

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

**Das Exportprotein XPO1 in Rhabdomyosarkomzelllinien-
Ansatz neuer Therapiemöglichkeiten?**

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

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

vorgelegt von

Biró, Franziska Antonia, geb. Weber

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: PD Dr. Verena Ellerkamp
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Kopp

Tag der Disputation: 29.09.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Das Rhabdomyosarkom beim Kind	10
1.1.1 Vorkommen und Einteilung	10
1.1.2 Histologie und Genetik	10
1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild	14
1.1.4 Diagnostik	14
1.1.5 Therapieansätze	15
1.2 Das Exportprotein XPO1	20
1.3 Fragestellung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Materialien und Geräte	26
2.1.1 Allgemeine Materialien	26
2.1.2 Geräte	27
2.2 Methoden	28
2.3 Zellkultur	28
2.3.1 Zelllinien	28
2.3.2 Auftauen von Zellen	29
2.3.3 Kultivierung	29
2.3.4 Passagieren von Zellen	30
2.3.5 Bestimmung der Zellzahl	31
2.3.6 Kryokonservierung von Zellen	31
2.4 Western Blot	33
2.4.1 Einführung	33
2.4.2 Herstellen von Proteinlysaten	33
2.4.3 Herstellen von Proteinproben	34
2.4.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.4.3.2 Probenvorbereitung für Gelelektrophorese	34
2.4.4 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	35
2.4.5 Übertragung der Proteine	37

2.4.6	Immundetektion	37
2.5	Zellviabilitäts-Assay (MTT)	40
2.6	Colony Forming Assay (CFA).....	41
2.7	Berechnungen zu synergistischen, additiven und antagonistischen Effekten bei RMS- Zelllinien unter Kombinationstherapie mit Selinexor und Curcumin	43
2.8	Statistik.....	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Expressionsprofil des Exportproteins XPO1.....	44
3.2	Zytotoxisches Potenzial von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Zellviabilität in RMS-Zelllinien.....	45
3.2.1	Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Zellviabilität von RMS-Zellen (MTT-Assays)	49
3.3	Analyse des Effektes von Curcumin auf die Expression des Exportproteins XPO1	51
3.4	Analyse des Effektes von Selinexor auf die Expression des Exportproteins XPO1	52
3.5	Untersuchung der Wirkung einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Expression des Exportproteins XPO1	53
3.5.1	Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die XPO1-Expression in RMS-Zellen (Western Blot).....	54
3.6	Expressionsmuster der Zielgene Cyclin D1 und p53 des Exportproteins XPO1..	55
3.6.1	Analyse des Effektes von Curcumin auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1...	55
3.6.2	Analyse des Effektes von Curcumin auf das Zielgen p53 von XPO1...	56
3.6.3	Analyse des Effektes von Selinexor auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1.....	57
3.6.4	Analyse des Effektes von Selinexor auf das Zielgen p53 von XPO1...	58
3.6.5	Untersuchungen zur Wirkung einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1	59
3.6.5.1	Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Cyclin D1-Expression in RMS-Zellen (Western Blot).....	60
3.6.6	Untersuchungen zur Wirkung einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf das Zielgen p53 von XPO1.....	61

3.6.6.1	Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die p53-Expression in RMS-Zellen (Western Blot)	62
3.7	Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Koloniebildung (CFA).....	63
3.7.1	Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Koloniebildung in RMS-Zellen (CFA)	65
4	Diskussion	66
4.1	Zytotoxische Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie in RMS-Zelllinien	67
4.2	Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Expression von XPO1 und die Zielgene p53 und Cyclin D1	70
4.3	Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Reproduktionsfähigkeit in Rhabdomyosarkomzelllinien	74
4.4	Limitationen/Ausblick.....	75
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis.....	81
7	Erklärung zum Eigenanteil	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Summenformel von Curcumin	17
Abbildung 2: Ausgewählte Wirkmechanismen von Curcumin (frei nach Fig.4 (30))	18
Abbildung 3: Vulcano Blot von RH30 Zellen.....	20
Abbildung 4: Wirkmechanismus von XPO1 (frei nach Fig. 1 (42)).....	21
Abbildung 5: Summenformel von Selinexor (frei nach „Chemical structure of Selinexor“ (35)).....	22
Abbildung 6: Wirkmechanismus von Selinexor.....	23
Abbildung 7: Expressionsprofil von XPO1 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien sowie in der Skelettmuskelzelllinie SKMC	44
Abbildung 8: Untersuchung der Zellviabilität bei Behandlung mit aufsteigenden Curcumin-Konzentrationen in Rhabdomyosarkom-Zelllinien.....	46
Abbildung 9: Untersuchung der Zellviabilität in Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Behandlung mit Selinexor.....	47
Abbildung 10: Auswirkungen von Curcumin in Kombination mit Selinexor auf die Zellviabilität in Rhabdomyosarkom-Zelllinien.....	48
Abbildung 11: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Zellviabilität von Rhabdomyosarkomzelllinien (MTT-Assays).....	49
Abbildung 12: Analyse der Zellviabilität in Skelettmuskelzellen unter Behandlung mit Curcumin und Selinexor	50
Abbildung 13: Untersuchung der Wirkung von Curcumin auf die XPO1-Expression in Rhabdomyosarkom-Zelllinien	51
Abbildung 14: Analyse der XPO1-Expression unter Gabe von Selinexor in Rhabdomyosarkom-Zelllinien	52
Abbildung 15: Auswirkungen der Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die XPO1-Expression in Rhabdomyosarkom- Zelllinien	53
Abbildung 16: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die XPO1-Expression in Rhabdomyosarkomzelllinien (Western Blot).....	54
Abbildung 17: Expressionslevel von Cyclin D1 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien nach Curcumin-Behandlung	55
Abbildung 18: Expressionsanalyse von p53 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Curcumin-Behandlung.....	56
Abbildung 19: Expressionslevel von Cyclin D1 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien nach Selinexor-Behandlung	57
Abbildung 20: Expressionsanalyse von p53 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Selinexor-Behandlung	58
Abbildung 21: Auswirkungen von Curcumin in Kombination mit Selinexor auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1 bei Rhabdomyosarkom- Zelllinien	59

Abbildung 22: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Cyclin D1-Expression in Rhabdomyosarkomzelllinien (Western Blot).....	60
Abbildung 23: Auswirkungen von Curcumin in Kombination mit Selinexor auf p53 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien	61
Abbildung 24: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die p53-Expression in Rhabdomyosarkomzelllinien (Western Blot).....	62
Abbildung 25: Auswirkung von Selinexor auf die Koloniebildung bei Rhabdomyosarkom-Zelllinien	63
Abbildung 26: Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Koloniebildung bei Rhabdomyosarkom-Zelllinien	64
Abbildung 27: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Koloniebildung in Rhabdomyosarkomzelllinien (CFA)	65
Abbildung 28: Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf XPO1 und die ausgewählten Proteine Cyclin D1 und p53	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risiko-Stratifizierung der Children's Oncology Group (COG)	12
Tabelle 2: Aktuelle Risiko-Stratifizierung der COG	13
Tabelle 3: Klinische Einteilung Rhabdomyosarkome (frei nach Table 4 (3))	13
Tabelle 4: Zusammensetzung Zellkulturmedium	30
Tabelle 5: Zusammensetzung Einfriermedium	32
Tabelle 6: Zellzahlen für die jeweiligen Behandlungen.....	32
Tabelle 7: Zusammensetzung Zell-Lysepuffer (1 x)	34
Tabelle 8: Zusammensetzung Gele für Western Blot	36
Tabelle 9: Zusammensetzung APS 10 %	36
Tabelle 10: Zusammensetzung SDS 10 %.....	36
Tabelle 11: Zusammensetzung Laufpuffer	36
Tabelle 12: Zusammensetzung Transferpuffer (10 x und 1 x)	37
Tabelle 13: Zusammensetzung TBS (10x) und TBS-T (1x)	38
Tabelle 14: Erstantikörper Western Blot.....	39
Tabelle 15: Zweitantikörper Western Blot.....	39
Tabelle 16: Zusammensetzung Lysepuffer und MTT-Reagenz.....	41
Tabelle 17: Zusammensetzung 1%ige Kristallviolett-Lösung	42

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
BSA	bovines Serumalbumin
CFA	Colony forming Assay
CRM1 (=XPO1)	Chromosome Maintenance Region 1 (Exportin 1)
CT	Computertomographie
CWS	Cooperative Weichteilsarkomstudie
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERMS	embryonales Rhabdomyosarkom
FBS	Fetales bovines Serum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
LMB	Leptomycin B
LOH	Loss of heterozygosity
LOI	Loss of imprinting
M	Molar
ml	Milliliter
min	Minute
MP	Milchpulver
MRT	Magnetresonanztomographie
NES	nukleäre Exportsignalsequenz
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
RB	Retinoblastomprotein
RMS	Rhabdomyosarkom
Seli	Selinexor
SINE	selektiver Inhibitor nukleären Exports
TSP	Tumorsuppressorprotein
TSPE	Tumorsuppressorproteine
vgl.	vergleiche
XPO1 (=CRM1)	Exportin 1

1 Einleitung

1.1 Das Rhabdomyosarkom beim Kind

1.1.1 Vorkommen und Einteilung

Erstmals wurde das Rhabdomyosarkom (RMS) 1854 von Weber beschrieben (1). Es gehört zu den häufigsten Weichteilsarkomen bei Kindern (2, 3) und steht nach ZNS-Tumoren, Lymphomen und Neuroblastomen an vierter Stelle kindlicher solider Tumore (4). Insgesamt 7 % aller pädiatrischen Tumorerkrankungen sind RMS (5). Die jährliche Inzidenz des RMS liegt bei 4,5 von einer Million Kindern (6). Es gibt einen Altersgipfel zwischen zwei und sechs Jahren und einen zwischen zehn bis achtzehn Jahren, jedoch werden 80 % der RMS vor dem vierzehnten Lebensjahr diagnostiziert. Diese Verteilung geht mit den verschiedenen Subtypen des RMS einher (6).

In der aktuellen WHO-Klassifikation werden die RMS in vier Gruppen eingeteilt; embryonale RMS (ERMS), alveoläre RMS (ARMS), pleomorphe RMS und Spindelzell-/ sklerosierende RMS. Im Fokus dieser Dissertation stehen vor allem die zwei größeren Subtypen ERMS und ARMS. Diese beiden unterscheiden sich neben der Histologie vor allem hinsichtlich des Verlaufs und der 5-Jahres-Überlebensraten. Während das ERMS, häufig in der Altersklasse unter 10 Jahre, ein 5-Jahres-Überleben von 75 % aufweist, liegt dies bei den ARMS, das sowohl bei den unter 10-jährigen als auch bei Jugendlichen auftritt, bei 50 % (7). Das ERMS ist mit 65-75 % häufiger als das ARMS mit 25-32 % (6). Darüber hinaus besteht für ERMS eine Androtomie mit einem Verhältnis von 1,5:1 (3). Pleomorphe RMS treten gewöhnlich bei Erwachsenen auf und sehr selten bei Kindern (1). Typischerweise werden pleomorphe RMS bei Kindern als ERMS mit diffuser Anaplasie bezeichnet (3).

1.1.2 Histologie und Genetik

Das RMS gehört zur Gruppe der klein-, rund- und blauzelligen Tumoren („small round blue cell tumor“), ebenso wie das Lymphom, das Neuroblastom und primäre mesenchymale Tumore (6). Rhabdomyosarkomzellen stammen von primären Mesenchymzellen ab, die eine Differenzierung von Skelettmuskelzellen aufweisen (1).

Prädisponierende Faktoren für das RMS sind bisher nicht gesichert (1). Eine Hypothese ist, dass Umweltfaktoren und eine genetische Anlage eine Rolle in der Entwicklung von RMS spielen (3). So besteht ein Zusammenhang mit genetischen Syndromen, die zur Tumorbildung führen, wie zum Beispiel dem Li-Fraumeni-Syndrom (8), der Neurofibromatose I (9) oder dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (10). Das Li-Fraumeni-Syndrom ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die häufig mit einer Keimbahnmutation von p53 einhergeht (1, 2, 8). Zu erwähnen ist hierbei, dass eine Prädisposition zu Tumoren häufiger bei Patienten mit ERMS als mit ARMS auftritt. Weitere Syndrome, die bei Kindern mit ERMS auftreten sind zum Beispiel das Costello Syndrom, das Noonan-Syndrom und das DICER1-Syndrom (3).

Im Folgenden werden histologische Charakteristika und genetische Merkmale von ERMS und ARMS genauer beschrieben. Um immunhistochemisch ein RMS zu identifizieren, können Desmin, Myogenin, Myo D1 und muskelspezifisches Aktin verwendet werden (11).

ERMS können je nach Differenzierungsgrad eine Querstreifung in ihrem Wachstumsmuster aufweisen und ähneln fetaler Muskulatur (11). Sie stellen sich als kleine, spindel- bis pyramidenförmig -ausgezogene Zellen dar. ERMS können sich zytologisch in großer Variabilität präsentieren. Beim ERMS liegt in 80 % ein Verlust der Heterozygotie („Loss of heterozygosity“ (LOH)) bei dem Chromosomenabschnitt 11p15 vor (3, 6). In dieser Chromosomenregion sind viele Gene lokalisiert, die genomischer Prägung unterliegen. Bei Veränderung des Expressionsmusters reagieren sie mit epigenetischen Modifikationen. Man geht davon aus, dass neben LOH auch LOI (=Loss of imprinting), bei dem es zu einer Dysregulation in der Genexpression kommt in der Onkogenese der ERMS eine Rolle spielt (12).

ARMS hingegen ähneln Lungenparenchym. So können die dichten Zellnester mit Bindegewebssepten durchzogen sein und Pseudoalveolen bilden (2). Bei Patienten mit ARMS wurde beobachtet, dass vermehrt Fusionsproteine exprimiert werden. Diese entstehen aus dem FOXO-Transkriptionsfaktor-Gen in Verbindung mit PAX-Transkriptionsfaktoren; in 60 % mit PAX3 und in 20 % mit

PAX7 (3, 6, 13). Durch die Verbindung der PAX-DNA-Domäne mit der regulierenden FOXO-Proteindomäne kommt es zu einer erhöhten Aktivität von PAX-Transkriptionsfaktoren, was zu einer Entartung und Vermehrung von myogenen Zellen führt. Patienten mit PAX7/FOXO-Fusion haben dabei das schlechteste Gesamtüberleben (1, 6). So liegt in der Hochrisikogruppe das 5-Jahres- Gesamtüberleben bei < 40 % (14). Nur ungefähr 20 % der ARMS sind PAX negativ (13).

Aufgrund der nachgewiesenen prognostischen Bedeutung des Fusionsstatus, wurde die Klassifizierung der RMS für zukünftige Therapie-Protokolle entsprechend erweitert (in Anlehnung an die Children´s Oncology Group (COG), siehe Tabelle 1 und 2) (6, 15, 16). Die Einteilung erfolgt in Fusionsstatus-positive RMS (FPRMS) und Fusionsstatus-negative RMS (FNRMS); abhängig davon, ob eine Genfusion mit PAX3 oder PAX7 vorhanden ist oder nicht (3, 17). Des Weiteren hat die COG eine Risiko-Stratifizierung erarbeitet, in die verschiedene Faktoren miteinfließen, die eine günstige bzw. ungünstige Prognose bedingen (siehe Tabelle 2 und 3) (3, 15, 16). Der wichtigste prognostische Faktor nach dem Grad der Metastasierung ist demnach der FOXO1-Fusionsstatus, der zu einer verbesserten Risikostratifizierung lokaler RMS führt (15).

Tabelle 1: Risiko-Stratifizierung der Children's Oncology Group (COG)

Risiko-gruppe	Histo-logie	Primär-Tumor	Initiale Resek-tion	Fern-meta-stasen	Anteil der Patienten (%)	Event-freies-Überleben (%)
Niedrig	ERMS	Günstig Ungünstig	Teilweise Ja	Nein	32	70-95
Inter-mediär	ERMS ARMS	Ungünstig Irrelevant	Nein Teilweise	Nein	27 25	73 65
Hoch	ERMS ARMS	Irrelevant	Teilweise	Ja	8 8	35 15

Tabelle 2: Aktuelle Risiko-Stratifizierung der COG

Faktor	Günstig	Ungünstig
Klinische Einteilung (siehe Tabelle 3)	I-III	IV
Fusionsstatus	PAX3- und PAX7-FOXO1 negativ	PAX3- und PAX7-FOXO1 positiv
Lokalisation	Orbita Kopf und Hals (nicht parameningeal) Urogenital (außer Blase und Prostata) Gallenwege	Parameningeal Extremitäten Blase/ Prostata Sonstige
Größe	< 5 cm	> 5 cm
Alter	> 1 Jahr bis < 10 Jahre	> 10 Jahre oder < 1 Jahr

Tabelle 3: Klinische Einteilung Rhabdomyosarkome (frei nach Table 4 (3))

Klinische Einteilung	Definition
I	Lokal beschränktes Wachstum, R0-Resektion
II (A-C)	Resektion mit Hinweis auf regionale Beteiligung (R1, R1+N0, R1+Nx)
III	Nur Biopsie oder R1-Resektion
IV	Fernmetastasen

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

RMS können sich klinisch unauffällig als nicht druckschmerzhaft und von der Konsistenz als weiche Raumforderung darstellen. Die Lokalisation ist abhängig vom histologischen Subtyp. So finden sich ERMS meist im Kopf-/Halsbereich inklusive der Augenhöhle oder auch im Urogenitaltrakt. Für ARMS ist eine Lokalisation an den Extremitäten typisch (1, 18). Je nach Ausbreitung und Lokalisation können sie mit unterschiedlicher Symptomatik einhergehen, wenn die Tumormasse angrenzende Strukturen und Organe verdrängt oder infiltriert. RMS im Kopf-/Halsbereich können zu neurologischen Ausfällen und Auffälligkeiten durch eine Parese der Hirnnerven (III, IV, VI, VII) und Erbrechen führen. Im Urogenitaltrakt können sie zu Beschwerden beim Wasserlassen wie Hämaturie und Dysurie führen oder durch Bauchschmerzen, Obstipation oder Hodenschwellung auffällig werden (4, 19). RMS in der Augenhöhle präsentieren sich typischerweise mit Exophthalmus (19). Bei ungefähr 20 % der Kinder finden sich bei Diagnose Fernmetastasen. Es kann über eine lymphatische und hämatogene Metastasierung zu Metastasen in Lunge, Knochen und Knochenmark kommen (3).

1.1.4 Diagnostik

Die Primärdiagnostik umfasst neben einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung, eine Blutentnahme, eine Schnittbilddiagnostik und eine Biopsie. Die Schnittbilddiagnostik erfolgt von der gesamten Primärtumorregion. Dabei sollten folgende Parameter vor und nach Kontrastmittelgabe festgestellt werden: Tumorgröße und -volumen, Beziehung des Tumors zu Gefäßen, Nerven und anderen Nachbarstrukturen, tumorbedingte Veränderungen am Skelettsystem, Gefäßversorgung des Tumors und eine multiplanare Darstellung zur Operationsplanung. Bevorzugt wird hier aufgrund der besseren Weichteildarstellung die Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Zusätzlich wird für das Staging, je nach Tumorart (ERMS oder ARMS) und -lage, eine Knochenmarksbiopsie und Liquordiagnostik durchgeführt nebst einer Tumorausbreitungsdiagnostik mittels Röntgen, Computertomographie (CT) oder MRT. Bei der Frage nach einer regionalen Lymphknotenbeteiligung zeigt das FDG-PET-CT eine niedrige Sensitivität und es

bedarf eines chirurgischen Vorgehens (16). Für die Ganzkörperdiagnostik (Frage nach Metastasen) wird vor allem die Skelettszintigraphie durchgeführt (4).

Die Einteilung des Tumors erfolgt nach Primärtumorlokalisation, Histologie und Fernmetastasierung in eine Niedrig-, Intermediär- oder Hoch-Risikogruppe. Abhängig von der kompletten oder inkompletten Resektion erfolgt die Risiko-Stratifizierung und die Prognose für das Ereignis-freie-Überleben (siehe Tabelle 1,2) (4).

1.1.5 Therapieansätze

Eine Standardtherapie hat als Ziel, die ausreichende systemische und lokale Kontrolle zu gewährleisten. Für die Therapie des RMS stehen Chemotherapie, Chirurgie und Bestrahlung zur Verfügung. Dabei ist die Reihenfolge und Modalität abhängig von mehreren Faktoren wie Tumorgöße und -ausbreitung, Alter, Histologie und Lokalisation und der damit verbundenen Resektabilität (vgl. auch Tabelle 1,2, Risiko-Stratifizierung COG) (4).

In den letzten Jahrzehnten hat sich die RMS- Therapie bedeutend entwickelt. Die Systemtherapie für die intermediäre und Hoch-Risikogruppe (Einteilung nach COG siehe Tabelle 1) der RMS basiert auf einer multimodalen Chemotherapie in Intervallen über 6-9 Monate. Als Substanzen kommen dabei Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin), Alkylanzien (Cyclophosphamid, Ifosfamid), Vincaalkaloide (Vincristin) und Actinomycine (Dactinomycin) in Frage (4). In Europa wird standardisiert mit IVA (Ifosfamid, Vincristin und Actinomycin D) behandelt. In Amerika wird nach VAC-Schema (Vincristin, Dactinomycin und Cyclophosphamid) behandelt (3). So besteht die Therapie in der Niedrigrisikogruppe aus der kompletten Tumorentfernung und einer Chemotherapie mit Vincristin und Actinomycin D über einen Zeitraum von etwa 22 Wochen. In der Standardrisikogruppe kommt zusätzlich Ifosfamid über ca. 25 Wochen zur Chemotherapie hinzu und die Patienten werden zusätzlich bestrahlt (20). Bei primär fernmetastasierten RMS wird eine intensivierete Chemotherapie mit sechs Medikamenten (CEVAIE; Ifosfamid, Vincristin, Actinomycin-D, Carboplatin, Epirubicin und Etoposid) über etwa 25 Wochen empfohlen. Eine Tumorentfernung erfolgt je nach Lage und Ausdehnung primär meist aber erst nach der neoadjuvanten Chemotherapie (20). Ziel der Systemtherapie ist eine

Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle und die Vernichtung von okkulten Metastasen.

Die lokoregionäre Therapie umfasst die chirurgische Resektion und die Strahlentherapie. Dabei sollte eine primäre Resektion nur erfolgen, wenn eine radikale Tumorsektion möglich scheint. Bei bioptisch gesicherten Tumoren, die nicht primär resektabel sind, sollte schnellstmöglich eine Chemotherapie erfolgen. Bei Patienten mit ERMS/negativem Fusionsstatus und primärer kompletter Resektion (R0) bedarf es keiner nachfolgenden Strahlentherapie (RTX). Alle anderen Patienten mit RMS sollten abhängig von Histologie, Lokalisation, Alter und Ansprechen der Chemotherapie bestrahlt werden. Neben den vorherigen genannten Faktoren sowie abhängig vom Resektionsstatus kann die Bestrahlung prä- oder postoperativ erfolgen. Die kumulative Dosis liegt bei einer konventionellen Fraktionierung (1 x 1,8-2 Gy/d) bei 40-50 Gy. Alternativ wird seit 1986 von der CWS-Studiengruppe eine akzelerierte Hyperfraktionierung (2x 1,6 Gy) bis zu einer kumulativen Dosis von 32-48 Gy empfohlen. Eine hochkonformale Bestrahlung kann durch Weiterentwicklungen wie die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT), die bildgestützte Radiotherapie (IGRT) oder die Protonentherapie erzielt werden. Hierbei kann die Dosisverteilung dem Zielvolumen optimal angepasst werden. Der Einsatz einer Brachytherapie kann in Einzelfällen sinnvoll sein (z. B. urogenitale Tumore) (4). Ebenso kommt es bei Kindern mit metastasierten intra-abdominellen Weichteilsarkomen in spezialisierten Zentren zum Einsatz cytoreduktiver Chirurgie mittels hyperthermer, intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC). Dabei wird nach Tumorentfernung ein erwärmtes Chemotherapeutikum direkt in die Bauchhöhle gegeben, um so letzte Tumorreste zu beseitigen (21, 22).

Zu nennen sind Nebenwirkungen, die sowohl Chemo- als auch Strahlentherapie mit sich bringen. Diese reichen auf der einen Seite unter einer Chemotherapie von Übelkeit und Erbrechen (23) bis hin zu laborchemischen Veränderungen wie Anämie mit Abgeschlagenheit und Neutropenie mit vermehrten Infektionen (24). Auf der anderen Seite kann es unter Strahlentherapie zu Hautveränderungen wie einer Strahlendermatitis (25) und Funktionseinschränkungen der bestrahlten Region wie erektiler Dysfunktion bei Blasen-/ Prostata-RMS (3, 4) kommen. Als

Spätfolgen können unter anderem neben Nephropathie (z.B. bei Alkylantien) und Kardiomyopathie (z.B. bei Anthrazyklinen) wie auch Wachstums- und Pubertätsverzögerung (z.B. Platin-Derivate) bis hin zur Infertilität (RTX) beobachtet werden. Dies bedarf einer regelmäßigen Nachsorge um potenzielle Schädigungen frühzeitig behandeln zu können (4).

Bei fortgeschrittener primärer oder rezidivierender Krankheit sollen in Phase II-/III-Studien auf Basis molekularer Charakteristika zielgerichtete experimentelle Therapieansätze eingeschlossen werden (4).

Da die Therapiemöglichkeiten und damit auch der Therapieerfolg vor allem bei Rezidiven immer noch begrenzt sind, ist es wichtig nach weiteren Therapieoptionen zu suchen.

Der Naturstoff Curcumin und der XPO1-Inhibitor Selinexor könnten dabei eine Rolle spielen.

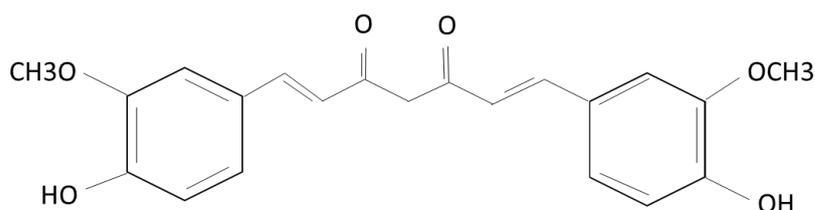


Abbildung 1: Summenformel von Curcumin

Curcumin (1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dion, (siehe Abbildung 1) oder auch Diferuloylmethan ist ein gelborangefarbenes Pulver aus der Gelbwurz (*Curcuma longa*). Die Gelbwurz gehört zur Gattung der Ingwerarten (*Zingiberaceae*) und ist sowohl in der indischen als auch der chinesischen Medizin als Mittel gegen diverse Leiden wie zum Beispiel Krebs, der Alzheimer Erkrankung, erektiler Dysfunktion und Hirsutismus (26) sowie Husten, Anorexie, Lebererkrankungen und Stirnhöhlenentzündung beschrieben (27). Vielen auch aus der indischen Küche bekannt, wird Curcumin mit einer antiinflammatorischen, antibakteriellen, antioxidativen und tumorhemmenden Wirkung assoziiert (27). Curcumin wurde 1815 von Vogel und Pelletier entdeckt (28). Es ist eines der am meisten untersuchten sekundären Pflanzenstoffe in der komplementären Onkologie. Wirkmechanismen von Curcumin, wie zum Beispiel Induktion von Apoptose und Hemmung der Proliferation und Angiogenese (29)

sind in Abbildung 2 dargestellt. Darüber hinaus beeinflusst Curcumin verschiedene Proteine.

Das Tumorsuppressorprotein (TSP) p53 wird durch Curcumin hochreguliert, was zu einer Hemmung des Tumorwachstums durch Apoptose führt (30, 31). Ebenso kann Curcumin auch direkt die Apoptose induzieren (31). Als weiteres Protein wird Cyclin D1, welches bei Malignomen vermehrt exprimiert wird und eine Rolle im Zellzyklus spielt, herunterreguliert (30), dadurch kommt es nachfolgend zur Abnahme der Zellproliferation (wie in Abb.2 dargestellt). Zudem kann Curcumin noch weitere Signalwege herunterregulieren wie zum Beispiel den nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) (32), den Cyclooxygenase-2 (COX-2)- (33) und den WNT/ β -Catenin-Signalweg (28). Dabei sind viele der genauen molekularen Wirkmechanismen noch weitgehend unbekannt (34).

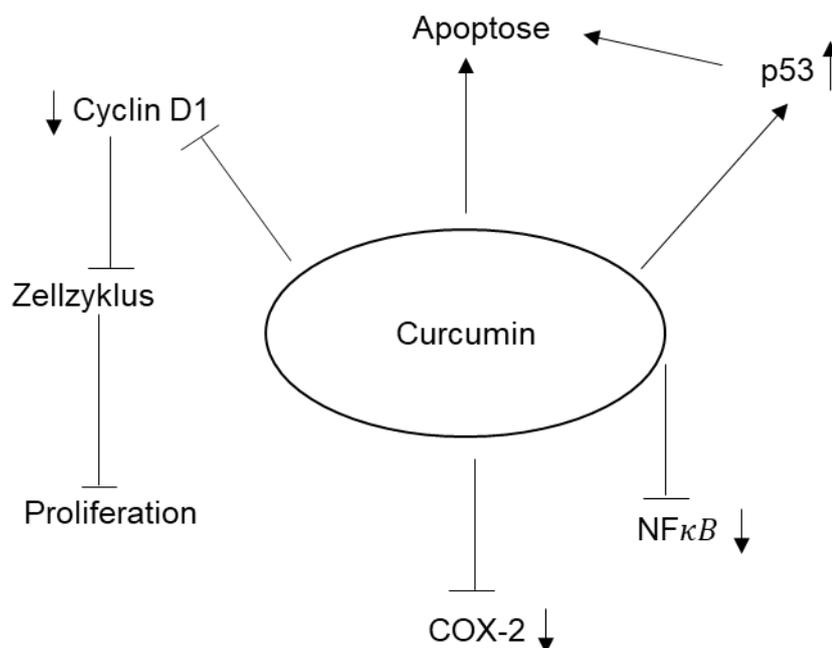


Abbildung 2: Ausgewählte Wirkmechanismen von Curcumin (frei nach Fig.4 (30))

Curcumin kann auf verschiedene Proteine und Gene Einfluss nehmen. Dabei wird schematisch mithilfe von Aktivierungspfeilen und Hemmpfeilen die Wirkung von Curcumin auf beispielhaft ausgewählte Proteine und Gene vereinfacht dargestellt. Neben der Induktion der Apoptose unter anderem über den p53-Signalweg, führt es direkt und indirekt über Cyclin D1 zur Abnahme der Zellproliferation. Ebenso wird der COX-2 - und der TNF-Signalweg durch Curcumin gehemmt.

In vorangegangenen Projekten unserer Arbeitsgruppe wurden bereits erste Ergebnisse zur Curcuminwirkung bei kindlichen soliden Tumoren erzielt. So wurde gezeigt, dass Curcumin die Zellviabilität von hepatozellulären Karzinomzellen (HCC-Zellen) reduziert und in der Reverse-Transkriptase-

Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die Boten-RNA (engl. Messenger RNA (mRNA)) von β -Catenin, NF- κ B und Cyclin D1 herunterreguliert (35). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Curcumin alleine und in Kombination mit einer Phototherapie oder Chemotherapeutika (Dactinomycin und Vincristin) in RMS-Zelllinien (RD und RH30) die Zellviabilität und Migrationsfähigkeit reduziert und die Apoptose steigert (36).

Eine große Herausforderung stellen die schlechte orale Bioverfügbarkeit (27) und der schnelle Metabolismus von Curcumin (37) dar. Es wurden schon verschiedene Versuche unternommen mithilfe von Liposomen und Nanopartikeln (26), Mizellen (35), Phospholipidkomplexen und Nanoemulsionen (37, 38) Curcumin in höheren Konzentrationen in den Organismus zu schleusen. Kharat et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass die Verwendung von Antioxidantien wie zum Beispiel Ascorbinsäure die chemische Stabilität von Curcumin in Öl-in-Wasser-Emulsionen deutlich verbessern kann (39). In unserer Arbeitsgruppe wurde mithilfe von Mizellen als Vehikel gearbeitet. Dabei wurde ein Surfactant-basiertes System genutzt, welches die orale Bioverfügbarkeit von schlecht löslichen Stoffen verbessert. Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe der Mizellen die schlechte orale Bioverfügbarkeit von Curcumin deutlich verbessert und relevante Konzentrationen in Lebertumorgewebe erreicht wurden (35).

Durch eine Proteomics-Analyse der RH30-Zelllinie, welche in An- und Abwesenheit von Curcumin untersucht wurde, sind wir auf das XPO1-Protein aufmerksam geworden. Es konnte in Anwesenheit von Curcumin eine signifikante Herunterregulierung des XPO1-Proteins beobachtet werden (siehe Abbildung 3).

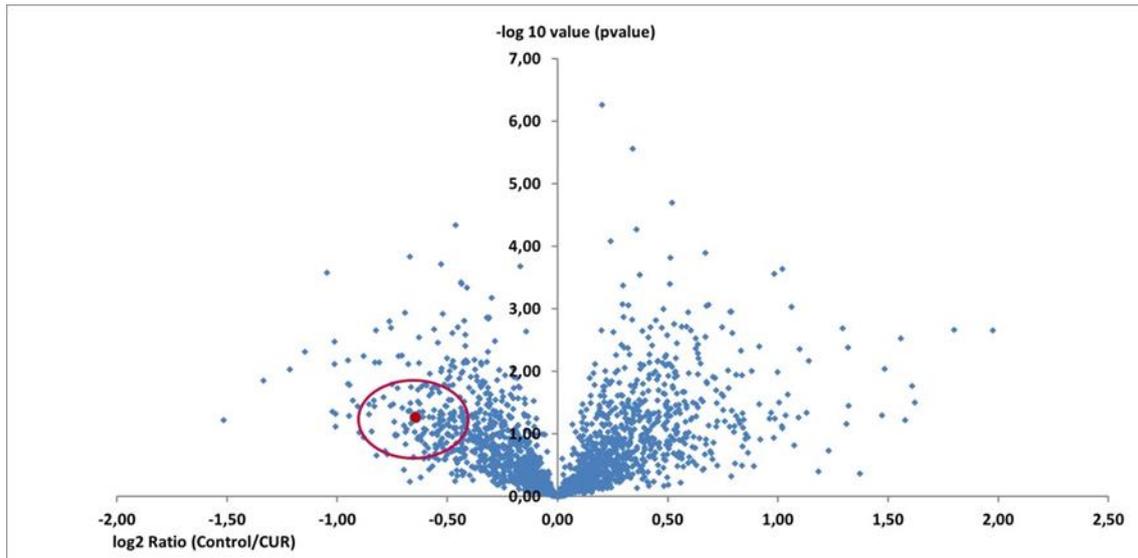


Abbildung 3: Vulcano Blot von RH30 Zellen.

Der Vulcano Blot zeigt die pValues sowie die log₂ Ratio zwischen unbehandelten und mit 10µM Curcumin für 24 Stunden behandelten RH30 Zellen (n=3). Der rote Punkt mit dem roten Kreis markiert XPO1 mit dem pvalue Wert von 1,27 und eine log₂ fold change von -0,61.

1.2 Das Exportprotein XPO1

Das Exportprotein XPO1, auch als Exportin 1 Molekül oder CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) bezeichnet, ist ein Mitglied der Karyopherin β -Familie nukleärer Transportproteine (40). XPO1 befindet sich, wie in Abbildung 4 dargestellt, zunächst im Nucleus. Dort bildet es einen Kern-Poren-Komplex und erleichtert den Transport von RNA und von mehr als 220 verschiedenen Proteinen aus dem Zellkern (41). Darunter sind Tumorsuppressorproteine (TSPE) wie p53 (41), das Retinoblastom-Protein (RB) (42) oder FOXO3a (43). XPO1 erkennt dabei ein nukleäres Exportsignal (NES) der Proteine.

Der Transport erfolgt durch die Bindung von Ran-GTP an das XPO1 Molekül, das dadurch seine Affinität zum transportierenden Protein erhöht und dieses an sich bindet (siehe Abb. 4). Der Transportvorgang wird durch einen GTP-GDP Gradient aus dem Nucleus ins Zytosol gesteuert. Im Zytosol erfolgt anschließend die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP und XPO1 verliert seine Affinität zu dem Trägerprotein und dem Transportkomplex. Durch die Mislokation der transportierten Proteine geht ihre Funktion verloren und sie sind inaktiv (42). In Malignomen führt der erhöhte nukleäre Export von TSPE, wie zum Beispiel p53 zu deren Inaktivität (44) und folglich zu einem ungehemmten Tumorwachstum. Des Weiteren wurde von einer Überexpression des XPO1-Proteins in vielen

verschiedenen malignen Tumorentitäten wie zum Beispiel dem Multiplen Myelom (41), dem Ovarialkarzinom (45), Leukämien (43) und auch Sarkomen (46) berichtet. Eine Überexpression von XPO1 wird mit Chemoresistenz, einer schlechteren Prognose und einem kürzeren Überleben in Zusammenhang gebracht (40-42). Für kindliche solide Tumore gibt es jedoch bis jetzt noch wenig Erkenntnisse für eine Überexpression von XPO1.

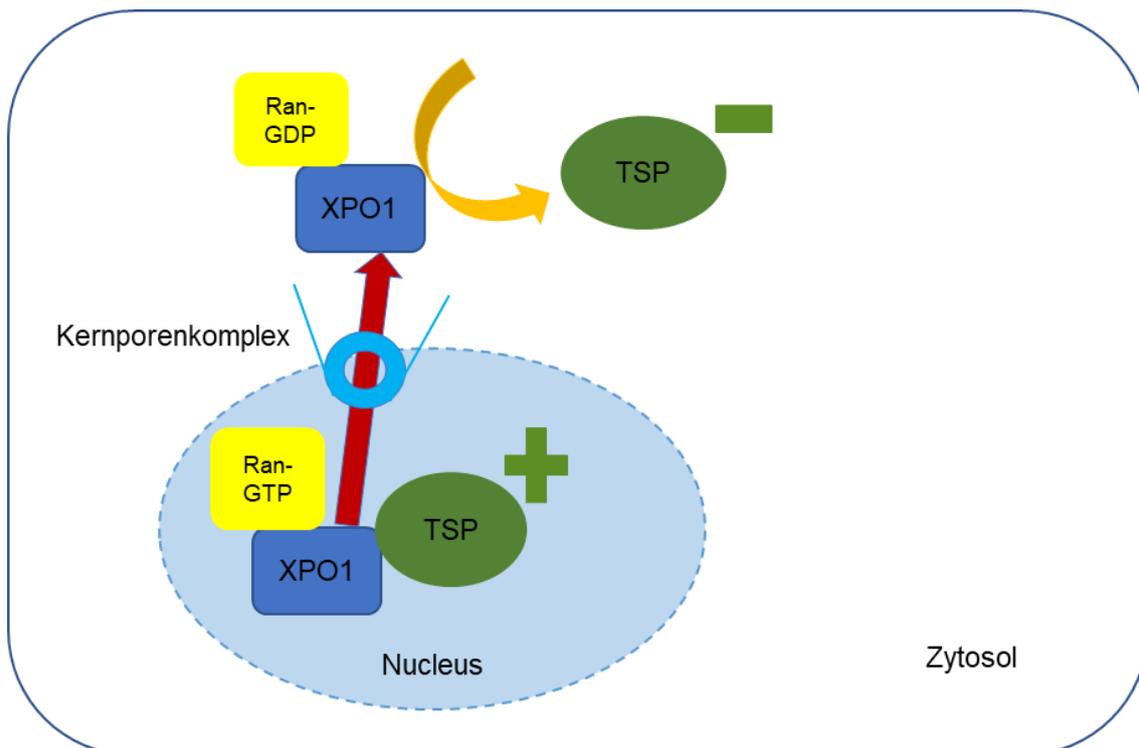


Abbildung 4: Wirkmechanismus von XPO1 (frei nach Fig. 1 (42))

Durch die Bindung von Ran-GTP an XPO1 bindet dieses das Tumorsuppressorprotein (TSP) an sich und transportiert es aus dem Zellkern ins Zytosol über einen GTP-GDP-Gradient (roter Pfeil). XPO1 verliert im Zytosol seine Affinität zum TSP, welches hier in einen funktionslosen Zustand übergeht und anschließend abgebaut wird (gelber Pfeil).

Selektive Inhibitoren des nukleären Exports (SINE) blockieren den Transport, in dem sie an eine NES-Sequenz binden, die das XPO1 erkennt und inhibiert (47). Somit können keine Zielproteine gebunden werden. Daraus resultiert, dass wichtige Proteine wie zum Beispiel das TSP p53, im Nucleus akkumulieren und dort ihre Funktion ausüben können (42). Ebenso kommt es zu einem abnehmenden Konzentrationsspiegel von Onkoproteinen, zu einem Zellzyklusarrest und der Apoptose von Tumorzellen durch SINE. Als erste

Substanz konnte Leptomycin B (LMB, ursprünglich als Pilzmittel eingesetzt) die Exportfunktion von XPO1 inhibieren. LMB bindet kovalent an die Aminosäure Cys528 und verhindert so das Erkennen des NES-Signals durch die Zielproteine (42). Mit einer sehr engen therapeutischen Breite und hohen Toxizität stellt sich LMB jedoch als eher ungeeignete Substanz in der Behandlung von Malignomen dar (41).

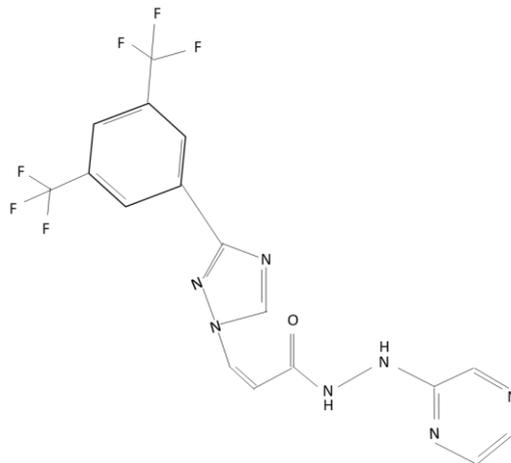


Abbildung 5: Summenformel von Selinexor (frei nach „Chemical structure of Selinexor“ (35))

Ein oral verfügbares SINE ist der selektive XPO1 Inhibitor Selinexor (KPT330) (siehe Summenformel Abb. 5), der sich mittlerweile in klinischer Erprobung befindet (40, 44). Selinexor bindet reversibel an Cys528 und blockiert somit die Bindungsstelle für die Transportproteine von XPO1 (48). Es ist ein hochspezifischer kovalenter Inhibitor von XPO1 (44). Selinexor führt durch einen positiven Feedback-Mechanismus zu einer erhöhten XPO1-mRNA-Expression in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren (47). Bei Alexander et al. zeigte sich in einer Phase-I Studie bei Kindern mit therapierefraktärer Leukämie eine Expressionszunahme von XPO1-mRNA, welche eine Hemmung des XPO1-Proteins anzeigt (23). In anderen reinen *in vitro*-Arbeiten wie der von Baek et al. konnte bei Blasenkrebs eine verminderte Expression von XPO1-Protein unter Selinexor gezeigt werden (49).

In Abb. 6 ist der Wirkmechanismus von Selinexor dargestellt. Selinexor bindet im Nucleus über den Cys528-Aminosäurerest (Cys528-AS-Rest) an XPO1 und

verhindert dadurch das Binden von Ran-GTP. Es wird kein Kernporenkomplex ausgebildet und folglich der Abtransport von beispielsweise TSPe verhindert, welche im Kern verbleibend ihre richtige Funktion ausüben können.

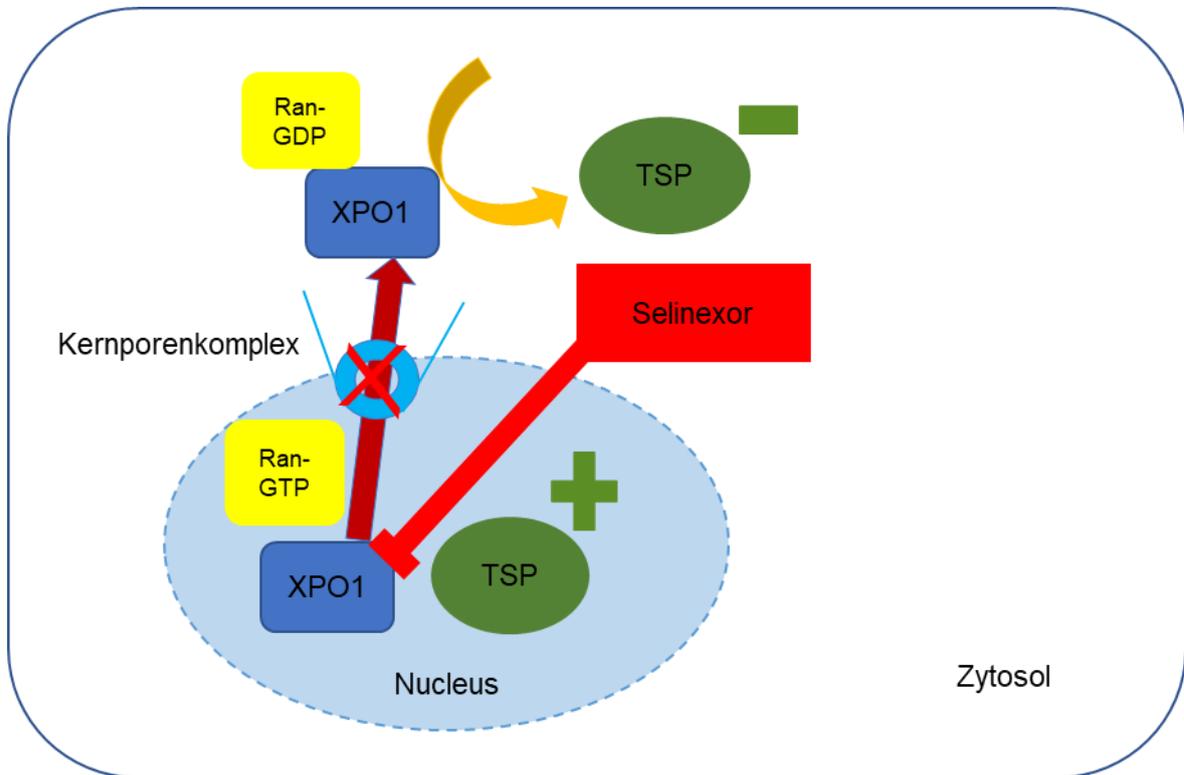


Abbildung 6: Wirkmechanismus von Selinexor
 Selinexor bindet an XPO1 (über den Cys528-AS-Rest) und verhindert damit die Bildung des Kern-Poren-Komplex (roter Hemmpfeil), Ran-GTP kann sich nicht an XPO1 binden und somit keinen GTP-GDP-Gradienten ausbilden. Proteine, wie zum Beispiel TSPe verbleiben so in funktionsfähiger Form im Kern (als grünes Plus dargestellt).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Das Rhabdomyosarkom ist ein maligner Tumor der Skelettmuskelzellen und der häufigste Weichteiltumor bei Kindern (50). In der Behandlung von RMS wurden multimodale therapeutische Strategien, die neben der chirurgischen Entfernung und Bestrahlung auch eine konventionelle Kombinations-Chemotherapie beinhalten, entwickelt und etabliert. So kommen bekannte Substanzen wie Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin), Alkylanzien (Cyclophosphamid, Ifosfamid), Vincaalkaloide (Vincristin) und Actinomycine (Dactinomycin) zum Einsatz (20). Diese Therapiemöglichkeiten revolutionierten die Behandlung von RMS und erzielten ein Gesamtüberleben von 61 % der diagnostizierten RMS bei Kindern und Jugendlichen. Mittlerweile stagnieren die Heilungsraten insbesondere bei den Hochrisiko-Patienten in der RMS-Behandlung (51). In Zukunft werden auch vermehrt zielgerichtete Therapien, die abgestimmt auf molekulare Charakteristika der Tumoren sind, zum Einsatz kommen (4). Es bedarf jedoch in jedem Falle weiterer Therapiestrategien, um das Gesamtüberleben zu verbessern. Das Ziel sollte hierbei sein, die maligne Grunderkrankung zu behandeln, das Gesamtüberleben zu verbessern und gleichzeitig akute Nebenwirkungen und Spätschäden möglichst gering zu halten.

In dieser Dissertationsschrift wurde mit Fokus auf das Exportprotein XPO1 untersucht wie dessen Expressionslevel im Rhabdomyosarkom ist und inwieweit der XPO1-Inhibitor Selinexor und der Naturstoff Curcumin eine Wirkung an diesem ausüben, um weitere mögliche Therapieansätze für die Behandlung von RMS zu erarbeiten.

Zu Beginn wurden Expressionsanalysen von XPO1 bei RMS-Zelllinien (RD, RUCH3, SRH, RH30) und einer gesunden Skelettmuskelzelllinie mittels Western Blot durchgeführt. In weiteren Western Blot Analysen wurde der Einfluss von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie beider Substanzen auf die Dynamik der XPO1-Expression bei den zwei RMS-Zelllinien RD und RH30 untersucht. Ebenso wurden Western Blot-Analysen mit zwei Zielproteinen von XPO1, CyclinD1 und p53, durchgeführt um auch deren Expression unter Therapie mit Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie zu analysieren. Es wurden diese beiden Proteine ausgewählt, da sie sowohl bekannte

Zielproteine von XPO1 als auch von Curcumin (siehe Abb. 2) sind und somit eine Schnittstelle in unseren Untersuchungen darstellen. Parallel wurde mit verschiedenen Methoden, wie dem Viabilitäts-Assay sowie dem koloniebildenden Assay gearbeitet und die Auswirkungen sowohl der Einzel- als auch der Kombinationstherapie auf die RMS-Zellen beobachtet.

In der Arbeit wurde anhand von *in vitro* Modellen untersucht, inwieweit die oben genannten Substanzen eine Therapieoption bei der Behandlung von Rhabdomyosarkomen darstellen und als Therapieoptionen bei der Behandlung von kindlichen Rhabdomyosarkomen in Zukunft in der pädiatrischen Onkologie eine Rolle spielen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Nachfolgend sind die im allgemeinen Gebrauch verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt. Spezielle Chemikalien und Geräte werden zu den jeweiligen Methoden aufgelistet.

2.1.1 Allgemeine Materialien

Desinfektionsspray Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, Deutschland
Einwegpinzetten, steril	Servoprax GmbH, Wesel, Deutschland
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland
Handschuhe nitrile, powder-free	Abena GmbH, Zörbig, Deutschland
Handschuhe Peha-soft nitrile GUARD	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Pasteur-Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz, Deutschland
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten (Falcon Serologische Pipette) (2, 5, 10, 25 ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen (0.5 – 1 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (20-200 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0.5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 1.5 ml/ 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Taschenrechner (Sharp EL-243S)	Sharp Devices Europe GmbH, München, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 12-, 96-Well, TC-Treated)	Corning Incorporated, New York, USA
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (15 ml/ 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.2 Geräte

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

2.2 Methoden

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Alle Zellexperimente wurden mit zwei etablierten RMS-Zelllinien durchgeführt, der ERMS-Zelllinie RD (ATCC, Wesel) und der ARMS-Zelllinie RH30 (DSMZ, Braunschweig). In der zu Beginn durchgeführten Expressionsanalyse wurden noch weitere RMS-Zelllinien verwendet, die ERMS-Zelllinie RUCH3 und die spindelzellige RMS-Zelllinie SRH. Für Vergleiche zu gesunden Zellen kam die Skelettmuskelzelllinie SKMC zum Einsatz.

RD (embryonal): Die RD-Tumorzellen stammen aus einer Beckenbiopsie eines 7-jährigen Mädchens mit RMS. Sie wurde mit Cyclophosphamid vorbehandelt und bestrahlt. Im Karyogramm zeigte sich ein 51-hyperdiploider instabiler Chromosomensatz. Es wurde gezeigt, dass die RD Zelllinie MYC-Amplifikation, NRAS Mutation (Q61H, Neuroblastoma Rat Sarcoma) und eine homozygote p53 Mutation aufweist (7).

RH30 (alveolär): Die RH30-Tumorzellen stammen aus einer Knochenmarksmetastase eines 17-jährigen Jungen mit histologisch undifferenziertem ARMS. Der Junge war noch nicht therapiert worden, da die Probenentnahme zum Zeitpunkt der Diagnosestellung stattgefunden hat. Die Zellen exprimieren hohe Spiegel an Myogenin und Myo D (muskelspezifische Transkriptionsfaktoren, die essenziell für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myoblasten sind) und sind positiv für die t(2;13)(q35; q14) Translokation, welche die Bildung des Fusionsproteins PAX3/FKHR bedingt (52-54).

Der ursprüngliche Xenograft hatte das Wildtyp-Allel für p53. In den etablierten RH30-Zellen ist p53 in über 60 % der Zellen jedoch mutiert (52-54).

SRH: Die SRH-Tumorzellen stammen aus einem metastasierten spindelzellig-sklerosierendem RMS. Die Biopsie des Primärtumors erfolgte an der rechten Wade der nicht vortherapierten 25-jährigen Patientin. Die Zelllinie wurde am Uniklinikum Tübingen, Kinderklinik, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, durch Sabine Schleicher etabliert (55).

RUCH3 (embryonal): Die Tumorzelllinie stammt aus einem Rezidiv eines ERMS und exprimiert PAX3 (7).

SKMC: Die Skelettmuskel-Zelllinie SKMC (PromoCell, Heidelberg) wird aus gesunden Skelettmuskeln erwachsener Spender gewonnen. Dabei wird zum Beispiel Gewebe aus dem M. gluteus maximus entnommen und anschließend kultiviert. Als Markerprotein für Skelettmuskelzellen dient Myosin.

2.3.2 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in welchem 10 ml Zellkulturmedium (siehe Tabelle 2) vorgelegt war. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 min und bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit ca. 11 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Abschließend wurde die Zellsuspension in Zellkulturflaschen überführt. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen benötigten 2-3 Passagen, um sich zu regenerieren.

2.3.3 Kultivierung

Um ein steriles Arbeiten mit den Zellen zu gewährleisten, wurde unter der Sicherheitswerkbank mit Handschuhen gearbeitet. Es erfolgte vor und nach der Arbeit eine Desinfektion mit Descosept. Zellkulturmedium und Phosphat Buffered Saline (PBS) wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt bevor damit gearbeitet wurde.

Die Kultivierung der RMS-Zelllinien fand in Zellkulturflaschen in einem Luftgemisch von 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und bei 37°C im Brutschrank statt.

Tabelle 4: Zusammensetzung Zellkulturmedium

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

Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
1x-PBS (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zellkulturflaschen (Cellstar 75 cm ² , 125 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Corning incorporated, New York, USA

2.3.4 Passagieren von Zellen

Es erfolgte täglich eine Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop, um sie nach ihrer Konfluenz zu beurteilen. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert, um zu vermeiden, dass sie ihr Expressionsmuster genetisch verändern beziehungsweise absterben. Das Passagieren der Zellen erfolgte, indem das Medium (siehe Tabelle 4) abgenommen und warmes PBS in die Zellkulturflasche dazugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert, um sie in Lösung zu bringen und die Zell-Zell-Kontakte aufzubrechen. Für das Passagieren in einem Verhältnis von 1:10, wurde 9 ml frisches Medium dazugegeben und gut resuspendiert. Von dieser Suspension wurde 1 ml in der Zellkulturflasche belassen, ca. 11 ml frisches Medium dazugegeben und Passagienummer, Datum und Passagierverhältnis notiert.

2.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer benutzt. Es wurden je 10 µl Trypanblau und Zelllösung auf den Objektträger pipettiert und gut resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch in die Neubauer-Kammer pipettiert und unter dem Mikroskop mithilfe eines Zellzählers die Zellen in den Quadraten gezählt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mithilfe folgender Formel:

$$\frac{n}{4} * 2 * 10 * V$$

dabei ist

- N** = Zellzahl auf Objektträger
- 4** = Anzahl der Quadrate
- 2** = Verdünnungsfaktor
- 10** = Kammerfaktor
- V** = Gesamtvolumen der Zelllösung

Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert und mit Zellkulturmedium auf die gezählte Zellmenge (10⁶ Zellen/ml) verdünnt.

Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Leica DMI1	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Neubauer-Zählkammer DHC-N01 (C-Chip)	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Trypanblau (0,4 %)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Trypsin (Trypsin/EDTA, 0,05 %, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zellzähler	Infactory Einhandzähler, Freiburg i. Br., Deutschland

2.3.6 Kryokonservierung von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wurden diese gezählt (siehe 2.3.5) und anschließend im Einfriermedium, welches aus 90 % FCS und 10 % DMSO zusammengesetzt ist, resuspendiert. Die Zellsuspension, bestehend aus 1,5-2 Mio. Zellen/ ml wurde in 1,5 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zell-Aliquots wurden um ca. -1°C/min in 24 Stunden (h) auf -80°C in einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Gefrierbehälter im -80°C - Gefrierschrank gekühlt und

anschließend eingefroren. Die längerfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Tabelle 5: Zusammensetzung Einfriermedium

<p>Einfriermedium:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 90 % FCS (fetales Kälberserum) - 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) 	<p>Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland</p>
---	---

<p>Kryoröhrchen</p> <p>Kryo-Gefrierbehälter (5100 Cryo)</p> <p>- 80°C Gefrierschrank</p>	<p>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland</p>
--	---

Tabelle 6: Zellzahlen für die jeweiligen Behandlungen

Zelllinie	Zellzahl/well	Methode	Inkubationszeit (h)	Größe Mikrotiterplatte
RD	7,5 × 10 ³	MTT-Assay	72	96
RD	5 × 10 ⁵	Proteinlysate Western Blot	24	6
RD	7,5 × 10 ²	CFA	240-336	6
RH30	7,5 × 10 ³	MTT-Assay	72	96
RH30	5 × 10 ⁵	Proteinlysate Western Blot	24	6
RH30	7,5 × 10 ²	CFA	240-336	6
SKMC	5 × 10 ³	MTT-Assay	72	96

In Tabelle 6 sind die Zelllinien mit der jeweils verwendeten Zellzahl für die verschiedenen Methoden zu entnehmen und die Inkubationszeiten. Ebenso sind die zwei verwendeten Größen der Mikrotiterplatten angegeben.

2.4 Western Blot

2.4.1 Einführung

Der Western Blot ist ein molekulargenetisches Verfahren, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe der Gelelektrophorese aufzutrennen und anschließend mittels Immundetektion sichtbar zu machen. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte für die Durchführung eines Western Blots aufgeführt.

2.4.2 Herstellen von Proteinlysaten

Nach Aussäen der RMS-Zellen in 6-Well Platten (siehe Tabelle 6) und deren Behandlung mit Curcumin (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M), Selinexor (0,01 μ M; 0,05 μ M; 0,1 μ M) und der Kombination beider (Curcumin 15 μ M plus Selinexor 0,01, 0,05 und 0,1 μ M) wurden die Tumorzellen nach 24-stündiger Inkubation geerntet. Dazu wurde das Zellkulturmedium mit einer Glaspipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend folgte ein Waschschriff mit PBS. Dafür wurde warmes PBS in die Wells pipettiert und die Platte leicht geschwenkt. Das PBS wurde mit der Glaspipette wieder abgenommen, ohne den Zellrasen dabei zu verletzen. Danach wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA abgelöst. Frisches Medium wurde zu den gelösten Zellen gegeben und sorgfältig resuspendiert. Die Suspension wurde mit der Pipette in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Für das Herstellen von Proteinlysaten wurden die Zellen anschließend für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und erneut bei 1500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abpipettiert und abhängig von der Größe des Zellpellets der Zell-Lysepuffer (zwischen 70-150 μ l; Zusammensetzung siehe Tabelle 4) hinzugegeben und die Proben in beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Danach inkubierten die Proben auf Eis für 15 min (=Lyseschriff). Im nächsten Schritt wurden die Proteinlösungen in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (=Zelllysate) wurde in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für weitere Versuche bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 7: Zusammensetzung Zell-Lysepuffer (1 x)

Zell-Lysepuffer (1x):	
– 9 ml bidest. H ₂ O	
– 1 ml Lyse Puffer (10x)	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
– 1 Tablette Proteaseinhibitor Cocktail Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Curcumin, Rohstoff 95 % nativ	Aquanova AG, Darmstadt, Deutschland
Selinexor (KPT-330)	Selleck Chemicals, US

2.4.3 Herstellen von Proteinproben

2.4.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinlysate wurden auf Eis aufgetaut. Um den Proteingehalt zu bestimmen, wurde 795 µl Aqua dest., 200 µl Protein Assay Farbstoffkonzentrat und 5 µl Proteinlysate bzw. 5 µl Zell-Lysepuffer für den Leerwert in Küvetten pipettiert. Die Proteinproben wurden gemischt und nach 5 min Inkubation im Dunkeln die Extinktion gemessen.

Die Methode nach Bradford ist eine quantitative Bestimmung des Proteingehaltes bei der es zu einer Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 mit Seitenketten von Proteinen kommt. Die Proteinbindung stabilisiert die anionische blau erscheinende Form und es kommt dabei zu einem Farbumschlag von Rot zu Blau. Außerdem verschiebt sich das maximale Absorptionsspektrum von ca. 470 nm (ungebundener Zustand) zu 595 nm (gebundener Zustand = Wert der Messung der Lichtabsorption im Photometer). So lässt sich über die Absorption eine Aussage über den Proteingehalt der jeweiligen Probe treffen (56-58).

2.4.3.2 Probenvorbereitung für Gelelektrophorese

Proteinlysate, Zell-Lysepuffer und Laufpuffer (Protein Auftragspuffer Roti-Load 1) wurden in berechneter Menge in vorbeschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, bei 96°C für 5 min denaturiert, abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

Mithilfe des Laufpuffers und dem darin enthaltenen β -Mercaptoethanol wurden die Disulfidbrücken der Proteine aufgebrochen. Der Zell-Lysepuffer entfaltet die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine. Die Proteine sind durch den Laufpuffer einheitlich negativ geladen, um in der folgenden Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht zur Anode zu wandern (59, 60).

Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland
Photometer (BioPhotometer D30)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Protein Auftragspuffer Roti-Load 1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protein Assay Farbstoffkonzentrat (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2.4.4 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gelelektrophorese wurde, um die in den Proteinproben enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzuteilen, zunächst ein Laufgel hergestellt (Zusammensetzung siehe Tabelle 8). Das Gel wurde unter dem Abzug in den vorbereiteten Polyacrylamid-Gießstand gegossen und mit Isopropanol geglättet, um eine sauerstofffreie Polymerisation zu gewährleisten. Nach Auspolymerisation wurde das Isopropanol abgenommen und das Laufgel mit dem Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) überdeckt. Direkt anschließend wurden Kämme für die Geltaschen eingesetzt.

Für die Gelelektrophorese wurden die Gele in eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer eingesetzt, die Kämme entfernt und anschließend die Geltaschen mit einem Molekulargewichtstandard bzw. mit den Proben befüllt (30 μ g Protein/Tasche). Als Laufpuffer wurde Rotiphorese® 10xSDS-Page (1x) (siehe Tabelle 11) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 120 V für 90 min.

Tabelle 8: Zusammensetzung Gele für Western Blot

	Laufgel Volumen (10 %ig)	Sammelgel Volumen (4 %ig)
bidest. H ₂ O	7,9 ml	4,1 ml
1,5 M Tris Puffer ph 8,8 bzw. 1,0 M Tris ph 6,8	5,5 ml	0,75 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,06 ml
Acrylamid Mix 30 %	6,7 ml	1,0 ml
10 % APS	0,2 ml	0,06 ml
TEMED	0,008 ml	0,006 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung APS 10 %

-1 g APS (Ammoniumpersulfat) - auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
---	-----------------------------------

Tabelle 10: Zusammensetzung SDS 10 %

- 10 g SDS - auffüllen auf 10 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
--	---

Tabelle 11: Zusammensetzung Laufpuffer

Laufpuffer (1x): - 100 ml Laufpuffer Rotiphorese® 10xSDS-Page - auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
---	---

Acrylamid Stammlösung
Isopropanol

Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer

Polyacrylamidgel-Gießstand

1,5 mm Glasplatten

Protein-Marker IV Prestained 10 - 170 kDa

TEMED - Tetramethylethyldiamin

SERVA, Amstetten, Österreich
Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe, Deutschland

Biorad, München, Deutschland

Biorad, München, Deutschland

Biorad, München, Deutschland

PEQLAB GmbH, Erlangen,
Deutschland

Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe, Deutschland

2.4.5 Übertragung der Proteine

Für das Übertragen der in Gel gewanderten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Gele bei konstanten 300 mA für 90 min bei RT unter Eiskühlung geblottet.

Dabei wurden die Gele vorsichtig aus den Glasscheiben herausgelöst und auf mit Puffer getränktes Filterpapier gelegt. Unter dem Filterpapier lag ein Formpad. Anschließend wurde luftblasenfrei die Membran und darüber mit Puffer - getränktes Filterpapier gelegt. Abschließend wurde noch ein Formpad darübergelegt und alles zu einer Kassette zusammengesetzt, die dann in die Blotkammer eingesetzt und mit 1×Transferpuffer (siehe Tabelle 12) befüllt wurde. Die in der Gelelektrophorese aufgeteilten Proteine wurden nun mittels des elektrischen Feldes auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Mit Hilfe des Proteinmarkers konnten die Proteine dann anhand ihres Molekulargewichtes lokalisiert werden.

Tabelle 12: Zusammensetzung Transferpuffer (10 × und 1 ×)

Transferpuffer (10×) - 24 g Tris-Base (Trizma base) - 173 g Glycin - auf 1000 ml Aqua dest. Auffüllen	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Transferpuffer (1×) - 100 ml Transferpuffer (10 ×) - auf 1 l mit Aqua dest. Auffüllen	

Amersham Protran Nitrocellulose
 Blotting Membranes, 0,2 µm
 Whatmann-Filterpapiere 0,34 mm

Carl Roth GmbH + Co. KG,
 Karlsruhe, Deutschland
 Carl Roth GmbH + Co. KG,
 Karlsruhe, Deutschland
 Biorad, München, Deutschland
 Biorad, München, Deutschland

Blotkammer
 Formpads

2.4.6 Immundetektion

Die Membran wurde für 1 h bei RT auf dem Schüttler in 10 %igem Milchpulver (MP) geblockt. Das Blocken dient dazu freie Bindungsstellen abzusättigen, damit die Antikörper möglichst spezifisch an ihre Antigene binden können. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) (siehe Tabelle 14) über Nacht bei 4°C.

Die Membran wurde dreimalig für etwa 10 min mit 1×TBST bei RT gewaschen und anschließend bei RT für 1 h mit dem Zweitantikörper (siehe Tabelle 15) inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1×TBST für etwa je 10 min bei RT wurde die Membran mit einem Detektions-Reagenz für 5 min inkubiert. Bei dem Detektions-Reagenz handelt sich um ein Chemolumineszenz-Substrat. Die an die Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase) oxidierte das im Chemolumineszenz-Substrat enthaltene Luminol. Die freigesetzte Energie in Form von blauem Licht wurde mithilfe des Softwareprogramms LI-COR Image am PC detektiert. Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit Image Studio™ Software Western und MPX™ Western Analyses über die Intensitätsbestimmung der Proteinbanden.

Tabelle 13: Zusammensetzung TBS (10×) und TBS-T (1×)

<p>TBS (Tris Buffered Saline)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 24,2 g Tris-Base - 80 g Natriumchlorid - auf 1000 ml Aqua des. Auffüllen 	<p>Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA</p>
<p>TBS-T (Tris Buffered Saline mit Tween)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml TBS (10×) - auf 1000 ml Aqua dest. Auffüllen - 1 ml Tween 20 dazu 	<p>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</p>

BSA Albumin Fraktion V, US-Origin

Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe, Deutschland

Chemilumineszenz Odyssey® Fc Imaging System

LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Magermilchpulver

Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe, Deutschland

Rollschüttler
Schüttler

Phoenix Instrument RS-TR 05
neolab LOGIC SHAKER

WesternSure™ PREMIUM
Chemiluminescent Substrate

LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Image Studio™ Software Western
and MPX™ Western Analyses

LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Tabelle 14: Erstantikörper Western Blot

Erstantikörper	Firma	Verdünnung in 5 % BSA	Bestellnummer
CRM 1 (C-1)	Santa Cruz Biotechnology	1:100	sc-74454
GAPDH	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:1000	2118S
p53	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:1000	9282T
Cyclin D1	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:100	2922s
β -Actin	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:250	8457S

Tabelle 15: Zweitantikörper Western Blot

Zweitantikörper	Firma	Verdünnung in 5 % MP	Bestellnummer
anti-Mouse	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:3000	7076P2
anti-Rabbit	Cell Signaling, Cambridge, UK	1:3000	7074S

2.5 Zellviabilitäts-Assay (MTT)

Der MTT-Assay ist ein Verfahren, um das zytotoxische Potenzial von Substanzen auf die Zellviabilität zu untersuchen. Im MTT-Assay kommt es zur NADPH-abhängigen Umwandlung von wasserlöslichem MTT-Reagenz zu wasserunlöslichem Formazan, um damit die vitalen Zellen quantifizieren zu können. Dabei läuft die Umwandlung hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum der Zelle und dort abhängig von der Glykolyse-Rate ab. Die Menge des gebildeten Formazans korreliert somit mit der Stoffwechselaktivität und damit auch mit der Zellviabilität der Zelle. Durch die Zugabe des Lysepuffers wird das Ausfallen der wasserunlöslichen Kristalle bewirkt (siehe Tabelle 16) (61-63).

Für den Zellviabilitäts-Assay wurden in eine 96-Well Platte RMS-Zellen ausgesät (siehe Tabelle 6). Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie der Zellen für 24 h und 72 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach der Inkubationszeit wurde pro Well 25 µl MTT-Reagenz (siehe Tabelle 16) dazugegeben und eine Inkubation für weitere 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ fand im Brutschrank statt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte auf Zellstoffpapier abgekippt und 100 µl Lysepuffer (siehe Tabelle 16) pro Well hinzugegeben. Die vormals gelbliche Farbe änderte sich durch das Ausfallen der Formazan-Kristalle zu dunkelviolet. Die Inkubation des Lysepuffers erfolgte für etwa 5 min auf dem Plattformschüttler, um die Formazan-Kristalle in Lösung zu bringen. Abschließend wurde der MTT-Assay mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen und mithilfe von Windows Excel ausgewertet.

Ein Toxizitäts-Assay dient der Charakterisierung und Evaluation eines Wirkstoffs beispielsweise bei der Etablierung einer neuen *in vitro* - Behandlung. Bei der hier gewählten Form eines Zellviabilitäts-Assays kann mit den erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven ein Wirkstoff und dessen Effekt auf die verwendeten Zelllinien eingeschätzt werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung Lysepuffer und MTT-Reagenz

Lysepuffer (für 100 ml Stocklösung) - 99,4 ml DMSO - 0,6 ml Essigsäure - 10 g SDS (Natriumlaurylsulfat in Pelletform)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
MTT-Reagenz (für 50 ml Stocklösung [5mg/ml]) -250 mg MTT [3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid] (=Thiazolylblau; Tetrazoliumbromid) - 50 ml 1x-PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Gen5™ Datenanalyse-Software
 Plattenspektralphotometer ELx 800

BioTek Instrumets Inc., Winooski, VT, USA
 BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland

Plattformschüttler Titramax 100

Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach, Deutschland

2.6 Colony Forming Assay (CFA)

Bei dem CFA handelt es sich um einen indirekten Test für den klonogenen/reproduktiven Zelltod. Dabei wird untersucht, wie sich die Zellkoloniebildung einzelner Zellen unter Behandlung verhält.

Die RMS-Tumorzellen (RD und RH30) wurden dafür zunächst in einer definierten Zelldichte (siehe Tabelle 6) in 6-Well Platten angelegt, über Nacht inkubiert und anschließend mit Curcumin 5 µM und Selinexor 0,01 µM jeweils alleine und in Kombination behandelt. Es folgte ein Waschschrift mit warmen PBS und einem Mediumwechsel ohne weitere Behandlung mit Curcumin und/ oder Selinexor. Die Zellen wurden anschließend weiter inkubiert und in regelmäßigen Abständen die Ausbildung neuer Kolonien unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach ca. 10 bis 14-tägiger Kultivierung der Zellen wurden die Kolonien von RD und RH30 vorsichtig

mit 5 ml warmen PBS gewaschen und zweimal für 5 min mit 2 ml Methanol (99,9 %) auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien mit 1 ml 1 %- Kristallviolettlösung bei RT für 30 min (RD) bzw. 2 h (RH30) auf einem Schüttler angefärbt, zweimal mit VE-Wasser gewaschen und im Dunkeln über Nacht getrocknet.

Die Auswertung des Koloniebildungstests im Anschluss erfolgte durch Auszählen der Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, dabei wurde untersucht inwiefern eine einzelne Zelle noch in der Lage war sich zu teilen und eine Kolonie zu bilden. Eine Kolonie wird dabei als größer/ gleich 50 Zellen definiert (64).

Tabelle 17: Zusammensetzung 1%ige Kristallviolett-Lösung

<p>1% Kristallviolett-Lösung: - 1 g Kristallviolettpulver - mit bidest. H₂O auf 100 ml auffüllen</p>	<p>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland</p>
<p>CELLSTAR® Zellkultur Schalen 35x10 mm Formaldehyd</p>	<p>Greiner Bio - One GmbH, Frickenhausen, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</p>
<p>Methanol</p>	<p>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</p>

2.7 Berechnungen zu synergistischen, additiven und antagonistischen Effekten bei RMS- Zelllinien unter Kombinationstherapie mit Selinexor und Curcumin

Es wurde der Coefficient of Drug Interaction (CDI) gemäß dem Bliss Independence Modell mittels folgender Formel bestimmt: $CDI = (A+B - A \times B) / AB$ um synergistische (<1), additive ($=1$) und antagonistische (>1) Effekte zu untersuchen (36, 65). Dabei stehen A und B für die zwei verwendeten Substanzen Curcumin und Selinexor und AB entspricht der Kombinationstherapie. Die errechneten Werte sind als orientierend einzuordnen, da sie nur eine Momentaufnahme aufzeigen, für genauere Untersuchungen bedürfte es einer Verdünnungsreihe der oben genannten Substanzen.

2.8 Statistik

Für die Anfertigung der Dissertationsschrift wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Word und dem Literaturprogramm EndNote gearbeitet. Die statistische Auswertung und die Graphen wurden mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 8.1.0 erstellt. Mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wurde die statistische Prüfung der Hypothese vorgenommen. Als Testverfahren wurden als Methoden Dunnett und Bonferroni verwendet. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. In den Graphen wurden die Mittelwerte der Einzelversuche mit Standardfehler (SEM) angegeben. Das 95 %-Konfidenzintervall wurde als Signifikanzniveau gewählt, so wurden alle p-Werte $<0,05$ 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 8.4.0

Office 365 Pro Plus

EndNote X9

Adobe Systems, München,
Deutschland

GraphPad Software, La Jolla, USA

Microsoft, Unterschleißheim,
Deutschland

Clarivate Analytics

3 Ergebnisse

Ziel der Dissertation war, zu untersuchen, ob XPO1 vermehrt in kindlichen RMS exprimiert wird und inwieweit Selinexor und Curcumin diese Expression beeinflussen können, um einen Grundstein für einen weiteren Therapieansatz in der Behandlung kindlicher RMS zu setzen.

3.1 Expressionsprofil des Exportproteins XPO1

XPO1 wird in vielen Tumoren wie beispielsweise Melanom, Mamma-Karzinom und Lymphomen überexprimiert (66) und ist mit einem insgesamt schlechteren Outcome assoziiert (40, 42). Daher wurde mittels einer Western Blot Analyse ein Expressionsmuster des XPO1-Proteins in Rhabdomyosarkom-Zelllinien (RMS-Zelllinien) und einer gesunden Skelettmuskel-Zelllinie (SKMC-Zelllinie) erstellt, um die Expression von XPO1 in RMS zu analysieren.

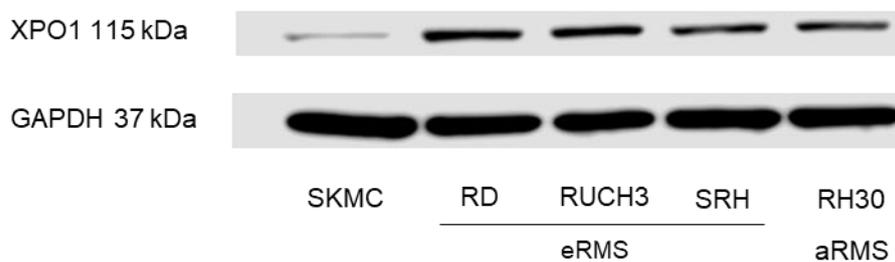


Abbildung 7: Expressionsprofil von XPO1 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien sowie in der Skelettmuskelzelllinie SKMC
Es wurden Proteinlysate gewonnen, um XPO1 über eine Western Blot Analyse detektieren zu können. Als housekeeping gene diente GAPDH. SKMC = Skelettmuskelzellen, RD, RUCH3 und SRH =ERMS, RH30 = ARMS.

In der Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass XPO1 in allen Zelllinien exprimiert wird. Im Vergleich zur gesunden Skelettmuskelzelllinie SKMC zeigten die RMS-Zelllinien eine deutlich höhere Expression von XPO1. Die stärkste Expression war bei den ERMS-Zelllinien RD und RUCH3 nachweisbar (siehe Abb. 7).

Im Folgenden wurden die Hauptexperimente mit zwei verschiedenen etablierten RMS-Zelllinien durchgeführt. Dabei wurden eine embryonale Zelllinie (RD), welche u.a. eine homozygote p53-Mutation aufweist, stellvertretend für die

ERMS und eine alveoläre Zelllinie (RH30), welche positiv für die t (2;13) (q35; q14) Translokation, welche die Bildung des Fusionsproteins PAX3/FKHR bedingt (52-54), stellvertretend für die ARMS ausgewählt.

Ebenso wurde der MTT-Assay mit Skelettmuskelzellen (SKMC) durchgeführt. Hiermit wurde untersucht, ob die Behandlung auch einen Einfluss auf die Zellviabilität gesunder Zellen hat.

3.2 Zytotoxisches Potenzial von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Zellviabilität in RMS-Zelllinien

Für die Beurteilung der Zytotoxizität von Curcumin und Selinexor auf die Zelllinien RD und RH30 wurde als Methode der Zellviabilitäts-Assay (MTT-Assay) verwendet. Die gewonnenen Daten sollten Aufschluss auf die Auswirkungen auf zelluläre metabolische Prozesse geben. Dabei wurde die Kontrollpopulation auf 100 % normiert.

In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Curcumin Auswirkungen auf die Zellviabilität von hepatozellulären Karzinomzellen hat (35). Da im Western Blot nachgewiesen werden konnte, dass XPO1 in RMS-Zelllinien gegenüber benignen Zellen vermehrt exprimiert wird, sollte nun im Folgenden untersucht werden, ob Curcumin und Selinexor sowie die Kombinationstherapie aus Curcumin und Selinexor Auswirkungen auf die Viabilität von RMS-Zelllinien hat.

Die nachfolgende Abbildung 8 zeigt die konzentrationsabhängige Behandlung mit Curcumin auf die Zellviabilität der gewählten RMS-Zelllinien (RD und RH30).

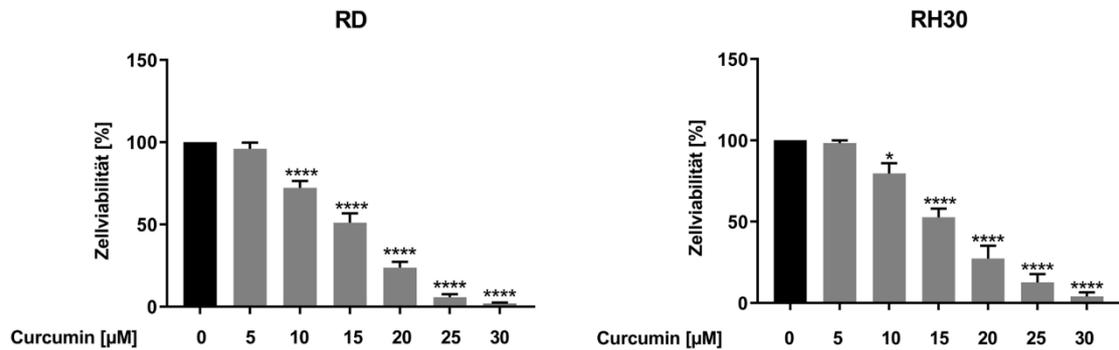


Abbildung 8: Untersuchung der Zellviabilität bei Behandlung mit aufsteigenden Curcumin-Konzentrationen in Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Analyse erfolgte mittels MTT-Assay. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Curcumin in aufsteigender Konzentration (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µM) für 72 h behandelt und die Zellviabilität anschließend spektralphotometrisch gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 4 Einzelversuchen bei den Zelllinien RD und aus 3 Einzelversuchen bei der Zelllinie RH30. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

In Abbildung 8 ist bei beiden RMS-Zelllinien eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität zu erkennen. Ab einer Konzentration von 10 µM konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in RD und RH30 nachgewiesen werden. Dabei wurde bei 10 µM eine Reduktion der Zellviabilität um 30 % in der RD-Zelllinie und um 20 % in der RH30-Zelllinie erzielt. Die errechneten IC₅₀-Werte liegen bei der RD-Zelllinie bei 14 µM und bei der RH30-Zelllinie bei 16 µM.

Die Ergebnisse der Behandlung mit Selinexor sind in Abbildung 9 dargestellt.

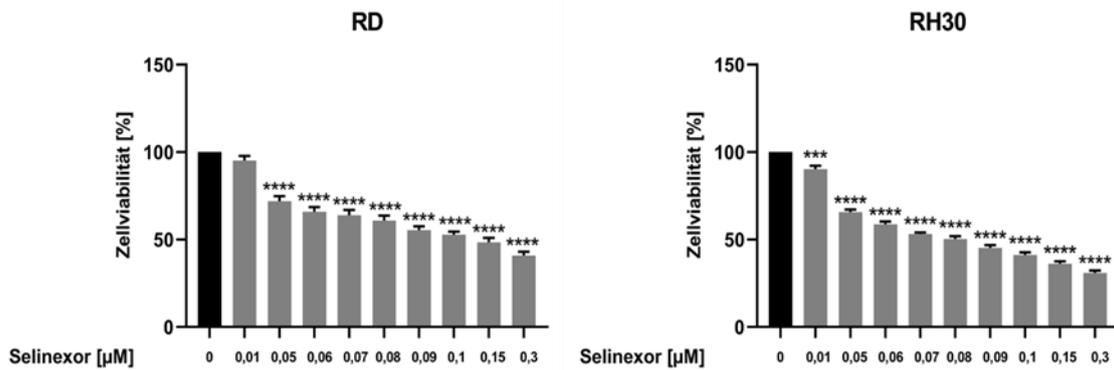


Abbildung 9: Untersuchung der Zellviabilität in Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Behandlung mit Selinexor. Die Analyse erfolgte mittels MTT-Assay. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Selinexor in aufsteigender Konzentration (0; 0,01; 0,05-0,09; 0,1; 0,15 und 0,3 µM) für 72 h behandelt und die Zellviabilität anschließend spektralphotometrisch gemessen. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und stellte sich unauffällig dar. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde als Methode Dunnett verwendet, **** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Zellviabilität unter steigenden Selinexor-Konzentrationen, beginnend ab einer Konzentration von 0,05 µM Selinexor in der RD-Zelllinie und von 0,01 µM in der RH30-Zelllinie. Bei 0,05 µM Selinexor zeigt sich eine Reduktion der Zellviabilität um 30 % in der RD-Zelllinie und in der RH30-Zelllinie um 40 %. Die errechneten IC50-Werte liegen bei der RD-Zelllinie bei 0,08 µM, bei der RH30-Zelllinie bei 0,07 µM.

Um eine mögliche Wirkverstärkung einer Kombinationstherapie durch Selinexor und Curcumin untersuchen zu können, wurden im Folgenden die beiden RMS-Zelllinien mit einer Kombinationstherapie aus Curcumin (10 µM) und je drei Konzentrationen Selinexor (0,01 µM, 0,05 µM und 0,1 µM) behandelt.

In Abbildung 10 sind die jeweiligen Ergebnisse der Kombinationstherapie dargestellt.

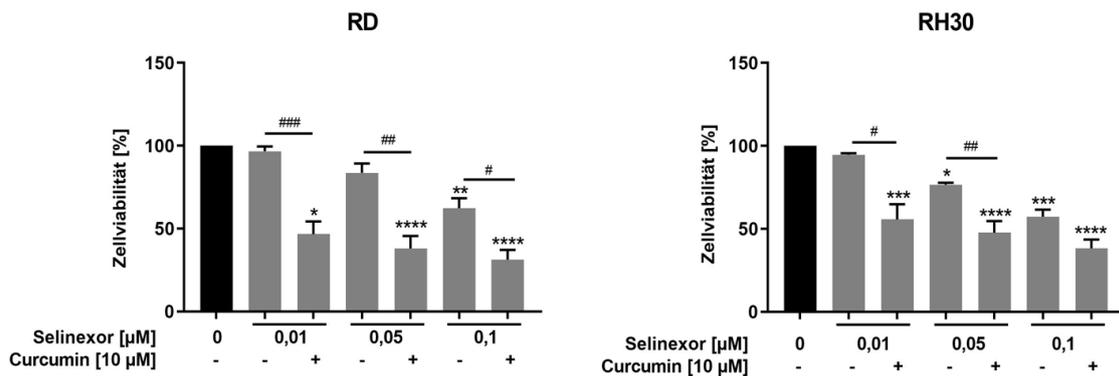


Abbildung 10: Auswirkungen von Curcumin in Kombination mit Selinexor auf die Zellviabilität in Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Analyse erfolgte mittels MTT-Assay. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit 10 μM Curcumin und Selinexor in aufsteigender Konzentration (0; 0,01; 0,05 und 0,1 μM) in Kombination für 72 h behandelt und die Zellviabilität anschließend spektralphotometrisch gemessen. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde als Methode Bonferroni ($\#p < 0,05$, $\#\#p < 0,01$, $\#\#\#p < 0,001$) und Dunnett ($*p < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$) verwendet.

In Abbildung 10, wie auch in Abbildung 9, konnte gezeigt werden, dass eine alleinige konzentrationsabhängige Gabe von Selinexor zu einer Reduktion der Zellviabilität führt. Eine Kombinationstherapie aus Curcumin und Selinexor führte zu einer signifikanten weiteren Reduktion der Zellviabilität gegenüber der alleinigen Gabe von Selinexor. In der RD-Zelllinie zeigt sich der größte Effekt bei der Kombination mit 0,01 μM Selinexor gegenüber der Einzelbehandlung bei einer Abnahme der Zellviabilität um ca. 50 %. Bei der RH30-Zelllinie weist der Vergleich der Kombinationstherapie mit 0,01 μM Selinexor gegenüber der Einzelbehandlung eine signifikante Reduktion der Zellviabilität um 30 % auf.

3.2.1 Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Zellviabilität von RMS-Zellen (MTT-Assays)

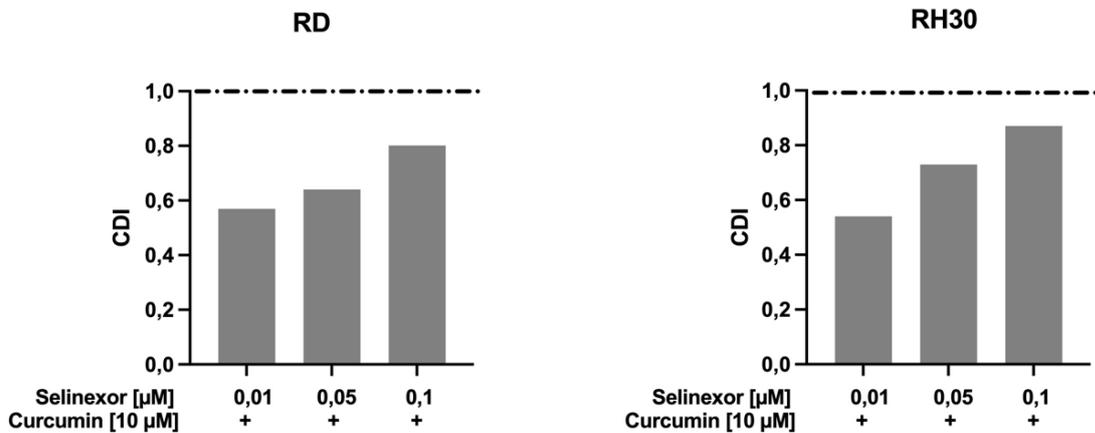


Abbildung 11: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Zellviabilität von Rhabdomyosarkomzelllinien (MTT-Assays)

CDI nach Bliss Independence Modell $CDI = (A+B - AxB) / AB$; Werte unter (<) 1 (gestrichelte Linie) sprechen für einen Synergismus, über (>) 1 für einen Antagonismus und 1 für additive Effekte.

In Abbildung 11 sind die CDI-Werte aus den MTT-Analysen dargestellt (siehe Abb. 8-10). Bei beiden RMS-Zelllinien sind mit Werten unter 1 synergistische Werte errechnet worden (CDI-Werte bei 0,01; 0,05; 0,1 μM Selinexor: RD: 0,57; 0,64; 0,8, RH30: 0,05; 0,23; 0,43). Mit steigenden Konzentrationen von Selinexor stellt sich ein höherer CDI-Wert dar.

Des Weiteren wurden Messungen an gesunden Skelettmuskelzellen durchgeführt. Es wurde überprüft, ob Curcumin und/ oder Selinexor abgesehen von ihren Wirkungen an Tumorzellen, auch gesunde Körperzellen beeinflussen und theoretisch zu zusätzlichen Nebenwirkungen führen könnten. Die Ergebnisse dieser Zellviabilitäts-Analysen sind Abbildung 12 zu entnehmen.

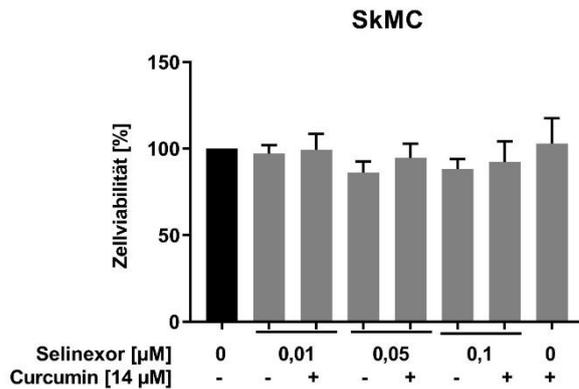


Abbildung 12: Analyse der Zellviabilität in Skelettmuskelzellen unter Behandlung mit Curcumin und Selinexor

Die Analyse erfolgte mittels MTT-Assay. Die Skelettmuskelzelllinie (SKMC) wurde mit Curcumin ($14 \mu\text{M}$) und Selinexor in aufsteigender Konzentration (0; 0,01; 0,05 und $0,1 \mu\text{M}$) alleine und in Kombination der beiden Substanzen für 72 h behandelt und die Zellviabilität anschließend spektralphotometrisch gemessen. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und stellte sich unauffällig dar. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 4 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde als Methode Bonferroni verwendet.

In Abbildung 12 zeigt sich, dass weder Curcumin noch Selinexor einen signifikanten Effekt auf die Zellviabilität der Skelettmuskelzelllinie haben. Auch bei höheren Konzentrationen kommt es zu keinem zytotoxischen Effekt der Substanzen auf die Skelettmuskelzellen.

3.3 Analyse des Effektes von Curcumin auf die Expression des Exportproteins XPO1

Um zu überprüfen, ob Curcumin in den von uns verwendeten RMS-Zelllinien (RD und RH30) eine Auswirkung auf die XPO1-Expression hat, wurden Western Blot-Analysen zur semiquantitativen Analyse der XPO1-Expression durchgeführt. Dabei wurde das Expressionsprofil von Tumorzellen, die 24 h mit aufsteigenden Curcumin-Konzentrationen behandelt wurden, mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb.13).

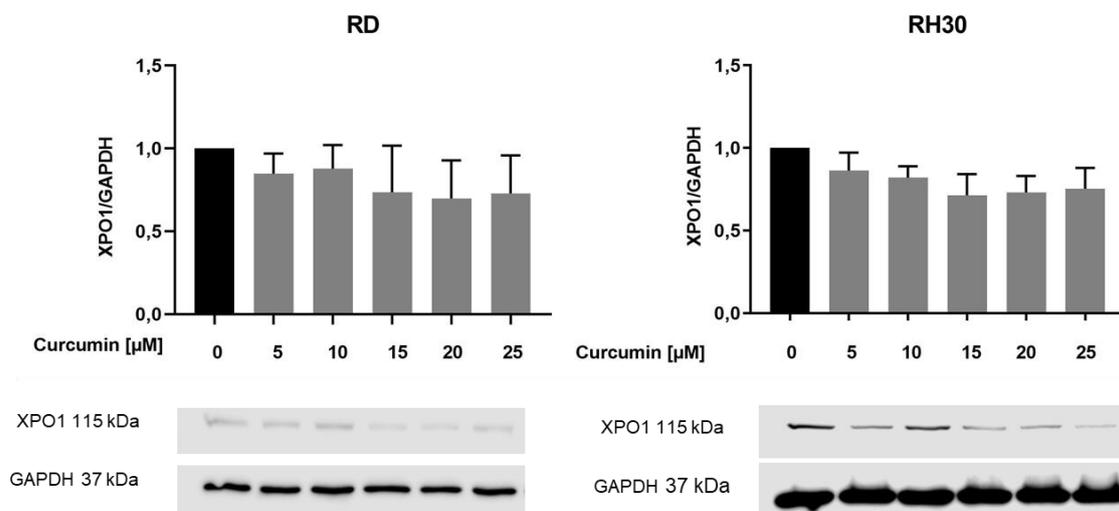


Abbildung 13: Untersuchung der Wirkung von Curcumin auf die XPO1-Expression in Rhabdomyosarkom-Zelllinien
Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Curcumin in aufsteigender Konzentration (0, 5, 10, 15, 20, 25 µM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot XPO1 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente GAPDH. Die Kontrolle wurde auf 1 normiert. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 4 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett).

Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, zeigt sich eine tendenzielle, jedoch keine signifikante Abnahme der XPO1-Expression unter alleiniger Curcumin-Behandlung in beiden RMS-Zelllinien. Auch höhere Konzentrationen (25 µM) scheinen keinen großen Einfluss auf das XPO1-Protein zu haben.

3.4 Analyse des Effektes von Selinexor auf die Expression des Exportproteins XPO1

Um mögliche Veränderungen der XPO1-Expression unter Behandlung mit Selinexor nachweisen zu können, wurden Western Blot-Analysen in aufsteigenden Konzentrationen mit Selinexor durchgeführt.

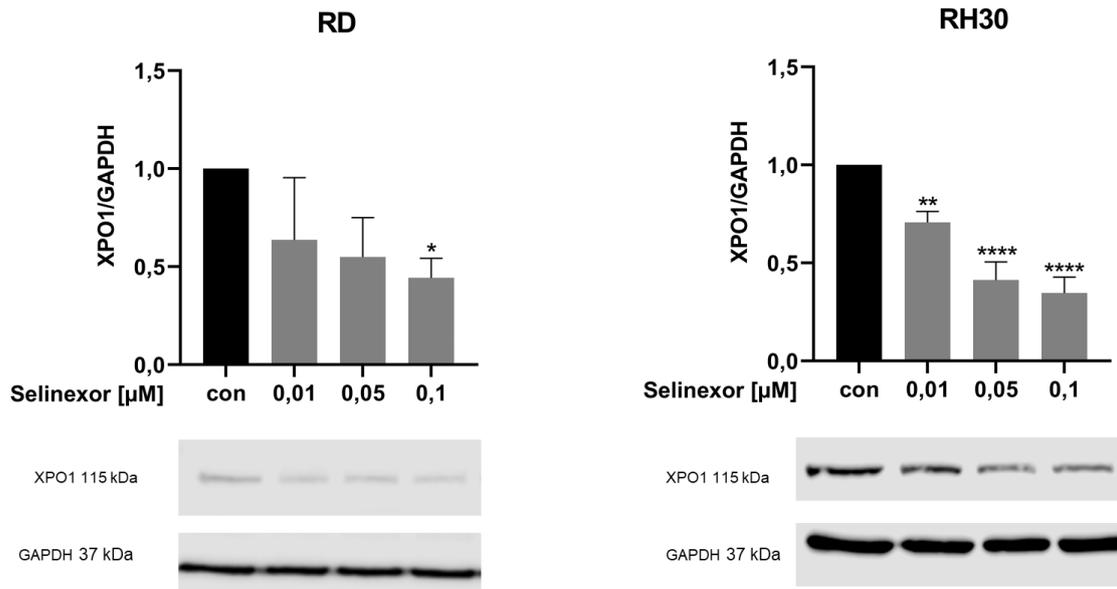


Abbildung 14: Analyse der XPO1-Expression unter Gabe von Selinexor in Rhabdomyosarkom-Zelllinien. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Selinexor in aufsteigender Konzentration (0; 0,01; 0,05 und 0,1 µM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot XPO1 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente GAPDH. Die Kontrolle wurde auf 1 normiert. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA) und als Testverfahren wurde Dunnett (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$) verwendet.

In Abbildung 14 lässt sich eine signifikante Abnahme der XPO1-Expression unter steigender Konzentration mit Selinexor verzeichnen. Dabei zeigt sich bei der RH30-Zelllinie eine signifikante Abnahme der XPO1-Expression bereits beginnend ab 0,01 µM Selinexor. Bei der RD-Zelllinie hingegen zeigen sich erst ab einer zehnfach höheren Konzentration von 0,1 µM signifikante Veränderungen der XPO1-Expression.

3.5 Untersuchung der Wirkung einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Expression des Exportproteins XPO1

Um einen möglichen additiven beziehungsweise synergistischen Effekt der Kombinationsbehandlung auf XPO1 ermitteln zu können, erfolgte eine semiquantitative Analyse der XPO1-Expression in RMS-Zelllinien mittels Western-Blot Analyse. Die Tumorzellen wurden mit 0,01; 0,05 und 0,1 μM Selinexor und 15 μM Curcumin alleine und in Kombination für 24 h behandelt. Anschließend wurde das Expressionsprofil von XPO1 der beiden RMS-Tumorzelllinien unter Kombinationstherapie gegenüber der Einzelbehandlung und auch gegenüber einer unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb. 15).

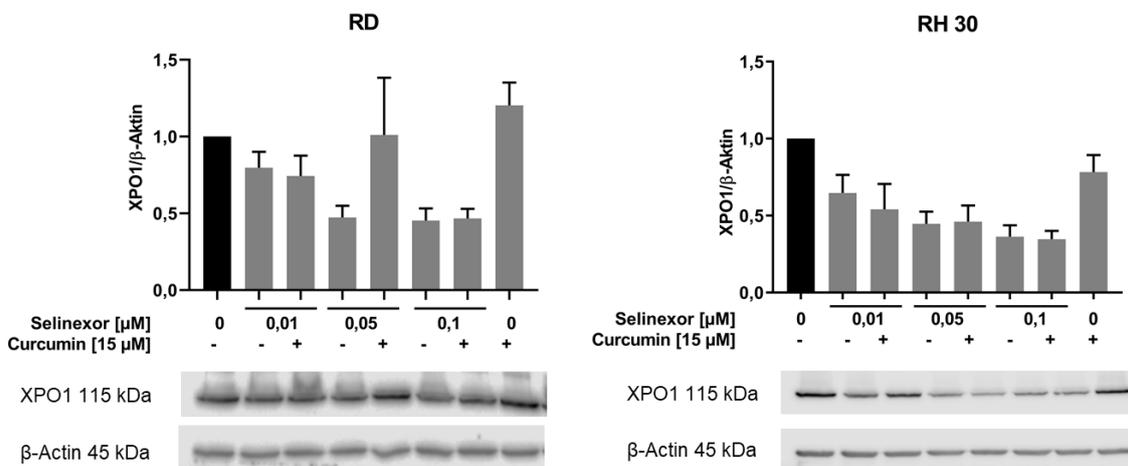


Abbildung 15: Auswirkungen der Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die XPO1-Expression in Rhabdomyosarkom-Zelllinien
Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Curcumin (15 μM) und Selinexor (0,01; 0,05 und 0,1 μM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot XPO1 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente β -Aktin. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Bonferroni).

In Abbildung 15 zeigt eine Einzelbehandlung mit allen drei Selinexor-Konzentrationen eine verstärkte Abnahme der XPO1-Expression, ähnlich wie in Abbildung 14. Eine Kombinationsbehandlung von Curcumin und Selinexor führt in beiden Tumorzelllinien (RD und RH30) zur verstärkten Abnahme der Expression von XPO1. Bei beiden Zelllinien lässt sich bei der Kombination von 0,01 μM Selinexor mit 15 μM Curcumin eine Abnahme der XPO1-Expression um

20 % gegenüber der Einzelbehandlung mit 0,01 μM Selinexor erkennen. Jedoch ließen sich keine signifikanten Werte aufzeigen.

3.5.1 Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die XPO1-Expression in RMS-Zellen (Western Blot)

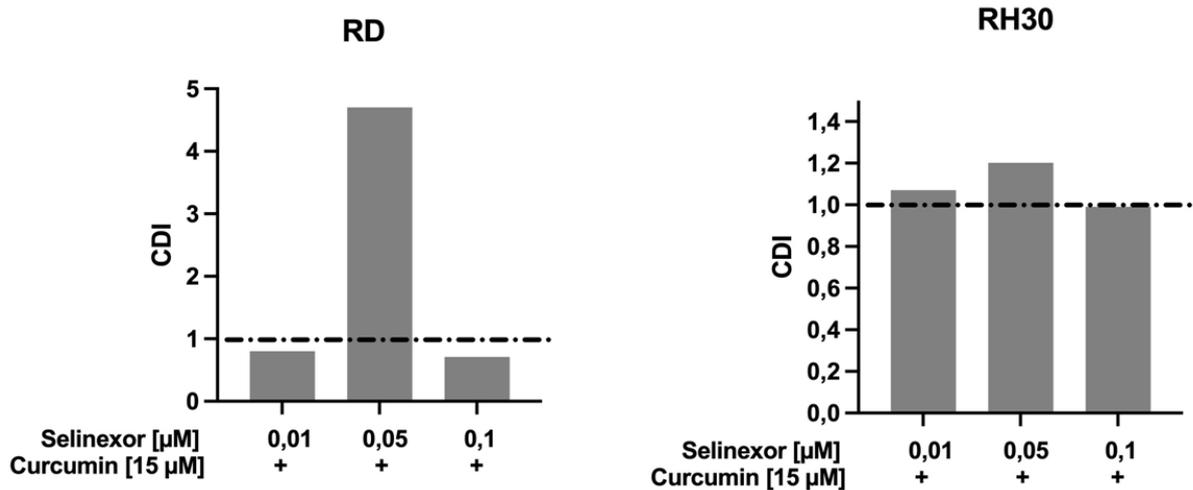


Abbildung 16: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die XPO1-Expression in Rhabdomyosarkomzelllinien (Western Blot)
 CDI nach Bliss Independence Modell $CDI = (A+B - A \times B) / AB$; Werte unter (<) 1 (gestrichelte Linie) sprechen für einen Synergismus, über (>) 1 für einen Antagonismus und 1 für additive Effekte.

In Abbildung 16 ist der CDI-Wert bei Kombinationstherapie von $15 \mu\text{M}$ Curcumin mit Selinexor bei den Western Blot-Analysen auf XPO1 dargestellt. In der RD-Zelllinie zeigt sich mit Werten unter 1 ein synergistischer Effekt (den CDI-Wert bei einer Selinexor-Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ beurteilen wir als Ausreißer). Im Gegensatz dazu sind die CDI-Werte in der RH30-Zelllinie eher bei 1 und zeigen einen antagonistischen Effekt beider Substanzen an.

3.6 Expressionsmuster der Zielgene Cyclin D1 und p53 des Exportproteins XPO1

Das Exportprotein XPO1 transportiert eine Vielzahl von Proteinen wie Cyclin D1, p53, p73, RB1 aus dem Zellkern ins Zytosol (40, 67). Sowohl Cyclin D1 als auch p53 sind Proteine, die von Curcumin moduliert werden (30-32), als auch als Transportproteine von XPO1 fungieren (34, 44).

In den folgenden Experimenten soll die Frage beantwortet werden, ob die Expression von Cyclin D1 und p53 von Curcumin bzw. Selinexor beeinflusst wird.

3.6.1 Analyse des Effektes von Curcumin auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1

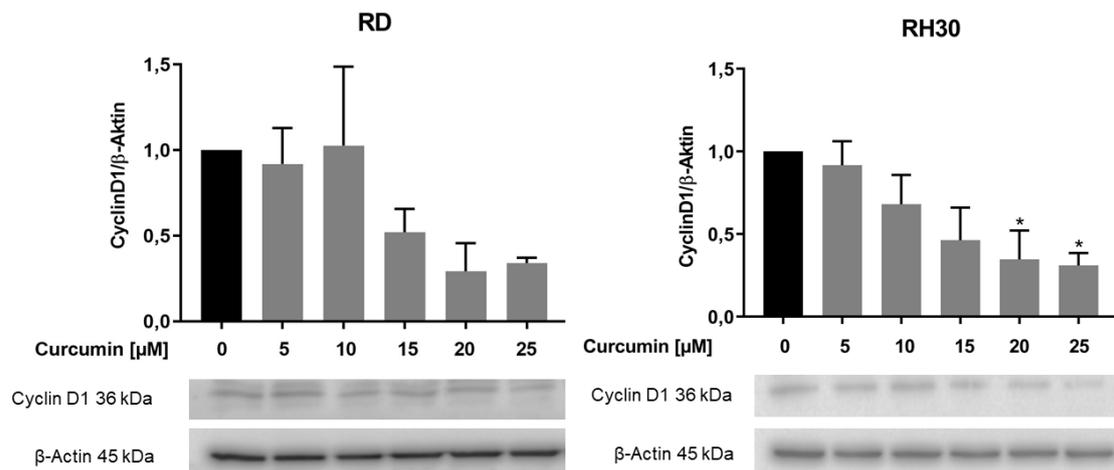


Abbildung 17: Expressionslevel von Cyclin D1 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien nach Curcumin-Behandlung. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD, RH30 wurden mit Curcumin in aufsteigender Konzentration (0, 5, 10, 15, 20, 25 µM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot Cyclin D1 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente β-Aktin für Cyclin D1. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Dunnett; *p<0,05).

Bei beiden RMS-Zelllinien zeigte sich für Cyclin D1 eine tendenzielle Abnahme der Expression unter steigender Curcumin-Konzentration (siehe Abb. 17). Bei der RH30-Zelllinie war eine signifikante Verminderung der Expression von Cyclin D1 bei 20 und 25 µM Curcumin festzustellen.

3.6.2 Analyse des Effektes von Curcumin auf das Zielgen p53 von XPO1

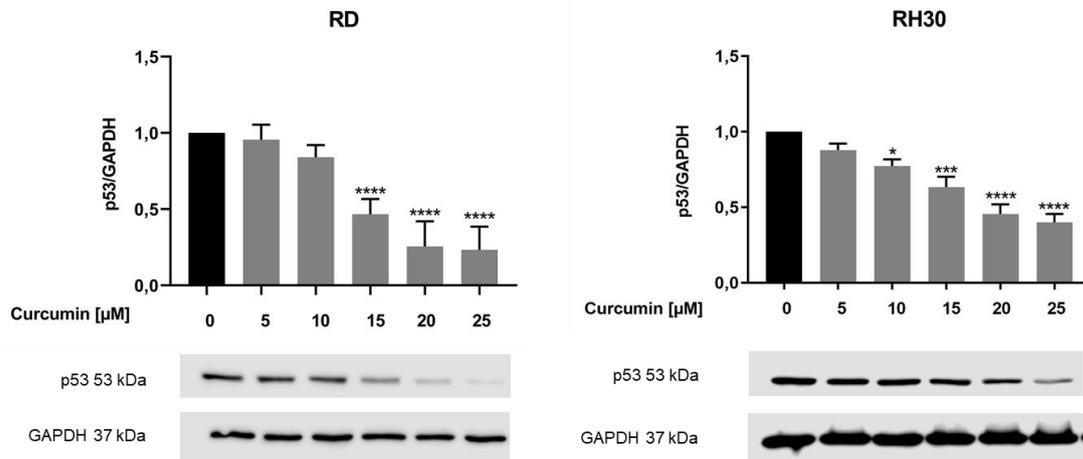


Abbildung 18: Expressionsanalyse von p53 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Curcumin-Behandlung. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Curcumin in aufsteigender Konzentration (0, 5, 10, 15, 20, 25 µM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot p53 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente GAPDH. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde Dunnett (*p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001) verwendet.

Wie in Abbildung 18 dargestellt lässt sich bei der RD- und RH30-Zelllinie eine signifikante Abnahme der p53-Expression unter steigender Curcumin-Konzentration erkennen. In der RD-Zelllinie lässt sich ab 15 µM Curcumin eine signifikante Abnahme der p53 Expression feststellen, wohingegen die RH30-Zelllinie schon ab 10 µM signifikante Werte aufzeigt.

3.6.3 Analyse des Effektes von Selinexor auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1

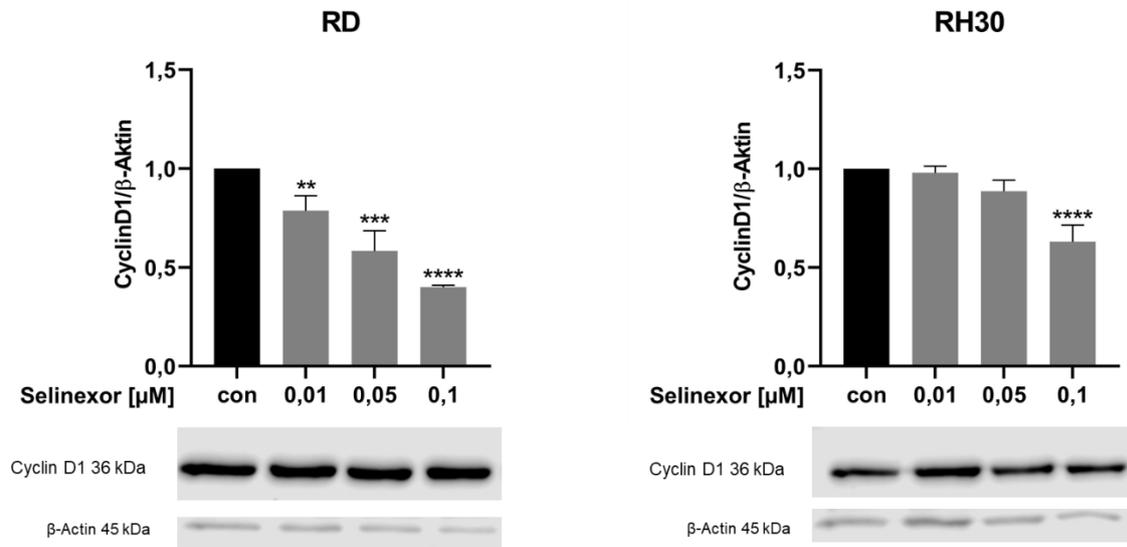


Abbildung 19: Expressionslevel von Cyclin D1 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien nach Selinexor-Behandlung. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Selinexor in aufsteigender Konzentration (0, 0,01, 0,05 und 0,1 µM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot Cyclin D1 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente β-Aktin für Cyclin D1. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde Dunnett ($p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$, $p^{****}<0,0001$) verwendet.

In Abbildung 19 lässt sich eine signifikante Abnahme der Cyclin D1- Expression unter Selinexor-Behandlung in beiden RMS-Zelllinien nachweisen. Während bei der RD-Zelllinie eine signifikante Verminderung der Expression von Cyclin D1 ab einer Konzentration von 0,01 µM erkennbar ist, braucht es eine 10-fache Konzentration (0,1 µM Selinexor), um eine signifikante Reduktion der Cyclin D1- Expression bei der RH30-Zelllinie nachzuweisen.

3.6.4 Analyse des Effektes von Selinexor auf das Zielgen p53 von XPO1

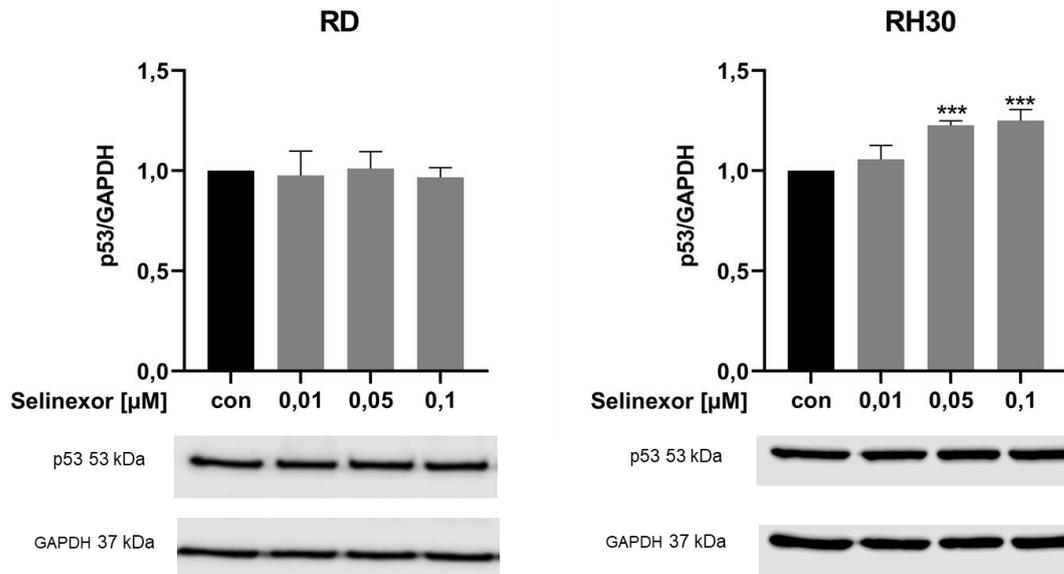


Abbildung 20: Expressionsanalyse von p53 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Selinexor-Behandlung. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Selinexor in aufsteigender Konzentration (0; 0,01; 0,05 und 0,1 µM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot p53 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente GAPDH. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde Dunnett (*** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) verwendet.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, führte in den RD-Zellen eine Inkubation mit Selinexor zu keiner Veränderung der Expression von p53. Diese blieb bei allen verwendeten Konzentrationen konstant. Hingegen bei der RH30-Zelllinie konnte ab einer Konzentration von 0,05 µM Selinexor eine signifikante Steigerung der p53 Expression nachgewiesen werden.

3.6.5 Untersuchungen zur Wirkung einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1

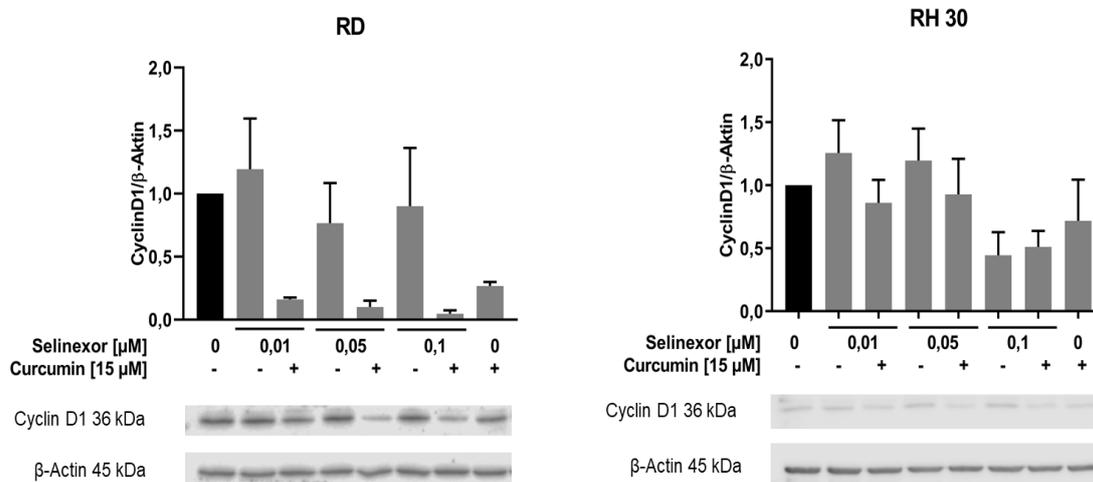


Abbildung 21: Auswirkungen von Curcumin in Kombination mit Selinexor auf das Zielgen Cyclin D1 von XPO1 bei Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Curcumin ($15 \mu\text{M}$) und Selinexor ($0,01$; $0,05$; $0,1 \mu\text{M}$) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot Cyclin D1 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente β -Aktin. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA), als Testverfahren wurde Bonferroni verwendet.

Unter der Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor zeigte sich bei beiden RMS-Zelllinien eine deutliche Expressionsabnahme von Cyclin D1, wie in Abbildung 21 zu sehen ist. Ein deutliches Ansprechen auf die Kombinationstherapie zeigt sich in der RD-Zelllinie mit Abnahmen der Cyclin D1-Expression um mehr als 50 %. In der RH30-Zelllinie hat die alleinige Behandlung mit $0,1 \mu\text{M}$ Selinexor den größten Effekt und zeigt eine Expressionsabnahme um ca. 50 %. Des Weiteren zeigt sich in der RH30-Zelllinie, dass die Kombinationstherapie mit $0,01$ und $0,05 \mu\text{M}$ Selinexor und $15 \mu\text{M}$ Curcumin eine deutliche Abnahme der Cyclin D1-Expression gegenüber einer Einzeltherapie mit Selinexor in diesen Konzentrationen aufzeigt.

3.6.5.1 Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Cyclin D1-Expression in RMS-Zellen (Western Blot)

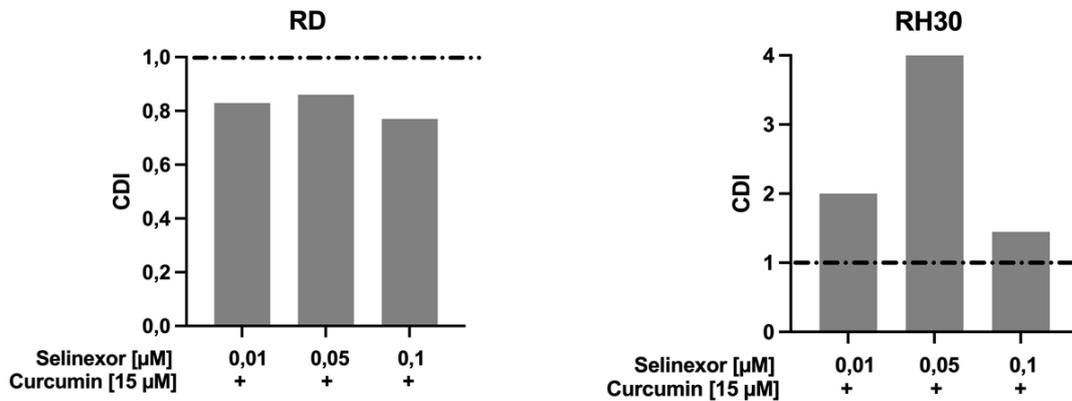


Abbildung 22: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Cyclin D1-Expression in Rhabdomyosarkomzelllinien (Western Blot)
CDI nach Bliss Independence Model $CDI = (A+B - AxB) / AB$; Werte unter (<) 1 (gestrichelte Linie) sprechen für einen Synergismus, über (>) 1 für einen Antagonismus und 1 für additive Effekte.

Die CDI-Werte in Abbildung 22 liegen unter der Kombinationstherapie mit $15 \mu\text{M}$ Curcumin und $0,01$; $0,05$ und $0,1 \mu\text{M}$ Selinexor bei Western Blot-Analysen auf Cyclin D1 in der RD-Zelllinie unter 1 entsprechend einem synergistischen Effekt. Auffallend sind die hohen CDI-Werte in der RH30-Zelllinie mit Werten über 1 entsprechend einem antagonistischen Effekt.

3.6.6 Untersuchungen zur Wirkung einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf das Zielgen p53 von XPO1

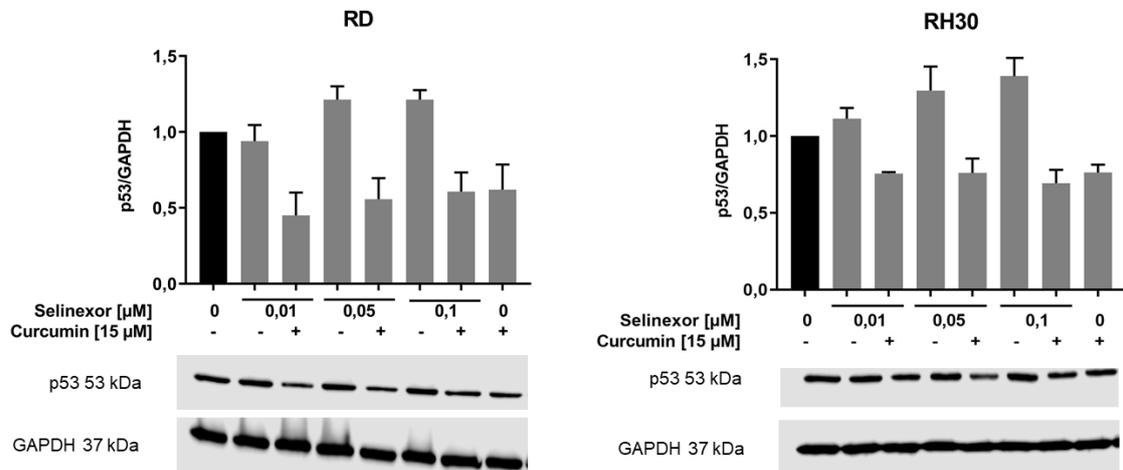


Abbildung 23: Auswirkungen von Curcumin in Kombination mit Selinexor auf p53 in Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit Curcumin ($15 \mu\text{M}$) und Selinexor ($0,01$; $0,05$; $0,1 \mu\text{M}$) für 24 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot p53 detektiert und quantifiziert. Als housekeeping gene diente GAPDH. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, Bonferroni).

Wie in Abbildung 23 gezeigt, führt eine steigende Selinexor-Konzentration bei den RMS-Tumorzelllinien RD und RH30 zu einer Zunahme der p53-Expression. Die Einzelbehandlung mit $15 \mu\text{M}$ Curcumin führt in beiden Zelllinien zu einer Abnahme der p53-Expression um ca. 30 %. Die Kombinationstherapie aus $0,01 \mu\text{M}$ Selinexor und $15 \mu\text{M}$ Curcumin senkt die Expression von p53 in der RD-Zelllinie um mehr als 50 %, in der RH30-Zelllinie um ca. 30 %. Auch bei der Kombinationstherapie mit $0,05$ und $0,1 \mu\text{M}$ Selinexor kommt es in beiden RMS-Zelllinien zu einer Abnahme der p53-Expression um ca. 30 %.

3.6.6.1 Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die p53-Expression in RMS-Zellen (Western Blot)

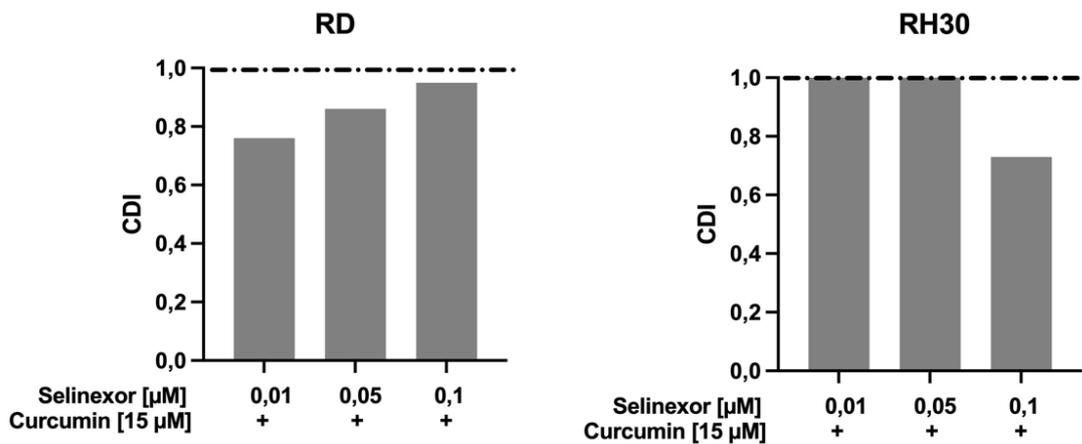


Abbildung 24: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die p53-Expression in Rhabdomyosarkomzelllinien (Western Blot)
 CDI nach Bliss Independence Modell $CDI = (A+B - A \times B) / AB$; Werte unter (<) 1 (gestrichelte Linie) sprechen für einen Synergismus, über (>) 1 für einen Antagonismus und 1 für additive Effekte.

Bei Western Blot Analysen auf p53 liegen die CDI-Werte unter Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor bei der RMS-Zelllinie RD unter 1 entsprechend einem synergistischen Effekt und bei RH30 in den beiden niedrigeren Konzentrationen bei 1 (additiv) und bei einer Konzentration von 0,1 μM Selinexor unter 1 (synergistisch).

3.7 Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Koloniebildung (CFA)

Bei Tumorzellen handelt es sich um Zellen, die sich ungehemmt teilen und die sich der natürlichen Regulation von Wachstum und Proliferation entzogen haben. Der Colony Forming Assay (CFA) ist eine Methode zur Beurteilung der Reproduktionsfähigkeit einzelner Zellen (64). Hierbei sollte untersucht werden, ob Curcumin und Selinexor alleine und in Kombination im Rahmen ihrer hemmenden Einflüsse auf zelluläre Prozesse den klonogenen Zelltod ursprünglich reproduktionsfähiger Tumorzellen induzieren können. Es soll untersucht werden, ob sich somit das Überleben von Tumorzellpopulationen durch Wachstum zahlreicher neuer Zellklone ausgehend von überlebenden Zellen reduzieren lässt. Die Kontrollpopulationen wurden auf 100 % normiert.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der CFA-Analysen dargestellt (Abb. 25-27).

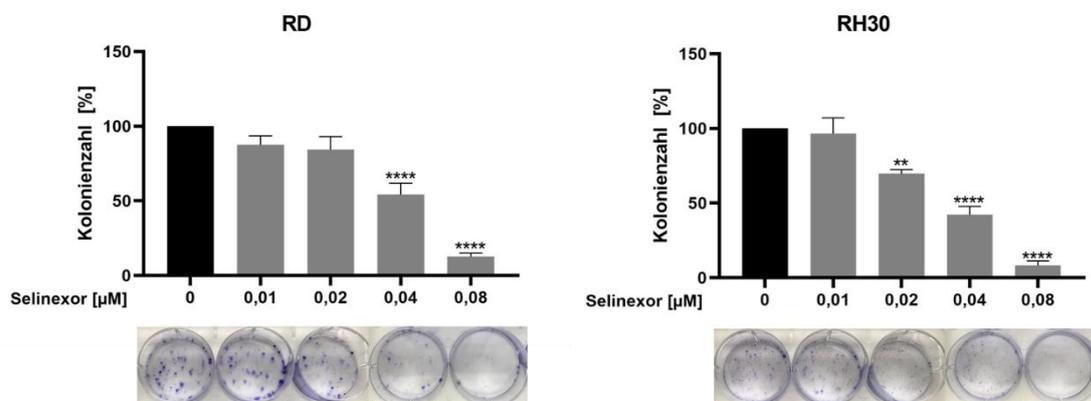


Abbildung 25: Auswirkung von Selinexor auf die Koloniebildung bei Rhabdomyosarkom-Zelllinien. Die Analyse erfolgte mittels Colony Forming Assay (CFA). Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit 0,01; 0,02; 0,04 und 0,08 µM Selinexor behandelt und anschließend für 10-14 Tage inkubiert. Die neu gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 6 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde als Methode Dunnett (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$) verwendet.

In Abbildung 25 zeigt sich eine signifikante Abnahme der Koloniebildung unter Selinexor-Behandlung. In der Zelllinie RD lässt sich ab 0,04 µM eine Reduktion um ca. 40 % und in der RH30-Zelllinie ab 0,02 µM um ca. 30 % nachweisen. Mit zunehmend höheren Konzentrationen von Selinexor finden sich dazu passend eine signifikante Zunahme der Reduktion der Koloniebildung.

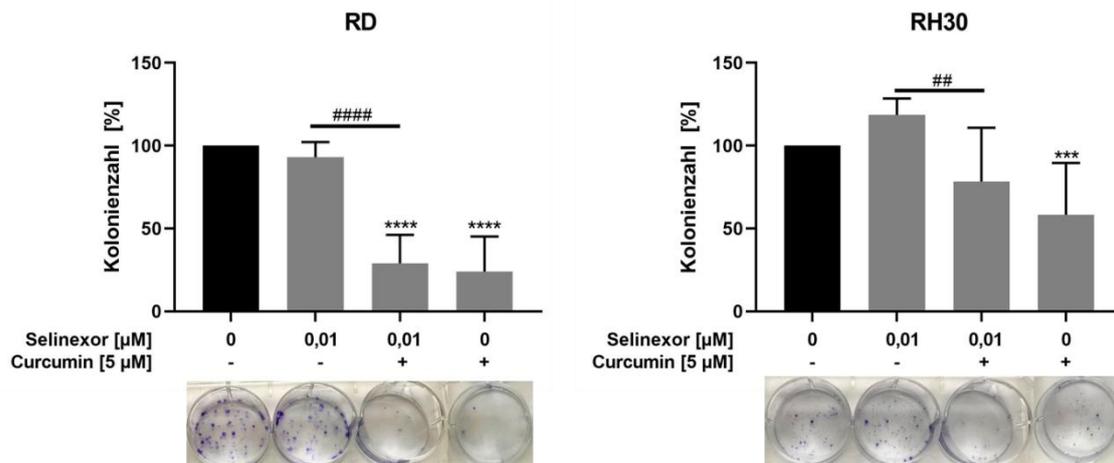


Abbildung 26: Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Koloniebildung bei Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Die Analyse erfolgte mittels Colony Forming Assay (CFA). Die RMS-Zelllinien RD und RH30 wurden mit $5 \mu\text{M}$ Curcumin und je $0,01 \mu\text{M}$ Selinexor alleine und in Kombination behandelt und anschließend für 10-14 Tage inkubiert. Die neu gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde bei allen Versuchen durchgeführt und blieb ohne Signifikanzen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler aus 6 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als Testverfahren wurde als Methode Bonferroni (## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$) und Dunnett (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) verwendet.

Wie Abbildung 26 zu entnehmen ist, zeigt sich eine signifikante Reduktion der Kolonienzahl unter Einzelbehandlung mit $5 \mu\text{M}$ Curcumin. Auch die Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor zeigt eine signifikante Reduktion der Kolonienzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Mit der gewählten Selinexor-Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ lassen sich keine Effekte auf eine Reduktion der Koloniebildung zeigen.

3.7.1 Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Koloniebildung in RMS-Zellen (CFA)

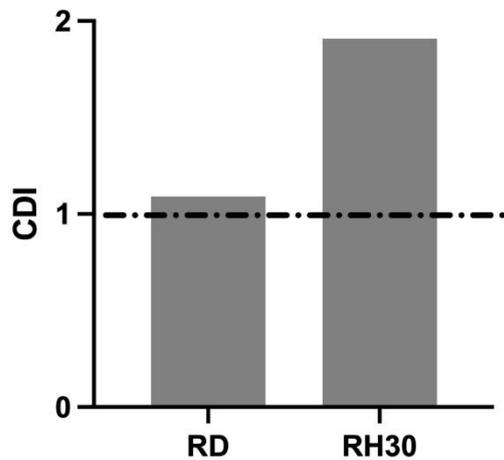


Abbildung 27: Effekte einer Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor auf die Koloniebildung in Rhabdomyosarkomzelllinien (CFA)

CDI nach Bliss Independence Modell $CDI = (A+B - AxB) / AB$; Werte unter (<) 1 (gestrichelte Linie) sprechen für einen Synergismus, über (>) 1 für einen Antagonismus und 1 für additive Effekte.

In Abbildung 27 sind die CDI-Werte der Kombinationstherapie 5 μ M Curcumin mit 0,01 μ M Selinexor in CFA-Analysen der beiden Zelllinien RD und RH30 dargestellt. In der RD-Zelllinie ist der CDI-Wert mit 1,09 als additiv zu werten, in der RH30-Zelllinie ist er dagegen mit 1,91 als antagonistisch zu sehen.

4 Diskussion

Das Rhabdomyosarkom (RMS) ist das am häufigsten vorkommende Weichteilsarkom bei Kindern. Jahrzehnte klinischer und experimenteller Forschung haben unser Verständnis für die Pathophysiologie des RMS verbessert und geholfen die Behandlung zu optimieren (3). Dennoch bedarf es noch weiterer Therapieoptionen bei der Behandlung von RMS. Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, liegt das Ereignis-freie-Überleben in der Hochrisikogruppe bei den ERMS bei 35 % und bei ARMS bei 15 % - dies gilt es zu erhöhen. Ebenso haben die derzeitigen Therapieverfahren beeinträchtigende Nebenwirkungen wie Übelkeit, Gewichtsverlust und hämatologische Toxizität (68, 69). Darüber hinaus ist es von enormer Wichtigkeit, gravierende Langzeitfolgen wie zum Beispiel Neuropathie, Kardiomyopathie und Wachstumsverzögerung (70), zu reduzieren. Dies war der Ansatz, nach weiteren, gut verträglichen Behandlungsalternativen zu suchen und so die Therapierbarkeit kindlicher RMS noch weiter voranzutreiben.

Für Curcumin konnte in unserer AG bereits eine gute Wirksamkeit, nicht nur beim kindlichen HCC *in vitro* und *in vivo* (29, 35)), sondern auch bei RMS-Zelllinien nachgewiesen werden (36). Curcumin, ein Naturstoff aus der Wurzel der Pflanze *Curcuma longa*, könnte als „Nutraceutical“ - ein Lebensmittel, dem eine gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben wird, eine wichtige Rolle als Therapeutikum darstellen (71, 72). In ausgedehnten vorklinischen Studien über die letzten drei Jahrzehnte ließ sich das therapeutische Potenzial von Curcumin gegen eine große Anzahl von Krankheiten wie neurodegenerative Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson), Lebererkrankungen (alkoholische und nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, Leberfibrose), kardiovaskuläre Erkrankungen (73), Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Psoriasis und Krebserkrankungen (z. B. Colon-Karzinom, Multiples Myelom, Prostata-Karzinom) aufzeigen (72). Um die Wirkung von Curcumin in kindlichen soliden Tumoren noch besser zu verstehen, wurde eine Proteomics-Analyse durchgeführt. Auf diesem Wege wurden wir auf das unter Curcumin-Behandlung in RH30-Zellen vermindert exprimierte XPO1-Protein aufmerksam. Das Exportprotein XPO1 vermittelt den nukleären Transport von mehreren anti-kanzerogenen Proteinen aus dem Zellkern ins Zytosol, die unter

anderem für die Regulierung des Zellwachstums essenziell sind (74). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist das XPO1-Protein in den RMS-Zelllinien in seiner Expression gegenüber gesunden Skelettmuskelzellen (SKMC) erhöht. Mehrere Publikationen stärken dieses Ergebnis, dass in Tumoren XPO1 hochreguliert wird (41, 75). Dabei beschreiben Garg et al. und Azmi et al., dass XPO1 an der nukleären Membran lokalisiert ist, wie Garg et al. durch Immunfluoreszenz-Aufnahmen bei Liposarkom-Zellen auch zeigen konnten (41, 42).

Somit stellt das nukleäre Transportprotein XPO1, welches vermehrt in Malignomen, vor allem auch in Weichteilsarkomen exprimiert wird, einen neuen, vielversprechenden Angriffspunkt für neue Therapien dar. Der selektive XPO1-Inhibitor Selinexor zeigt demgemäß vielversprechende Ergebnisse bei verschiedenen fortgeschrittenen Tumoren, wie beim Multiplem Myelom, Ovarial- und Mamma-Karzinom (44, 47)- bisher allerdings vorwiegend bei Erwachsenen. Selinexor befindet sich aktuell unter bisher geringen Nebenwirkungen in der klinischen Phase II beim Multiplem Myelom bei Erwachsenen (44).

Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurde die Wirkung von Curcumin und Selinexor auf das XPO1-Protein untersucht.

Ziele der vorliegenden Dissertationsschrift sind es, neue Erkenntnisse über die *in vitro* Wirkung des selektiven Inhibitors Selinexor alleine und in Kombination mit dem Naturstoff Curcumin im kindlichen Rhabdomyosarkom zu gewinnen und daraus neue Therapiemöglichkeiten hinsichtlich der Interaktion zwischen Selinexor, Curcumin, dem Exportprotein XPO1 und den Tumorzellen zu entwickeln.

4.1 Zytotoxische Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie in RMS-Zelllinien

In mehreren Studien konnte eine Reduktion der Zellviabilität mit Selinexor in verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel dem Hepatoblastom oder Ewing-Sarkom nachgewiesen werden (35, 75). Zur Beurteilung des zytotoxischen Potenzials von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie wurden MTT-Analysen mit behandelten Zellen durchgeführt und es wurde untersucht, wie sich eine Einzel- und Kombinationstherapie beider Substanzen auf die Zellviabilität

in RMS-Zelllinien auswirkt. Unter Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Curcumin ließ sich ab 10 μM eine signifikante Abnahme der Zellviabilität bei den RMS-Zelllinien RD und RH30 beobachten. Dies unterstützt vorangegangene Untersuchungen an Hepatoblastom-Zelllinien unserer Arbeitsgruppe bei denen es zur Abnahme der Zellviabilität unter Curcumin-Behandlung gekommen ist (IC₅₀ 34,8 μM , 72 h) (29, 35). Ebenso beschreiben Niu et al. einen zytotoxischen Effekt unter Curcumin-Behandlung von HeLa-Zellen (IC₅₀ 32,4 μM , 72 h) (34). Xu et al. konnten auch bei der ARMS-Zelllinie RH30 ab 10 μM Curcumin hemmende Effekte auf die Apoptose feststellen (73). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Curcumin eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen hat und es wurden weitere Untersuchungen gemacht um dies erhärten zu können.

Neben der Einzelbehandlung mit Curcumin, wurde auch eine Einzelbehandlung mit Selinexor durchgeführt. Studien haben gezeigt, dass Selinexor ein selektiver XPO1-Inhibitor ist (48). Ebenso zeigten vorklinische Studien eine dosisabhängige Zytotoxizität von Selinexor in verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (67). Dies konnte auch bei den Untersuchungen zum RMS in dieser Dissertation beobachtet werden. Es kommt bei beiden RMS-Zelllinien (RD und RH30) zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität unter steigenden Selinexor-Konzentrationen. Bei Attiyeh et al. zeigte Selinexor in *in vitro*-Untersuchungen einen deutlichen zytotoxischen Effekt mit medianen IC₅₀-Werten von 0,12 μM . Hierbei wiesen die RH30-Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber Selinexor im Vergleich zu den RD-Zellen auf (76). In den Ergebnissen dieser Arbeit liegt die IC₅₀ bei der RH30-Zelllinie bei 0,07 μM und bei der RD-Zelllinie bei 0,08 μM , was ebenso für eine höhere Sensitivität der RH30-Zellen gegenüber Selinexor sprechen könnte, aber nicht signifikant ist. Auch bei verschiedenen Tumorzelllinien von Ewing-Sarkomen zeigt sich eine Abnahme der Zellviabilität unter der Selinexor-Behandlung. Die mediane IC₅₀ liegt hier wie von Sun et al. beschrieben bei 0,4 μM (75). In Zusammenschau zeigt sich ein eindeutiges zytotoxisches Potential von Selinexor auf verschiedene Sarkom-Zelllinien.

Für die Kombinationstherapie wurden drei Konzentrationen von Selinexor und von Curcumin ausgewählt. Unter der Kombinationstherapie war eine signifikante Abnahme der Zellviabilität in beiden RMS-Zelllinien zu sehen. Azmi et al.

beschreiben, dass SINE, z.B. Selinexor, mit Chemotherapeutika (wie zum Beispiel Cyclophosphamid und Vincristin), aber auch mit Prednison/Dexamethason synergistisch wirken in verschiedenen Tumoren wie Non-Hodgkin-Lymphom und Leukämien (42). Xu et al. beschreiben, dass Curcumin zusammen mit Chemotherapeutika einen synergistischen Effekt aufweist, und dadurch die Krebsbehandlung verbessert zum Beispiel beim kolorektalen Karzinom (73).

Auch in unseren Versuchen zeigte sich in beiden Zelllinien ein synergistischer Effekt unter Kombinationstherapie von Curcumin mit allen drei Selinexor-Konzentrationen mit CDI-Werten unter 1 (Abb. 11).

Im Weiteren haben Sun et al. an gesunden CD34-Zellen das therapeutische Fenster von Selinexor mittels MTT-Assay bestimmt. Mit einer IC₅₀ von 9,4 µM zeigt sich ein großes therapeutisches Fenster von Selinexor (75), was für den weiteren Einsatz als Chemotherapeutikum von größerer Bedeutung sein könnte. Auch wir konnten in unseren Untersuchungen keinen negativen Einfluss von Selinexor auf gesunde Skelettmuskelzellen sehen, so dass eine Schädigung benachbarter Organstrukturen durch die Therapie unwahrscheinlich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ausgewählten Substanzen Selinexor und Curcumin sowohl einzeln als auch in Kombination signifikante Effekte auf die Zellviabilität von RMS-Zellen aufweisen. So kam es in beiden Zelllinien (RD und RH30) zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität unter Einzelbehandlung mit Curcumin und Selinexor. Bei weiteren Untersuchungen wurden die CDI-Werte der Kombinationstherapie berechnet, die auf einen synergistischen Effekt der beiden Substanzen auf die RMS-Zellen deuten. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien feststellen, so dass die Therapie sowohl auf ARMS (RH30) als auch auf ERMS (RD) zu wirken scheint. Weiterführend wurden nun auf Proteinebene mögliche Wirkungsmechanismen analysiert.

4.2 Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Expression von XPO1 und die Zielgene p53 und Cyclin D1

Ausgehend von der Expressionsanalyse, die eine deutlich erhöhte Expression von XPO1 in RMS-Zelllinien (RD, RH30, RUCH3, SRH) gegenüber Zellen gesunder Skelettmuskulatur (SKMC) zeigt, wurde die Wirkung von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die XPO1-Expression untersucht.

In den Western Blot Analysen zeigt sich, dass eine Behandlung mit Curcumin keinen signifikanten Einfluss auf die XPO1-Expression hat. Niu et al. gehen davon aus, dass XPO1 ein Target von Curcumin sein könnte, welches in seiner Funktion inhibiert, jedoch nicht in seiner Expression reduziert wird (34). Die entscheidende chemisch-strukturelle Eigenschaft von Curcumin ist der α , β -ungesättigte Kohlenstoffrest, der als Michael-Akzeptor funktioniert (77) und mit einem nucleophilen Angriff zugänglich für den Cys528-Aminosäurerest von XPO1 ist (34). Niu et al. sind der Annahme, dass XPO1 über den Cys528-Rest kovalent an Curcumin gebunden ist und dadurch seine Funktion verliert (34). Ebenso haben Niu et al. herausgefunden, dass abhängig von der Curcumindosis eine deutliche und schnelle Verschiebung von Ran-BP1 vom Zytoplasma in den Zellkern beobachtet werden konnte (34). Ran BP1 ist ein Ran-bindendes Protein, welches ein nukleäres Exportsignal (NES) enthält und einen anerkannten Biomarker für die XPO1-Inhibition darstellt (34). In weiteren Analysen sollte daher zukünftig untersucht werden, ob in RMS-Zelllinien XPO1 nach einer Behandlung mit Curcumin vermehrt im Nukleus oder im Zytoplasma zu finden ist.

Azmi et al. beschreiben, dass Selinexor kovalent über den Cys528-Rest an XPO1 bindet, machen aber keine Aussage zu einer möglichen XPO1-Expressionszu- oder -abnahme (42, 44). In unseren Untersuchungen kommt es unter Selinexor-Behandlung zu einer Abnahme der XPO1-Expression.

Und auch unter Kombinationstherapie mit Selinexor und Curcumin zeigt sich eine signifikante Reduktion der XPO1-Expression. Unter diesen Aspekten sollte differenziert werden, inwieweit Selinexor und Curcumin um die Cys528-Stelle konkurrieren, synergistisch zusammenarbeiten oder die signifikante Expressionsminderung vielleicht auch alleine durch die Wirkung von Selinexor

bedingt ist. In Berechnungen ergaben sich CDI-Werte für die RD-Zelllinie unter 1, die für einen Synergismus beider Substanzen sprechen. Der hohe CDI-Wert bei der 0,05 µM Selinexor-Konzentration in den RD-Zellen wurde von uns als Ausreißer interpretiert bei einem fehleranfälligen Versuchsaufbau (Western Blot-Pipettierfehler, Limitation der verwendeten CDI-Formel). In der RH30-Zelllinie liegt der CDI-Wert bei 1, was einem additiven Effekt der beiden Substanzen entspricht und demnach einer anderen Wirkweise auf die RH30-Zellen im Vergleich zu den RD-Zellen.

In Zusammenschau der erhobenen Daten werfen der Mechanismus und die Wirkung von Curcumin und Selinexor auf den XPO1-Rezeptor noch viele Fragen auf, die wir mit unseren Untersuchungen weiter versuchen wollen zu beantworten. Es wurde die Expression der Proteine Cyclin D1 und p53 unter Behandlung mit Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie untersucht, um eine möglicherweise additive oder synergistische Wirkung der Substanzen nachweisen zu können.

Aggarwal et al. untersuchten das Potenzial von Curcumin gegenüber Tumorzellen und beschreiben, dass eine Hemmung der Proliferation von Prostata-, Brust- und Multiple Myelom-Krebszellen durch Curcumin mit einer verminderten Cyclin D1-Expression auf Proteinebene korreliert (30). Nach Untersuchungen von He et al., könnte die Abnahme der Cyclin D1-Expression durch Curcumin auch unabhängig von XPO1 erfolgen (32). In unseren Ergebnissen zeigt sich unter alleiniger Curcumin- und Selinexor-Behandlung eine signifikante Abnahme der Cyclin D1-Expression. Im Weiteren muss untersucht werden, ob dies XPO1-abhängig ist oder nicht.

Hosseini et al. untersuchten die Wirkung von Nanomizellen-Curcumin und Sorafenib alleine und in Kombination auf die Cyclin D1-Expression in hepatozellulären Karzinomzellen (HUH7-Zelllinie) und fanden heraus, dass im Vergleich zur alleinigen Sorafenib-Behandlung eine Kombination mit Curcumin zur Abnahme der Cyclin D1-Expression führt (78). Dies spiegelt sich zum Teil auch in unseren Untersuchungen wider, in denen eine Kombinationstherapie mit Curcumin und Selinexor einen größeren Effekt auf Cyclin D1 zu haben scheint

als eine Einzeltherapie mit Selinexor. Die Berechnung des CDI ergaben für die beiden RMS-Zelllinien verschiedene Werte, in der RD-Zelllinie zeigte sich ein eher synergistischer Effekt, während sich in der RH30-Zelllinie ein additives Wirken abzeichnete. Aufgrund der in dieser Versuchsreihe sehr hohen Standardabweichungen ist der CDI neben allen seinen Einschränkungen (s.u.) an dieser Stelle möglicherweise nicht valide. Sinnvolle Ergänzungen könnten in weiteren Studien Untersuchungen mit Selinexor und einem Chemotherapeutikum als Kombinationspartner darstellen. Darüber hinaus wäre eine Zellzyklus-Analyse anzustreben, da das Protein Cyclin D1 eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Ist Cyclin D1 überexprimiert führt dies zu einem Verlust der Regulation der Übergangsphase G1 zu S und folglich zu einer schnelleren Tumorprogression (79).

Das TSP p53 ist das am meisten mutierte Gen in menschlichen Krebsarten (53). Durch Verlust seiner Funktion, wie zum Beispiel bei einer Keimbahnmutation beim Li-Fraumeni-Syndrom kommt es zu einer vermehrten Karzinombildung (18). In Rezidiven von ERMS kommt es häufig zu p53-Mutationen, was eine wichtige Rolle in der Krankheitsdynamik und Therapierbarkeit spielt, da RMS mit p53-Mutation eine schlechtere Prognose haben als solche ohne diese Mutation (80). In Kolonkarzinomzellen induziert Curcumin p53, was zu Apoptose führen könnte (30). Auch in HeLa-Zellen konnte eine Zunahme der p53-Expression unter singulärer Curcuminbehandlung beobachtet werden. Dies unterstützt auch die Hypothese, dass Curcumin ein Inhibitor von XPO1 ist (34). In unseren Untersuchungen zeigt sich eine signifikante Abnahme der p53-Expression in den RMS-Zelllinien RH30 und RD unter Curcumin-Behandlung, was sich mit den Beobachtungen anderer Autoren deckt (32). Unter Kombinationstherapie mit Selinexor und Curcumin gibt es zwar weiterhin einen Trend zu verminderten p53-Expressionen, dieser ist jedoch nicht mehr signifikant. Dies erklärt sich durch die in unseren Ergebnissen gezeigte vermehrte Expression von p53 unter singulärer Selinexor-Behandlung, allerdings haben wir in unseren Untersuchungen nicht unterschieden, ob die Akkumulation im Zellkern oder im Zytoplasma stattfindet, da wir die gesamte Zelle untersucht haben. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Liposarkomzelllinien beschrieben, in denen es unter Selinexorbehandlung zu

einer Zunahme der p53-Expression kam (40). Eine nukleäre Akkumulation von dem XPO1-Transport- und Tumorsuppressorprotein p53 nach Behandlung mit Selinexor beschreiben Barouch et al. in klinischen, pharmadynamischen Analysen bei dem diffus großzelligen B-Zelllymphom (67).

Des Weiteren haben Attiyeh et al. in ihren Untersuchungen mittels des Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP) herausgefunden, dass eine nukleäre Akkumulation von p53 nur in bestimmten Zellarten des Programms ein pharmakodynamischer Marker für eine XPO1-Inhibition ist. Darunter war unter anderem die RMS-Zelllinie RH30. Vergleichbare Untersuchungen an RD-Zelllinien stehen noch aus. Das PPTP ist eine Initiative des National Cancer Institute, um neuartige Therapieansätze in Malignomen der Kindheit zu testen.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass, wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, Selinexor in allen *in vitro*-Untersuchungen einen deutlichen zytotoxischen Effekt, unabhängig vom Mutationsstatus von p53, aufweist (76).

Es lässt sich in Anbetracht der inhomogenen Ergebnisse unter Curcumin-, Selinexor- und der Kombinationstherapie zusammenfassen, dass in den RMS-Zelllinien RD und RH30 eine Behandlung mit Selinexor zu einer Expressionszunahme von p53 führt. Eine Kombinationstherapie von Selinexor mit Curcumin führt zu einer Abnahme der Cyclin-D1-Expression, ebenso wie eine alleinige Curcumin-Behandlung. Hinsichtlich der Kombinationstherapie ließen sich für Cyclin D1 und p53 durch Berechnungen mit CDI-Werten unter 1 in der RD-Zelllinie synergistische Effekte der beiden Substanzen aufzeigen. In der RH30-Zelllinie zeigten sich mit Werten über 1 Hinweise auf ein antagonistisches Verhalten bei Cyclin D1, bei p53 ergaben sich für die niedrigen Konzentrationen Hinweise für eine additive Wirkweise der Substanzen, während sich bei der Selinexorkonzentration von 0,1 μM ein Wert von unter 1 zeigte (synergistischer Effekt) (siehe Abbildungen 16, 22, 24).

In Zusammenschau der von uns erhobenen Daten und zitierten Arbeiten anderer Autoren gehen wir davon aus, dass Selinexor auch in kindlichen RMS ein spezifischer Inhibitor von XPO1 ist, da es zu einer Zunahme der p53-Expression unter Selinexorbehandlung kommt und dies für die RH30-Zelllinie in den

Untersuchungen von Attiyeh et al. einen pharmadynamischen Marker darstellt (76). Hinsichtlich der Wirkweise der Kombinationstherapie zeigten sich deutliche Unterschiede in beiden Zelllinien, welche neben natürlichen Fehlerquellen, mutationsbedingt oder auch konzentrationsabhängig zu sehen sind. Um dies genauer beurteilen zu können bedarf es weiterer Untersuchungen (s.u.).

4.3 Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf die Reproduktionsfähigkeit in Rhabdomyosarkomzelllinien

Im Weiteren wurde das Verhalten zur Koloniebildung von RMS-Zelllinien untersucht. Hier zeigte sich, dass vor allem die Behandlung mit Curcumin einen hemmenden Einfluss auf zelluläre Prozesse der Tumorzellen hat, den klonogenen Zelltod induziert und somit einen negativen Effekt auf die Reproduktionsfähigkeit aufweist. Es kann davon ausgegangen werden, dass Curcumin das Überleben von Zellklonen und somit neuen Tumorzellen reduziert. Selinexor zeigt in der für die Kombinationstherapie gewählten Konzentration von 0,01 μM keine signifikanten Effekte, jedoch konnten in weiterführenden Untersuchungen signifikante Ergebnisse ab einer Konzentration von 0,02 μM (RH30) bzw. 0,04 μM (RD) erhoben werden. Positive Effekte von Selinexor auf die Metastasierung wurden auch von anderen Autoren mittels CFU-Assay (Colony-forming Unit-Assay) nachgewiesen, bei denen sich eine Inhibition des klonogenen Wachstums bei Ewing-Sarkomzellen unter Selinexorbehandlung mit 0,1-0,2 μM zeigte (75).

Ebenso ließ sich eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Anzahl neuer Kolonien verzeichnen, so dass Curcumin und Selinexor zelluläre Prozesse zu stören scheinen, die für die Zellteilung und das Überleben der Zellen essentiell sind. Möglicherweise hat dies auch Auswirkungen auf eine Metastasierung, welche vor allem bei den ARMS ein limitierender Faktor für Therapieoptionen und mit einem deutlich schlechteren Überleben assoziiert ist (1, 6, 14). Hinsichtlich der Kombinationstherapie zeigten sich CDI-Werte von 1,09 in der RD-Zelllinie, welche wir als additiven Effekt der Substanzen werten und 1,91 in der RH30-Zelllinie, die auf antagonistische Effekte beider Substanzen schließen lässt bzw. auf eine alleinige Wirkung von Selinexor (siehe Abb. 27).

Zusammenfassend ist dies ein vielversprechendes Ergebnis für die mögliche Verwendung von Selinexor als Therapieoptionen bei metastasierten RMS-Tumoren möglicherweise auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika.

4.4 Limitationen/Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* – Wirkung von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf RMS-Zellen untersucht. Der Vorteil von *in vitro* - Versuchen besteht darin, unter kontrollierten Bedingungen und Eliminierung möglicher Störfaktoren (die ein lebender Organismus mit sich bringt, wie z.B. Stoffwechselfvorgänge, genetische Disposition) die Auswirkungen der oben genannten Substanzen auf Tumorzellen zu untersuchen. Allerdings ist diese isolierte Betrachtung der Auswirkungen in Tumorzellen nicht ausreichend, um eine Aussage über die Effekte der Therapie in Patienten zu machen. Es gilt zu überprüfen, ob sich die *in vitro* -Ergebnisse auch *in vivo* reproduzieren lassen und es bedarf weiterer Untersuchungen, beispielsweise im Maus-Modell, um Selinexor und Curcumin als mögliche Therapieoption bei kindlichen RMS in Zukunft besser einordnen zu können.

Die stark variierenden Ergebnisse lassen sich unter anderem auf die chemische Instabilität von Curcumin und die Tatsache, dass Curcumin ein Naturstoff ist zurückführen (39). Nelson et al. fassen zusammen, dass keine Verabreichungsform von Curcumin Eigenschaften besitzt, die ein gutes Medikament ausmacht, wie chemische Stabilität, hohe Wasserlöslichkeit, gute Bioverfügbarkeit oder ein stabiler Metabolismus. Sie schließen die Möglichkeit jedoch nicht aus, dass möglicherweise ein bestimmtes Extrakt aus unverarbeitetem, reinem Curcumin nützliche Effekte auf die menschliche Gesundheit hat. Die umfangreiche Restkomplexität (residual complexity- RC) von Naturstoffextrakten und von Naturstoffaufbereitungen machen die Identifikation aktiver Bestandteile und deren Einfluss auf den menschlichen Organismus sehr schwer (26). Kasi et al. fassen die Effekte der Curcuminwirkung gegen Tumoren als multi-zielgerichtet zusammen und sehen in Curcumin ein Nahrungsergänzungsmittel in der Behandlung von verschiedenen Malignomen (37). Und auch Aggarwal et al. weisen auf die Rolle von Gewürzen wie Curcumin in verschiedenen Phasen der Tumorgenese hin, sowohl hinsichtlich einer

präventiven als auch therapeutischen Verwendung (71). In den Untersuchungen von Kharat et al. zeigt sich, dass durch Antioxidantien wie Ascorbinsäure eine signifikant höhere Bioverfügbarkeit und erhöhte chemische Stabilität von Curcumin in einer Öl-in-Wasser-Nanoemulsion erreicht werden kann. Dies könnte in Zukunft hilfreich sein für die Entwicklung Emulsions-basierter Transportsysteme für Curcumin in Nahrungsergänzungsmitteln oder pharmazeutischen Produkten (39).

In Anbetracht der Ergebnisse von Azmi et al. und Xu et al. und auch unseren Ergebnissen mit Curcumin wäre eine Kombination mit einem Chemotherapeutikum und Selinexor durchaus ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Dem gegenüber steht der selektive XPO1-Inhibitor Selinexor. Das Medikament erhielt eine Zulassung in den USA im Juli 2019 für die Behandlung erwachsener Patienten mit fortgeschrittenem oder therapierefraktärem Multiplen Myelom in Kombination mit Dexamethason (47). Nebenwirkungsprofil und Verträglichkeit (47, 48) sind bisher vielversprechend für weitere Einsatzgebiete von Selinexor. Auch Attiyeh et al. erzielten bei *in vivo* Untersuchungen mit einer Behandlung von 10 mg/kg Selinexor dreimal wöchentlich eine breite Hemmung des Tumorwachstums verschiedener pädiatrischer solider Tumore (u.a. Wilms-Tumor, Ewing-Sarkom, Rhabdomyosarkom) mit moderatem Nebenwirkungsprofil (76).

Des Weiteren gilt es zu erwähnen, dass der von uns verwendete Cyclin D1-Antikörper in Western Blot-Analysen sehr anspruchsvoll in der Verarbeitung und störanfällig ist (wie z. Bsp. Pipettierfehler, Temperaturunterschiede).

Ebenso stellt der von uns verwendete CDI ein Hilfsinstrument dar zur Beurteilung von Kombinationstherapien (vgl. Foucquier et al. (65)), hier gilt es zu beachten, dass in der Auswertung und Interpretation von Effekten von Kombinationstherapien die Qualität der erhobenen Daten ein Problem darstellen kann. Biologische Systeme tragen Fehlerquellen mit sich und demnach ist es fast unmöglich Grenzwerte richtig einzuordnen. Kombinations-Indices wie der CDI, die von Modellen wie dem Bliss Independence Modell herrühren, sind meistens

ohne Miteinberechnung der Qualität der Ausgangswerte des Experiments. Diese Annäherungen lassen somit keine direkten statistischen Schlussfolgerungen zu (65) und stellen nur einen orientierenden Wert dar.

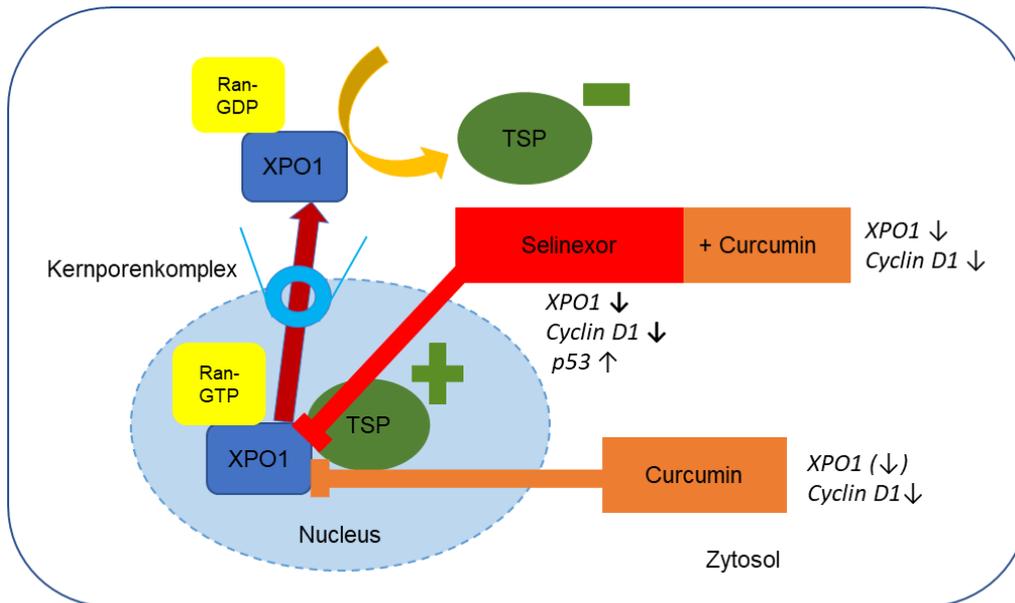
Abschließend stellt sich die Frage, ob Selinexor in Zukunft eine Rolle in der Behandlung pädiatrisch solider Tumoren, insbesondere des Rhabdomyosarkoms spielen könnte und inwiefern Curcumin unterstützend als Therapieoption eine Verwendung finden kann.

5 Zusammenfassung

Curcumin findet seit Jahrhunderten Verwendung in der indischen Küche und ayurvedischen Medizin und hat mit seinen antientzündlichen, antioxidativen und antitumorösen Eigenschaften einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Menschen (39). Im Gegensatz dazu ist Selinexor ein neues Medikament, das als spezifischer Inhibitor des Exportproteins XPO1 fungiert und die ersten klinischen Ergebnisse zeigt (44, 47, 67).

In der vorliegenden Dissertation wurde mit dem Naturstoff Curcumin und dem selektiven XPO1-Inhibitor Selinexor gearbeitet und deren Wirkung auf die RMS-Zelllinien RD und RH30 untersucht. Im Zentrum der Versuche stand das Exportprotein XPO1, welches vermehrt bei etlichen Malignomen und, wie nun hier gezeigt auch in Rhabdomyosarkomzellen, exprimiert wird (40, 41). Die bereits bekannte tumorrepressive Wirkung von Curcumin konnte bestätigt werden und auch unter Behandlung mit Selinexor kam es zu positiven Effekten auf die Tumorsuppression.

In Abbildung 28 sind zusammenfassend die Auswirkungen von Selinexor, Curcumin und der Kombinationstherapie auf die Expression von XPO1 und ausgewählte Proteine dargestellt.



Legende:

- ↓ - deutliche Abnahme der Expression
- ↓ - Abnahme der Expression
- (↓) - Tendenz zur Abnahme der Expression
- ↑ - Zunahme der Expression

Abbildung 28: Auswirkungen von Curcumin, Selinexor und der Kombinationstherapie auf XPO1 und die ausgewählten Proteine Cyclin D1 und p53

Die Expression des XPO1-Rezeptors ist sowohl unter alleiniger Selinexor- als auch unter Kombinationstherapie mit Curcumin vermindert. Selinexor verhindert ein Anbinden des Tumorsuppressorproteins (TSP) an den XPO1-Rezeptor. Es kommt zu einer Zunahme der p53-Expression und zu einer Expressionsabnahme von Cyclin D1. Unter der Kombinationstherapie mit Curcumin kommt es zu einer Expressionsabnahme von Cyclin D1, diese fällt bei Einzelbehandlung von Curcumin schwächer aus.

Zusammenfassend zeigen Selinexor und Curcumin deutlich anti-kancerogene Eigenschaften gegenüber RMS-Tumorzellen auf. Sowohl unter Einzel- als auch Kombinationstherapie kommt es zu einer Abnahme der Zellviabilität in den ausgewählten RMS-Zelllinien. Die XPO1-Expression nimmt unter alleiniger Selinexorbehandlung und Kombinationsbehandlung mit Curcumin ab. Das Tumorsuppressorgen p53 wird unter Selinexor-Therapie in den RMS-Zelllinien RD und RH30 deutlich vermehrt exprimiert. Die Kombinationstherapie mit Selinexor und Curcumin führt bei dem Zellzyklusprotein Cyclin D1 zu einer Expressionsabnahme. Es lässt sich auch ein hemmender Einfluss auf die Metastasierung der RMS-Zelllinien unter Curcumin-, Selinexor- und der Kombinationsbehandlung verzeichnen.

Hinsichtlich der aktuellen Datenlage, einschließlich der von uns neu erhobenen Erkenntnisse dieser Dissertationsschrift, zeigt sich der selektive XPO1-Inhibitor Selinexor, als Medikament mit deutlich tumorsuppressiven Eigenschaften. Es bedarf noch weiterer *in vitro* und *in vivo* Studien, um die Wirkweise von Selinexor und Curcumin auf die Tumorzellen besser zu verstehen und deren Auswirkungen richtig einordnen zu können. Schon jetzt drängt sich die Frage auf, inwieweit Selinexor und Curcumin als Therapieoption in der Behandlung von kindlichen RMS in Zukunft eine Rolle spielen könnten.

6 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Dziuba I, Kurzawa P, Dopierala M, Larque AB, Januszkiewicz-Lewandowska D. Rhabdomyosarcoma in children - current pathologic and molecular classification. *Pol J Pathol.* 2018;69(1):20-32.
2. Dasgupta R, Fuchs J, Rodeberg D. Rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg.* 2016;25(5):276-83.
3. Skapek SX, Ferrari A, Gupta AA, Lupo PJ, Butler E, Shipley J, et al. Rhabdomyosarcoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):1.
4. Koscielniak E. ; Klingebiel T. S1-Leitlinie Weichteilsarkome Stand: März 2017 AWMF-Register Nr. 025/0077777: AWMF online 2017 [updated 03/2017. Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-007I_S1_Weichteilsarkome_2017-03.pdf.
5. Mertens F, Antonescu CR, Hohenberger P, Ladanyi M, Modena P, D'Incalci M, et al. Translocation-related sarcomas. *Semin Oncol.* 2009;36(4):312-23.
6. Gurria JP, Dasgupta R. Rhabdomyosarcoma and Extrasosseous Ewing Sarcoma. *Children (Basel).* 2018;5(12).
7. Hinson AR, Jones R, Crose LE, Belyea BC, Barr FG, Linardic CM. Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol.* 2013;3:183.
8. Mai PL, Malkin D, Garber JE, Schiffman JD, Weitzel JN, Strong LC, et al. Li-Fraumeni syndrome: report of a clinical research workshop and creation of a research consortium. *Cancer Genet.* 2012;205(10):479-87.
9. Farschtschi S, Mautner VF, McLean ACL, Schulz A, Friedrich RE, Rosahl SK. The Neurofibromatoses. *Dtsch Arztebl Int.* 2020;117(20):354-60.
10. Brioude F, Kalish JM, Mussa A, Foster AC, Bliik J, Ferrero GB, et al. Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(4):229-49.
11. Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, Lynch JC, Qualman SJ, Shimada H, et al. Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol.* 2009;174(2):550-64.
12. Anderson J, Gordon A, McManus A, Shipley J, Pritchard-Jones K. Disruption of imprinted genes at chromosome region 11p15.5 in paediatric rhabdomyosarcoma. *Neoplasia.* 1999;1(4):340-8.
13. Parham DM, Qualman SJ, Teot L, Barr FG, Morotti R, Sorensen PH, et al. Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(6):895-901.
14. van Erp AEM, Versleijen-Jonkers YMH, van der Graaf WTA, Fleuren EDG. Targeted Therapy-based Combination Treatment in Rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(7):1365-80.
15. Hibbitts E, Chi YY, Hawkins DS, Barr FG, Bradley JA, Dasgupta R, et al. Refinement of risk stratification for childhood rhabdomyosarcoma using FOXO1 fusion status in addition to established clinical outcome predictors: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Med.* 2019;8(14):6437-48.

16. Rhee DS, Rodeberg DA, Baertschiger RM, Aldrink JH, Lautz TB, Grant C, et al. Update on pediatric rhabdomyosarcoma: A report from the APSA Cancer Committee. *J Pediatr Surg.* 2020;55(10):1987-95.
17. Walther C, Mayrhofer M, Nilsson J, Hofvander J, Jonson T, Mandahl N, et al. Genetic heterogeneity in rhabdomyosarcoma revealed by SNP array analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55(1):3-15.
18. Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist.* 1999;4(1):34-44.
19. Hayes-Jordan A, Andrassy R. Rhabdomyosarcoma in children. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21(3):373-8.
20. Maria Yiallouros DmSK. Weichteilsarkome und seltene Weichteiltumoren (Kurzinformation) 2009 [updated 2020. Available from: https://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e9031/e10591/e77084/e66699/e66835/WTS_Kurzinfo09022020_ger.pdf.
21. Seitz G, Fuchs J, Konigsrainer I, Warmann SW, Konigsrainer A, Beckert S. [Cytoreductive surgery and HIPEC for peritoneal malignancies in children]. *Zentralbl Chir.* 2014;139(6):607-12.
22. Gesche J, Beckert S, Neunhoeffler F, Kachanov D, Konigsrainer A, Seitz G, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: A safe treatment option for intraperitoneal rhabdomyosarcoma in children below 5 years of age. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(2):e27517.
23. Alexander TB, Lacayo NJ, Choi JK, Ribeiro RC, Pui CH, Rubnitz JE. Phase I Study of Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export, in Combination With Fludarabine and Cytarabine, in Pediatric Relapsed or Refractory Acute Leukemia. *J Clin Oncol.* 2016;34(34):4094-101.
24. Bisogno G, De Salvo GL, Bergeron C, Gallego Melcon S, Merks JH, Kelsey A, et al. Vinorelbine and continuous low-dose cyclophosphamide as maintenance chemotherapy in patients with high-risk rhabdomyosarcoma (RMS 2005): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(11):1566-75.
25. Singh M, Alavi A, Wong R, Akita S. Radiodermatitis: A Review of Our Current Understanding. *Am J Clin Dermatol.* 2016;17(3):277-92.
26. Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, Graham J, Pauli GF, Walters MA. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem.* 2017;60(5):1620-37.
27. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat.* 2014;46(1):2-18.
28. Vallee A, Lecarpentier Y, Vallee JN. Curcumin: a therapeutic strategy in cancers by inhibiting the canonical WNT/beta-catenin pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):323.
29. Ellerkamp V, Bortel N, Schmid E, Kirchner B, Armeanu-Ebinger S, Fuchs J. Photodynamic Therapy Potentiates the Effects of Curcumin on Pediatric Epithelial Liver Tumor Cells. *Anticancer Res.* 2016;36(7):3363-72.
30. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):363-98.
31. Liou AT, Chen MF, Yang CW. Curcumin Induces p53-Null Hepatoma Cell Line Hep3B Apoptosis through the AKT-PTEN-FOXO4 Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:4063865.
32. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules.* 2015;20(5):9183-213.

33. Dai C, Zhang X, Zhang K. New Discovery of Curcumin Combination Therapy and Action Mechanism. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:4793058.
34. Niu M, Wu S, Mao L, Yang Y. CRM1 is a cellular target of curcumin: new insights for the myriad of biological effects of an ancient spice. *Traffic.* 2013;14(10):1042-52.
35. Bortel N, Armeanu-Ebinger S, Schmid E, Kirchner B, Frank J, Kocher A, et al. Effects of curcumin in pediatric epithelial liver tumors: inhibition of tumor growth and alpha-fetoprotein in vitro and in vivo involving the NFkappaB- and the beta-catenin pathways. *Oncotarget.* 2015;6(38):40680-91.
36. Sorg C, Schmid E, Bortel N, Fuchs J, Ellerkamp V. Antitumor effects of curcumin in pediatric rhabdomyosarcoma in combination with chemotherapy and phototherapy in vitro. *Int J Oncol.* 2021;58(2):266-74.
37. Kasi PD, Tamilselvam R, Skalicka-Wozniak K, Nabavi SF, Daglia M, Bishayee A, et al. Molecular targets of curcumin for cancer therapy: an updated review. *Tumour Biol.* 2016;37(10):13017-28.
38. Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D, et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target.* 2016;24(8):694-702.
39. Kharat M, Skrzynski M, Decker EA, McClements DJ. Enhancement of chemical stability of curcumin-enriched oil-in-water emulsions: Impact of antioxidant type and concentration. *Food Chem.* 2020;320:126653.
40. Nakayama R, Zhang YX, Czaplinski JT, Anatone AJ, Sicinska ET, Fletcher JA, et al. Preclinical activity of selinexor, an inhibitor of XPO1, in sarcoma. *Oncotarget.* 2016;7(13):16581-92.
41. Garg M, Kanojia D, Mayakonda A, Said JW, Doan NB, Chien W, et al. Molecular mechanism and therapeutic implications of selinexor (KPT-330) in liposarcoma. *Oncotarget.* 2017;8(5):7521-32.
42. Azmi AS, Mohammad RM. Targeting Cancer at the Nuclear Pore. *J Clin Oncol.* 2016;34(34):4180-2.
43. Conforti F, Zhang X, Rao G, De Pas T, Yonemori Y, Rodriguez JA, et al. Therapeutic Effects of XPO1 Inhibition in Thymic Epithelial Tumors. *Cancer Res.* 2017;77(20):5614-27.
44. Abdul Razak AR, Mau-Soerensen M, Gabrail NY, Gerecitano JF, Shields AF, Unger TJ, et al. First-in-Class, First-in-Human Phase I Study of Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export, in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol.* 2016;34(34):4142-50.
45. Chen Y, Camacho SC, Silvers TR, Razak AR, Gabrail NY, Gerecitano JF, et al. Inhibition of the Nuclear Export Receptor XPO1 as a Therapeutic Target for Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(6):1552-63.
46. Nair JS, Musi E, Schwartz GK. Selinexor (KPT-330) Induces Tumor Suppression through Nuclear Sequestration of IkappaB and Downregulation of Survivin. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4301-11.
47. Syed YY. Selinexor: First Global Approval. *Drugs.* 2019;79(13):1485-94.
48. Gounder MM, Zer A, Tap WD, Salah S, Dickson MA, Gupta AA, et al. Phase IB Study of Selinexor, a First-in-Class Inhibitor of Nuclear Export, in Patients With Advanced Refractory Bone or Soft Tissue Sarcoma. *J Clin Oncol.* 2016;34(26):3166-74.
49. Baek HB, Lombard AP, Libertini SJ, Fernandez-Rubio A, Vinall R, Gandour-Edwards R, et al. XPO1 inhibition by selinexor induces potent cytotoxicity against high grade bladder malignancies. *Oncotarget.* 2018;9(77):34567-81.
50. Lupo PJ, Danysh HE, Plon SE, Curtin K, Malkin D, Hettmer S, et al. Family history of cancer and childhood rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group and the Utah Population Database. *Cancer Med.* 2015;4(5):781-90.

51. Hettmer S, Li Z, Billin AN, Barr FG, Cornelison DD, Ehrlich AR, et al. Rhabdomyosarcoma: current challenges and their implications for developing therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(11):a025650.
52. Douglass EC, Valentine M, Etcubanas E, Parham D, Webber BL, Houghton PJ, et al. A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet Cell Genet.* 1987;45(3-4):148-55.
53. Taylor AC, Shu L, Danks MK, Poquette CA, Shetty S, Thayer MJ, et al. P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med Pediatr Oncol.* 2000;35(2):96-103.
54. Gibson AA, Harwood FG, Tillman DM, Houghton JA. Selective sensitization to DNA-damaging agents in a human rhabdomyosarcoma cell line with inducible wild-type p53 overexpression. *Clin Cancer Res.* 1998;4(1):145-52.
55. Schleicher SB, Zaborski JJ, Riester R, Zenkner N, Handgretinger R, Kluba T, et al. Combined application of arsenic trioxide and lithium chloride augments viability reduction and apoptosis induction in human rhabdomyosarcoma cell lines. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178857.
56. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
57. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985;151(2):369-74.
58. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996;236(2):302-8.
59. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
60. Brunelle JL, Green R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol.* 2014;541:151-9.
61. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
62. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986;94(1-2):57-63.
63. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989;119(2):203-10.
64. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315-9.
65. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect.* 2015;3(3):e00149.
66. Mahipal A, Malafa M. Importins and exportins as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther.* 2016;164:135-43.
67. Ben-Barouch S, Kuruvilla J. Selinexor (KTP-330) - a selective inhibitor of nuclear export (SINE): anti-tumor activity in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Expert Opin Investig Drugs.* 2020;29(1):15-21.
68. Mayor S. Side-effects of cancer drugs are under-reported in trials. *Lancet Oncol.* 2015;16(3):e107.
69. Hawkins DS, Chi YY, Anderson JR, Tian J, Arndt CAS, Bomgaars L, et al. Addition of Vincristine and Irinotecan to Vincristine, Dactinomycin, and Cyclophosphamide Does Not Improve Outcome for Intermediate-Risk Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2018;36(27):2770-7.

70. Sparber-Sauer M, Stegmaier S, Vokuhl C, Seitz G, von Kalle T, Scheer M, et al. Rhabdomyosarcoma diagnosed in the first year of life: Localized, metastatic, and relapsed disease. Outcome data from five trials and one registry of the Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS). *Pediatr Blood Cancer*. 2019:e27652.
71. Aggarwal BB, Van Kuiken ME, Iyer LH, Harikumar KB, Sung B. Molecular targets of nutraceuticals derived from dietary spices: potential role in suppression of inflammation and tumorigenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234(8):825-49.
72. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J*. 2013;15(1):195-218.
73. Xu XY, Meng X, Li S, Gan RY, Li Y, Li HB. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives. *Nutrients*. 2018;10(10).
74. Aladhraei M, Al-Salami E, Pongvarin N, Suwannalert P. The roles of p53 and XPO1 on colorectal cancer progression in Yemeni patients. *J Gastrointest Oncol*. 2019;10(3):437-44.
75. Sun H, Lin DC, Cao Q, Guo X, Marijon H, Zhao Z, et al. CRM1 Inhibition Promotes Cytotoxicity in Ewing Sarcoma Cells by Repressing EWS-FLI1-Dependent IGF-1 Signaling. *Cancer Res*. 2016;76(9):2687-97.
76. Attiyeh EF, Maris JM, Lock R, Reynolds CP, Kang MH, Carol H, et al. Pharmacodynamic and genomic markers associated with response to the XPO1/CRM1 inhibitor selinexor (KPT-330): A report from the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(2):276-86.
77. Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev*. 2014;66(1):222-307.
78. Hosseini S, Chamani J, Sinichi M, Bonakdar AM, Azad Z, Ahangari N, et al. The effect of nanomicelle curcumin, sorafenib, and combination of the two on the cyclin D1 gene expression of the hepatocellular carcinoma cell line (HUH7). *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22(10):1198-202.
79. Magro G, Brancato F, Musumeci G, Alaggio R, Parenti R, Salvatorelli L. Cyclin D1 is a useful marker for soft tissue Ewing's sarcoma/peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor in children and adolescents: A comparative immunohistochemical study with rhabdomyosarcoma. *Acta Histochem*. 2015;117(4-5):460-7.
80. Ignatius MS, Hayes MN, Moore FE, Tang Q, Garcia SP, Blackburn PR, et al. tp53 deficiency causes a wide tumor spectrum and increases embryonal rhabdomyosarcoma metastasis in zebrafish. *Elife*. 2018;7.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie unter Betreuung von Fr. Dr. rer. nat. Evi Schmid (Laborleiterin) und Fr. PD Dr. med. Verena Ellerkamp durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte gemeinsam mit Fr. PD Dr. med. Verena Ellerkamp und Fr. Dr. rer. nat. Evi Schmid.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Melanie Hauth (MTA) und Fr. Dr. rer. nat. 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).

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

Ich versichere, das Manuskript selbständig, nach Anleitung durch Fr. Dr. rer. nat. Evi Schmid und Fr. PD Dr. med. Verena Ellerkamp, verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.