durch regelmäßige Fotodokumentation der Zellen Aussagen über Proliferation und Migration unter bestimmten Behandlungsschemata erlaubt. Die hierbei erhobenen Daten einschließlich einer exemplarischen Fotoreihe jeder Zelllinie sind Abb. 12 zu entnehmen.



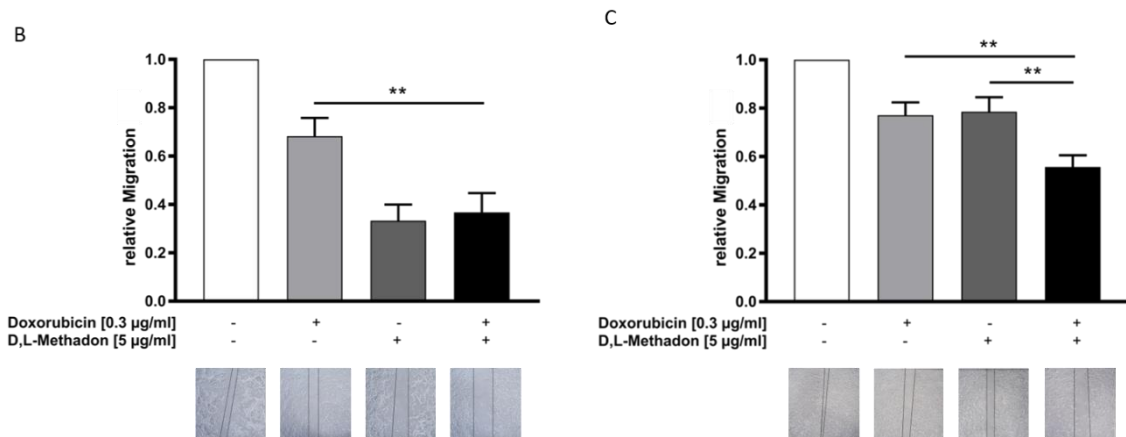


Abbildung 12: Inhibition der Migration durch D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Es erfolgte die Analyse des Migrationsverhaltens der MRT-Zelllinie A204 (A) und die RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) mithilfe des Wound Healing Assays. Nach Anwachsen eines konfluenten, einschichtigen Zellrasens wurde mit einer Pipettenspitze ein Defekt von etwa 1 mm Breite in den Zellrasen gekratzt und die Behandlung von 0.3 µg/ml Doxorubicin und 5 µg/ml D,L-Methadon jeweils allein und in Kombination aufgegeben und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Ergebnis fotodokumentiert und mithilfe der AxioVision Software die Spaltweite ausgemessen und zur 0 h - Kontrolle in Relation gesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 7 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

In allen 3 Zelllinien zeigte sich zunächst unter Doxorubicin-Einzelbehandlung eine verminderte Migration von Tumorzellen, sowie weiterhin eine signifikante Spaltgrößendifferenz zwischen Doxorubicin-Einzelbehandlung und Kombinationsbehandlung mit D,L-Methadon (siehe Abb. 12). Diese Daten legen nahe, dass D,L-Methadon auch hinsichtlich Proliferation und Migration zu einer Effektivitätssteigerung von Doxorubicin beitragen kann. Außerdem konnte auch eine Spaltgrößendifferenz zwischen der Kontrolle und einer D,L-Methadon-Einzelbehandlung beobachtet werden: Der Effekt ist in allen Zelllinien - allerdings besonders deutlich in RD Zellen - zu sehen und spricht für eine Wirkung von D,L-Methadon auch unabhängig von Doxorubicin.

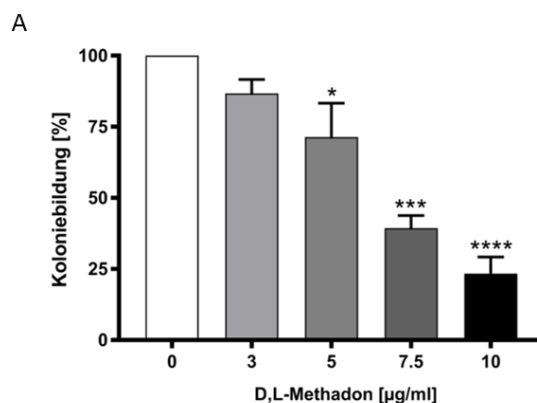
3.3.2 Induktion des klonogenen Zelltods mit Verlust der Fähigkeit zur Reproduktion und Koloniebildung unter Behandlung mit D,L-Methadon

In der Behandlung maligner Erkrankungen ist neben der Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose, der klonogene bzw. reproduktive Zelltod von Bedeutung, im Zuge dessen die Zellen durch genotoxische Schädigung ihre Reproduktionsfähigkeit verlieren (Balcer-Kubiczek, 2012, Eriksson and Stigbrand, 2010, Tannock and Lee, 2001). Dies ist bei Tumorzellen von

besonderem Interesse, da es sich hierbei um Zellen handelt, die sich prinzipiell unbegrenzt teilen können und sich der natürlichen Regulation von Wachstum und Proliferation entzogen haben.

Ausgangspunkt für die Analysen zu Auswirkungen von D,L-Methadon auf die Reproduktionsfähigkeit der Zellen war die Erkenntnis, dass D,L-Methadon zwar unfähig ist als einzelner Wirkstoff Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, allerdings zu einer Reduktion der Stoffwechsellistung und zu einer Inhibition der Zellproliferation führt (siehe Abb. 8, 9, 11 und 12).

Mithilfe des Colony Forming Assays (CFA), einer Methode zur Beurteilung der Reproduktionsfähigkeit einzelner Zellen, sollte geklärt werden, ob D,L-Methadon im Rahmen seiner hemmenden Einflüsse auf zelluläre Prozesse den klonogenen Zelltod in Tumorzellen induzieren kann und sich somit das Überleben von Tumorzellpopulationen durch Wachstum neuer Zellklone ausgehend von einzelnen, überlebenden Zellen reduzieren lässt. Die Ergebnisse der CFA-Analysen sind nachfolgend in Abb. 13 dargestellt.



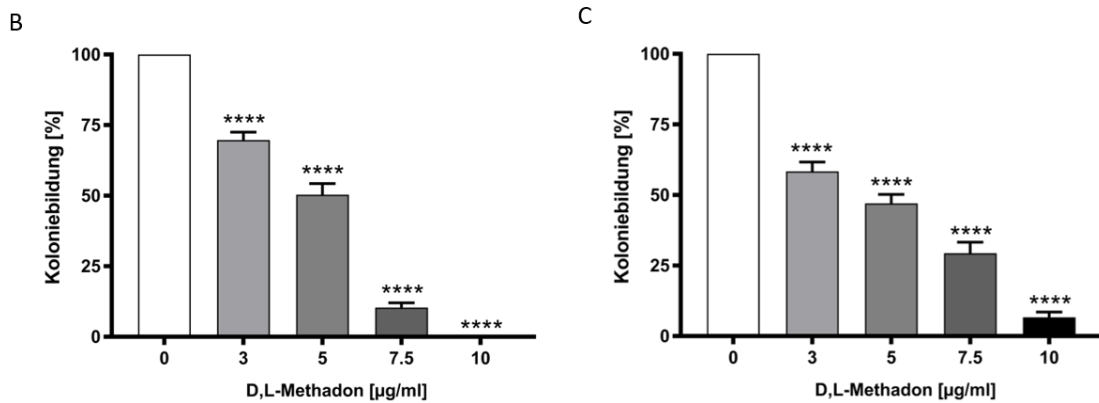


Abbildung 13: Induktion des klonogenen Zelltods mit verminderter Bildung neuer Kolonien bei Behandlung mit D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Zur Analyse wurde der Colony Forming Assay (CFA) eingesetzt. Zellen der MRT-Zelllinie A204 (A) und der RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) wurden mit D,L-Methadon in aufsteigender Konzentration (3, 5, 7.5 und 10 µg/ml) behandelt und für 1-2 Wochen inkubiert. Anschließend wurden die neu angewachsenen Kolonien ausgezählt und zur unbehandelten Kontrolle in Relation gesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Unter Behandlung mit D,L-Methadon in aufsteigender Konzentration (3, 5, 7.5 und 10 µg/ml) ließ sich eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der Koloniebildung nach Behandlung mit D,L-Methadon nachweisen, die in allen Zelllinien einen sehr ähnlichen Verlauf nahm.

3.4 Molekulare pro-apoptotische Wirkmechanismen von D,L-Methadon allein sowie als Teil der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Zellviabilität und Apoptose, sowie zu Proliferation, Migration und Stammzeleigenschaften mit Koloniebildung unter Behandlung von Doxorubicin mit D,L-Methadon forderten Erklärungen auf molekularer Ebene: Hierzu wurden Versuche durchgeführt, die Hinweise liefern sollten, über welche Wege und auf welchen Ebenen die Tumorzellen inhibiert werden, um mögliche Wirkmechanismen der Kombinationsbehandlung aufzudecken.

3.4.1 Gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies sind toxische Derivate aus molekularem Sauerstoff, die durch verschiedene Nebenreaktionen gebildet werden und eine hohe Reaktivität und chemischen Aggressivität aufweisen. Das Superoxid-Radikal-Anion O_2^- gilt als das toxischste ROS, weitere reaktive Sauerstoffspezies sind das Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$), Hydroperoxyl-Radikal ($HOO\cdot$), Peroxylradikal ($ROO\cdot$) und Alkoxyradikal ($RO\cdot$), sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid ($ROOH$), Ozon (O_3), Hypochlorit-Anion (OCl^-) und Singulett-Sauerstoff (O_2) (Schieber and Chandel, 2014, Thannickal and Fanburg, 2000). Im Organismus entstehen reaktive Sauerstoffspezies als Produkte des physiologischen, aeroben Stoffwechsels und im Normalfall verfügt die Zelle über effektive Schutz- und Reparaturmechanismen, um die reaktiven Sauerstoffspezies abzubauen und entstandene Schäden an DNA und zellulären Proteinen sowie Lipidperoxidationen an Membranmolekülen zu reparieren. Bis zu einem gewissen Grad ist ROS insofern physiologisch und in vielen Stoffwechselprozessen sogar notwendig (Schieber and Chandel, 2014, Thannickal and Fanburg, 2000). Übersteigt die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies in einer Zelle jedoch ein gewisses Maß, schädigen sie Zellen und Gewebe und führen über gesteigerten oxidativen Stress mit Zusammenbruch der zellulären Redoxsysteme und Mangel an Antioxidantien über die Induktion apoptotischer Signalwege zum Zelltod (Circu and Aw, 2010).

Die gezielte Exposition der Zelle mit erhöhten Leveln an reaktiven Sauerstoffspezies ist in der Onkologie eine bewährte Strategie zur Bekämpfung von Tumorzellen. Auch das Anthrazyklin Doxorubicin generiert oxidativen Stress in der Zelle: Das Medikament enthält in seiner Molekülstruktur ein Quinon, das durch zelluläre Reduktasen (Cytochrom P 450) in ein äußerst instabiles Semiquinon-Radikal umgesetzt werden kann. Bei Rückfall des reduzierten Doxorubicin in die stabile, oxidierte Form entsteht durch Abgabe eines freien Elektrons an molekularen Sauerstoff ein Hyperoxid Anion (O_2^-), welches über die genannten Mechanismen die Zelle in die Apoptose führt (Finn et al., 2011, Gewirtz, 1999). Aufbauend auf den Kenntnissen zur Wirkung von Doxorubicin auf ROS, wurden FACS-Messungen (siehe Abb. 14) mit Zellen unter Behandlung

von Doxorubicin und D,L-Methadon durchgeführt, um zu ermitteln, ob auch auf dieser Ebene eine Verbesserung der Chemotherapie durch die Kombination der beiden Medikamente erreicht werden kann.

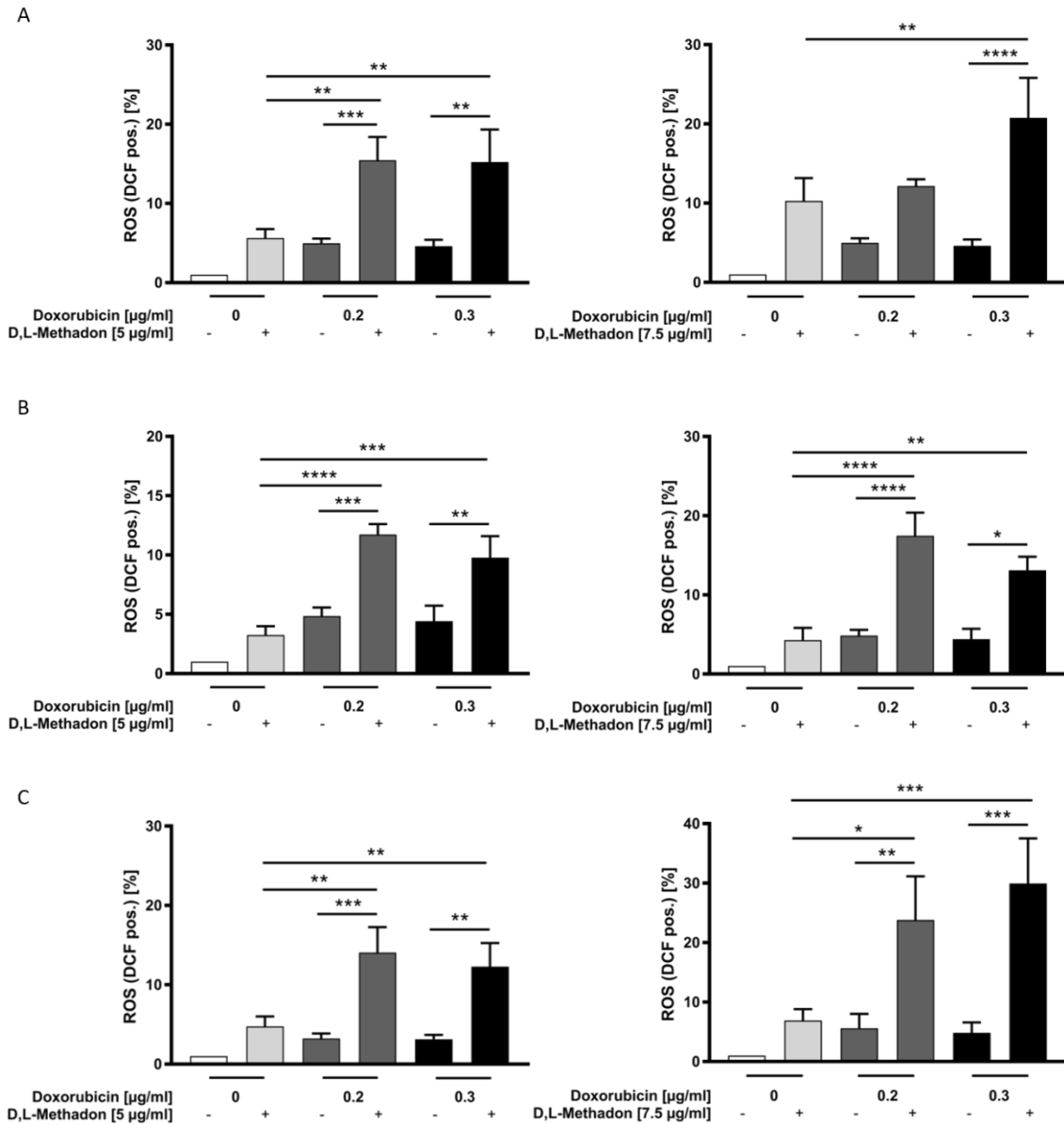


Abbildung 14: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter Behandlung mit D,L-Methadon in An- und Abwesenheit von Doxorubicin mit konsekutiv erhöhtem oxidativem zellulärem Stress

Zur Beurteilung der Auswirkungen von D,L-Methadon auf den Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies in der MRT-Zelllinie A204 (A) und den RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) erfolgte eine Behandlung mit 5 µg/ml (links) und 7.5 µg/ml (rechts) D,L-Methadon und 0.2 und 0.3 µg/ml Doxorubicin über einen Zeitraum von 72 h mit anschließender Färbung der Zellen mit 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFDA) und durchflusszytometrischer Messung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 6 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Es zeigte sich, dass D,L-Methadon in Kombination mit Doxorubicin in allen Zelllinien (A204, RD und RH30) einen signifikanten Einfluss auf die ROS-Bildung hat. Am ausgeprägtesten ist der Effekt in der Rhabdoid-Zelllinie A204 und der Rhabdomyosarkom-Zelllinie RH30 zu sehen: Bei Behandlung der Zellen mit D,L-Methadon in Kombination mit Doxorubicin konnte die ROS-Bildung verglichen mit der Doxorubicin-Einzelbehandlung um das 4-5-fache gesteigert werden. In den RD Zellen erreichten die ROS-Spiegel unter Kombinationsbehandlung ungefähr das 2-3-fache der Spiegel unter Doxorubicin - Einzelbehandlung. Interessanterweise zeigt sich außerdem, dass die ROS-Bildung bei Erhöhung der Doxorubicin-Konzentration im Wesentlichen gleich bleibt und allein durch die Zugabe von D,L-Methadon eine Steigerung möglich scheint. Für D,L-Methadon gilt dasselbe: mit Ausnahme der A204 Zellen, die in der D,L-Methadon-Einzelbehandlung bei Erhöhung der Konzentration von 5 auf 7.5 µg/ml eine Verdopplung der ROS-Produktion von ca. 5 % auf 10 % aufweisen, zeigen sich in den RD und RH30 Zellen nur minimale Differenzen. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass sowohl Doxorubicin, also auch D,L-Methadon alleine eine Basisrate an ROS induzieren, diese aber durch Konzentrationssteigerung nicht besonders effektiv gesteigert werden kann. Die Kombinationsbehandlung jedoch ermöglicht eine deutliche Steigerung, wobei eine Vervielfachung der ROS-Bildung um das 2-5-fache erreicht werden kann.

Es zeigt sich außerdem, dass der Faktor, um den die ROS-Bildung gesteigert wird, nicht zwingendermaßen mit der eingesetzten Konzentration D,L-Methadon korreliert: In A204 Zellen führt beispielsweise eine Kombination von 0.2 µg/ml Doxorubicin mit 5 µg/ml D,L-Methadon zu einer Verdreifachung der ROS-Produktion, wohingegen Zellen unter Behandlung mit derselben Doxorubicin-Konzentration, aber 7.5 µg/ml D,L-Methadon nur mit einer Verdopplung der ROS-Produktion reagieren.

Zusammenfassend führt D,L-Methadon als Kombinationspartner von Doxorubicin zu einer signifikanten Steigerung der intrazellulären ROS-Produktion.

3.4.2 Erhöhte intrazelluläre Doxorubicin-Wirkspiegel durch verbesserte Doxorubicin-Aufnahme und Reduktion des Doxorubicin-Effluxes in malignen Rhabdoidtumoren

Die Erkenntnis, dass D,L-Methadon den MDR1-Kanal (multi drug resistance 1-Kanal) - einen ABC-Transporter (ABC = ATP binding cassette), der maßgeblich für die Entstehung der Medikamentenresistenz von Zellen verantwortlich ist - inhibiert und somit den Efflux von Medikamenten vermindert und sich höhere Wirkspiegel aufbauen können, ist nicht neu (Bouer et al., 1999, Callaghan and Riordan, 1993, Crettol et al., 2007, Shen et al., 2008): 1993 veröffentlichten Callaghan und Riordan die Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen mit medikamenten-resistenten Ovarialzellen zur Aufnahme von D,L-Methadon: Diese zeigten erstmals, dass D,L-Methadon ein Substrat des MDR1-Kanals ist und ein Transport nach extrazellulär über diesen stattfindet. Des Weiteren stellte sich heraus, dass D,L-Methadon eine deutlich höhere Affinität als andere Substrate aufwies und so dazu fähig war, über kompetitive Inhibition des Kanals die Akkumulation anderer Substrate wie beispielsweise des Vincaalkaloids Vinblastin in chemoresistenten Zellen herbeizuführen (Callaghan and Riordan, 1993).

Der Versuch sollte für RMS- und MRT-Zellen klären, inwieweit dies auch für das Anthrazyklin Doxorubicin gilt und ob durch eine Behandlung der Tumorzellen mit D,L-Methadon die intrazellulären Wirkspiegel auf einem höheren Niveau gehalten werden können. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Doxorubicin und im Anschluss für unterschiedlich lange Zeiträume mit D,L-Methadon behandelt. Nach Ablauf der Behandlungszeiten von D,L-Methadon wurden die intrazellulären Doxorubicin-Wirkspiegel über die Eigenfluoreszenz des Medikaments durchflusszytometrisch quantifiziert und anschließend der relative Doxorubicin-Verlust der Zellpopulation in Bezug auf eine Kontrollpopulation errechnet. Die Ergebnisse dieser Analysen sind nachfolgend in Abb. 15 dargestellt.

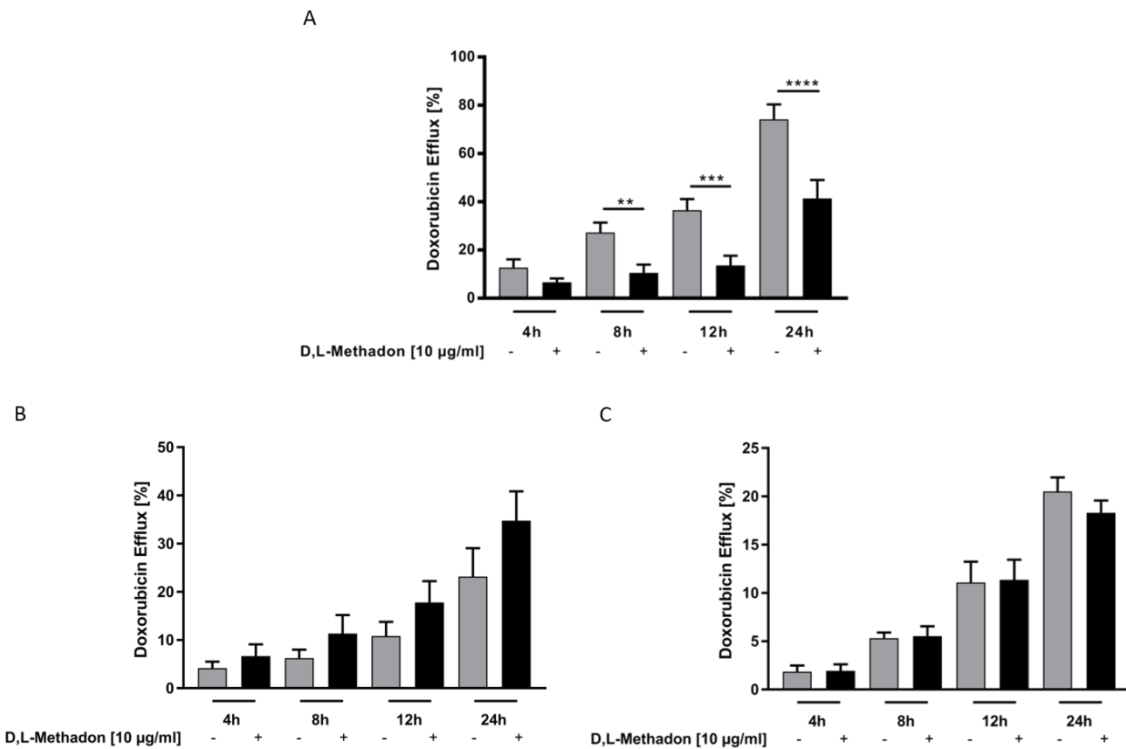


Abbildung 15: Auswirkungen von D,L-Methadon auf den Doxorubicin-Efflux in der Rhabdoid-Zelllinie A204 und den Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH30

Zur vergleichenden Analyse des zellulären Gehalts an Doxorubicin wurden mit 0.4 µg/ml Doxorubicin behandelte Zellen der MRT-Zelllinie A204 (A) und der RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) für 4 h, 8 h, 12 h und 24 h mit 10 µg/ml D,L-Methadon behandelt und daraufhin der Gehalt an Doxorubicin durchflusszytometrisch über die Eigenfluoreszenz des Medikaments erschlossen. Hierbei wurde die Eigenfluoreszenz der über Doxorubicin markierten Zellen im PE-Kanal gemessen und anschließend die Fluoreszenzintensität bei Doxorubicin-Verlust in Relation zum Bezugsgate der 0 h - Kontrolle gesetzt und in der Graphik in % auf der y-Achse aufgetragen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 5 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Die in Abb. 15 dargestellten Daten decken erhebliche Unterschiede zwischen der Rhabdoid-Zelllinie und den beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien auf:

Während die Rhabdoid-Zelllinie A204 eine signifikante Reduktion des Doxorubicin-Efflux aufweist und es unter D,L-Methadon zu bis zu 50 % weniger Doxorubicin-Efflux mit deutlich erhöhten und länger anhaltenden intrazellulären Wirkspiegeln kommt, geben die Daten für RD und RH30 keinen Anhalt für einen positiven Effekt von D,L-Methadon.

Auf Grundlage des stark verminderten Doxorubicin-Verlustes bei Inhibition des MDR1-Kanals in den Efflux-Untersuchungen der A204-Zellen stellte sich die Frage, ob D,L-Methadon über diesen Wirkmechanismus hohe Wirkspiegel nicht nur länger aufrechterhalten kann, sondern es auch zu einem schnelleren Aufbau

eines therapeutischen Spiegels in der Zelle kommt. Um diese Frage zu klären wurden Influx-Messungen durchgeführt, die einen ähnlichen Versuchsaufbau aufweisen, mit dem Unterschied, dass die Zellen zum selben Zeitpunkt mit Doxorubicin und D,L-Methadon behandelt wurden und zu verschiedenen Zeitpunkten die Wirkspiegel der Zellen untersucht wurden.

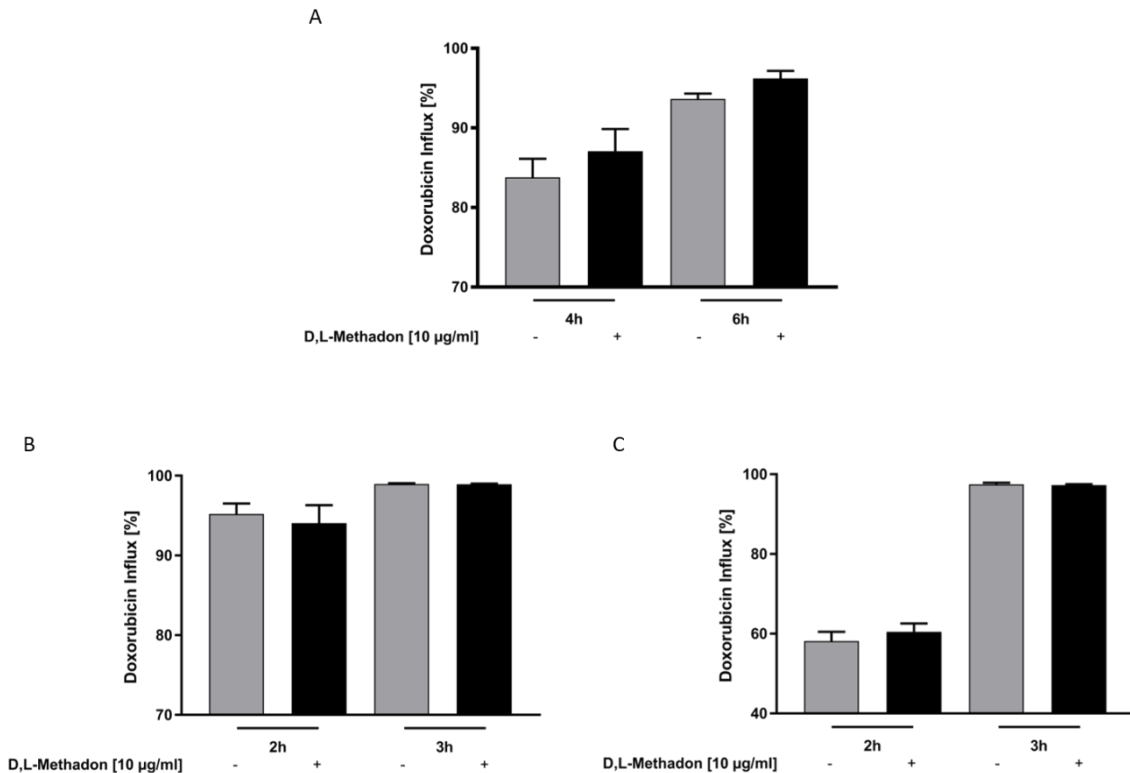


Abbildung 16: Auswirkungen von D,L-Methadon auf den Doxorubicin-Influx in der Rhabdoid-Zelllinie A204 und den Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH30

Die MRT-Zelllinie A204 (A) und die RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) wurden mit 0.4 µg/ml Doxorubicin sowie mit der Kombinationsbehandlung (= 0.4 µg/ml Doxorubicin + 10 µg/ml D,L-Methadon) behandelt und anschließend nach 2 h, 3 h, 4 h und 6 h der Gehalt an Doxorubicin der Zellpopulation über die Eigenfluoreszenz von Doxorubicin durchflusszytometrisch ermittelt. Dabei wurde die Eigenfluoreszenz der über Doxorubicin markierten Zellen im PE-Kanal gemessen und die Verschiebung der Zellwolke bei Doxorubicin-Aufnahme in Relation zum Bezugsgate der 0 h - Kontrolle gesetzt und in der Graphik in % auf der y-Achse aufgetragen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA).

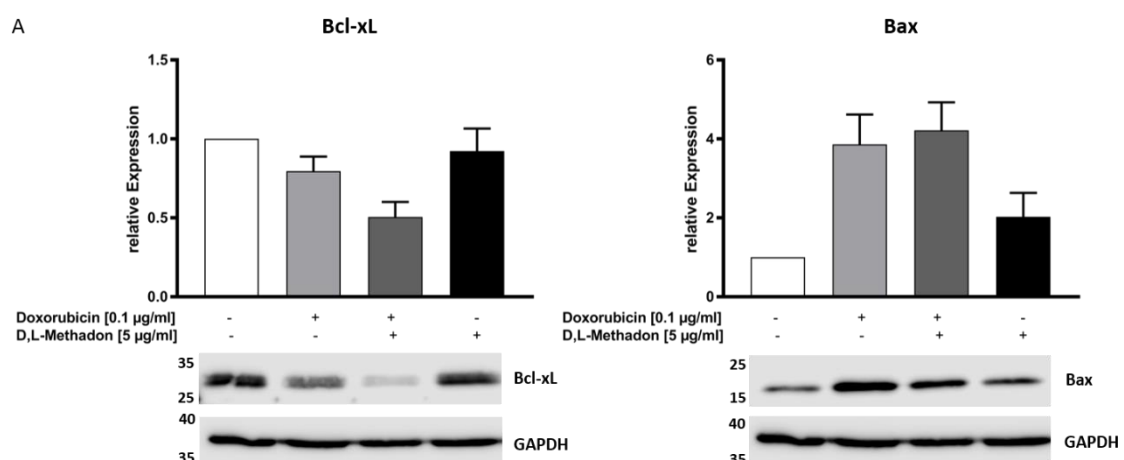
Abb. 16 zeigt die Ergebnisse der Influx-Messungen: Es stellte sich heraus, dass es in A204-Zellen unter Behandlung mit D,L-Methadon erneut zu tendenziell erhöhten Wirkspiegeln in den Zellen kam. Die Messungen der beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH30 ergaben, wie auch in den Efflux-Messungen, keine Differenzen zwischen den Vergleichsgruppen.

Die Analysen zeigen sowohl bei Anfluten von Doxorubicin, als auch in der Phase der Elimination in der Rhabdoid-Zelllinie A204 in Anwesenheit von D,L-Methadon deutlich erhöhte intrazelluläre Doxorubicin-Wirkstoffspiegel. D,L-Methadon führt demzufolge zu einer Akkumulation des Medikaments in den Tumorzellen und in der Konsequenz zu einer Wirkverstärkung von Doxorubicin.

3.4.3 Beeinflussung insuffizienter mitochondrialer Apoptose-Signalwege durch Behandlung mit D,L-Methadon

Die mitochondrial vermittelte Apoptose unterliegt im Wesentlichen der Regulation durch Proteine der Bcl-2 Proteinfamilie (b-cell lymphoma 2) (Villanova et al., 2018). Die Bcl-2 Proteinfamilie umfasst eine Gruppe von Proteinen, die nach ihrer Aktivität in pro- und anti-apoptotische Proteine unterteilt werden und deren Verhältnis zueinander darüber unterscheidet, ob eine Zelle überlebt oder bei Überwiegen von pro-apoptotischen Signalen die intrinsische Apoptose eingeleitet wird.

Anhand von Western Blot Analysen sollte untersucht werden, ob sich eine Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon auch auf die Signalkaskade der intrinsischen Apoptose in Tumorzellen auswirkt. Hierzu wurden stellvertretend zunächst zwei Bcl-2 Proteine untersucht, Bcl-xL mit anti-apoptotischer Wirkung und Bax mit pro-apoptotischer Wirkung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 17 dargestellt.



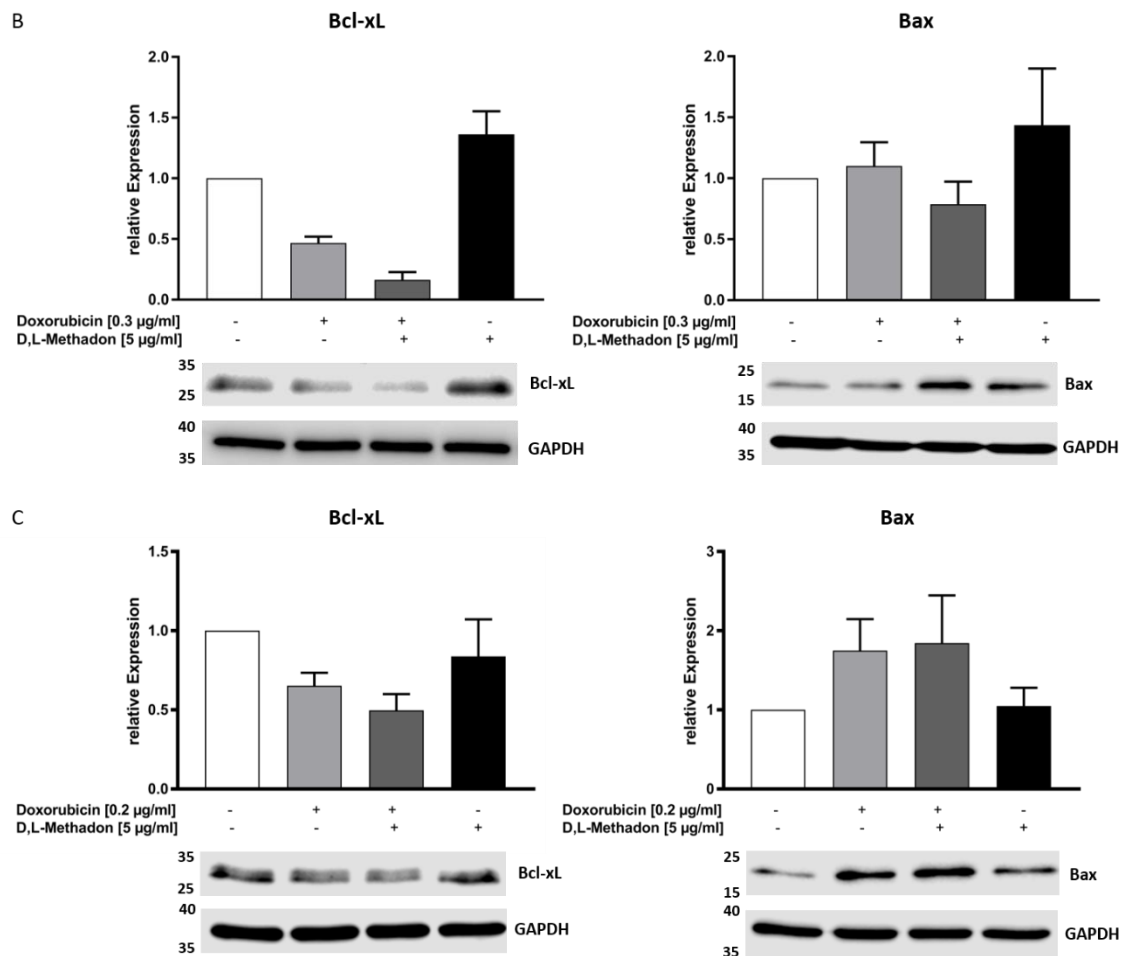


Abbildung 17: Expressionsanalysen der zwei Bcl-2 Proteine Bcl-xL (anti-apoptotisch) und Bax (pro-apoptotisch) zur Untersuchung intrinsischer Apoptose-Signalwege unter Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon

Es erfolgten Western Blot Analysen zur Ermittlung der molekularen Signalkaskade von Doxorubicin und D,L-Methadon. Hierzu wurden die MRT-Zelllinie A204 (A) und die RMS-Zelllinien RD (B) und RH30 (C) für 48 h mit 0.1 µg/ml (A204), 0.2 µg/ml (RH30) und 0.3 µg/ml (RD) Doxorubicin behandelt, Proteinlysate hergestellt und anschließend die Expression der Bcl-2 Proteine Bcl-xL und Bax semiquantitativ ermittelt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 6 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA).

Bei Betrachtung der Expression von Bcl-xL zeigte sich in der MRT-Zelllinie A204 sowie in den beiden RMS-Zelllinien RD und RH30 unter Kombinationsbehandlung durchgehend eine verstärkte Abnahme der Expression verglichen mit der Doxorubicin- bzw. D,L-Methadon-Einzelbehandlung (Abb. 17 A, B und C, links). Besonders ausgeprägt ist der Effekt bei der RMS-Zelllinie RD, hier führt die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Doxorubicin-Einzelbehandlung zu einer Verminderung der Proteinexpression um mehr als die Hälfte (Abb. 17 C, links). In der Analyse des pro-apoptotischen Proteins Bax zeigten sich beim Vergleich der Doxorubicin-Einzelbehandlung mit der

Kombinationsbehandlung in Einzelversuchen Unterschiede in der Expression, die allerdings in der zusammenfassenden Auswertung aller Einzelversuche nicht ins Gewicht fallen und somit schlussendlich keine veränderte Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 17 A, B und C, rechts).

4 DISKUSSION

Das Rhabdomyosarkom ist das häufigste Weichteilsarkom und nach ZNS-Tumoren, Lymphomen und Neuroblastomen der vierthäufigste, solide Tumor im Kindes- und Jugendalter (Walterhouse and Watson, 2007). Maligne Rhabdoidtumoren präsentieren sich bei ZNS-Manifestation (AT/RT) als häufigster Hirntumor im Alter von < 2 Jahren (Woehrer et al., 2010). Viele pädiatrische onkologische Patienten erfahren im Verlauf ihrer Erkrankung starke Schmerzen, die eine systemische Behandlung mit Opioiden erfordern (Friedrichsdorf and Postier, 2014). In Untersuchungen der letzten Jahre fanden sich zahlreiche Hinweise für eine pharmakologische Wirkung der Opiode außerhalb der Schmerzminderung auf ZNS-Ebene: Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen Opioidrezeptoren exprimieren und durch die Opioid-Behandlung Proliferation und Tumorprogression, sowie Apoptose, Angiogenese, Metastasierung und das Auftreten von Rezidiven beeinflusst werden kann (Bohn et al., 1998, Brar and Lowry, 1999, Chatikhine et al., 1994, Maneckjee et al., 1990, Nylund et al., 2008, Roth and Barchas, 1986, Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013, Hatzoglou et al., 1996, Jemal et al., 2006, Kampa et al., 2001, Maneckjee and Minna, 1994, Sasamura et al., 2002, Simon and Arbo, 1986, Singh et al., 2011, Sueoka et al., 1998, Tegeder and Geisslinger, 2004, Yeager et al., 2002). Allerdings lassen die stellenweise sehr unstimmgigen Ergebnisse keine eindeutige Aussage darüber zu, ob Opiode schlussendlich Tumorprogression fördern oder hemmen (Tegeder and Geisslinger, 2004).

Die Diskussion um die Kontroversen hinsichtlich Opioiden und ihrer Anwendung bei onkologischen Patienten ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung geraten und führte zu zahlreichen, weiterführenden und differenzierten Analysen der Wirkung einzelner Opiode bei verschiedensten Tumorerkrankungen. An dieser Stelle setzen auch die Untersuchungen der vorliegenden Dissertationsschrift an: Ziel der Forschungsarbeit war es, neue Erkenntnisse über die *in vitro* Wirkung des Opioids D,L-Methadon in Tumorzellen zweier pädiatrischer Tumoren, dem malignen Rhabdoidtumor und dem

Rhabdomyosarkom, zu gewinnen und im Zuge dessen ein besseres Verständnis für die Interaktion zwischen D,L-Methadon und Tumorzellen zu entwickeln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals mit Fokus auf solide, pädiatrische Tumoren eine deutliche Zytotoxizitätssteigerung von Doxorubicin durch die Kombination mit dem Opioid D,L-Methadon. Außerdem sprechen die Ergebnisse dafür, dass D,L-Methadon nicht nur eine unterstützende Funktion in der Kombinationsbehandlung hat, sondern auch eigene, unabhängige Mechanismen besitzt, den Stoffwechsel der Tumorzellen zu beeinflussen.

4.1 Zytotoxische Auswirkungen von D,L-Methadon in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien (Apoptose und Viabilität)

Erstmals wurden die Auswirkungen von D,L-Methadon in Zellen eines malignen Rhabdoidtumors und eines embryonalen/alveolären Rhabdomyosarkoms untersucht und es konnte dabei eine erhebliche Zytotoxizität nachgewiesen werden. Zur Beurteilung des zytotoxischen Potentials von D,L-Methadon allein und in Kombination mit Doxorubicin wurden Analysen mit behandelten RMS- und MRT-Zellen durchgeführt. Der Fokus lag dabei auf Veränderungen hinsichtlich Zellviabilität und Apoptose. Mithilfe eines Zellviabilität-Assays wurden Veränderungen der Stoffwechselaktivität gemessen. Allerdings erlauben die Ergebnisse keine Aussagen darüber, ob es sich bei einer Reduktion der Zellviabilität um eine homogene Reduktion der Stoffwechselaktivität aller Zellen handelt oder ob einzelne Zellen apoptotisch sind und somit die Gesamtmessung der Population eine verminderte Zellviabilität aufweist. Aus diesem Grund wurden zusätzlich FACS-Messungen mit Annexin V- und PI-Färbungen durchgeführt, um an dieser Stelle einen differenzierteren Einblick zu gewinnen und um zu überprüfen, ob die Tumorzellen durch die Behandlung primär über Apoptose oder Nekrose zugrunde gehen.

Die Differenzierung zwischen „Zellviabilität-Reduktion“ und „Apoptose-Induktion“ ist im Zusammenhang mit den Auswirkungen einer D,L-Methadon-Einzelbehandlung wichtig, da hier Unterschiede in den Zellviabilitäts-Messungen und den Apoptose-Messungen zu finden sind.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit Doxorubicin zu einer Reduktion der Zellviabilität mit einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate in den FACS-Analysen führte. Zudem zeigte sich jeweils eine deutliche Steigerung der beobachteten Effekte bei zusätzlicher Behandlung mit D,L-Methadon (siehe Kap. 3.2 Abb. 8-11). Dies bestätigt die Ergebnisse aus *in vitro* Analysen anhand von Leukämie- und Glioblastom-Zelllinien, die in den letzten Jahren von Friesen et al. veröffentlicht wurden: Bei Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon konnte gezeigt werden, dass es zu einem deutlichen Anstieg der Apoptose kam, was erste Hinweise dafür lieferte, dass D,L-Methadon in Kombination mit Doxorubicin eine ausgeprägte, tumorspezifische Zytotoxizität aufweist (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2008, Friesen et al., 2013). Friesen et al. zeigt, dass es bei Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon (in aufsteigender Konzentration von 0.5-10 µg/ml D,L-Methadon) zu einer Steigerung der Apoptoserate um den Faktor 4 in Leukämiezellen und um den Faktor 8 in Glioblastomzellen kommt (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013). Unsere Messungen ergaben in RMS- und MRT-Zellen nach 72 h bei Behandlung mit 5 bzw. 7.5 µg/ml D,L-Methadon eine signifikante Verdopplung der Apoptose. Interessanterweise zeigten die Messungen anhand der Leukämie- und Glioblastom-Zelllinien, dass die Steigerung von D,L-Methadon in der Kombinationsbehandlung keinesfalls linear mit der nachfolgend gemessenen Apoptoserate korreliert: Bei Vergleich der Effekte unter 1 und 10 µg/ml D,L-Methadon zeigt sich in Leukämiezellen maximal ein Steigerung der Apoptose von ca. 50 % (1 µg/ml) auf 65 % (10 µg/ml). In Glioblastomzellen war der Effekt - ebenfalls beim Vergleich von 1 und 10 µg/ml - mit einer Verdopplung der Apoptose D,L-Methadon etwas stärker ausgeprägt (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013). An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die hohen Wirkstoffkonzentrationen nötig sind und mögliche Nebenwirkungen von D,L-Methadon rechtfertigt oder ob auch niedrigere Konzentrationen (wie die von uns verwendeten 5 bzw. 7.5 µg/ml D,L-M.) bei längerer Behandlungsdauer ausreichend sind. Grundsätzlich lässt sich jedenfalls sagen, dass die Kombination von Doxorubicin mit D,L-Methadon eine sinnvolle Strategie ist, die zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen zu erhöhen.

Ein wesentliches Merkmal speziell bei Leukämie-Zelllinien ist die Reaktion der Zellen mit Apoptose-Induktion auf D,L-Methadon nicht nur in Form einer Kombinationstherapie, sondern auch als Einzeltherapie: Messungen ergaben bei 24- und 48-stündiger Behandlung mit D,L-Methadon (0.1-10 µg/ml) deutlich gesteigerte Apoptoseraten, wohingegen bei Glioblastom- und den von uns verwendeten RMS- und MRT-Zelllinien D,L-Methadon alleine zu keinem Anstieg der Apoptose führte (Friesen et al., 2014). In den Zellviabilitäts-Analysen hingegen konnten wir in unseren RMS- und MRT-Zelllinien erstmals eine signifikante Reduktion der Zellviabilität unter D,L-Methadon beobachten. D,L-Methadon führt demzufolge zwar zu einer Inhibition des zellulären Stoffwechsels, verfügt jedoch über keine eigenen Mechanismen, die die Zelle unabhängig von Doxorubicin in die Apoptose leiten können.

4.2 Auswirkungen von D,L-Methadon auf Migration und Adhäsion in Rhabdoid- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien (Migration und CFA)

Im weiteren Verlauf wurde das Migrationsverhalten der Tumorzellen *in vitro* in einer 2D-Migrations-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass es unter Kombinationstherapie zu einer signifikant stärkeren Inhibition der Zellmigration als bei Doxorubicin-Einzelbehandlung kommt und D,L-Methadon somit auch diesbezüglich zu einer Wirkverstärkung von Doxorubicin führt (siehe Kap. 3.3.1 Abb. 12). Auch an Makrophagen konnte bereits gezeigt werden, dass es bei μ -Opioidrezeptor-Aktivierung zu einer Inhibition der Adhäsion und in der Folge zur verminderten Zellmigration kommt, was unsere Ergebnisse zu bestätigen scheint (Patel et al., 2003).

„Zellmigration“ ist ein Überbegriff für verschiedene Formen der aktiven Ortsveränderung von Zellen und schließt dabei die ungerichtete Spontanbewegung ebenso wie auch die gerichtete Bewegung entlang eines Gradienten chemotaktischer Zytokine mit ein. Außerdem wird die Migration isolierter Einzelzellen (amöboide oder mesenchymale Migration) der kollektiven Migration ganzer Zellverbände gegenübergestellt. Es bestand lange Zeit die Annahme, dass Tumormetastasierung über die Ablösung einzelner Tumorzellen

geschieht, die in umliegende Blut- und Lymphgefäße gelangen und hierüber verstreut werden und Sekundärtumore bilden. Neuere Daten sprechen jedoch zunehmend dafür, dass Tumordissemination im Wesentlichen auf der Ablösung kohärenter Zellgruppen basiert (Trepap et al., 2012, Christiansen and Rajasekaran, 2006, Friedl and Gilmour, 2009, Sahai, 2005). Die Annahme stützt sich auf zweierlei Beobachtungen, einerseits kommen disseminierte Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäßen häufig in Clustern vor und andererseits zeigen auch histopathologische Befunde verschiedenster Primärtumoren, dass die Randzellen des Tumors im umliegenden Bindegewebe ebenfalls flächenhaft in Zellnestern vorliegen oder zu langen Ketten aneinandergereiht sind (Kawakami et al., 2009, Macpherson et al., 2007).

Der verwendete Wound Healing Assay misst die zeitabhängige Migration von Zellen eines einschichtigen Zellrasens in eine direkt angrenzende, zellfreie Fläche und erlaubte somit eine Analyse des 2D Migrationsverhaltens der von uns verwendeten RMS- und MRT-Zellen unter Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon. In den Versuchen zeigte sich, dass es sowohl durch Einzelbehandlung mit Doxorubicin bzw. D,L-Methadon als auch bei Kombination beider Wirkstoffe in RMS- und MRT-Zellen zu einem deutlich langsameren Zusammenwachsen der zellfreien Fläche kommt, was ein Hinweis auf ein gestörtes Migrationsverhalten darstellt.

Für Doxorubicin konnte bereits gezeigt werden, dass über die Reorganisation von Aktin die zytoskelettale Stabilität der Zelle beeinflusst wird und sich Doxorubicin so auf das Migrationsverhalten von Zellen auswirkt (Finn et al., 2011, Gewirtz, 1999, Lee et al., 2017). Croft et al. konnte zeigen, dass es durch genotoxischen Stress bei Doxorubicin-Behandlung neben einer gesteigerten ROS-Bildung zu Beeinflussung Rho-abhängiger Signalwege kommt (Croft et al., 2011). Rho-GTPasen sind Schlüsselproteine, die für die Regulation und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts migrierender Zellen zuständig sind und somit besonders in die Tumormetastasierung und Angiogenese involviert sind (Ridley, 2015).

Im Hinblick auf D,L-Methadon spielen möglicherweise die Interaktionen mit Ionenkanälen und die damit einhergehende Modulation des transmembranären

Potentials eine Rolle. Bei Aktivierung des μ -Opioidrezeptors kommt es zur Aktivierung des Kir3-Kanals mit Ausstrom an Kalium-Kationen sowie zu einer Inhibition von T-, L- und N-Typ Kalziumkanälen mit einer Reduktion des transmembranären Kalzium-Stroms (Al-Hasani and Bruchas, 2011, Sesena et al., 2014). Die Grundlage gerichteter Migration stellen lokale Kalzium-Ströme dar, die zum Aufbau eines zyttoplasmatischen Kalzium-Gradienten innerhalb der Zelle führen und in der Folge dessen eine Vielzahl von Kalzium-abhängigen Effektorproteinen beeinflusst wird, die die Aktivität zytoskelettaler Proteine regulieren (Brundage et al., 1991, Wei et al., 2012). Die Interaktion von D,L-Methadon mit oben genannten Kalzium-Kanälen führt zu einer Beeinflussung des transmembranären Kalzium-Stroms und stellt daher einen möglichen Mechanismus dar, über den die Wirkung von Doxorubicin verstärkt wird und die Zellmigration von Tumorzellen inhibiert wird.

Weiterhin ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, mithilfe von D,L-Methadon in RMS- und MRT-Zelllinien einen funktionellen Zelltod zu induzieren, im Zuge dessen die Zelle ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit verliert und somit auch nicht mehr ihre Rolle als Stammzelle neuer Tumorzellklone einnehmen kann (siehe Kap. 3.3.2 Abb. 13). Zweierlei Mechanismen können zu einem funktionellen Zelltod führen: Beim klonogenen Zelltod findet der Schaden während der Interphase statt und führt zur Differenzierung der Zellen zu terminalen Funktionszellen, die weiter existieren, allerdings keine Kolonien mehr bilden können. Der reproduktive Zelltod beschreibt den Zustand der Zelle, in der sie zunächst zu einzelnen Zellteilungen noch fähig ist, es aber nach wenigen Teilungen zügig zum endgültigen Zelltod kommt. In unseren RMS- und MRT-Zelllinien zeigte sich nach Behandlung mit D,L-Methadon ebenfalls eine deutliche, konzentrationsabhängige Reduktion der Anzahl neuer Kolonien, sodass davon auszugehen ist, dass D,L-Methadon zelluläre Prozesse stört, die für Zellteilung und unbegrenztes Überleben essentiell sind.

Maneckjee et al. konnten bereits an SCLC (small cell lung carcinoma) - und verschiedenen NSCLC (non small cell lung carcinoma) - Zelllinien beobachten, dass Opioide zu einer Induktion des reproduktiven Zelltods führen und hierdurch

die Anzahl der Zellen, die zur Bildung neuer Kolonien befähigt sind, abnimmt (Maneckjee and Minna, 1992). Der reproduktive Zelltod spielt besonders in der Radioonkologie eine wichtige Rolle, da das Wirkungsprinzip ionisierender Strahlung auf der reproduktiven Inaktivierung von Tumorstammzellen beruht und hierdurch Tumorstammzellen durch unbegrenzte Zellteilung gehemmt wird. In diesem Kontext wäre es interessant zu wissen, ob die zusätzliche Behandlung mit D,L-Methadon bei einer Radiotherapie zu einer Verbesserung des Therapieansprechens führt und sich die zytotoxische Wirkung der Bestrahlung durch D,L-Methadon intensivieren lässt.

Abschließend zeigen die die Zytotoxizitäts-Analysen aus Kap. 3.2 und die Adhäsions- und Migrations-Analysen aus Kap. 3.3 eindrücklich, dass D,L-Methadon als Einzelbehandlung sowie in Kombination mit Doxorubicin in RMS- und MRT-Zelllinien ein hohes zytotoxisches Potential aufweist, das sich einerseits durch eine gesteigerte Apoptoserate und eine Reduktion der Zellviabilität sichtbar macht, wie auch durch die Inhibition der Zellmigration und Einschränkungen der Koloniebildungsfähigkeit.

Im weiteren Verlauf folgten Untersuchungen, die sich mit den molekularen Mechanismen, die hinter der Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung stecken, beschäftigten. Das inhomogene Bild, das sich beim Vergleich der Auswirkungen verschiedenster Opioidrezeptor-Agonisten auf Tumorzellen zeigt, lässt vermuten, dass nicht alleine die Eigenschaft als μ -Opioidrezeptor-Agonist ausschlaggebend für die beobachteten einzigartigen Effekte von D,L-Methadon ist, sondern vielmehr die Aktivierung ausgewählter Signalwege eine Rolle spielen muss.

4.3 Wirkmechanismen der Kombinationsbehandlung Doxorubicin und Methadon

Vor dem Hintergrund, dass D,L-Methadon besonders in Kombination mit Doxorubicin gute Wirkungen in Tumorzellen erzielt, wurden gemeinsame Schnittstellen der molekularen Signalkaskaden von Doxorubicin und D,L-Methadon gesucht, über deren Aktivierung D,L-Methadon die Tumorzellen für Doxorubicin möglicherweise sensibilisiert. Hierzu wurden Signalwege

ausgewählt, die durch Doxorubicin beeinflusst werden und somit maßgeblich an der Entwicklung des hohen zytotoxischen Potentials des Medikaments beteiligt sind. In Western Blot- und FACS-Analysen wurde untersucht, ob und inwiefern diese Signalwege unter D,L-Methadon ebenfalls beeinflusst werden, um mögliche ähnliche Mechanismen aufzudecken, die zur Wirkverstärkung von Doxorubicin in der Kombinationsbehandlung führen könnten.

Doxorubicin erzielt sein hohes zytotoxisches Potential über eine Reihe verschiedener Mechanismen. Zunächst führt Doxorubicin zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle. Diese Wirkung unter Behandlung mit Doxorubicin konnten wir in FACS-Messungen zur ROS-Quantifizierung auch in den von uns verwendeten RMS- und MRT-Zellen bestätigen. Die Molekülstruktur von Doxorubicin verfügt über ein Quinon, welches durch zelluläre Reduktasen (Cytochrom P 450) in ein instabiles Semiquinon-Radikal umgesetzt werden kann. Bei Rückfall des reduzierten Doxorubicin in die stabile, oxidierte Form entsteht durch Abgabe eines freien Elektrons an molekularen Sauerstoff ein Hyperoxid Anion (O_2^-). O_2^- zählt zur Gruppe reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und schädigt durch seine hohe Reaktivität die DNA und zelluläre Proteine, führt an der Membran zu Lipidperoxidation und leitet über verschiedene Signalproteine die Apoptose ein (Thorn et al., 2011). An dieser Stelle standen bisher besonders die Signalwege der intrinsischen Apoptose im Mittelpunkt: ROS erhöht die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran und initiiert so über die Freisetzung von Cytochrom C die Aktivierung der Caspasen-Kaskade, die letztlich zum Zelltod führt (Ryter et al., 2007).

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass ROS seine Wirkung auch über die Beeinflussung von Signalwegen der extrinsischen Apoptose entfaltet: Zhang et al. konnten zeigen, dass es bei erhöhten ROS-Spiegeln zur Bildung von CD95/TNF α -Rezeptor-Clustern kommt und es darüber zur Einleitung extrinsischer Apoptose-Signalwege kommt (Zhang et al., 2007, Zhang et al., 2006). In unseren FACS Messungen zeigte sich unter Doxorubicin-Behandlung zuverlässig ein signifikanter Anstieg des intrazellulären ROS-Gehaltes. Ähnliche Wirkung zeigte auch die Einzelbehandlung mit D,L-Methadon und darüber hinaus

war eine deutliche Wirksteigerung von Doxorubicin durch die Kombination mit D,L-Methadon ersichtlich (siehe Kap. 3.4.1 Abb. 14). Die Ergebnisse spiegeln ein Erkenntnis der letzten Jahre wieder, welche die große Bandbreite an Auswirkungen von Opioiden, einschließlich der Induktion von ROS, zu erklären vermag: Der μ -Opioidrezeptor ist nicht allein an den klassischen Adenylatzyklase-cAMP-Proteinkinase-Signalweg gebunden, von dem man lange Zeit annahm, dass es der einzige Signalweg sei, der der Regulation des μ -Opioidrezeptor unterliegt, sondern beeinflusst eine Vielzahl von zellulären Prozessen (Tegeder and Geisslinger, 2004). Hierzu zählt u.a. auch die über β -Arrestin und Phospholipase D2 (PLD2) vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (siehe Kap. 1.2.2 Abb. 3) (Koch et al., 2009, Saify and Saadat, 2015). Koch et al. konnte zeigen, dass rezeptor-internalisierende Agonisten (wie z.B. D,L-Methadon) über PLD2 zu einer starken Induktion der NADH/NADPH-Oxidase-vermittelte ROS-Synthese führen (siehe Kap. 1.2.2 Abb. 3) (Koch et al., 2009, Williams et al., 2013). Diese Daten erklären einerseits die beobachtete Wirkverstärkung von Doxorubicin in der Kombinationsbehandlung, andererseits aber auch die ROS-Bildung unter Methadon-Einzelbehandlung.

Ein weiterer relevanter Wirkmechanismus von Doxorubicin auf nukleärer Ebene ist die Inhibition der Topoisomerase II (Binaschi et al., 2001). Doxorubicin bindet und spaltet das Enzym und verursacht insbesondere in schnell-proliferierendem Gewebe eine Inhibition der Replikation und Proteinbiosynthese. Außerdem interkaliert Doxorubicin zwischen Basenpaare der DNA, was durch Rastermutationen und Strangbrüche zu einer gestörten Replikation und Transkription führt. In der Folge kommt es zu irreversiblen DNA-Schäden, die ebenso wie ROS, zur Aktivierung intrinsischer Apoptose-Wege mit mitochondrialer Aktivierung und Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran führen (Hotchkiss et al., 2009, Krammer et al., 2007, Oberst et al., 2008). Im Verlauf untersuchten wir, ob die Wirkverstärkung von Doxorubicin durch die zusätzliche Behandlung mit D,L-Methadon eventuell auch durch eine Steigerung der intrinsischen Apoptose zustande kommt.

Die intrinsische Apoptose unterliegt der Kontrolle und Regulation durch pro- und anti-apoptische Proteine der Bcl-2 Familie: Bei Überwiegen pro-apoptischer Faktoren kommt es zum Verlust des transmembranären Potentials und zur Freisetzung von Cytochrom C, Smac/DIABLO und der Serinprotease HtrA2/Omi mit Einleitung der Apoptose über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Du et al., 2000, Saelens et al., 2004). In Western Blot Analysen untersuchten wir die zwei Bcl-2 Proteine Bcl-xL und Bax und konnten zeigen, dass es in RMS- und MRT-Zellen unter Kombinationsbehandlung zu einer tendenziell verminderten Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-xL kommt. In den Expressionsanalysen für das pro-apoptische Bax konnten wir allerdings keinen zusätzlichen Effekt durch die Kombinationsbehandlung sehen (siehe Kap. 3.4.3 Abb. 17). Friesen et al. untersuchte ebenfalls Signalwege der intrinsischen Apoptose: Die Arbeitsgruppe analysierte die Dynamik einiger Bcl-Proteine sowie die Spaltung verschiedener Caspasen unter Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon und konnte zeigen, dass es unter Kombinationstherapie zu einer gesteigerten Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9, einer Spaltung von PARP, sowie zu einer Reduktion der anti-apoptischen Proteine XIAP und Bcl-xL kommt (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013). Caspase 9 ist eine Initiatorcaspase, die über die Assoziation als Procaspase 9 mit Cytochrom C und APAF-1 ein Apoptosom bildet und hierbei aktiviert wird. Die aktivierte Caspase 9 induziert die Spaltung der Procaspase 3 und Procaspase 7, welche wiederum eine Reihe zellulärer Zielproteine, wie z.B. PARP, spalten. Als Reparatur-Enzym bei DNA-Einzelstrangbrüchen ist die Inaktivierung von PARP ein wesentlicher Bestandteil der Apoptose, um einen ungehinderten Abbau der Zelle einschließlich der DNA zu gewährleisten.

Die gesteigerte Spaltung von Caspase 3 und Caspase 9, sowie von PARP, liefert dementsprechend Hinweise dafür, dass D,L-Methadon zu einer Aktivierung einzelner Caspasen mit entsprechenden Auswirkungen in den nachgeschalteten Signalwegen führt und somit die beobachtete pro-apoptische Wirkung in den Tumorzellen erzielt wird. Außerdem zeigt sich eine Reduktion des Regulatorproteins XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), einem Vertreter der IAP (inhibitor of apoptosis protein) - Proteinfamilie, der die Aktivität der

Effektorcaspase 3 inhibiert, sowie ebenfalls eine Reduktion des Bcl-2-Proteins Bcl-xL, das in Mitochondrien zu einer Stabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt. Diese Beobachtungen liefern Hinweise für eine Aktivierung intrinsischer Apoptose-Wege durch D,L-Methadon bei Leukämie- und Glioblastom-Zelllinien. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen allerdings bei RMS- und MRT-Zelllinien keine eindeutige Aktivierung dieses Signalweges, da die Expressionsanalysen der beiden Bcl-2 Proteine Bcl-xL und Bax nur minimale Veränderungen aufzeigten.

In MRT-Zellen ließ sich im weiteren Verlauf noch ein weiterer Wirkmechanismus beobachten: Über erhöhte Doxorubicin-Wirkspiegel bei zusätzlicher Behandlung mit D,L-Methadon kommt es ebenfalls zu einer Steigerung des zytotoxischen Potentials. Wir untersuchten in RMS- und MRT-Zellen in getrennten Messungen den Doxorubicin-Influx und - Efflux, um zu unterscheiden, ob die gesteigerten Wirkspiegel durch eine verbesserte Doxorubicin-Aufnahme in die Zelle oder durch eine Reduktion des Doxorubicin-Effluxes zustande kommen.

Es ist bereits bekannt, dass D,L-Methadon ein Substrat des MDR1-Kanals ist, einem ABC-Transporter, der im Wesentlichen für die Entstehung medikamenten-resistenter Zellen verantwortlich ist (Bouer et al., 1999, Callaghan and Riordan, 1993, Crettol et al., 2007, Shen et al., 2008). D,L-Methadon verfügt über eine äußerst hohe Affinität zum MDR1-Kanal und kann über die kompetitive Inhibition des Kanals eine intrazelluläre Akkumulation von Medikamenten in Tumorzellen erreichen (Callaghan and Riordan, 1993). Friesen et al. zeigte bereits an Leukämie- und Glioblastomzellen, dass es unter Behandlung mit D,L-Methadon zu einem erhöhten Doxorubicin-Influx ebenso wie zu einem verminderten Doxorubicin-Efflux kommt (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013).

Unsere Analysen zeigten bei der MRT-Zelllinie A204 nach 8 h, 12 h und 24 h einen signifikant reduzierten Doxorubicin-Efflux mit deutlich gesteigerten intrazellulären Wirkspiegeln (siehe Kap. 3.4.2 Abb. 15). Allerdings konnte bei den beiden RMS-Zelllinien RD und RH30 kein Unterschied zwischen der Kombinationsbehandlung und der Doxorubicin-Behandlung ohne D,L-Methadon beobachtet werden. Um sicherzustellen, dass die erhöhten Wirkspiegel ein

Resultat der Inhibition des MDR1-Kanals sind, wurden ebenfalls Kontrollmessungen mit Zellen, die mit Verapamil, einem MDR1-Inhibitor, behandelt worden waren, durchgeführt. Dies lässt, unter Einbeziehung der vorbestehenden Kenntnisse über die Interaktion von D,L-Methadon mit MDR1, die Annahme zu, dass der verminderte Doxorubicin-Efflux auf einer kompetitiven Bindung von D,L-Methadon an den Kanal basiert (Bouer et al., 1999, Callaghan and Riordan, 1993, Crettol et al., 2007, Shen et al., 2008). Die gesteigerte Expression insbesondere von MDR1 ist einer der Hauptmechanismen von Tumorzellen, um Chemotherapeutika aus der Zelle zu schleusen, noch bevor sie ihre zytotoxische Wirkung entfalten können (Germann, 1996). Auch in der Behandlung mit Doxorubicin stellt die Entwicklung resistenter Zellen einen limitierenden Faktor in der Behandlung dar, sodass die Erkenntnis, dass D,L-Methadon zu einer Inhibition einer der wichtigsten Efflux-Kanäle führt, besonders für die Behandlung chemoresistenter Zellen eine Rolle spielt und einen möglichen Ansatz darstellt, Chemoresistenz in Tumorzellen zu überwinden (Kaye and Merry, 1985, Weiss, 1992).

In den Influx-Messungen zeigte sich in A204-Zellen ein tendenziell etwas schnellerer Anstieg der intrazellulären Wirkspiegel, der in RD- und RH30-Zellen nicht zu sehen war (siehe Kap. 3.4.2 Abb. 16). Das in unseren Analysen verwendete Doxorubicinhydrochlorid wird einerseits über Diffusion durch Gap-Junctions als auch über bestimmte Influx-Transporter wie SLC22A16 (solute carrier family 22 member 16) in die Zelle aufgenommen (Lal et al., 2010, Okabe et al., 2005). Fraglich ist an dieser Stelle, ob die Beobachtungen in den Influx-Messungen, wie von Friesen et al. postuliert, tatsächlich auf einer Modulation der Doxorubicin-Aufnahme gründen, oder ob die leicht gesteigerten Wirkspiegel unter Kombinationsbehandlung bereits die Folgen einer effektiven und sofort einsetzenden MDR1-Inhibition durch D,L-Methadon sind. Die Analysen zeigen jedenfalls, dass D,L-Methadon in der MRT-Zelllinie A204 zu signifikant gesteigerten Doxorubicin-Wirkspiegeln führt und somit die Zellen für die Behandlung mit Doxorubicin sensibilisiert.

Allerdings scheint nicht nur D,L-Methadon Tumorzellen für eine Behandlung mit Doxorubicin zu sensibilisieren, sondern auch umgekehrt trägt Doxorubicin wesentlich zur Verbesserung der Wirkung von D,L-Methadon bei. In Western Blot Analysen untersuchten wir inwiefern sich die μ -Opioid-Rezeptor-Expression unter Behandlung mit Doxorubicin verändert. Es stellte sich heraus, dass es bei Behandlung mit Doxorubicin zu einer signifikanten Steigerung der OPRM1-Expression um 50-75 % und somit zu einer erhöhten Sensibilität der Zelle für D,L-Methadon kommt (siehe Kap. 3.1.2 Abb. 7). Nach 12-48 h erreicht die Rezeptor-Expression unter Doxorubicin-Behandlung ein Maximum und fällt anschließend wieder, sodass D,L-Methadon als Bestandteil der Kombinationstherapie wahrscheinlich in den ersten 2 Tagen besonders effektiv wirkt. Friesen et al. konnte bereits zeigen, dass es nach Behandlung mit Doxorubicin für 96 h bzw. 120 h in Leukämie- und Glioblastomzellen zu einer gesteigerten Expression des μ -Opioidrezeptors kommt (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013). Unsere Analysen weisen hingegen bereits innerhalb der ersten 48 h eine starke Dynamik der Rezeptorexpression unter Doxorubicin-Behandlung auf.

4.4 Klinische Relevanz von D,L-Methadon im Vergleich mit anderen μ -Opioidrezeptor-Agonisten im onkologischen Setting

Mittlere bis starke Tumorschmerzen treten bei 70-80 % der Patienten im fortgeschrittenen Stadium einer malignen Tumorerkrankung auf (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015). Neben tumorspezifischen Verfahren wie z.B. der Bestrahlung von Knochenmetastasen, der Punktion von Aszites oder Pleuraergüssen oder der Entlastung bei Leberkapseldehnungsschmerzen, kommen in der medikamentösen Schmerztherapie insbesondere Opioide zum Einsatz. Als Stufe-III-Opioide kann bei mittleren bis starken Schmerzen neben Morphin, Oxycodon und Hydromorphon auch D,L-Methadon bzw. Levomethadon eingesetzt werden (Cherny, 2011).

Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der letzten Jahre zeigen eindrücklich, dass verschiedenste Opioide, einschließlich der oben genannten

Präparate, nicht nur das Schmerzempfinden lindern, sondern parallel Einfluss auf zelluläre Prozesse nehmen, die wesentlich an der Regulation von Proliferation, Zellüberleben und Zelltod beteiligt sind (Tegeder and Geisslinger, 2004). Allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, welche Signalwege im einzelnen durch die Opioid-Behandlung beeinflusst und verändert werden und von welchen Faktoren es abhängt, ob die Wirkungen der einzelnen Opioide eher pro- oder anti-apoptischen Charakters sind. An dieser Stelle ist es wichtig zwischen den einzelnen Wirkstoffen und deren Wirkung als Ligand am Rezeptor zu differenzieren, da dies möglicherweise die stellenweise erheblich variierenden Ergebnisse von verschiedenen, unabhängigen Untersuchungen erklären könnte: Versucht man, die bisherigen Erkenntnisse zusammenzufassen und in eine Ordnung zu bringen, stößt man auf erhebliche Kontroversen.

Zahlreiche *in vitro* Experimente konnten in den letzten Jahren zeigen, dass es unter Behandlung mit verschiedenen Opioiden, darunter Morphin, β -endorphin, DAMGO und D,L-Methadon, in Tumorzellen (kleinzelliges Bronchial-Karzinom, Leukämie, Neuroblastom, Melanom, Magen-Karzinom, Kolon-Karzinom, Glioblastom, Prostata-Karzinom, Mamma-Karzinom und Weichteilsarkomen) zu einer Inhibition der Proliferation mit Anstieg der Apoptose kommt (Friesen et al., 2011, Friesen et al., 1996, Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2008, Friesen et al., 2013, Hatzoglou et al., 1996, Ishikawa et al., 1993, Kampa et al., 1997, Kampa et al., 2001, Kawase et al., 2002, Maneckjee et al., 1990, Maneckjee and Minna, 1990, Maneckjee and Minna, 1994, Sasamura et al., 2002, Singh et al., 2011, Sueoka et al., 1998, Sueoka et al., 1996, Tegeder et al., 2003, Yin et al., 1999, Yin et al., 1997). *In vivo* Untersuchungen konnten diese Ergebnisse bei deutlich reduziertem Tumorwachstum und verminderter Metastasierungsrate bestätigen (Harimaya et al., 2002, Maneckjee and Minna, 1992, Sasamura et al., 2002, Tegeder et al., 2003, Yeager and Colacchio, 1991, Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013). Allerdings wurden auch genau entgegengesetzte Wirkungen beobachtet - eine verminderte Apoptoserate mit starker Proliferation *in vitro* (Iglesias et al., 2003, Melzig et al., 1995, Moon, 1988, Sergeeva et al., 1993) sowie gesteigertes Tumorwachstum und eine erhöhte Anzahl an Metastasen *in vivo* (Simon and Arbo, 1986). Ishikawa et al. konnte im direkten

Vergleich zeigen, dass Morphin *in vitro* zu einer Reduktion der Zellviabilität und der Zellproliferation führen und *in vivo* die gleichen Zellen mit gesteigertem Tumorwachstum reagieren (Ishikawa et al., 1993).

Im Kontext der aktuellen Datenlage, einschließlich der von uns neu erhobenen Daten, zeigt sich, dass das vollsynthetische Opioid D,L-Methadon der einzige μ -Opioidrezeptor-Agonist ist, der sich bisher durchgehend tumorrepressiv auf Tumorzellen auswirkte und somit nicht nur zur Behandlung von Schmerzen ein vielversprechender Wirkstoff bei einer malignen Grunderkrankung ist.

4.5 Limitationen

Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit handelt es sich ausschließlich um *in vitro* Versuche und vor dem Hintergrund der oben erwähnten stark variierenden Ergebnisse beim Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Studien wäre es im weiteren Verlauf wichtig, zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch *in vivo* reproduzieren lassen. Die isolierte Betrachtung der Effekte in Tumorzellen im *in vitro* - Modell ist nicht ausreichend, um eine Aussage über die Auswirkungen der Therapie im Patienten zu machen, da Tumorzellen im Körper in einem komplexen Wechselspiel mit vielen anderen Zellen des Tumormilieus stehen, die ebenfalls der Behandlung mit D,L-Methadon ausgesetzt sind (Chen et al., 2015, Wang et al., 2017). Beispielsweise tragen zahlreiche Immunzellen den μ -Opioid-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, sodass diese bei einer Opioid-Behandlung ebenfalls Reaktionen auf das Medikament aufzeigen können (Borner et al., 2009, Li et al., 2009, Roy et al., 2006, Saurer et al., 2006). Zudem lassen sich die verwendeten Konzentrationen der *in vitro* Versuche nur schwer auf die klinische Anwendung am Menschen übertragen, sodass nur *in vivo* Versuche klären können, ob die Mengen an D,L-Methadon, die ein Patient einnehmen müsste, um eine ausreichend lokale Konzentration am Tumor zu erreichen und die gewünschten Wirkungen zu erzielen, auch realistisch sind. Die Versuche wurden mit 3 verschiedenen Zellreihen durchgeführt, stellvertretend für die beiden RMS-Subtypen alveoläres und embryonales Rhabdomyosarkom sowie für einen malignen Rhabdoidtumor. An dieser Stelle

ist es notwendig, weitere Zelllinien auch anderer Histologien zu untersuchen, um ein differenzierteres Bild von den Auswirkungen von Methadon auf die einzelnen Subtypen zu gewinnen. Um das Metastasierungsverhalten der Tumorzellen unter Methadonbehandlung noch genauer zu untersuchen, würden sich Versuche mit Sphäroiden eignen, mithilfe derer eine Umgebung geschaffen wird, die die Verhältnisse *in vivo* sehr gut simulieren kann. Des Weiteren wurden die Versuche nur mit Doxorubicin durchgeführt, sodass allein Aussagen über die Wirkungen der Kombination D,L-Methadon und Doxorubicin gemacht werden können. Für eine umfangreichere Beurteilung der Wirkung von D,L-Methadon in Kombination mit Chemotherapie müssten noch zahlreiche andere Medikamente unterschiedlicher Wirkstoffklassen untersucht werden.

4.6 Ausblick

Um das Opioid D,L-Methadon und seine Rolle im Rahmen maligner Tumorerkrankungen besser einordnen und verstehen zu können ist es wichtig, einerseits weitere *in vivo* Studien zu planen und andererseits ganz grundsätzlich D,L-Methadon von anderen Opioiden abzugrenzen. Wie bereits erwähnt, spielt die selektive Funktionalität am μ -Opioidrezeptor zur Charakterisierung von D,L-Methadon im Vergleich mit anderen Opioiden eine wichtige Rolle: Für einige Rezeptor-Klassen, u.a. nukleäre Hormonrezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, konnte gezeigt werden, dass Wirkstoffe oder Liganden im Sinne einer funktionellen Selektivität häufig einen von mehreren möglichen Signaltransduktionswegen bevorzugt aktivieren. Auch am μ -Opioidrezeptor variiert die pharmakologische Wirkung verschiedener Agonisten trotz des gemeinsamen Ansatzpunktes erheblich und es kommt je nach Ligand zur Aktivierung einzelner oder mehrerer, ausgewählter Signalwege (Raehal et al., 2011).

Für D,L-Methadon konnte gezeigt werden, dass es zur Aktivierung sowohl des G-Protein-abhängigen als auch des G-Protein-unabhängigen Signalweges kommt: Der G-Protein-abhängige Signalweg wird über die Inhibition des Adenylatzyklase durch die $G\alpha_i$ -Untereinheit eingeleitet, was in der Folge zu

einem Absinken der cAMP-Spiegel mit verminderter Aktivität der PKA führt (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2013). Der Botenstoff cAMP reguliert eine Vielzahl an zellulären Prozessen und abhängig davon, welche nachgeschalteten Signalwege in der Zelle dominieren, kann cAMP sowohl eine pro-apoptische Rolle einnehmen, als auch als Protektiv-Faktor anti-apoptische Auswirkungen auf die Zelle haben (Insel et al., 2012, Myklebust et al., 1999, Orlov et al., 1999). In Leukämiezellen konnte allerdings gezeigt werden, dass cAMP vor dem Hintergrund einer Doxorubicin-Behandlung die Chemotherapie-induzierte Apoptose über die Akkumulation von p53 hemmt (Safa et al., 2010). Somit spielt D,L-Methadon als Aktivator des G-Protein-abhängigen Signalweges mit Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel sicherlich eine wichtige Rolle.

Trotzdem präsentiert sich D,L-Methadon im Vergleich zu anderen μ -Opioidrezeptor-Agonisten auch als Ligand mit starker Induktion des G-Protein-unabhängigen, β -Arrestin vermittelten Signalweges (Doi et al., 2016). 2016 konnte Nuber et al. erstmals nachweisen, dass β -Arrestin nicht nur regulatorische Funktionen im An- und Ausschalten von GPCR übernimmt, sondern vielmehr ein eigenständiges Signalmolekül ist und an der Regulation zahlreicher nachgeschalteter Signalwege beteiligt ist, die Auswirkungen auf Proliferation und Apoptose, sowie Zellzyklus und Differenzierung haben (Nuber et al., 2016). Hierzu gehört insbesondere die Regulation zahlreicher MAP (mitogen-activated protein) - Kinasen, wie ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), JNK1-3 (c-Jun N-terminal kinase 1-3) und die p38-Proteinkinase ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) (Lefkowitz and Shenoy, 2005, Al-Hasani and Bruchas, 2011). Spallarossa et al. konnte zeigen, dass auch Doxorubicin diese Signalwege beeinflusst, sodass eine Wirkverstärkung durch D,L-Methadon über die Aktivierung des G-Protein-unabhängigen, β -Arrestin vermittelten Signalweges ebenfalls wahrscheinlich erscheint (Spallarossa et al., 2006).

Schlussendlich präsentiert sich D,L-Methadon mit einem pharmakologischen Profil, das sich von dem anderer μ -Opioidrezeptor-Agonisten im Wesentlichen dadurch unterscheidet, dass es neben der Aktivierung des klassischen G-Protein-abhängigen Signalweges zu einem nicht unerheblichen Anteil auch zur

Aktivierung des β -Arrestin vermittelten Signalweges kommt. Der einzigartigen Wirkung von D,L-Methadon auf Tumorzellen liegt somit wahrscheinlich die individuelle, funktionelle Selektivität des Wirkstoffes am μ -Opioidrezeptor zugrunde. Es bleibt allerdings ungeklärt, welche Signalwege im Detail im Hinblick auf die zytotoxischen Wirkungen von D,L-Methadon bedeutend sind. Die Frage ob vorwiegend die Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels ausschlaggebend für die tumorsuppressiven Auswirkungen in der Zelle ist oder möglicherweise auch die Aktivierung des β -Arrestin vermittelten Signalweges eine größere Rolle spielt als bisher gedacht, bleibt unbeantwortet und stellt einen interessanten Aspekt dar, der in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden sollte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bereits seit über 500 Mio. Jahren existieren Opiode in Wirbeltieren und beeinflussen eine Vielzahl an Prozessen in unserem Körper (Schäfer and Mousa, 2009). Vor dem Hintergrund maligner Tumorerkrankungen zeigte sich, dass Opiode auch Einfluss auf die Tumorgenese nehmen und insbesondere D,L-Methadon als Vertreter der μ -Opioidrezeptor-Agonisten erwies sich besonders in Kombination mit dem Anthrazyklin-Antibiotikum Doxorubicin *in vitro* als tumorsuppressiv und zeigte ausnahmslos positive Effekte (Friesen et al., 2014, Friesen et al., 2008, Friesen et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig systematisch bei Vertretern kindlicher solider Tumoren (Rhabdomyosarkom und maligner Rhabdoidtumor) untersucht, wie sich eine Behandlung mit Doxorubicin und D,L-Methadon auf die Zellen auswirkt. Die bereits beschriebenen tumorsuppressiven Eigenschaften von D,L-Methadon im Zusammenhang mit einer Doxorubicin-Behandlung konnten erstmals auch für kindliche, solide Weichteiltumore und maligne Rhabdoidtumoren bestätigt werden. Außerdem konnten zahlreiche Wirkungsansätze von D,L-Methadon in der Zelle identifiziert werden, die in Abb. 18 graphisch dargestellt sind.

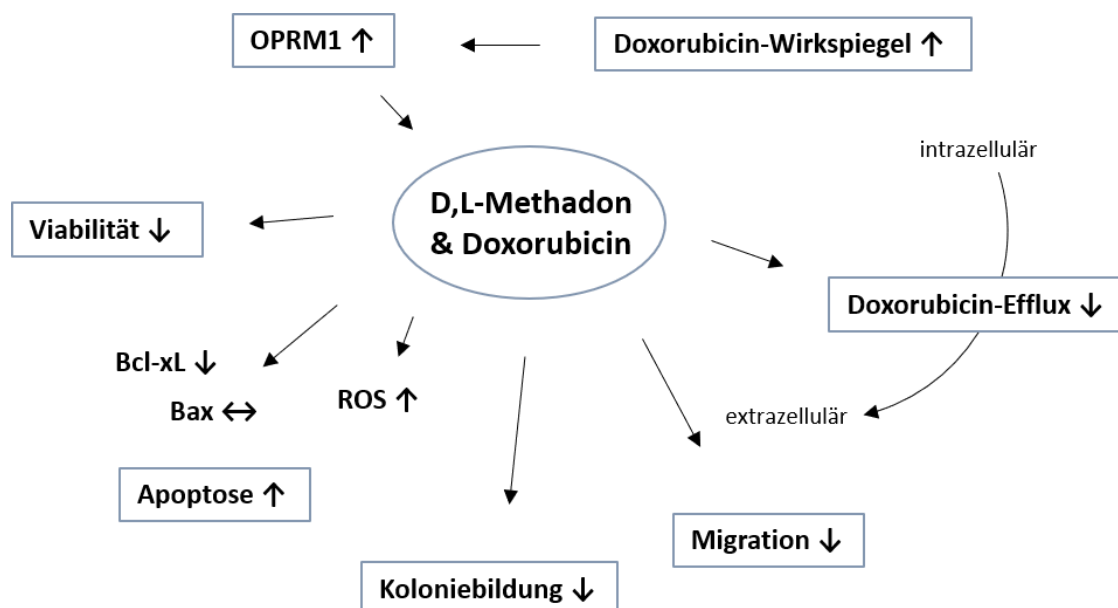


Abbildung 18: Auswirkungen von Doxorubicin und D,L-Methadon auf RMS- und MRT-Zellen

Zusammenfassend zeigte sich, dass D,L-Methadon das Therapieansprechen der untersuchten Tumorzellen auf eine Behandlung mit Doxorubicin deutlich verbessert. Die Kombinationsbehandlung führt verglichen mit der Doxorubicin-Einzelbehandlung zu einer stärkeren Reduktion der Viabilität und zu signifikant gesteigerten Apoptoseraten. Die Analysen hinsichtlich der molekularen Mechanismen zeigten in allen Zelllinien eine gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Allerdings konnte keine eindeutige Aktivierung intrinsischer Apoptosewege festgestellt werden. Außerdem kommt es unter Kombinationsbehandlung zu einer Inhibition der Zellmigration und bei D,L-Methadon-Einzelbehandlung zu einer verminderten Koloniebildung. Wir konnten zudem feststellen, dass es zu einer gegenseitigen Wirkverstärkung von Doxorubicin und D,L-Methadon kommt: Einerseits führt Doxorubicin zu einer gesteigerten Expression des μ -Opioidrezeptors in der Zellmembran, sodass in der Folge die Effektivität der Methadonbehandlung gesteigert wird. Andererseits zeigte sich in MRT-Zellen, dass es unter Behandlung mit D,L-Methadon zu einem signifikant geringeren Doxorubicin-Efflux kommt, sodass unter Kombinationsbehandlung deutlich höhere Wirkspiegel erreicht werden als bei einer Doxorubicin-Einzelbehandlung.

Im Kontext der aktuellen Datenlage, einschließlich der von uns neu erhobenen Daten aus der vorliegenden Arbeit, präsentiert sich das Opioid D,L-Methadon als ein Wirkstoff mit eindeutig tumorsuppressiven Eigenschaften. Um die Auswirkungen von D,L-Methadon in Tumorzellen besser einordnen und eine sichere Therapie gewährleisten zu können, bedarf es allerdings noch weiterer *in vitro* und *in vivo* Studien. Dennoch drängt sich bereits jetzt die Frage auf, inwiefern die Rolle von D,L-Methadon im Rahmen maligner Tumorerkrankungen neu definiert werden muss.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- AHMED, H. U., ARYA, M., LEVITT, G., DUFFY, P. G., MUSHTAQ, I. & SEBIRE, N. J. 2007. Part I: Primary malignant non-Wilms' renal tumours in children. *Lancet Oncol*, 8, 730-7.
- AL-HASANI, R. & BRUCHAS, M. R. 2011. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, 115, 1363-81.
- AMER, K. M., THOMSON, J. E., CONGIUSTA, D., DOBITSCH, A., CHAUDHRY, A., LI, M., CHAUDHRY, A., BOZZO, A., SIRACUSE, B., AYTEKIN, M. N., GHERT, M. & BEEBE, K. S. 2019. Epidemiology, Incidence, and Survival of Rhabdomyosarcoma Subtypes: SEER and ICES Database Analysis. *J Orthop Res*.
- ANDERSON, J., GORDON, A., MCMANUS, A., SHIPLEY, J. & PRITCHARD-JONES, K. 1999. Disruption of Imprinted Genes at Chromosome Region 11p15.5 in Paediatric Rhabdomyosarcoma. *Neoplasia*, 1, 340-8.
- BALCER-KUBICZEK, E. K. 2012. Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword. *Exp Oncol*, 34, 277-85.
- BEAGLES, K., WELLSTEIN, A. & BAYER, B. 2004. Systemic morphine administration suppresses genes involved in antigen presentation. *Mol Pharmacol*, 65, 437-42.
- BECKWITH, J. B. & PALMER, N. F. 1978. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer*, 41, 1937-48.
- BETZ, B. L., STROBECK, M. W., REISMAN, D. N., KNUDSEN, E. S. & WEISSMAN, B. E. 2002. Re-expression of hSNF5/INI1/BAF47 in pediatric tumor cells leads to G1 arrest associated with induction of p16ink4a and activation of RB. *Oncogene*, 21, 5193-203.
- BIEGEL, J. A., KALPANA, G., KNUDSEN, E. S., PACKER, R. J., ROBERTS, C. W., THIELE, C. J., WEISSMAN, B. & SMITH, M. 2002. The role of INI1 and the SWI/SNF complex in the development of rhabdoid tumors: meeting summary from the workshop on childhood atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Cancer Res*, 62, 323-8.
- BIEGEL, J. A., ZHOU, J. Y., RORKE, L. B., STENSTROM, C., WAINWRIGHT, L. M. & FOGELGREN, B. 1999. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res*, 59, 74-9.
- BIGGS, P. J., GAREN, P. D., POWERS, J. M. & GARVIN, A. J. 1987. Malignant rhabdoid tumor of the central nervous system. *Hum Pathol*, 18, 332-7.
- BINASCHI, M., BIGIONI, M., CIPOLLONE, A., ROSSI, C., GOSO, C., MAGGI, C. A., CAPRANICO, G. & ANIMATI, F. 2001. Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 1, 113-30.
- BOHN, L. M., BELCHEVA, M. M. & COSCIA, C. J. 1998. Evidence for kappa- and mu-opioid receptor expression in C6 glioma cells. *J Neurochem*, 70, 1819-25.
- BOHN, L. M., GAINETDINOV, R. R., LIN, F. T., LEFKOWITZ, R. J. & CARON, M. G. 2000. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408, 720-3.
- BORNER, C., LANCIOTTI, S., KOCH, T., HOLLT, V. & KRAUS, J. 2013. mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 263, 35-42.
- BORNER, C., WARNICK, B., SMIDA, M., HARTIG, R., LINDQUIST, J. A., SCHRAVEN, B., HOLLT, V. & KRAUS, J. 2009. Mechanisms of opioid-mediated inhibition of human T cell receptor signaling. *J Immunol*, 183, 882-9.
- BOUCHE, M., CANIPARI, R., MELCHIONNA, R., WILLEMS, D., SENNI, M. I. & MOLINARO, M. 2000. TGF-beta autocrine loop regulates cell growth and

- myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *Faseb j*, 14, 1147-58.
- BOUER, R., BARTHE, L., PHILIBERT, C., TOURNAIRE, C., WOODLEY, J. & HOUIN, G. 1999. The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. *Fundam Clin Pharmacol*, 13, 494-500.
- BOUQUIE, R., HERNANDO, H., DESLANDES, G., BEN MOSTEFA DAHO, A., RENAUD, C., GRALL-BRONNEC, M., DAILLY, E. & JOLLIET, P. 2015. Chiral on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of (R) and (S) enantiomers of methadone and its main metabolite in plasma. *Talanta*, 134, 373-8.
- BOYADJIEVA, N., DOKUR, M., ADVIS, J. P., MEADOWS, G. G. & SARKAR, D. K. 2001. Chronic Ethanol Inhibits NK Cell Cytolytic Activity: Role of Opioid Peptide β -Endorphin. *The Journal of Immunology*, 167, 5645-5652.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAR, B. K. & LOWRY, P. J. 1999. The differential processing of proenkephalin A in mouse and human breast tumour cell lines. *J Endocrinol*, 161, 475-84.
- BRENNAN, B., STILLER, C. & BOURDEAUT, F. 2013. Extracranial rhabdoid tumours: what we have learned so far and future directions. *Lancet Oncol*, 14, e329-36.
- BRUNDAGE, R. A., FOGARTY, K. E., TUFT, R. A. & FAY, F. S. 1991. Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science*, 254, 703-6.
- BURNETTE, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
- CALLAGHAN, R. & RIORDAN, J. R. 1993. Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem*, 268, 16059-64.
- CHAN, Y. Y., YANG, S. N., LIN, J. C., CHANG, J. L., LIN, J. G. & LO, W. Y. 2015. Inflammatory response in heroin addicts undergoing methadone maintenance treatment. *Psychiatry Res*, 226, 230-4.
- CHATIKHINE, V. A., CHEVRIER, A., CHAUZY, C., DUVAL, C., D'ANJOU, J., GIRARD, N. & DELPECH, B. 1994. Expression of opioid peptides in cells and stroma of human breast cancer and adenofibromas. *Cancer Letters*, 77, 51-56.
- CHEN, F., ZHUANG, X., LIN, L., YU, P., WANG, Y., SHI, Y., HU, G. & SUN, Y. 2015. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med*, 13.
- CHERNY, N. 2011. Is oral methadone better than placebo or other oral/transdermal opioids in the management of pain? *Palliat Med*, 25, 488-93.
- CHI, S. N., ZIMMERMAN, M. A., YAO, X., COHEN, K. J., BURGER, P., BIEGEL, J. A., RORKE-ADAMS, L. B., FISHER, M. J., JANSS, A., MAZEWSKI, C., GOLDMAN, S., MANLEY, P. E., BOWERS, D. C., BENDEL, A., RUBIN, J., TURNER, C. D., MARCUS, K. J., GOUMNEROVA, L., ULLRICH, N. J. & KIERAN, M. W. 2009. Intensive Multimodality Treatment for Children With Newly Diagnosed CNS Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor. *J Clin Oncol*, 27, 385-9.
- CHRISTIANSEN, J. J. & RAJASEKARAN, A. K. 2006. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, 66, 8319-26.
- CIRCU, M. L. & AW, T. Y. 2010. REACTIVE OXYGEN SPECIES, CELLULAR REDOX SYSTEMS AND APOPTOSIS. *Free Radic Biol Med*, 48, 749-62.
- COMPTON, S. J. & JONES, C. G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*, 151, 369-74.

- CORTES-FUNES, H. & CORONADO, C. 2007. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol*, 7, 56-60.
- CRETOL, S., DIGON, P., GOLAY, K. P., BRAWAND, M. & EAP, C. B. 2007. In vitro P-glycoprotein-mediated transport of (R)-, (S)-, (R,S)-methadone, LAAM and their main metabolites. *Pharmacology*, 80, 304-11.
- CRIST, W., GEHAN, E. A., RAGAB, A. H., DICKMAN, P. S., DONALDSON, S. S., FRYER, C., HAMMOND, D., HAYS, D. M., HERRMANN, J., HEYN, R. & ET AL. 1995. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol*, 13, 610-30.
- CROFT, D. R., CRIGHTON, D., SAMUEL, M. S., LOURENCO, F. C., MUNRO, J., WOOD, J., BENSAD, K., VOUSDEN, K. H., SANSOM, O. J., RYAN, K. M. & OLSON, M. F. 2011. p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*, 21, 666-82.
- CULLINANE, C. J. 2003. *Molecular Biology and Pathology of Paediatric Cancer*, Oxford University Press.
- DASCAL, N. & KAHANOVITCH, U. 2015. The Roles of Gbetagamma and Galpha in Gating and Regulation of GIRK Channels. *Int Rev Neurobiol*, 123, 27-85.
- DE LANGE, J. H., SCHIPPER, N. W., SCHUURHUIS, G. J., TEN KATE, T. K., VAN HEIJNINGEN, T. H., PINEDO, H. M., LANKELMA, J. & BAAK, J. P. 1992. Quantification by laser scan microscopy of intracellular doxorubicin distribution. *Cytometry*, 13, 571-6.
- DOI, S., MORI, T., UZAWA, N., ARIMA, T., TAKAHASHI, T., UCHIDA, M., YAWATA, A., NARITA, M., UEZONO, Y., SUZUKI, T. & NARITA, M. 2016. Characterization of methadone as a beta-arrestin-biased mu-opioid receptor agonist. *Mol Pain*, 12.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- EATON, K. W., TOOKE, L. S., WAINWRIGHT, L. M., JUDKINS, A. R. & BIEGEL, J. A. 2011. Spectrum of SMARCB1/INI1 Mutations in Familial and Sporadic Rhabdoid Tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 56, 7-15.
- EGAS-BEJAR, D. & HUH, W. W. 2014. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolesc Health Med Ther*, 5, 115-25.
- ERIKSSON, D. & STIGBRAND, T. 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol*, 31, 363-72.
- FACHINFORMATION: DOXO-CELL®. DOXO-cell® 10 mg/50 mg/150 mg
- Injektionslösung [2mg/ml] Stand: Dezember 2016. Stadapharm Arzneimittel AG, Bad Vilbel.* [Online]. Available: <http://fachinformation.srz.de/pdf/cellpharm/doxo-cell10mg50mg150mginjektionsl%C3%B6sung.pdf> [Accessed 24.11.2017].
- FELIX, C. A., KAPPEL, C. C., MITSUDOMI, T., NAU, M. M., TSOKOS, M., CROUCH, G. D., NISEN, P. D., WINICK, N. J. & HELMAN, L. J. 1992. Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, 52, 2243-7.
- FINN, N. A., FINDLEY, H. W. & KEMP, M. L. 2011. A switching mechanism in doxorubicin bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity. *PLoS Comput Biol*, 7, e1002151.
- FOGH, J., WRIGHT, W. C. & LOVELESS, J. D. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 58, 209-14.
- FRANKEN, N. A., RODERMOND, H. M., STAP, J., HAVEMAN, J. & VAN BREE, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1, 2315-9.
- FRIEDL, P. & GILMOUR, D. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 445-57.

- FRIEDRICHSDORF, S. J. & POSTIER, A. 2014. Management of breakthrough pain in children with cancer. *J Pain Res*, 7, 117-23.
- FRIESEN, C., BACHER, S., HORMANN, I., ROSCHER, M. & MILTNER, E. 2011. Cytotoxic effects of opioids on cancer cell lines. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 49, 60-2.
- FRIESEN, C., HERR, I., KRAMMER, P. H. & DEBATIN, K. M. 1996. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med*, 2, 574-7.
- FRIESEN, C., HORMANN, I., ROSCHER, M., FICHTNER, I., ALT, A., HILGER, R., DEBATIN, K. M. & MILTNER, E. 2014. Opioid receptor activation triggering downregulation of cAMP improves effectiveness of anti-cancer drugs in treatment of glioblastoma. *Cell Cycle*, 13, 1560-70.
- FRIESEN, C., ROSCHER, M., ALT, A. & MILTNER, E. 2008. Methadone, commonly used as maintenance medication for outpatient treatment of opioid dependence, kills leukemia cells and overcomes chemoresistance. *Cancer Res*, 68, 6059-64.
- FRIESEN, C., ROSCHER, M., HORMANN, I., FICHTNER, I., ALT, A., HILGER, R. A., DEBATIN, K. M. & MILTNER, E. 2013. Cell death sensitization of leukemia cells by opioid receptor activation. *Oncotarget*, 4, 677-90.
- FRÜHWALD, M. C. 2015. *European Rhabdoid Registry Version 4 Stand: 2015. Prof. Dr. Dr. Michael C. Frühwald (Klinik für Kinder und Jugendliche, Augsburg)*, [Online]. Available: https://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e1676/e9032/e1758/e83294/download84621/EU-RHABProtokollStand10.09.2015_ger.pdf [Accessed 19.08.2017].
- FRÜHWALD, M. C. & GRAF, N. 2006. *Rhabdoidtumoren im Kindesalter. Einheitliches Konzept für die Behandlung von Tumoren des Gehirns, der Nieren und des Weichgewebes* [Online]. Available: <https://www.kinderkrebsstiftung.de/fileadmin/Redaktion/PDF/Forschung/HIT/2006/rhabdoide.pdf> [Accessed 20.08.2017].
- GALLEGO MELCON, S. & SANCHEZ DE TOLEDO CODINA, J. 2007. Molecular biology of rhabdomyosarcoma. *Clin Transl Oncol*, 9, 415-9.
- GANGULY, S., JAYKAR, K. C., KUMAR, R., JHA, A. K. & BANERJEE, P. 2015. Gorlin-Goltz Syndrome: A Rare Case. *Indian J Dermatol*, 60, 216.
- GATTA, G., CAPOCACCIA, R., COLEMAN, M. P., RIES, L. A. & BERRINO, F. 2002. Childhood cancer survival in Europe and the United States. *Cancer*, 95, 1767-72.
- GEORGE, R., LOBB, M., HAYWOOD, A., KHAN, S., HARDY, J., GOOD, P., HENNIG, S. & NORRIS, R. 2016. Quantitative determination of the enantiomers of methadone in human plasma and saliva by chiral column chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Talanta*, 149, 142-8.
- GERLIER, D. & THOMASSET, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*, 94, 57-63.
- GERMANN, U. A. 1996. P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer*, 32a, 927-44.
- GEWIRTZ, D. A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57, 727-41.
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H. & PARKS, W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1417-23.
- GRUESSNER, S. E., OMWANDHO, C. O., DREYER, T., BLUTTERS-SAWATZKI, R., REITER, A., TINNEBERG, H. R. & BOHLE, R. M. 2004. Management of stage I

- cervical sarcoma botryoides in childhood and adolescence. *Eur J Pediatr*, 163, 452-6.
- HAAS, J. E., PALMER, N. F., WEINBERG, A. G. & BECKWITH, J. B. 1981. Ultrastructure of malignant rhabdoid tumor of the kidney. A distinctive renal tumor of children. *Hum Pathol*, 12, 646-57.
- HANSEN, M. B., NIELSEN, S. E. & BERG, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119, 203-10.
- HARIMAYA, Y., KOIZUMI, K., ANDOH, T., NOJIMA, H., KURAISHI, Y. & SAIKI, I. 2002. Potential ability of morphine to inhibit the adhesion, invasion and metastasis of metastatic colon 26-L5 carcinoma cells. *Cancer Lett*, 187, 121-7.
- HATZOGLU, A., BAKOGEORGOU, E. & CASTANAS, E. 1996. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, 296, 199-207.
- HAWLEY T.S. & HAWLEY R.G. 2004. *Flow Cytometry Protocols*, Springer
- HAYES-JORDAN, A. & ANDRASSY, R. 2009. Rhabdomyosarcoma in children. *Curr Opin Pediatr*, 21, 373-8.
- HENNEKAM, R. C. 2003. Costello syndrome: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 117c, 42-8.
- HINSON, A. R., JONES, R., CROSE, L. E., BELYEA, B. C., BARR, F. G. & LINARDIC, C. M. 2013. Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol*, 3, 183.
- HOOT, A. C., RUSSO, P., JUDKINS, A. R., PERLMAN, E. J. & BIEGEL, J. A. 2004. Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 distinguishes renal and extra-renal malignant rhabdoid tumors from other pediatric soft tissue tumors. *Am J Surg Pathol*, 28, 1485-91.
- HOTCHKISS, R. S., STRASSER, A., MCDUNN, J. E. & SWANSON, P. E. 2009. Cell death. *N Engl J Med*, 361, 1570-83.
- HU, S., CHAO, C. C., HEGG, C. C., THAYER, S. & PETERSON, P. K. 2000. Morphine inhibits human microglial cell production of, and migration towards, RANTES. *J Psychopharmacol*, 14, 238-43.
- HU, S., SHENG, W. S., LOKENSGARD, J. R. & PETERSON, P. K. 2002. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology*, 42, 829-36.
- IGLESIAS, M., SEGURA, M. F., COMELLA, J. X. & OLMOS, G. 2003. Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuropharmacology*, 44, 482-92.
- INSEL, P. A., ZHANG, L., MURRAY, F., YOKOUCHI, H. & ZAMBON, A. C. 2012. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)*, 204, 277-87.
- ISHIKAWA, M., TANNO, K., KAMO, A., TAKAYANAGI, Y. & SASAKI, K. 1993. Enhancement of tumor growth by morphine and its possible mechanism in mice. *Biol Pharm Bull*, 16, 762-6.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., MURRAY, T., XU, J., SMIGAL, C. & THUN, M. J. 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, 56, 106-30.
- JONGMANS, M. C., HOOGERBRUGGE, P. M., HILKENS, L., FLUCKE, U., VAN DER BURGT, I., NOORDAM, K., RUITERKAMP-VERSTEEG, M., YNTEMA, H. G., NILLESEN, W. M., LIGTENBERG, M. J., VAN KESSEL, A. G., KUIPER, R. P. & HOOGERBRUGGE, N. 2010. Noonan syndrome, the SOS1 gene and embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 49, 635-41.
- KALIMUTHU, S. N. & CHETTY, R. 2016. Gene of the month: SMARCB1. *J Clin Pathol*, 69, 484-9.

- KAMPA, M., BAKOGEORGOU, E., HATZOGLOU, A., DAMIANAKI, A., MARTIN, P. M. & CASTANAS, E. 1997. Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, 335, 255-65.
- KAMPA, M., HATZOGLOU, A., NOTAS, G., NINIRAKI, M., KOUROUMALIS, E. & CASTANAS, E. 2001. Opioids are non-competitive inhibitors of nitric oxide synthase in T47D human breast cancer cells. *Cell Death Differ*, 8, 943-52.
- KAWAKAMI, T., NABESHIMA, K., HAMASAKI, M., IWASAKI, A., SHIRAKUSA, T. & IWASAKI, H. 2009. Small cluster invasion: a possible link between micropapillary pattern and lymph node metastasis in pT1 lung adenocarcinomas. *Virchows Arch*, 454, 61-70.
- KAWASE, M., SAKAGAMI, H., FURUYA, K., KIKUCHI, H., NISHIKAWA, H., MOTOHASHI, N., MORIMOTO, Y., VARGA, A. & MOLNAR, J. 2002. Cell death-inducing activity of opiates in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res*, 22, 211-4.
- KAYE, S. & MERRY, S. 1985. Tumour cell resistance to anthracyclines--a review. *Cancer Chemother Pharmacol*, 14, 96-103.
- KIM, K. H. & ROBERTS, C. W. 2014. Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth. *Cancer Genet*, 207, 365-72.
- KOCH, T., SEIFERT, A., WU, D. F., RANKOVIC, M., KRAUS, J., BORNER, C., BRANDENBURG, L. O., SCHRODER, H. & HOLLT, V. 2009. mu-opioid receptor-stimulated synthesis of reactive oxygen species is mediated via phospholipase D2. *J Neurochem*, 110, 1288-96.
- KOOPMAN, G., REUTELINGSPERGER, C. P., KUIJTEN, G. A., KEEHNEN, R. M., PALS, S. T. & VAN OERS, M. H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-20.
- KRAMMER, P. H., ARNOLD, R. & LAVRIK, I. N. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol*, 7, 532-42.
- KRISCHER, J. P., EPSTEIN, S., CUTHBERTSON, D. D., GOORIN, A. M., EPSTEIN, M. L. & LIPSHULTZ, S. E. 1997. Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol*, 15, 1544-52.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUNEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. & MELINO, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3-11.
- KUFE, D. W., POLLOCK, R. E., WEICHSELBAUM, R. D., BAST, R. C., T.S., G., J.F., H. & E., F. 2003. *Cancer Medicine, 6th edition*, Hamilton, Ontario, BC Decker.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAL, S., MAHAJAN, A., CHEN, W. N. & CHOWBAY, B. 2010. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Curr Drug Metab*, 11, 115-28.
- LEE, S. J., PARK, J. W., KANG, B. S., LEE, D. S., LEE, H. S., CHOI, S. & KWON, O. S. 2017. Chronophin activation is necessary in Doxorubicin-induced actin cytoskeleton alteration. *BMB Rep*, 50, 335-340.
- LEFKOWITZ, R. J. & SHENOY, S. K. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308, 512-7.

- LEITLINIENPROGRAMM DER GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE, E. K. U. T. K., GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE (GPOH),. 2017. *S1-Leitlinie Weichteilsarkome Stand: März 2017 AWMF-Register Nr. 025/0077777* [Online]. Available: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-007I_S1_Weichteilsarkome_2017-03.pdf [Accessed 13.07.2017].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF),. 2015. *S3-Leitlinie: Palliativmedizin für Patienten mit einer nicht heilbaren Krebserkrankung; Langversion 1.1 Stand: Mai 2015 AWMF-Register Nr. 128/001OL* [Online]. Available: http://www.dgpalliativmedizin.de/images/stories/LL_Palliativmedizin_Langversion_1_1.pdf [Accessed 09.07.2017].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF),. 2017. *S3-Leitlinie Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen; Langversion 1.1 Stand: April 2017 AWMF-Register Nr. 032/054OL* [Online]. Available: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-054OLI_S3_Supportiv_2017-05.pdf [Accessed 09.07.2017].
- LEITLINIENPROGRAMM PSYCHIATRIE (BAYERISCHE AKADEMIE FÜR SUCHT- UND GESUNDHEITSPRAGEN). 2010. *Leitfaden für Ärzte zur substituionsgestützten Behandlung Opiatabhängiger (2. vollständig überarbeitete Auflage) Stand: Juni 2010* [Online]. Available: http://www.bas-muenchen.de/fileadmin/documents/pdf/Publikationen/BAS_Substitutionsleitfaden_2011_final_110107.pdf [Accessed 19.08.2017].
- LEITLINIENPROGRAMM SCHMERZMEDIZIN (DEUTSCHE SCHMERZGESELLSCHAFT, A. 2015. *S3-Leitlinie „Langzeitanwendung von Opioiden bei nicht tumorbedingten Schmerzen - "LONTS" Stand: Sept. 2014 AWMF-Register Nr. 145/003* [Online]. Available: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/145-003I_S3_LONTS_2015-01.pdf [Accessed 09.07.2017].
- LI, F. P. & FRAUMENI, J. F., JR. 1969. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*, 71, 747-52.
- LI, Z. H., CHU, N., SHAN, L. D., GONG, S., YIN, Q. Z. & JIANG, X. H. 2009. Inducible expression of functional mu opioid receptors in murine dendritic cells. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, 359-67.
- LIANG, C. C., PARK, A. Y. & GUAN, J. L. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2, 329-33.
- LIANG, X., LIU, R., CHEN, C., JI, F. & LI, T. 2016. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. *Transl Perioper Pain Med*, 1, 5-13.
- LIN, C. C., LEE, I. T., WU, W. L., LIN, W. N. & YANG, C. M. 2012. Adenosine triphosphate regulates NADPH oxidase activity leading to hydrogen peroxide production and COX-2/PGE2 expression in A549 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303, L401-12.
- LOWE, L. H., ISUANI, B. H., HELLER, R. M., STEIN, S. M., JOHNSON, J. E., NAVARRO, O. M. & HERNANZ-SCHULMAN, M. 2000. Pediatric renal masses: Wilms tumor and beyond. *Radiographics*, 20, 1585-603.
- MACPHERSON, I. R., HOOPER, S., SERRELS, A., MCGARRY, L., OZANNE, B. W., HARRINGTON, K., FRAME, M. C., SAHAI, E. & BRUNTON, V. G. 2007. p120-catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma cells via a phosphorylation-independent mechanism. *Oncogene*, 26, 5214-28.
- MANECKJEE, R., BISWAS, R. & VONDERHAAR, B. K. 1990. Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth. *Cancer Res*, 50, 2234-8.

- MANECKJEE, R. & MINNA, J. D. 1990. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 3294-8.
- MANECKJEE, R. & MINNA, J. D. 1992. Nonconventional opioid binding sites mediate growth inhibitory effects of methadone on human lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1169-73.
- MANECKJEE, R. & MINNA, J. D. 1994. Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ*, 5, 1033-40.
- MARTIN, M. C., ALLAN, L. A., LICKRISH, M., SAMPSON, C., MORRICE, N. & CLARKE, P. R. 2005. Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem*, 280, 15449-55.
- MATSUI, A. & WILLIAMS, J. T. 2010. Activation of micro-opioid receptors and block of Kir3 potassium channels and NMDA receptor conductance by L- and D-methadone in rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol*, 161, 1403-13.
- MAURER, H. M., BELTANGADY, M., GEHAN, E. A., CRIST, W., HAMMOND, D., HAYS, D. M., HEYN, R., LAWRENCE, W., NEWTON, W., ORTEGA, J. & ET AL. 1988. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report. *Cancer*, 61, 209-20.
- MAURER, H. M., GEHAN, E. A., BELTANGADY, M., CRIST, W., DICKMAN, P. S., DONALDSON, S. S., FRYER, C., HAMMOND, D., HAYS, D. M., HERRMANN, J. & ET AL. 1993. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II. *Cancer*, 71, 1904-22.
- MCALLISTER, R. M., MELNYK, J., FINKELSTEIN, J. Z., ADAMS, E. C., JR. & GARDNER, M. B. 1969. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 24, 520-6.
- MCDOWELL, H. 2003. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child*, 88, 354-7.
- MELZIG, M. F., NYLANDER, I., VLASKOVSKA, M. & TERENIUS, L. 1995. Beta-endorphin stimulates proliferation of small cell lung carcinoma cells in vitro via nonopioid binding sites. *Exp Cell Res*, 219, 471-6.
- MERTENS, F., ANTONESCU, C. R., HOHENBERGER, P., LADANYI, M., MODENA, P., D'INCALCI, M., CASALI, P. G., AGLIETTA, M. & ALVEGARD, T. 2009. Translocation-related sarcomas. *Semin Oncol*, 36, 312-23.
- MILANI, D., MANZONI, F. M. P., PEZZANI, L., AJMONE, P., GERVASINI, C., MENNI, F. & ESPOSITO, S. 2015. Rubinstein-Taybi syndrome: clinical features, genetic basis, diagnosis, and management. *Ital J Pediatr*, 41.
- MOON, T. D. 1988. The effect of opiates upon prostatic carcinoma cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 153, 722-7.
- MORTON, C. L. & POTTER, P. M. 1998. Rhabdomyosarcoma-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene confers sensitivity to ganciclovir. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 1066-73.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MYKLEBUST, J. H., JOSEFSEN, D., BLOMHOFF, H. K., LEVY, F. O., NADERI, S., REED, J. C. & SMELAND, E. B. 1999. Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. *J Cell Physiol*, 180, 71-80.
- NAUCK, F., OSTGATHE, C. & DICKERSON, E. D. 2001. A German model for methadone conversion. *Am J Hosp Palliat Care*, 18, 200-2.
- NINKOVIC, J. & ROY, S. 2013. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids*, 45, 9-24.

- NUBER, S., ZABEL, U., LORENZ, K., NUBER, A., MILLIGAN, G., TOBIN, A. B., LOHSE, M. J. & HOFFMANN, C. 2016. beta-Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature*, 531, 661-4.
- NYLUND, G., PETTERSSON, A., BENGTTSSON, C., KHORRAM-MANESH, A., NORDGREN, S. & DELBRO, D. S. 2008. Functional expression of mu-opioid receptors in the human colon cancer cell line, HT-29, and their localization in human colon. *Dig Dis Sci*, 53, 461-6.
- OBERST, A., BENDER, C. & GREEN, D. R. 2008. Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ*, 15, 1139-46.
- OGNJANOVIC, S., LINABERY, A. M., CHARBONNEAU, B. & ROSS, J. A. 2009. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, 115, 4218-26.
- OKABE, M., UNNO, M., HARIGAE, H., KAKU, M., OKITSU, Y., SASAKI, T., MIZOI, T., SHIIBA, K., TAKANAGA, H., TERASAKI, T., MATSUNO, S., SASAKI, I., ITO, S. & ABE, T. 2005. Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. *Biochem Biophys Res Commun*, 333, 754-62.
- ORLOV, S. N., THORIN-TRESCASES, N., DULIN, N. O., DAM, T. V., FORTUNO, M. A., TREMBLAY, J. & HAMET, P. 1999. Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3. *Cell Death Differ*, 6, 661-72.
- PAGE, G. G., BEN-ELIYAHU, S., YIRMIYA, R. & LIEBESKIND, J. C. 1993. Morphine attenuates surgery-induced enhancement of metastatic colonization in rats. *Pain*, 54, 21-8.
- PATEL, K., BHASKARAN, M., DANI, D., REDDY, K. & SINGHAL, P. C. 2003. Role of heme oxygenase-1 in morphine-modulated apoptosis and migration of macrophages. *J Infect Dis*, 187, 47-54.
- PELEG, S., VARON, D., IVANINA, T., DESSAUER, C. W. & DASCAL, N. 2002. G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron*, 33, 87-99.
- PENG, J., SARKAR, S. & CHANG, S. L. 2012. Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend*, 124, 223-8.
- PHAN, N. N., WANG, C. Y., CHEN, C. F., SUN, Z., LAI, M. D. & LIN, Y. C. 2017. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett*, 14, 2059-2074.
- PICHOT, C. S., HARTIG, S. M., XIA, L., ARVANITIS, C., MONISVAIS, D., LEE, F. Y., FROST, J. A. & COREY, S. J. 2009. Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells. *Br J Cancer*, 101, 38-47.
- PLEIN, L. M. & RITTNER, H. L. 2017. Opioids and the immune system - friend or foe. *Br J Pharmacol*.
- PUTRI, H., JENIE, R. I., HANDAYANI, S., KASTIAN, R. F. & MEIYANTO, E. 2016. Combination of Potassium Pentagamavunon-0 and Doxorubicin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Inhibits Metastasis in Breast Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17, 2683-8.
- RADZIKOWSKA, J., KUKWA, W., KUKWA, A., CZARNECKA, A. & KRZESKI, A. 2015. Rhabdomyosarcoma of the head and neck in children. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19, 98-107.
- RAEHAL, K. M., SCHMID, C. L., GROER, C. E. & BOHN, L. M. 2011. Functional Selectivity at the μ -Opioid Receptor: Implications for Understanding Opioid Analgesia and Tolerance. *Pharmacol Rev*, 63, 1001-19.

- RICKERT, C. H. & PAULUS, W. 2001. Epidemiology of central nervous system tumors in childhood and adolescence based on the new WHO classification. *Childs Nerv Syst*, 17, 503-11.
- RIDLEY, A. J. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 36, 103-12.
- RODRIGUEZ-PERALES, S., MARTINEZ-RAMIREZ, A., DE ANDRES, S. A., VALLE, L., URIOSTE, M., BENITEZ, J. & CIGUDOSA, J. C. 2004. Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, 148, 35-43.
- RODRIGUEZ, L. G., WU, X. & GUAN, J. L. 2005. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol*, 294, 23-9.
- ROTH, K. A. & BARCHAS, J. D. 1986. Small cell carcinoma cell lines contain opioid peptides and receptors. *Cancer*, 57, 769-73.
- ROY, S., WANG, J., GUPTA, S., CHARBONEAU, R., LOH, H. H. & BARKE, R. A. 2004. Chronic morphine treatment differentiates T helper cells to Th2 effector cells by modulating transcription factors GATA 3 and T-bet. *J Neuroimmunol*, 147, 78-81.
- ROY, S., WANG, J., KELSCHENBACH, J., KOODIE, L. & MARTIN, J. 2006. Modulation of immune function by morphine: implications for susceptibility to infection. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1, 77-89.
- RYTER, S. W., KIM, H. P., HOETZEL, A., PARK, J. W., NAKAHIRA, K., WANG, X. & CHOI, A. M. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 9, 49-89.
- SACERDOTE, P., FRANCHI, S., GERRA, G., LECCESE, V., PANERAI, A. E. & SOMAINI, L. 2008. Buprenorphine and methadone maintenance treatment of heroin addicts preserves immune function. *Brain Behav Immun*, 22, 606-13.
- SAELENS, X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G. & VANDENABEELE, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-74.
- SAFA, M., KAZEMI, A., ZAND, H., AZARKEIVAN, A., ZAKER, F. & HAYAT, P. 2010. Inhibitory role of cAMP on doxorubicin-induced apoptosis in pre-B ALL cells through dephosphorylation of p53 serine residues. *Apoptosis*, 15, 196-203.
- SAHAI, E. 2005. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 87-96.
- SAIFY, K. & SAADAT, M. 2015. Expression patterns of antioxidant genes in human SH-SY5Y cells after treatment with methadone. *Psychiatry Res*, 230, 116-9.
- SASAMURA, T., NAKAMURA, S., IIDA, Y., FUJII, H., MURATA, J., SAIKI, I., NOJIMA, H. & KURASHI, Y. 2002. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol*, 441, 185-91.
- SAURER, T. B., CARRIGAN, K. A., IJAMES, S. G. & LYSLE, D. T. 2006. Suppression of natural killer cell activity by morphine is mediated by the nucleus accumbens shell. *J Neuroimmunol*, 173, 3-11.
- SCHAAF, G., HAMDY, M., ZWIJNENBURG, D., LAKEMAN, A., GEERTS, D., VERSTEEG, R. & KOOL, M. 2010. Silencing of SPRY1 triggers complete regression of rhabdomyosarcoma tumors carrying a mutated RAS gene. *Cancer Res*, 70, 762-71.
- SCHÄFER, M. & MOUSA, S. A. 2009. Opioid therapy and tumor progression. *Advances in Palliative Medicine*, 8, 53-56.
- SCHIEBER, M. & CHANDEL, N. S. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*, 24, R453-62.
- SERGEEVA, M. G., GRISHINA, Z. V. & VARFOLOMEYEV, S. D. 1993. Morphine effect on proliferation of normal and tumor cells of immune origin. *Immunol Lett*, 36, 215-8.

- SESENA, E., VEGA, R. & SOTO, E. 2014. Activation of mu-opioid receptors inhibits calcium-currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent mechanism. *Front Cell Neurosci*, 8, 90.
- SEVENET, N., SHERIDAN, E., AMRAM, D., SCHNEIDER, P., HANDGRETINGER, R. & DELATTRE, O. 1999. Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers. *Am J Hum Genet*, 65, 1342-8.
- SHEN, F., CHU, S., BENICE, A. K., BAILEY, B., XUE, X., ERICKSON, P. A., MONTROSE, M. H., BECK, W. T. & ERICKSON, L. C. 2008. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 95-102.
- SIMON, R. H. & ARBO, T. E. 1986. Morphine increases metastatic tumor growth. *Brain Res Bull*, 16, 363-7.
- SINGH, A., JAYANTHAN, A., FARRAN, A., ELWI, A. N., KIM, S. W., FARRAN, P. & NARENDRAN, A. 2011. Induction of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells by the therapeutic opioid methadone and effective synergy with Bcl-2 inhibition. *Leuk Res*, 35, 1649-57.
- SMITH, A. C., CHOUFANI, S., FERREIRA, J. C. & WEKSBERG, R. 2007. Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. *Pediatr Res*, 61, 43r-47r.
- SPALLAROSSA, P., ALTIERI, P., GARIBALDI, S., GHIGLIOTTI, G., BARISIONE, C., MANCA, V., FABBI, P., BALLESTRERO, A., BRUNELLI, C. & BARSOTTI, A. 2006. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res*, 69, 736-45.
- SREDNI, S. T., SUZUKI, M., YANG, J. P., TOPCZEWSKI, J., BAILEY, A. W., GOKIRMAK, T., GROSS, J. N., DE ANDRADE, A., KONDO, A., PIPER, D. R. & TOMITA, T. 2017. A functional screening of the kinome identifies the Polo-like kinase 4 as a potential therapeutic target for malignant rhabdoid tumors, and possibly, other embryonal tumors of the brain. *Pediatr Blood Cancer*.
- STEENMAN, M., WESTERVELD, A. & MANNENS, M. 2000. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer*, 28, 1-13.
- STOCKERT, J. C., BLAZQUEZ-CASTRO, A., CANETE, M., HOROBIN, R. W. & VILLANUEVA, A. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*, 114, 785-96.
- SUEOKA, E., SUEOKA, N., KAI, Y., OKABE, S., SUGANUMA, M., KANEMATSU, K., YAMAMOTO, T. & FUJIKI, H. 1998. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 252, 566-70.
- SUEOKA, N., SUEOKA, E., OKABE, S. & FUJIKI, H. 1996. Anti-cancer effects of morphine through inhibition of tumour necrosis factor-alpha release and mRNA expression. *Carcinogenesis*, 17, 2337-41.
- SUNG, L., ANDERSON, J. R., ARNDT, C., RANEY, R. B., MEYER, W. H. & PAPPO, A. S. 2004. Neurofibromatosis in children with Rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma study IV. *J Pediatr*, 144, 666-8.
- TANNOCK, I. F. & LEE, C. 2001. Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. *Br J Cancer*, 84, 100-5.
- TAYLOR, A. C., SHU, L., DANKS, M. K., POQUETTE, C. A., SHETTY, S., THAYER, M. J., HOUGHTON, P. J. & HARRIS, L. C. 2000. P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med Pediatr Oncol*, 35, 96-103.

- TEGEDER, I. & GEISSLINGER, G. 2004. Opioids as modulators of cell death and survival--unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev*, 56, 351-69.
- TEGEDER, I., GRÖSCH, S., SCHMIDTKO, A., HÄUSSLER, A., SCHMIDT, H., NIEDERBERGER, E., SCHOLICH, K. & GEISSLINGER, G. 2003. G Protein-independent G₁ Cell Cycle Block and Apoptosis with Morphine in Adenocarcinoma Cells. *Involvement of p53 Phosphorylation*, 63, 1846-1852.
- THANNICKAL, V. J. & FANBURG, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1005-28.
- THORN, C. F., OSHIRO, C., MARSH, S., HERNANDEZ-BOUSSARD, T., MCLEOD, H., KLEIN, T. E. & ALTMAN, R. B. 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21, 440-6.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24, 145-9.
- TREPAT, X., CHEN, Z. & JACOBSON, K. 2012. Cell Migration. *Compr Physiol*, 2, 2369-92.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- VERSTEEGE, I., SEVENET, N., LANGE, J., ROUSSEAU-MERCK, M. F., AMBROS, P., HANDGRETINGER, R., AURIAS, A. & DELATTRE, O. 1998. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, 394, 203-6.
- VILLANOVA, L., CARECCIA, S., DE MARIA, R. & FIORI, M. E. 2018. Micro-Economics of Apoptosis in Cancer: ncRNAs Modulation of BCL-2 Family Members. *Int J Mol Sci*, 19.
- VUJANIC, G. M., SANDSTEDT, B., HARMS, D., BOCCON-GIBOD, L. & DELEMARRE, J. F. 1996. Rhabdoid tumour of the kidney: a clinicopathological study of 22 patients from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) nephroblastoma file. *Histopathology*, 28, 333-40.
- WALTERHOUSE, D. & WATSON, A. 2007. Optimal management strategies for rhabdomyosarcoma in children. *Paediatr Drugs*, 9, 391-400.
- WANG, J., CHARBONEAU, R., BARKE, R. A., LOH, H. H. & ROY, S. 2002. Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol*, 169, 3630-6.
- WANG, M., ZHAO, J., ZHANG, L., WEI, F., LIAN, Y., WU, Y., GONG, Z., ZHANG, S., ZHOU, J., CAO, K., LI, X., XIONG, W., LI, G., ZENG, Z. & GUO, C. 2017. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*, 8, 761-73.
- WEI, C., WANG, X., CHEN, M., OUYANG, K., SONG, L. S. & CHENG, H. 2009. Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, 457, 901-5.
- WEI, C., WANG, X., ZHENG, M. & CHENG, H. 2012. Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 24, 254-61.
- WEISS, R. B. 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol*, 19, 670-86.
- WILLIAMS, J. T., INGRAM, S. L., HENDERSON, G., CHAVKIN, C., VON ZASTROW, M., SCHULZ, S., KOCH, T., EVANS, C. J. & CHRISTIE, M. D. J. 2013. Regulation of μ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacol Rev*, 65, 223-54.
- WOEHRER, A., SLAVC, I., WALDHOER, T., HEINZL, H., ZIELONKE, N., CZECH, T., BENESCH, M., HAINFELLNER, J. A. & HABERLER, C. 2010. Incidence of atypical teratoid/rhabdoid tumors in children: a population-based study by the Austrian Brain Tumor Registry, 1996-2006. *Cancer*, 116, 5725-32.

- XIA, S. J., PRESSEY, J. G. & BARR, F. G. 2002. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther*, 1, 97-104.
- YEAGER, M. P. & COLACCHIO, T. A. 1991. Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. *Arch Surg*, 126, 454-6.
- YEAGER, M. P., PROCOPIO, M. A., DELEO, J. A., ARRUDA, J. L., HILDEBRANDT, L. & HOWELL, A. L. 2002. Intravenous fentanyl increases natural killer cell cytotoxicity and circulating CD16(+) lymphocytes in humans. *Anesth Analg*, 94, 94-9, table of contents.
- YIN, D., MUFSON, R. A., WANG, R. & SHI, Y. 1999. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature*, 397, 218.
- YIN, D. L., REN, X. H., ZHENG, Z. L., PU, L., JIANG, L. Z., MA, L. & PEI, G. 1997. Etorphine inhibits cell growth and induces apoptosis in SK-N-SH cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. *Neurosci Res*, 29, 121-7.
- ZHANG, A. Y., YI, F., JIN, S., XIA, M., CHEN, Q. Z., GULBINS, E. & LI, P. L. 2007. Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*, 9, 817-28.
- ZHANG, A. Y., YI, F., ZHANG, G., GULBINS, E. & LI, P. L. 2006. Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells. *Hypertension*, 47, 74-80.
- ZHU, M., WANG, H., CUI, J., LI, W., AN, G., PAN, Y., ZHANG, Q., XING, R. & LU, Y. 2017. Calcium-binding protein S100A14 induces differentiation and suppresses metastasis in gastric cancer. *Cell Death Dis*, 8, e2938.
- ZOR, T. & SELINGER, Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 236, 302-8.

7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, in der Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie unter Betreuung von Prof. Dr. Steven Warmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Fr. Dr. rer. nat. Evi Schmid (Laborleiterin).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Matias Stagno (biologischer Doktorand) und Dr. Evi Schmid von mir eigenständig durchgeführt. Die Daten für den Colony Forming Assay wurden von Bettina Kirchner (MTA) erhoben. Die Durchführung der Western Blots erfolgte mit Unterstützung von Melanie Hauth (MTA) und Dr. Evi Schmid.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Evi Schmid eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig, nach Anleitung durch Prof. Dr. Steven Warmann und Dr. Evi Schmid, verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 25.07.2019

Ann-Sophie Raible

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen nachstehenden Personen bedanken, ohne deren Mithilfe die vorliegende Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Steven Warmann bedanken, für die Ermöglichung und Betreuung dieser Dissertation sowie für die freundliche Aufnahme in das Labor der Kinderchirurgie und Kinderurologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid, für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung durch Sie. Mit wertvollen Ratschlägen und viel Geduld begleitete sie mich während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Promotion und stand mir bei Anliegen und offenen Fragen immer tatkräftig und mit viel Zeit zur Seite.

Ein großes Dankeschön gilt außerdem Matias Stagno für die kompetente Einarbeitung zu Beginn der Arbeit und die tägliche Unterstützung bei großen und kleinen Problemen im Labor.

Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei den MTA's Julia Wenz, Bettina Kirchner und Melanie Hauth bedanken, für ihr Verständnis und ihre Geduld und das durchweg freundliche und nette Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger für die motivierenden und netten Gespräche und sein reges Interesse an meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie für ihre Unterstützung und die zahlreichen aufbauenden Gespräche bedanken, sowie für den großen Rückhalt, den ich während der Erstellung meiner Dissertation erfahren durfte.