

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

**„Antikanzerogene Wirkung des Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Inhibitors  
Istaroxim  
am Rhabdomyosarkom und malignen Rhabdoid-Tumor“**

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

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

**vorgelegt von  
Weil, Hannes Edgar  
2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Warmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. E.-M. Grischke

Tag der Disputation: 08.11.2022

Meiner Familie und allen, die mich unterstützt haben.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1. Einleitung .....	1
1.1. Rhabdomyosarkom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie und hereditäre Faktoren .....	2
1.1.3 Klassifikation der Tumorstadien .....	4
1.1.4 Symptomatik .....	4
1.1.5 Diagnostik .....	5
1.1.6 Heutiger Stand der Therapie & Prognose .....	5
1.2 Maligner Rhabdoid-Tumor .....	8
1.2.1 Epidemiologie .....	8
1.2.2 Ätiologie und hereditäre Faktoren .....	9
1.2.3 Klassifikation der Tumorstadien .....	9
1.2.4 Symptomatik .....	10
1.2.5 Diagnostik .....	10
1.2.6 Heutiger Stand der Therapie & Prognose .....	11
1.3 Istaroxim und Zytostatika .....	13
1.3.1 Istaroxim .....	13
1.3.2 Carboplatin .....	15
1.3.3 Doxorubicin .....	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	18
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Materialien .....	19
2.1.1 Verwendete Zelllinien .....	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.3 Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Pharmaka .....	22
2.1.4 Verwendete Antikörper .....	24
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen .....	25
2.1.6 Geräte .....	27
2.1.7 Verwendete Software .....	28

2.1.8 Wirkstoffe und Zytostatika .....	29
2.2 Methoden .....	29
2.2.1 Zellkultur .....	29
2.2.2 Western Blot .....	32
2.2.3 Viabilitäts-Assay .....	36
2.2.4 Wound-Healing-Assay .....	38
2.2.5 Durchflusszytometrie .....	40
2.2.6 Colony-Forming-Assay (CFA) .....	44
2.2.7 Statistische Auswertung .....	45
3. Ergebnisse .....	48
3.1 Expressionsprofil der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase .....	48
3.2 Analysen der Zellviabilität mittels MTT .....	49
3.3 Analyse des Apoptoseverhaltens .....	57
3.4 Einflüsse auf das Migrationsverhalten kindlich solider Tumorzellen .....	61
3.5 Untersuchung des klonogenen Zelltods in RMS- und mRT-Zelllinien nach Behandlung mit Istaroxim .....	65
4. Diskussion .....	68
4.1 Expressionslevel der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase in RMS- und mRT-Zelllinien sowie in der Skelettmuskelzelllinie SkMC .....	69
4.2 Zytotoxische Auswirkungen der Istaroxim- und Istaroxim-Zytostatika-Kombinationsbehandlung .....	69
4.3 Auswirkungen von Istaroxim auf das Migrationsverhalten von RMS und mRT-Zelllinien .....	73
4.4 Auswirkungen auf die Kolonienbildung .....	75
4.5 Klinische Relevanz .....	75
4.6 Limitationen .....	77
4.7 Ausblick .....	78
5. Zusammenfassung .....	80
Literaturverzeichnis .....	82
Eigenanteilserklärung .....	89
Danksagung .....	90

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Schematische Darstellung der potenziellen Lokalisationen eines Rhabdomyosarkom [10] .....	2
Abbildung 2 : Darstellung der chromosomalen Translokationen und der daraus entstehenden Fusionsgene PAX3-FKHR und PAX7-FKHR [16] .....	3
Abbildung 3 : Staging nach der TNM-Klassifikation für Rhabdomyosarkom [15] .....	4
Abbildung 4 : Strukturformel von Istaroxim [65] .....	13
Abbildung 5 : Zielstrukturen von Istaroxim [73] .....	14
Abbildung 6 : Reaktionsablauf zur Überführung von Carboplatin in seine aktive Form [75] ..	16
Abbildung 7 : Strukturformeln der Platin-Verbindungen [76] .....	16
Abbildung 8 : Strukturformeln der Anthrazykline Doxorubicin und Daunorubicin [92] .....	17
Abbildung 9 : RD Zellkultur (36. Passage) bei 5-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop .	19
Abbildung 10 : Rh30 Zellkultur (17. Passage) bei 5-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop .....	20
Abbildung 11 : A204 Zellkultur (25. Passage) bei 5-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop .....	20
Abbildung 12 : Strukturformel des Coomassie-Brillantblau G-250 Farbstoffes [107] .....	33
Abbildung 13 : Aufbau der zusammengesetzten Blottingkassette .....	35
Abbildung 14 : Reaktionsablauf des Viabilitäts-Assays mit chemischen Strukturformeln des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) -Formazans [112] .....	36
Abbildung 15 : Einteilung der 96-Well Zellkulturplatten für die Viabilitäts-Assays .....	38
Abbildung 16 : Schematische Darstellung der vorbereiteten Zellkulturplatten für Wound-Healing-Assays .....	39
Abbildung 17 : Vereinfachte Schemadarstellung der Durchflusszytometrie [116] .....	40
Abbildung 18 : Übersicht über die Streulichtwinkel bei der Durchflusszytometrie [116] .....	41
Abbildung 19 : Expressionsprofil der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase in den Zelllinien kindlich solider Tumoren und der Skelettmuskelzell-linie SkMC .....	48
Abbildung 20 : Modulation der Zellstoffwechselaktivität bei 24-stündiger Behandlung mit Istaroxim in Rhabdoid-Tumor- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien. ....	50

Abbildung 21 : Effekte auf die Zellstoffwechselaktivität der Rhabdoid-Tumor-, Rhabdomyosarkom- und Skelettmuskel-Zellen bei 72-stündiger Behandlung mit Istaroxim	51
Abbildung 22 : Auswirkungen der Kombinationsbehandlung mit Carboplatin und Istaroxim auf die Tumorzelllinien A204, RD und Rh30	54
Abbildung 23 : Auswirkungen der Therapieergänzung von Doxorubicin mit Istaroxim bei malignen Rhabdoid Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	56
Abbildung 24 : Apoptoseverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss von Istaroxim	58
Abbildung 25 : Apoptoseverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss Kombinationsbehandlung von Carboplatin und Istaroxim	60
Abbildung 26 : Histogramme zum Apoptoseverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss von Istaroxim, Carboplatin und der Kombinationsbehandlung aus Carboplatin und Istaroxim	61
Abbildung 27 : Einfluss von Istaroxim auf das Migrationsverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien	63
Abbildung 28 : Fotografische Darstellung des Migrationsverhaltens von malignen Rhabdoid-Tumor- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss von Istaroxim	64
Abbildung 29 : Induktion des klonogenen Zelltodes durch Istaroxim an Zelllinien des malignen Rhabdoid-Tumors und Rhabdomyosarkoms	66
Abbildung 30 : Fotografien der Zellkulturplatten zur Induktion des klonogenen Zelltodes durch Istaroxim an Zelllinien des malignen Rhabdoid-Tumors und Rhabdomyosarkoms	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anteile der beibehaltenen Zellsuspension zum Passagieren der Zellen .....	30
Tabelle 2: Gesamtvolumen an Medium/Zellsuspension pro Zellkulturflasche .....	31
Tabelle 3: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE .....	34
Tabelle 4: Zellzahl pro Well im Wound-Healing-Assay .....	39
Tabelle 5: Übersicht über mögliche Messergebnisse bei der FACS-Messung hinsichtlich Apoptose und Nekrose .....	42
Tabelle 6: Behandlung der Zelllinie A204 für die durchflusszytometrische Zelltodanalyse ....	43
Tabelle 7: Behandlung der Zelllinie RD & Rh30 für die durchflusszytometrische Zelltodanalyse .....	43
Tabelle 8: Istaroxim-Konzentrationen für den Colony-Forming-Assay (CFA) .....	44
Tabelle 9: Signifikanzkennzeichnung .....	46
Tabelle 10: Erklärungen des Koeffizienten für die Wirkstoffinteraktion (coefficient of drug interaction) .....	47
Tabelle 11: Übersicht über die Ergebnisse der einzelnen Experimente .....	81
Tabelle 12: Legende zu Tabelle 11 .....	81



## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATPase	Adenosintriphosphat-spaltendes Enzym
AT/RT	atypischer teratoider/rhabdoider Tumor
BSA	Bovine Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Zweifach positiv geladene Calciumionen
CCG	<i>Children Cancer Group</i>
CFA	Colony Forming Assay
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRAC	<i>Calcium-release activated channel</i>
CRS	<i>Cytoreductive surgery</i>
CWS	Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
EpSSG	<i>European pediatric Soft Tissue Sarcoma Group</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU-RHAB	<i>European rhabdoid registry</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FKHR	<i>Forkhead-Box-Protein</i>
FKS	Fetales Kälberserum

FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>vom englischen forward side scattered</i> )
Gy	Gray (Einheit für die Energiedosis ionisierender Strahlung)
h	Stunde(n)
HIPEC	Hypothermische intraperitoneale Chemotherapie
i.d.R.	In der Regel
IRS/ IRSG	<i>American Intergroup Rhabdomyosarcoma/ Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group</i>
K <sup>+</sup>	Einfach positiv geladenes Kaliumion
kDa	kiloDalton
Lsg.	Lösungsmittel
mA	Milliampere
Mg <sup>2+</sup>	Zweifach positiv geladenes Magnesiumion
min	Minute bzw. Minuten
ml	Milliliter
mRT	<i>malignant rhabdoid tumor</i> / Maligner Rhabdoid-Tumor
MTT	Methyl-thiazolyl-tetrazolium
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
n	Anzahl der Messungen einer Versuchsreihe
Na <sup>+</sup>	Einfach positiv geladenes Natriumion
NRAS	<i>Neuroblastoma Rat sarcoma</i>
nm	Nanometer
Orai1	<i>ORAI calcium release-activated calcium modulator 1</i>
PAX3 bzw. PAX7	<i>paired box protein gene 3 bzw. 7</i>

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI	Propidiumiodid
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphaten
PKB	Proteinkinase B
RMS	Rhabdomyosarkom
RT	Raumtemperatur
rpm	Rotations per minute
RT	Rhabdoid-Tumor
RTK	<i>rhabdoid tumor of the kidney</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>
SIOP	<i>European Society for Paediatric Oncology</i>
SOCE	<i>store operated Ca<sup>2+</sup> entry</i>
sog.	sogenannt
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>vom englischen side light scatter</i> )
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1. Rhabdomyosarkom

### 1.1.1 Epidemiologie

Unter den kindlichen Tumoren gelten die Rhabdomyosarkome (RMS) mit 3 bis 4 % als die häufigsten soliden Weichteiltumoren (Bindegewebe, Fettgewebe und Muskulatur) [1, 2]. Dabei machen sie einen Anteil von etwa 50 % bei Kindern und Jugendlichen vor Vollendung des 14. Lebensjahres aus. In den USA wird jährlich bei 850 – 900 Patienten im Alter von 0 bis 20 Jahre ein Weichgewebstumor diagnostiziert. Von den Betroffenen leiden schätzungsweise 350 an einem RMS [3]. In 60 % der Fälle treten RMS bei Kindern unter 6 Jahren auf [2, 4, 5]

Die Inzidenz in den USA liegt bei den unter 20-jährigen insgesamt bei etwa 4,5 Erkrankten pro 1 Million im Jahr, wobei Jungen in Relation zu Mädchen etwas häufiger betroffen sind (1,5:1) [1-3]. In einer 2015 veröffentlichten schwedischen Studie wird für 0 bis 14-jährige eine Inzidenz von 4,9 pro 1 Million angegeben [6].

Das RMS lässt sich grundsätzlich in zwei Hauptuntergruppen gliedern: Den embryonalen (ERMS) und den alveolären (ARMS) Subtyp. Knapp 60 % aller Erkrankten weisen den embryonalen, 20 % den alveolären Subtypen auf. Seltener Untergruppen stellen die botrioiden und die pleomorphen RMS dar [2, 7]. Das pleomorphe RMS tritt vorwiegend bei erwachsenen Patienten auf, während das ERMS vorwiegend bei Kindern und das ARMS im Jugendalter anzutreffen sind [1, 8, 9].

Unter allen betroffenen Arealen stellt sich mit einem Gesamtanteil von knapp 40 % die Kopf-Hals-Region als am häufigsten betroffene Lokalisation des RMS heraus. Es kann hier grob in 3 primär befallene Subregionen unterteilt werden. Das parameningeale Areal umfasst die Nasenhöhle, den Nasopharynx, die Nasennebenhöhlen, das Mittelohr und die Schädelbasis. Diese Strukturen sind bei 23 % der Patienten betroffen. In 7 % aller Fälle ist das RMS in der Orbita lokalisiert (siehe Abbildung 1). Die übrigen 9 % der nicht-parameningealen Lokalisationen verteilen sich auf die übrigen Kopf-Hals-Regionen, wie etwa die Speicheldrüsen, die Mundhöhle, epikraniale Aponeurosen, den Pharynx, das Nackenweichgewebe oder andere weichgewebige Strukturen. Außerhalb der Kopf-Hals-

Region ist das RMS im Urogenitaltrakt, an den Extremitäten und weiteren anatomischen Strukturen lokalisiert (vergleiche Abb. 1) [5, 10].

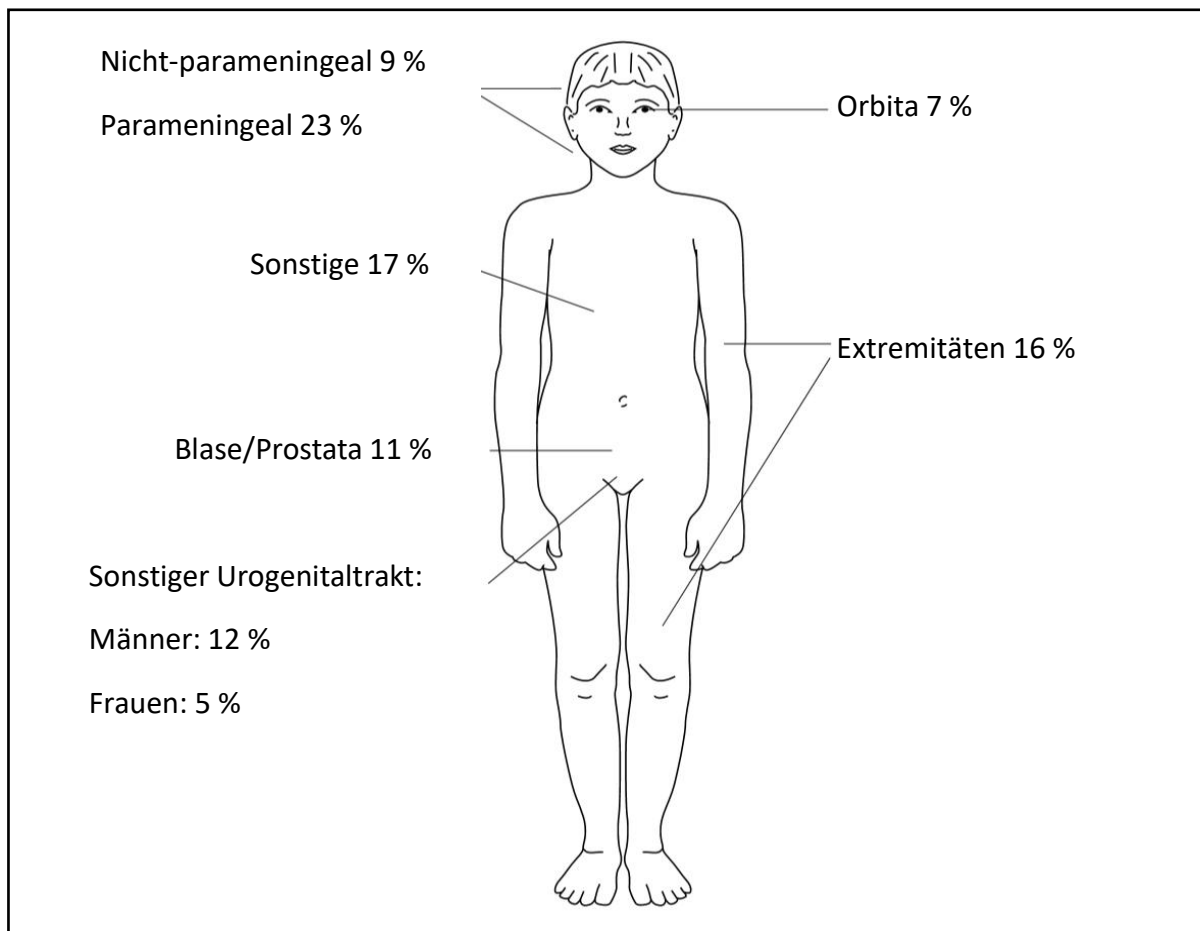


Abbildung 1: Schematische Darstellung der potenziellen Lokalisationen eines Rhabdomyosarkom [10]

### 1.1.2 Ätiologie und hereditäre Faktoren

Hinsichtlich der Entstehung von RMS wird derzeit von einer malignen Entartung multipotenter mesenchymaler Stammzellen bzw. Progenitorzellen der Skelettmuskulatur ausgegangen [11]. Die Lokalisation eines RMS ist allerdings nicht daran gebunden, dass in der betreffenden Körperregion physiologischerweise quergestreifte Muskelzellen vorkommen [1, 12].

Es ist aufgrund einiger molekulargenetischer Unterschiede allerdings denkbar, dass die einzelnen Subtypen auf verschiedene Zellursprünge zurückgehen [1, 10, 11]. Beim ERMS lässt sich beispielsweise eine Hochregulation des PAX7-Gens (*paired box protein gene 7*) nachweisen, dass an der Proliferation von Muskelvorläuferzellen beteiligt ist. Diese Hochregulation konnte beim ARMS nicht beobachtet werden [11]. Zudem ist das ERMS

durch den Allelverlust 11p15.5 am kurzen Arm des Chromosoms 11 gekennzeichnet [13]. Der alveoläre Subtyp (ARMS) hingegen weist die charakteristischen Gentranslokationen zwischen den Chromosomen 1 bzw. 2 und 13 [t(2;13)(q35;q14) (in 55 % der Fälle) und t(1;13)(p36;q14) (in 22% der Fälle)] auf [14]. Die Translokationen resultieren in den Fusionsgenen PAX3-FKHR oder PAX7-FKHR (vergleiche Abb. 2) [10, 15]. Auf Basis dieser Fusionsgene sind die für die Muskelentwicklung während der Embryogenese wichtigen Gene PAX3 und PAX7 potenter als ihr jeweiliger Wildtyp. Dies nimmt Einfluss auf das tumorgenetische Verhalten der Zellen, betreffend Zellwachstum, -differenzierung, Motilität und Apoptoseverhalten [5, 14].

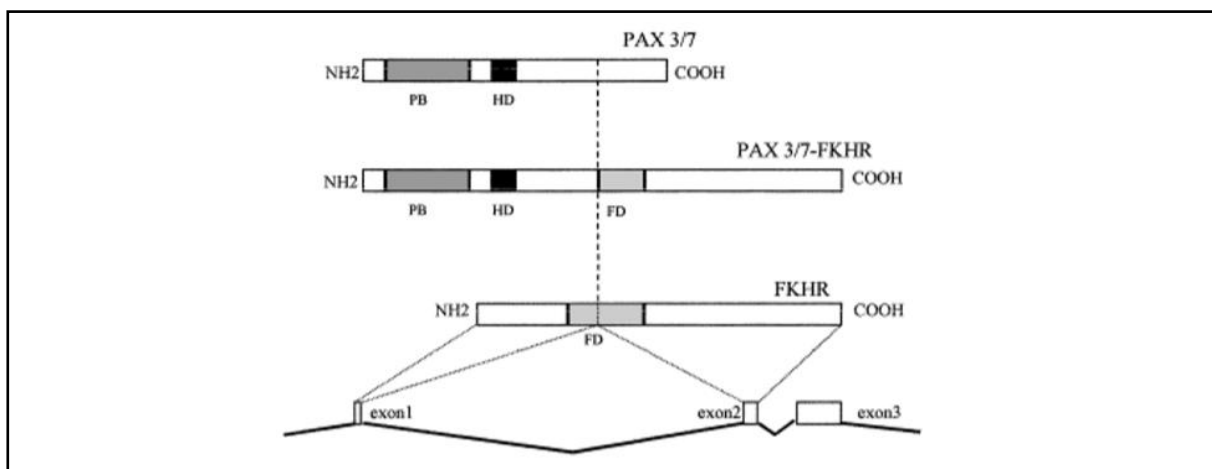


Abbildung 2: Darstellung der chromosomalen Translokationen und der daraus entstehenden Fusionsgene PAX3-FKHR und PAX7-FKHR [16]

Weiterhin wurden genetische Veränderungen im Sinne von Amplifikationen der Gene MYCN, MDM2 und CDK4, sowie Mutationen am p53 Tumorsuppressorgen im ARMS nachgewiesen [10, 17].

Zum jetzigen Forschungsstand wird ein sporadisches Auftreten von RMS vermutet [11]. Es konnte jedoch auch beobachtet werden, dass RMS in Verbindung mit Syndromen, wie etwa dem Recklinghausen-Syndrom [18], dem Li-Fraumeni-Syndrom [19], dem Costello-Syndrom [20], dem Noonan-Syndrom [21] oder dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom [22] auftreten können. Es werden demzufolge derzeit einige genetische Prädispositionen diskutiert.

Weiterhin wird von Zusammenhängen der RMS-Genese mit dem Marihuana- (3-fach erhöhtes Risiko) und Cocainabusus (5,1-fach erhöhtes Risiko) der Mutter während der Schwangerschaft ausgegangen [23].

### 1.1.3 Klassifikation der Tumorstadien

Da sich unterschiedliche internationale Gruppen mit dem Krankheitsbild des RMS auseinandersetzen, bestehen derzeit diverse, nicht vereinheitlichte Klassifikationen. Es wurde 1972 von der *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG)* eine Einteilung für postoperative RMS-Patienten in vier Risikogruppen erstellt [11]. Basierend auf dieser Einteilung erfolgte die postoperativ-histopathologische Klassifikation der CWS-Studien (Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe). Die SIOP-Stadieneinteilung (European Society for Paediatric Oncology) orientiert sich im Gegensatz dazu an der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) [24]. Die TNM-Klassifikation des RMS wird vor der Therapie angewandt. Es werden dabei die Größe des Primärtumors, der Grad der Tumorinvasion in sein benachbartes Gewebe und der Befall von Lymphknoten erfasst (siehe Abb. 3) [25].

Stage	Sites	Invasiveness	Size <sup>a</sup>	Nodes	Metastasis
1	Orbit, H/N (non-PM), GU (non-BP) and biliary	T1 or T2	a or b	N0, N1 or Nx	M0
2	BP, Ext, PM and other	T1 or T2	a	N0 or Nx	M0
3	BP, Ext, PM and other	T1 or T2	a	N1	M0
			b	N0, N1 or Nx	
4	Any	T1 or T2	a or b	N0, N1 or Nx	M1

Abbildung 3: Staging nach der TNM-Klassifikation für Rhabdomyosarkom [15]

### 1.1.4 Symptomatik

Die Symptomatik des RMS stellt sich allgemein als sehr unspezifisch dar und kann abhängig von der anatomischen Lokalisation variieren. Initial tritt häufig zunächst eine asymptomatische, mit sekundären funktionellen Einschränkungen assoziierte Schwellung auf. Im Kopf-Halsbereich kann es dabei infolge starker Tumorgewebsproliferation zu Beschwerden wie Dysphagie, Hirnnervenstörungen und Paresen, Motilitätseinschränkungen des Bulbus oculi, sowie blutiger und eitriger Sekretionen aus den Nasengängen kommen. Die Symptomatik kann gelegentlich starke Ähnlichkeiten zu entzündlichen Erkrankungen der Atemwege aufweisen, was die Diagnose ggf. verzögern kann. In der Regel sind die Patienten schmerzfrei [4, 5, 11].

### **1.1.5 Diagnostik**

Da zum Nachweis eines RMS bislang keine eindeutigen Serummarker vorliegen, kann eine gesicherte Diagnose nur durch eine Biopsie des fraglichen Gewebes mit anschließender histopathologischer Untersuchung erfolgen. Der alveoläre Typ (ARMS) zeichnet sich vor allem durch netzartige Zellstrukturen aus, die sich durch alveolenähnliche Hohlräume bilden. In diesen Alveolarräumen befinden sich zumeist einzeln verteilte, runde Tumorzellen [26]. Das ERMS setzt sich mikroskopisch aus kleinen, runden, spindelförmigen Zellen zusammen, die eine Querstreifung aufweisen können. Die Zellen besitzen einen großen hyperchromatischen Zellkern, der sich im Zuge einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung dunkelblau darstellt. Differenzialdiagnostisch sind Neuroblastome, Ewing-Sarkome und Lymphome nur sehr schwer vom RMS abzugrenzen. Laut IRS sind etwa 20 % der RMS-Diagnosen falsch. In immunhistochemischen Verfahren helfen Skelettmuskelzell-Antigene wie Desmin, Myoglobin, Aktin und Vimentin den RMS-Nachweis zu erbringen. Darüber hinaus werden bildgebende Verfahren angewandt, die Aufschluss über das präoperative Ausmaß des Primärtumors, sowie mögliche Metastasen oder Zweittumoren geben sollen. Dazu werden computertomografische Verfahren und Magnetresonanztomografien mit Kontrastmitteln, sowie Positronen-Emissions-Tomografien, Skelettszintigrafien und native Röntgenaufnahmen eingesetzt. In Abhängigkeit von der anatomischen Lage des Tumors erfolgen unter Umständen weitere klinische Untersuchungen wie etwa Biopsien des Knochenmarks [5, 10, 11, 27].

### **1.1.6 Heutiger Stand der Therapie & Prognose**

Die Behandlung eines RMS beruht grundsätzlich auf multimodalen und multidisziplinären Therapiekonzepten. Zum Einsatz kommen die Anwendungen von Chemotherapie, Radiatio und operativen Verfahren. Je nach individueller Diagnose und Krankheitsverlauf, sowie dem Ansprechen auf die einzelnen Therapiekomponenten wird der Einsatz von Strahlentherapie, chirurgischen Eingriffen und Chemotherapeutika unterschiedlich variiert [28]. Im Laufe der Zeit haben sich zwei verschiedene Therapiephilosophien manifestiert. Die Philosophie der IRS (American Intergroup Rhabdomyosarcoma) setzt zu Therapiebeginn auf eine radikale chirurgische Tumorentfernung und eine adjuvante Strahlentherapie, welche im Falle einer nachweislich vollständigen Tumorentfernung verzichtet wird. Im Anschluss daran wird eine langwierige chemotherapeutische Behandlung angesetzt, die sich bis über einen



zweijährigen Zeitraum erstrecken kann. Die SIOP hingegen behandelt zunächst im Rahmen einer neoadjuvanten Chemotherapie, an welche sich dann eine chirurgische Resektion der Tumormasse und eine begleitende Radiatio anschließen [10].

#### **1.1.6.1 Chemotherapie**

Die Standard-Zytostatika-Kombination besteht aus Vincristin, Actinomycin-D (Dactinomycin) und Cyclophosphamid (VAC-Kombination) für Patienten, deren Morbiditätsrisiko als niedrig eingestuft werden konnte. Im fortgeschritteneren Tumorstadium konnten die Vorteile einer Ifosfamid-Etoposid-Kombinationstherapie gegenüber der VAC-Kombination festgestellt werden [4, 11, 29]. Darüber hinaus konnten sich Anthrazykline, wie Doxorubicin und Epi-Doxorubicin als Zytostatika etablieren. Bei Nicht-Ansprechen oder in Hochrisikosituationen kommen zudem Platin-Derivate (Cisplatin, Carboplatin) zum Einsatz [24].

#### **1.1.6.2 Strahlentherapie**

Der Einsatz der Strahlentherapie richtet sich derzeit nach dem Konsensus der EpSSG und der CWS-Gruppe von 2005. Demzufolge bedarf es nach einer primären R0-Resektion eines ERMS keiner Radiatio. Bei alle anderen Rhabdomyosarkomsubtypen sollte eine Bestrahlung erfolgen. Für die anzuwendende Strahlendosis muss sich an den Faktoren der histologischen Beschaffenheit, dem chirurgischen Resektionsgrad und dem Ansprechen auf die Chemotherapie orientiert werden [24]. Bei geringem Risiko kann eine Dosis von insgesamt 36 Gray (Gy) angestrebt werden. Handelt es sich um einen makroskopischen Residualtumor, werden typischerweise 50,4 Gy eingesetzt [11].

#### **1.1.6.3 Chirurgische Therapie**

Für die Entscheidung, ob eine primäre oder eine sekundäre Tumorsektion erfolgt, müssen vor Therapiebeginn die Tumormasse, die Ausdehnung und der histologische Subtyp bekannt sein. Sofern ein großes Risiko besteht, dass funktionelle Schäden durch eine primäre Resektion entstehen könnten, sollten eine neoadjuvante Therapie zur Verkleinerung der Tumormasse und eine anschließende Second-Look-Operation vorgezogen werden. Auf eine chirurgische Reduktion der Tumormasse wird derzeit in der Regel verzichtet. Eine Ausnahme gilt für den Fall, dass das Tumorgewebe durch seinen Druck die Funktion lebenswichtige Organe beeinträchtigt. Für eine primäre Resektion ist demnach eine exakte histopathologische und molekulargenetische Diagnose die zwingende Voraussetzung [11, 24].

### 1.1.6.5 Prognose

Die Prognose eines RMS-Patienten hängt unter anderem von den histologischen Charakteristika des Tumors, der anatomischen Lage, der Ausbreitung und dem Vorliegen von Fernmetastasen ab. Eine besondere Rolle spielen darüber hinaus auch Faktoren hinsichtlich der kompletten operativen Tumorentfernung, der Tumorgöße und dem Patientenalter [4]. Demzufolge haben mit etwa 29 % alveoläre und pleomorphe RMS die deutlich schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate im Vergleich zu den ERMS. Deren 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei knapp 74 % [30]. RMS mit einer Größe von über 5 cm werden für prognostisch ungünstig erachtet. Zudem haben Kinder im Alter von 1 bis 10 Jahren eine bessere Prognose als Jugendliche und Erwachsene. Das Geschlecht und die ethnische Herkunft haben nach heutigem Kenntnisstand keine Auswirkungen auf die Überlebens- bzw. Heilungschancen [11, 31, 32]. Weiterhin hat die rezidivfreie Zeit unabhängig von anderen Faktoren ebenfalls einen Einfluss auf die Prognose [33]. Trotz der therapeutischen Fortschritte, die in den vergangenen drei Jahrzehnten erreicht werden konnten, werden die Heilungschancen für Patienten mit Tumorrezidiven oder schwerem Metastasenbefall als sehr schlecht eingestuft [15]. Bei Metastasenbefall sind derzeit trotz intensiver Behandlungsmethoden lediglich ein Viertel der Patienten nach 3 Jahren tumorfrei [25].

Mit Hilfe chirurgischer Methoden zur Behandlung peritonealer Karzinome bei Erwachsenen sollen auch in der Kinderchirurgie neue Therapiemöglichkeiten erschlossen werden. Demnach wurden 2018 erstmals eine vielversprechende klinische Studie über die kombinierte Behandlungsmethode embryonaler RMS mittels zytoreduktiver Chirurgie (*CRS = cytoreductive surgery*) in Verbindung mit der sogenannten hyperthermischen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) bei 1-5-jährigen Patienten veröffentlicht [34]. Zunächst erfolgte bei diesem Behandlungskonzept eine Reduktion der Tumorlast, mittels chirurgischer Entfernung aller makroskopisch sichtbaren Tumoranteile. Nachfolgend wurde die abdominale Kavität für etwa 60 min mit einer auf 42,5 °C erwärmten Zytostatika-Lösung aus Cisplatin und Doxorubicin durchspült. Durch die Erwärmung der Lösung sollen sich die verbliebenen Tumorzellen besser ablösen. Dieser Therapieansatz führte bei allen Patienten über einen Zeitraum von 12 Monaten zu vollständiger Tumorfreiheit. Außer kurzzeitiger Proteinurie zweier Patienten konnten keine Nebenwirkungen festgestellt werden [34].

Schmidt et al. veröffentlichte 2020 eine klinische Studie zur Reduktion der mutilierenden Faktoren bei tumorchirurgischen Eingriffen durch den Einsatz von Brachytherapie bei RMS-Befall der Blase oder Prostata im Kindesalter. Dabei wird nach der Tumorresektion eine innere Bestrahlung über intraoperativ eingebrachte Bestrahlungssonden durchgeführt. Hierdurch gelingt es einen gezielten Bereich hochdosiert zu erfassen ohne die Nebenwirkungen der transkutanen Bestrahlung in Kauf nehmen zu müssen. Durch die kombinierten chirurgischen und brachytherapeutischen Behandlungsschritte konnte eine 5-Jahres-Überlebensrate von 100 % erreicht werden, das ereignisfreie Überleben lag bei 85,6 % [35].

## **1.2 Maligner Rhabdoid-Tumor**

### **1.2.1 Epidemiologie**

Der Rhabdoid Tumor (RT) trat 1978 zum ersten Mal in der Literatur in Erscheinung. Damals wurde er noch als Subtyp des Wilms-Tumors definiert. Beckwith und Palmer beschrieben ihn als einen Tumor mit einer rhabdomyosarkomatoiden Morphologie [36]. 1981 wurde der maligne Rhabdoid Tumor (mRT) in der Niere schließlich als eigenständige histopathologische Entität definiert [37]. Im Jahr 1987 entdeckte man den RT auch extrarenal im zentralen Nervensystem [38].

Die seltene, aber hochgradig aggressive Krebserkrankung, die der mRT darstellt, tritt in erster Linie bei Kindern im Alter von 1 bis 4 Jahren auf. In den USA beträgt die Inzidenz unter den unter 15-jährigen etwa 1,4 pro eine Million. Nach Angaben des *Surveillance, Epidemiology, and End Results*-Programms (SEER) des National Cancer Institute in den Vereinigten Staaten von Amerika, waren etwa 14 % der Weichteilsarkome, die in den ersten 12 Lebensmonaten auftraten Rhabdoid-Tumoren. Vorzugsweise tritt der Tumor in der Niere (sog. *rhabdoid tumor of the kidney*, kurz RTK), im Gehirn (atypischer teratoider/rhabdoider Tumor, kurz AT/RT) oder in sonstigen Weichteilen (extrarenaler RT, maligner RT = mRT) [39-42] auf. Laut einer britischen Studie im Zeitraum zwischen 1993 und 2010 ergibt sich hinsichtlich des Befalls der einzelnen Organe folgende Verteilung: RTK 48 %, RT im Kopf- und Halsbereich 14 %, RT in der Leber 13 % und alle übrigen anatomischen Areale machen insgesamt 25 % aus [43]. Der *European rhabdoid registry (EU-RHAB)* -Datenbank zufolge besteht eine recht ausgewogene Inzidenz zwischen den Geschlechtern (jünger als 1 Jahr: 53 % männlich, älter als 1 Jahr: 56 % männlich) [44].

Der RTK macht etwa 2 % der kindlichen renalen Tumoren aus. 80 % davon treten innerhalb der ersten beiden Lebensjahre auf, 60 % innerhalb des ersten Lebensjahres. Studien der *Children Cancer Group* (CCG) zufolge leiden 10 – 15 % der Hirntumorpatienten unter drei Jahren an einem AT/RT [41].

### **1.2.2 Ätiologie und hereditäre Faktoren**

Rhabdoid-Tumor-Patienten weisen in 10-15 % der Fälle eine parallel bestehende Läsion des zentralen Nervensystems auf [45]. Ein verstärktes Auftreten von RT wird mit verschiedenen demografischen Begebenheiten assoziiert. Darunter fallen ein Geburtsgewicht von unter 2500 g, sowie Früh- (vor der 37. Woche) oder Spätgeburten (nach der 42. Woche) und Mehrlingsgeburten [46].

Aus molekulargenetischen Untersuchungen geht hervor, dass der RT durch eine partielle Deletion oder Mutation am langen Arm des Chromosoms 22 (22q11.2), die das Tumorsuppressorgen *SMARCB1* (*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1*) betreffen, gekennzeichnet ist [47-49]. Bei dem *SMARCB1*-Gen (auch bekannt als *INI1*, *BAF47* oder *hSNF5*) handelt es sich um einen Bestandteil des *SWI/SNF*-Multiproteinkomplexes, der ATP-vermittelt die Organisation und den Kondensationszustand der DNA-Struktur beeinflussen kann, wodurch die Expression verschiedener Gene reguliert wird [50]. Im Mausmodell konnte Roberts et al. (2000) nachweisen, dass eine Inaktivierung des *SMARCB1*-Gens zur Bildung von Rhabdoid Tumoren führt [51].

Lediglich etwa ein Drittel der Patienten, bei welchen die Diagnose eines RT gestellt wird, weisen eine genetische Prädisposition für eine *SMARCB1*-Anomalie auf. Hierbei wird auch vom Rhabdoid Tumor-Präpositions-Syndrom gesprochen. Bei den übrigen Patienten scheint eine spontane Mutation vorzuliegen [52, 53]. Frühwald et al. (2006) beschrieb 2006 einen Familienfall, in welchem trotz eines bestehenden Rhabdoid-Tumor-Präpositions-Syndrom eine normale *SMARCB1*-Expression nachgewiesen wurde. Demzufolge müssen auch andere molekulargenetische Faktoren Einfluss auf die Entstehung des RT haben [54].

### **1.2.3 Klassifikation der Tumorstadien**

Da sowohl die anatomische Lage eines Rhabdoid Tumors, wie auch sein histologisches Erscheinungsbild sehr variabel ist, wird sich für das Staging an den üblichen Tumoren der

entsprechenden Lokalisation orientiert. Nach der SIOP-Klassifikation für renale Tumoren im Kindesalter wird dementsprechend der renale RT als der häufigste Vertreter des RT eingestuft. Diese Einteilung umfasst Stadien und orientiert sich an der Tumorausbreitung innerhalb und außerhalb der Niere, sowie der vollständigen oder unvollständigen Entfernung, dem Vorliegen von Metastasen und daran, ob nur eine oder beide Nieren befallen sind [55].

#### **1.2.4 Symptomatik**

Ebenso wie beim Rhabdomyosarkom sind die Symptome auch beim Rhabdoid-Tumor abhängig vom Ausmaß und der Lokalisation des Befalls. Im Falle eines RTKs kommt es häufig zur Hämaturie. Des Weiteren kann es zu einer Hyperkalziämie infolge einer Überproduktion an Parathormon kommen. Die auffälligsten Symptome treten jedoch durch die Fernmetastasen in Erscheinung, die in 80 % der Patientenfälle auftreten und primär in den Lungen, der Leber oder im Gehirn lokalisiert sind [56].

#### **1.2.5 Diagnostik**

RTK stellen sich üblicherweise kleiner als Wilms-Tumoren, mit einem durchschnittlichen Volumen von etwa 570 ml dar und metastasieren deutlich früher [57]. Da sie allerdings weitaus seltener sind, muss die Differenzialdiagnose eines Wilms-Tumors immer in Erwägung gezogen werden [56].

Mit Hilfe klinischer Untersuchungsmethoden besteht derzeit keine Möglichkeit den AT/RT und die primitiven neuroektodermalen Tumoren zu differenzieren. Etwa 50 % der AT/RT treten in der Fossa cranii posterior auf [41].

Das histologische Erscheinungsbild des RT kann in drei Hauptgruppen unterteilt werden. Die Gruppe des konventionellen Typs ist durch epitheloide Tumorzellen mit rund-ovalen oder polygonalen Zellkernen mit großen Nukleoli und filamentösen Inklusionen in einem eosinophilen Zytoplasma charakterisiert. Die Zellen sind hier in soliden trabekulären oder alveolenartigen Strukturen angeordnet. Atypische Mitosefiguren, Tumornekrosen und Einblutungen können das histologische Bild prägen. Der zweite RT-Typ wird als atypischer teratoider/rhabdoider Typ mit mesenchymalen und epithelialen Merkmalen beschrieben. Er unterscheidet sich im Wesentlichen durch das Auftreten von spindelzellartigen Tumorzellen vom Typ 1. Typ 3 hingegen weist kleine lymphomartig-runde, zytoplasmaarme Zellen, anstelle von Rhabdoidzellen auf. Die hyperchromatischen Zellkerne verfügen über

ausgeprägte Nukleoli. Diese unterschiedlichen Merkmale erschweren eine sichere pathologische Diagnose [39, 40, 58, 59]. So konnte Parham et al. (1994) in ihrer Untersuchung von 42 extrarenalen RT-Fällen nur 11 Fälle nach immunhistochemischer und elektromikroskopischer Analyse sicher als Rhabdoid-Tumoren diagnostizieren [58]. In der Folge konnte durch SMARCB1 als Target für die immunhistochemische Färbung eine Verbesserung der Diagnostik erzielt werden. Dabei stützt sich dieses Verfahren darauf, dass SMARCB1 bei Rhabdoid-Tumoren nicht exprimiert wird. In einigen Fällen können dennoch falsch-positive Diagnosen gestellt werden, zumal auch bei anderen Tumoren die Expression des SMARCB1 ausbleibt [43, 60].

### **1.2.6 Heutiger Stand der Therapie & Prognose**

Typischerweise wird beim Rhabdoid-Tumor nach Empfehlung der EU-RHAB eine multimodale Therapie angewandt, die sich aus den Komponenten der Chemo-, Strahlen- und chirurgischen Therapie zusammensetzt. Da sich die betroffenen Patienten meist im Kleinkindes- oder Säuglingsalter befinden, können die Nebenwirkungen einer Radiotherapie oder einer Chemotherapie beträchtliche Ausmaße annehmen. Besonders neurokognitive und vaskuläre Folgeschäden können auftreten [44].

#### **1.2.6.1 Chemotherapie**

Als Chemotherapeutikum kommt den EU-RHAB-Empfehlungen zufolge vor allem Methotrexat zum Einsatz [44].

In zwei weiteren Fallberichten wurden erfolgreiche Behandlungen von drei Patienten mit bereits metastasierenden RTK beschrieben. Wagner et al. (2002) beschreibt das Ansprechen zweier Jungen im Alter von 12 und 19 Monaten. Bei beiden wurde vor Beginn der Chemotherapie der Primärtumor reseziert. Anschließend wurde eine Radio-Chemotherapie angewandt, bei welcher abwechselnd Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid und Vincristin, Doxorubicin und Cyclophosphamid verabreicht wurden. Beide Patienten waren ein bzw. zwei Jahre nach der Therapie rezidivfrei [61]. In einem weiteren Fallbericht behandelt Waldron et al. (1999) einen 31-monatigen Patienten im Tumorstadium IV. Auch hier wurde zunächst eine chirurgische Resektion des Primärtumors vorgenommen. Im Anschluss daran wurde der Patient bestrahlt und im Wechsel mit VDC und Ifosfamid und Etoposid therapiert. Bei dem Patienten konnten über einen Zeitraum von 60 Monaten keine weiteren Tumoren,

Tumorrezidive oder Metastasen diagnostiziert werden. Waldron et al. (1999) spricht dabei dem Zytostatikum Doxorubicin eine entscheidende Rolle im Therapieprozess zu [62].

#### **1.2.6.2 Strahlentherapie**

In Einzelfällen wurden Dosen von bis zu 54 Gy eingesetzt. Hinsichtlich der möglichen Langzeitfolgen für den Patienten wird die Radiotherapie allerdings als kritisch angesehen. Zu den potenziellen Folgeschäden einer Strahlentherapie bei Heranwachsenden zählen in erster Linie kognitive Beeinträchtigungen, die nach einer Radiatio im Kopfbereich auftreten können. Demzufolge ist es fraglich, ob eine Therapie mittels Radiatio an den von Rhabdoid-Tumoren betroffenen Patienten in jedem Alter angewandt werden kann [44].

#### **1.2.6.3 Chirurgische Therapie**

Eine frühestmögliche und weitgehend radikale Entfernung des Tumorgewebes sollte in jedem Fall angestrebt werden. Gerade bei schwierigen anatomischen Begebenheiten kann eine R0-Resektion des Tumors allerdings nicht immer gewährleistet werden. Dabei müssen beispielsweise bei der Resektion eines AT/RTs die Risiken für perioperative Morbiditäten und damit einhergehender Beeinträchtigungen neurologischer Funktionen abgewogen werden [63].

#### **1.2.6.4 Prognose**

Die 5-Jahres-Überlebensrate der AT/RT lag in Österreich in den Jahren 1996-2006 bei 39,5 % [64]. Die 1-Jahres-Überlebensrate in einer Langzeitstudie aus Großbritannien, in der Kinder mit extrakraniellen Rhabdoid-Tumoren untersucht wurden, lag hingegen nur bei 31 % [43]. In einer Studie der SIOP wurden 22 Patienten mit der Diagnose RTK untersucht. Bei 82 % dieser Patienten konnten innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von neun Monaten Fernmetastasen in der Lunge, im Abdomen, regionalen Lymphknoten, der Leber, im Knochen oder im Gehirn nachgewiesen werden. Binnen 20 Monaten nach der Diagnose des RTK verstarben 17 Patienten [55]. Das Tumorstadium und das Patientenalter bei der Erstdiagnose werden als wichtige prognostische Faktoren angesehen. So zeigte Tomlinson et al. (2005), dass Patienten mit einem niedrigeren Staging (Stadium I oder II) in der 4-Jahres-Überlebensrate bei 41,8 %, bei Patienten im Tumorstadium III oder IV hingegen bei nur noch 15,9 % liegen. Während die Patienten unter 5 Monaten eine 4-Jahres-Überlebensrate von 8,8 % aufweisen, beträgt diese in Tomlinsons Studie bei den über 2-Jährigen 41,1 % [45].

## 1.3 Istaroxim und Zytostatika

### 1.3.1 Istaroxim

#### 1.3.1.1 Ursprüngliche klinische Anwendungsgebiete und Wirkungsweise

Istaroxim (Strukturformel siehe Abb. 4) gilt momentan als vielversprechender Vertreter einer Reihe neuer Steroidenzyminhibitoren zur Behandlung der Herzinsuffizienz.

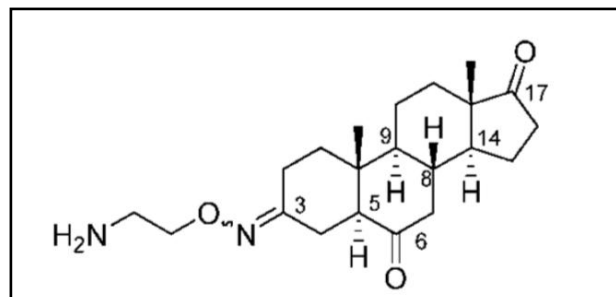


Abbildung 4: Strukturformel von Istaroxim [65]

Derzeit befindet es sich in der klinischen Forschungsphase II. Die dabei bislang festgestellten Arzneimittelwirkungen von Istaroxim bestehen in einer Herabsetzung des pulmonalkapillären Drucks, einer Steigerung des systolischen Blutdrucks, sowie einer Behebung der diastolischen Compliancestörung bei akuter Herzinsuffizienz [66-68]. Als pharmakologischer Angriffspunkt gilt zum einen die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , ein Protein in der Zellmembran, dass unter ATP-Verbrauch entgegen des eigentlichen Konzentrationsgradienten Natriumionen aus der Zelle und Kaliumionen in die Zelle schleust (dargestellt in Abb. 5). Entfällt die Funktion der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (bspw. durch den Einfluss eines klassischen Herzglykosids oder Istaroxim) steigt die Natriumkonzentration im Zellinneren. Um die intrazelluläre Konzentration wieder zu senken, wird  $\text{Na}^+$  mit  $\text{Ca}^{2+}$  über einen Antiport ausgetauscht. Die daraus resultierende erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration trägt dazu bei, die Kontraktionsfähigkeit des Myokards zu steigern wodurch die Inotropie des Herzens steigt [65, 69, 70]. Darüber hinaus stimuliert Istaroxim, unabhängig von seinem Effekt auf die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und im Gegensatz zu bereits bekannten Herzglykosiden, wie etwa Digoxin, die Aktivität der sarko-/endoplasmatischen retikulären  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase 2a}$  (SERCA2a) (dargestellt in Abb. 5). Bei der SERCA2a handelt es sich um den Hauptsubtypen von SERCA in Herzmuskelzellen, dessen Expression und Aktivität bei Herzinsuffizienz herabgesetzt sind. SERCA2a vermittelt die Kontraktion der Herzmuskelzellen



und die Rückführung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Zytoplasma der Kardiozyten in das sarkoplasmatische Retikulum [71]. Auf eine Stimulation durch Istaroxim weist SERCA2a eine stärkeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität auf, was mutmaßlich zu einer höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum beiträgt [72].

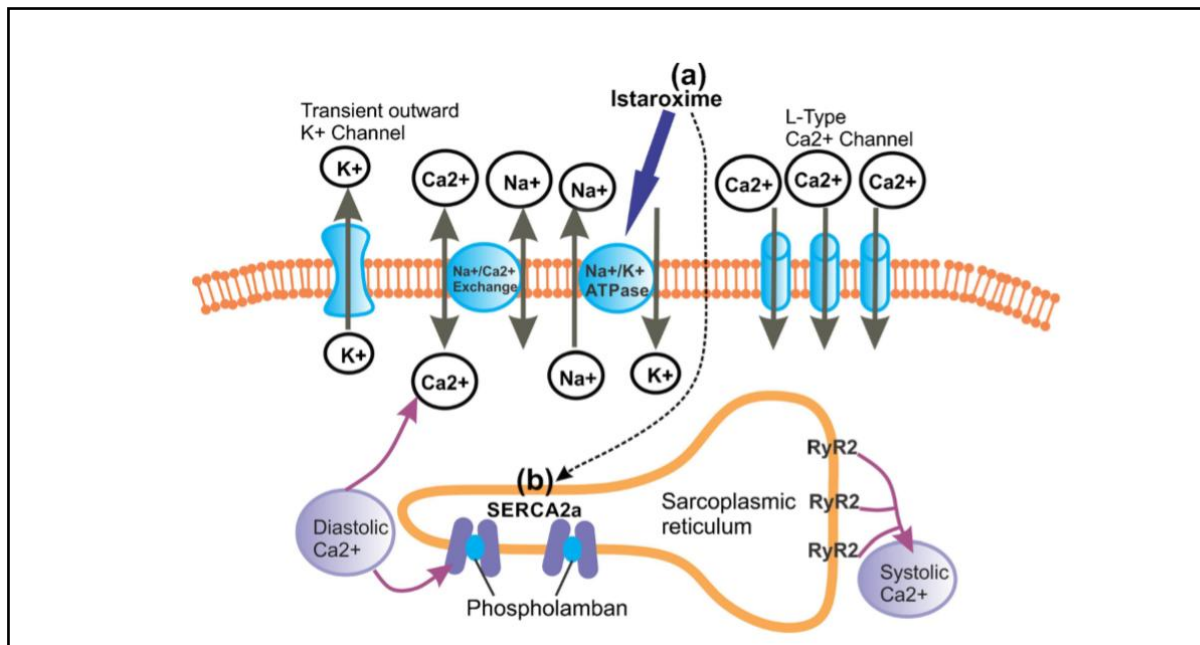


Abbildung 5: Zielstrukturen von Istaroxim [73]

### 1.3.1.2 Antikanzerogene Eigenschaften

Über die Therapieoption als Medikament zum Einsatz bei Herzinsuffizienz hinaus, konnten für Istaroxim auch antikanzerogene Eigenschaften nachgewiesen werden. Dies erfolgte *in vitro* an 22 unterschiedlichen Tumorzelllinien von insgesamt neun verschiedenen Entitäten (Melanom und Lungen-, Ovarial-, Nieren-, ZNS-, Pankreas-, Colon-, Mamma- und Prostatakarzinom), sowie *in vivo* im Mausmodell am Prostatakarzinom (PC-3-Zelllinie). Dabei zeigte Alvizopolulos et al. (2016), dass Istaroxim wichtige Apoptose- und Proliferationsmediatoren wie c-Myc und Caspase-3 beeinflusst [74].

Die Anzahl apoptotischer Tumorzellen konnte *in vitro* nachweislich um etwa den Faktor 5 gesteigert werden. Weiterhin stellte sich eine Herabregulation des c-Myc-Proteinlevels heraus, was auf eine Destabilisierung der Proteinstruktur zurückgeführt werden kann. Zudem wurde eine Veränderung des Verhältnisses von globulärem Aktin (G-Aktin) zu filamentärem Aktin (F-Aktin) zugunsten des G-Aktins nachgewiesen. Daraus geht hervor, dass verhältnismäßig weniger F-Aktin vorliegt, was zu einer Einschränkung der Zellmotilität führen kann [74].

Darüber hinaus konnte in den Prostatatumorzellen der Zelllinien PC-3, DU-145 und LNCaP eine Veränderung des Zytoskeletts festgestellt werden, die eine schnellere und beständigere Aktivität des RhoA (Ras homolog family member A) betraf [74]. Bei RhoA handelt es sich um ein Transformationsprotein aus der Familie der Rho-GTPasen, das mit der Regulation der Aktinfaserformation und der Actomyosinkontraktilität in Verbindung gebracht wird [75, 76]. Des Weiteren wurde im Tiermodell eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums unter Einfluss von Istaroxim festgestellt, ähnlich der Wirkung des bereits etablierten antikanzerogenen Medikaments Docetaxel [74].

Mit Hilfe von *Wound-healing*- und *Transwell*-Assays konnte ein klarer Nachweis der Migrationsinhibition der Prostatakarzinomzelllinie DU-145 nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Istaroxim erfolgen. Im Zusammenhang damit konnte zudem festgestellt werden, dass die Expression von Orai1 und STIM1 und in Folge des *store operated Ca<sup>2+</sup> entry* (SOCE) durch Istaroxim herunterreguliert werden. [77]. Orai1 ist ein Strukturelement des CRAC (*Calcium-release activated channel*) und interagiert mit STIM1, einem Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER), das als Sensor für die Calciumkonzentration im Inneren dieser Zellorganelle fungiert. Sinkt die Konzentration, bindet STIM1 an Orai1, was den CRAC aktiviert und dazu führt, dass sich die Orai1-Pore öffnet, wodurch Calciumionen in das ER einströmen können und sich die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im ER wieder erhöht [78].

Weiterhin konnte ein Einfluss von Istaroxim auf die Focal Adhesion Kinase (FAK), die unter anderem an Signalwegen diverser Zellüberlebensmechanismen und der Zellmotilität beteiligt ist, bei Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden. Das Verhältnis der nicht aktivierten dephosphorylierten FAK zur aktivierten phosphorylierten FAK verschob sich dabei signifikant zugunsten der nicht aktiven (dephosphorylierten) Form [77, 79].

### **1.3.2 Carboplatin**

Carboplatin bildet zusammen mit Cisplatin und Oxaplatin die Gruppe der platinhaltigen Substanzen unter den Chemotherapeutika. Neben seinem Einsatz bei Brust-, Lungen- und Ovariarkarzinomen bei Erwachsenen, wird Carboplatin auch weitläufig in der pädiatrischen Onkologie eingesetzt [80, 81].

Durch Carboplatin wird infolge der Vernetzung von Guanin-Basen im DNA-Strang durch kovalente Bindungen ein Replikationsstopp hervorgerufen, der zum Zelluntergang führt [82]. Die aktive Form des Carboplatins liegt nach der Hydrolyse des Moleküls vor. Dabei wird die Malonat-Gruppe in zwei Reaktionsschritten abgespalten (vergleiche Abb. 6) [83].

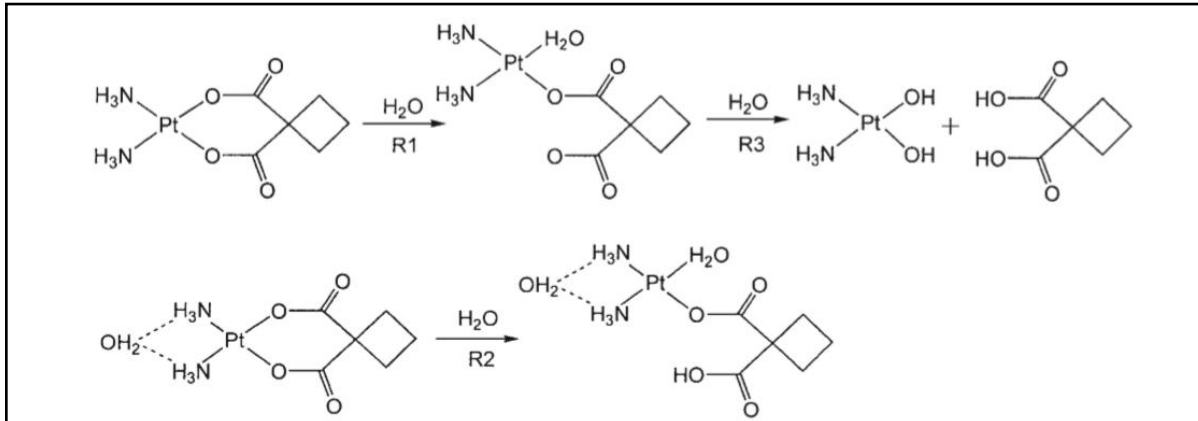


Abbildung 6: Reaktionsablauf zur Überführung von Carboplatin in seine aktive Form [75]

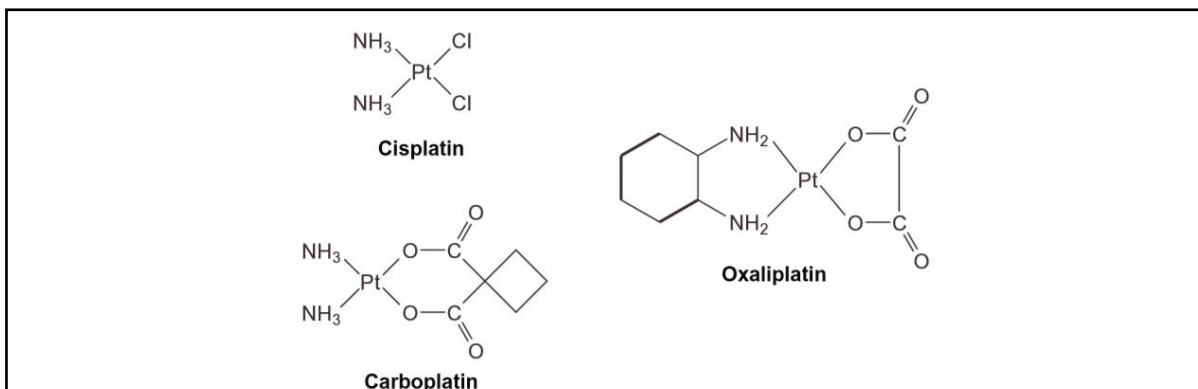


Abbildung 7: Strukturformeln der Platin-Verbindungen [76]

Carboplatin weist im Gegensatz zu Cisplatin, einem anderen Vertreter der platinhaltigen Zytostatika, eine stabilere Molekularstruktur auf (siehe Abb. 7).

Die daraus resultierende geringere Reaktionsfreudigkeit mit der DNA erfordert daher das Verabreichen von deutlich höheren Dosen an Carboplatin, um den gleichen therapeutischen Effekt wie bei Cisplatin zu erzielen. Simultan wird Carboplatin aber auch mit einer deutlich geringeren neuro- oder nephrotoxischen Wirkung assoziiert. Zudem reagiert es weniger stark mit Plasmaproteinen. Dennoch treten bei hohen Dosen Nebenwirkungen, wie etwa Knochenmarkssuppressionen auf [80, 84, 85]. Hinsichtlich der Ototoxizität divergieren die Meinungen in der Literatur. Weitgehende Einigkeit besteht in Anbetracht der deutlich geringeren ototoxischen Schädigung der Patienten im Vergleich zu Behandlungen mit Cisplatin. In einigen Veröffentlichungen werden mit Carboplatin ototoxischen Folgen nur

dann in Verbindung gebracht, sofern myeloablativen Dosen zur Therapie eingesetzt wurden [80, 86, 87]. In anderen wird vor allem bei der Behandlung von Kindern von deutlichen Risikosteigerungen für nachhaltige Gehörschädigungen berichtet [88]. Allgemeine Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Erbrechen sind bei Carboplatin geringer als bei Cisplatin [80].

### 1.3.3 Doxorubicin

Das auch als Adriamycin oder 14-Hydroxydaunomycin bekannte Doxorubicin entstammt der antineoplastischen Antibiotika-Gruppe der Anthracycline. Die Grundsubstanz für das Derivat wird aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius var. caesius* gewonnen. Doxorubicin wurde mittels Hydroxylierung aus Daunomycin 1969 entwickelt [89]. Der molekularstrukturelle Unterschied beider Anthrazykline beläuft sich lediglich auf eine zusätzliche Hydroxylgruppe am Doxorubicin (vergleiche Abb. 8) [90]. Der therapeutische Einsatzbereich des Doxorubicins ist allerdings deutlich größer, als der des Daunorubicins. Mittlerweile gehört es unter anderem in der pädiatrischen Onkologie zu den Standardchemotherapeutika für solide Tumoren [91].

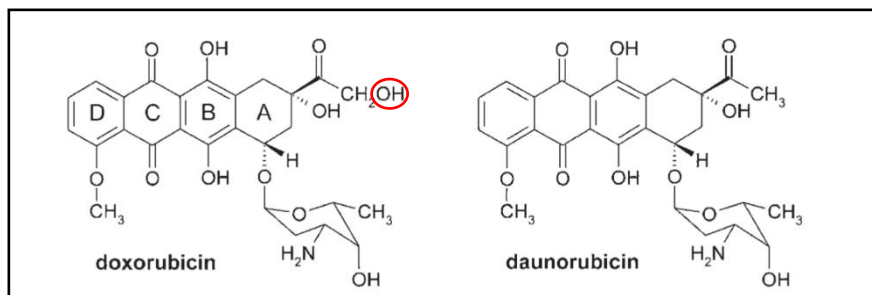


Abbildung 8: Strukturformeln der Anthrazykline Doxorubicin und Daunorubicin [92]

Beim Einsatz von Doxorubicin kommen verschiedene Wirkmechanismen zum Tragen. Trotz des inzwischen weitverbreiteten klinischen Einsatzes sind diese noch nicht vollständig entschlüsselt. Als einer der wichtigsten Angriffspunkte gilt die Topoisomerase II, die maßgeblich an der Reparatur der DNA-Stränge beteiligt ist. Dieses Enzym wird gespalten und seine Funktion damit inhibiert. Außerdem wird die Freisetzung freier Radikale, die eine Schädigung diverser Zellstrukturen (Zellmembran, Erbinformation, intrazelluläre Proteine) und damit den apoptotischen Zelluntergang herbeiführt, initiiert. Das Doxorubicin wird dabei in eine Semichinonstruktur oxidiert, wobei bei ihrer Rückreaktion zu Doxorubicin freie Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffspezies) als Nebenprodukt anfallen. Darüber hinaus

erfolgt eine sog. DNA-Interkalation, wobei die Transkription der Erbinformation durch ein Zwischenlagern der Wirkstoffmoleküle behindert wird [93-95].

Die Vielzahl an Wirkmechanismen bietet neben dem Vorteil eines breiten Wirkspektrums auch den Nachteil mehrerer unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Eine kritische Nebenwirkung stellt die dosisabhängige Kardiotoxizität des Doxorubicins dar [90]. Ob dabei eine eisenabhängige Bildung freier Radikale oder die Bildung eines Doxorubicinolmetabolites ursächlich ist, das zu einer Störung in den Mitochondrien führt, wird kontrovers diskutiert [93]. Weiterhin können akute Knochenmarksdepressionen auftreten, die Fieber, eine höhere Infektanfälligkeit, Sepsis und Gewebehypoxie nach sich ziehen können. Darüber hinaus treten häufig Übelkeit, Erbrechen und Alopezie auf [96].

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Das RMS und die mRT stellen nach wie vor eine immense Herausforderung für die bestehenden onkologischen Therapiekonzepte dar. Zwar konnten die Überlebensraten dank multimodaler Behandlungsoptionen in den vergangenen Jahrzehnten für das RMS deutlich verbessert werden, jedoch haben gerade Patienten mit einem Rezidiv eine überaus schlechte Prognose [11, 15, 25, 31-33].

Für die mRT (4-Jahres-Überlebensrate abhängig des Patientenalters bei z.T. unter 10 %) ist die Prognose deutlich schlechter als die der RMS. Selbst die primäre Therapie ist vor allem bei Patienten im Säuglingsalter mit einer sehr hohen Letalitätsrate assoziiert [43, 45, 55, 64].

Im Zuge der bisherigen Beobachtungen an anderen Tumorzelllinien *in vitro* und im Tiermodell besteht die Hoffnung mit dem Steroidenzymhemmer Istaroxim die Möglichkeit einer Erweiterung der Therapieoptionen zu eröffnen.

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, zu untersuchen, ob Istaroxim eine mögliche Ergänzung der multimodalen Therapieansätze beim RMS und mRT bietet und welche Vorteile sich bei einer Kombinationstherapie aus Zytostatika (Carboplatin oder Doxorubicin) und Istaroxim ergeben. Dazu stand die Frage der Wirkweise von Istaroxim auf die untersuchten Tumorzelllinien (RD, Rh30, A204) hinsichtlich der Inhibition wesentlicher Proliferations-, Migrations- und Viabilitätseigenschaften im Vordergrund.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Sofern keine anderweitigen Angaben gemacht wurden, befindet sich der Firmensitz des Herstellers aller aufgeführten Materialien in Deutschland.

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

Die Experimenten und Versuchsreihen, welche in dieser Arbeit vorgestellt werden, wurden unter Verwendung der Zelllinien des RMS (RD und Rh30) und des mRT (A204) durchgeführt. Bei den RMS-Zelllinien ist ein alveolärer (Rh30) sowie ein embryonaler (RD) Subtyp vertreten.

##### 2.1.1.1 RD

Die verwendete embryonale RMS-Zelllinie RD (siehe Abb. 9) entstammte der Beckenkammbiopsie eines 7-jährigen Mädchens, das vor der Entnahme bereits mit Cyclophosphamid behandelt und einer Radiatio unterzogen wurde. Es handelte sich demnach um ein Tumorrezidiv [97, 98]. Aus molekulargenetischen Untersuchungen geht hervor, dass die Zellen Myc-Amplifikationen [98, 99], homozygote Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 [98, 100, 101] und NRAS-Mutationen [102] aufweisen. Die Zellen konnten von der American Type Culture Collection (ATCC) aus Manassas, USA bezogen werden.



Abbildung 9: RD Zellkultur (36. Passage) bei 5-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop

### 2.1.1.2 Rh30

Die RMS-Zelllinie Rh30 (siehe Abb. 10) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig (DSMZ) bezogen. Die Biopsie wurde aus einer Metastase im Knochenmark eines alveolären RMS bei einem nicht vorbehandelten 16-jährigen jungen Mann entnommen [98]. Auch hier fanden sich bei der molekulargenetischen Diagnostik eine Mutation an p53 [98, 100, 101]. Darüber hinaus konnte die Expression der t(2;13)(q35;q14) Translokation nachgewiesen werden [98, 103].

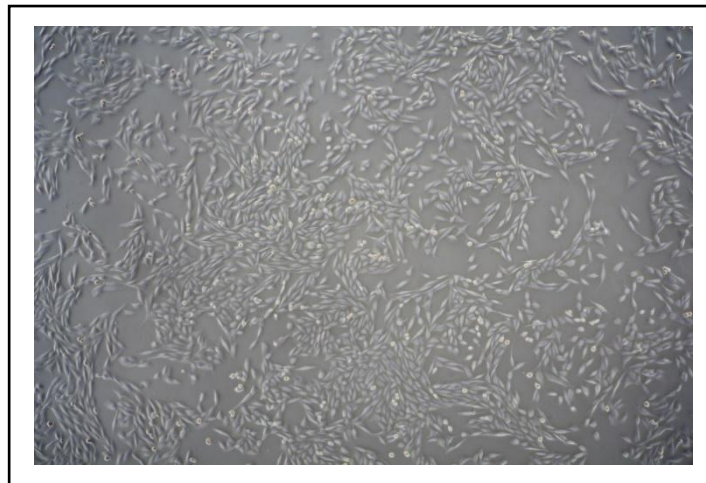


Abbildung 10: Rh30 Zellkultur (17. Passage) bei 5-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop

### 2.1.1.3 A204

Der in dieser Arbeit untersuchte Vertreter der mRT, die Zelllinie A204 (dargestellt in Abb. 11) stammte ebenfalls von der Firma ATCC (Manassas, USA). Die Zellen wurden aus dem Muskelgewebe eines 1-jährigen Kindes isoliert. Im Karyogramm ließen sich Di- und Tetraploidien nachweisen [104, 105].



Abbildung 11 : A204 Zellkultur (25. Passage) bei 5-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop

#### 2.1.1.4 SkMC

Um die Wirkung von Istaroxim auf nicht maligne bzw. gesunde Zellen zu ergründen, wurden in einigen Versuchen der Viabilitätsassayreihe auch mit humanen Skelettmuskelzellen (SkMC) gearbeitet. Die Zellen wurden laut der vertreibenden Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) von unterschiedlichen Skelettmuskeln erwachsener Spender isoliert. Auf das Markerprotein Myosin für quergestreifte Muskulatur wurden die SkMC-Zellen positiv getestet [106].

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Firmensitz
Aluminiumfolie 300 x 0.03 mm	Papstar, Kall
Cellstar Petrischalen 35x10mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Desinfektionsspray Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Einwegpinzetten, steril	Servoprax GmbH, Wesel
Einwegskalpelle, steril	Braun, Melsungen
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim
FACS-Röhrchen (5 ml Rundboden)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen mit Filter (peqGOLD SafeGuard 0,5 - 1500 µl)	Peqlab, Wilmington, USA
Gefrierbehälter (5100 Cryo Mr.Frosty)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Handschuhe Peha-soft nitrile GUARD	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kryoröhrchen Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt AG&Co, Nürmbrecht
Mikrotiterplatten 96-Vertiefungen	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer DHC-N01 (C-Chip)	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Maidstone, England
Pasteur-Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdB, Mainz
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (0,5 – 20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipetten (Falcon Serologische Pipette) (2, 5, 10, 25ml)	Corning Incorporated, New York, USA



Pipettenspitzen (0,5 – 20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10-200 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (0,5-10, 10-100,100-1500 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Deutschland GmbH, Mainz
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0,5ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 1,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilfilter (Easystrainer™ 40µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
WesternSure Pen	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Whatman Papier (Chromatography Papier 3mm)	Whatman, Maidstone, England
Zellkulturflaschen (Cellstar 75cm <sup>2</sup> , 125cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup>	Corning incorporated, New York, USA
Zellkulturplatte (6-, 12-, 96-Well, TC-Treated)	Corning Incorporated, New York, USA
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (15ml/50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zytostatika-Schutzmatte (56cmx41cm)	Berner International GmbH, Elmshorn

## 2.1.3 Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Pharmaka

### 2.1.3.1 Zellkultur

Chemikalie/Reagenz	Hersteller, Firmensitz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom GmbH, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Trypanblau (0,5%)	Biochrom GmbH, Berlin

Trypsin (Trypsin/EDTA, 0.05%, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
10x-PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> )	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
1x-PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom GmbH, Berlin

### 2.1.3.2 Western-Blot

Chemikalie/Reagenz	Hersteller, Firmensitz
Acrylamid Stammlösung	SERVA, Amstetten, Österreich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Cell Lysis Buffer (10X)	Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Cocktail Tabletten (Protease Inhibitor)	Roche, Mannheim
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteinauftragspuffer Roti-Load 1	Carl Roth, Karlsruhe
Protein-Marker IV10 - 170 kDa	Peqlab, Wilmington, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris – Base (Trizma base)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Western Blot Detektions Lösung (WesternSure-PREMIUM Chemiluminescent)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Western Sure Pen	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Rotiphorese 10x SDS-Page	Carl Roth, Karlsruhe

### 2.1.3.3 Viabilitäts-Assay

Chemikalie/Reagenz	Hersteller, Firmensitz
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	AppliChem GmbH, Darmstadt,
SDS Pellets (Natriumlaurylsulfat Pellets)	Carl Roth, Karlsruhe

### 2.1.3.4 Durchflusszytometrie

Chemikalie/Reagenz	Hersteller, Firmensitz
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg
Annexin V APC-conjugated	ImmunoTools, Friesoythe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Annexin Binding Buffer	ImmunoTools, Friesoythe
CellWASH solution	Becton Dickinson, Heidelberg

### 2.1.3.5 Colony-Forming-Assay

Chemikalie/Reagenz	Hersteller, Firmensitz
Kristallviolett-pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt

### 2.1.4 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung (in 5 % BSA in TBS-T)	Spezies	Bezugsquelle, Firmensitz
GAPDH (37 kDa)	1:1000	Hase	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase β1 (E-4)	1:200	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Sekundäre	Verdünnung (in 5 %	Spezies	Bezugsquelle, Firmensitz

Antikörper	Milchpulver in TBS-T)		
Anti-Rabbit	1:3000	Hase	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Anti-Mouse	1:2000	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

## 2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.1.5.1 Zellkultur

Medium/Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Einfríermedium	80 % DMEM 10 % FKS 10 % DMSO
Zellkulturmedium	88 % DMEM 10 % FKS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin

### 2.1.5.2 Western Blot

Medium/Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Zell-Lyse-Puffer (1x)	9 ml bidestilliertes Wasser 1 ml Cell Lysis Buffer (10x) 1 Cocktail Tablette (Protease Inhibitor)
SDS-Laufpuffer (1x)	100 ml SDS (10x) 900 ml bidest. Wasser
SDS-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris Base 144 g Glycerin 10g SDS Mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen
TBS (10x)	24,2 g Tris Base 80 g Natriumchlorid Mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

TBS-T (1x)	100 ml TBS (10x) 900 ml bidest. Wasser 1 ml Tween 20
Transferpuffer (10x)	24 g Tris Base 1 ml Tween 20 Mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen
Stripping Puffer	15 g Glycin 1 g SDS 10 ml Tween 20 Mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen
Milchpulverlösung 5%	5 ml Milchpulver 45 ml TBS-T
Milchpulverlösung 10 %	10 ml Milchpulver 40 ml TBS-T
BSA-Lösung 5%	5 ml Albumin Fraktion 5 20 ml TBS-T

### 2.1.5.3 Viabilitäts-Assay

Medium/Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Lysis-Puffer (10 ml)	9,94 ml DMSO 0,06 ml Essigsäure 1 g SDS Pellets
MTT-Reagenz (50 ml Stocklösung [5 mg/ml])	250 mg MTT 50 ml PBS

### 2.1.5.4 CFA

Medium/Lösung/Puffer	Zusammensetzung
1%ige Kristallviolett-Lösung (100 ml)	1 g Kristallviolettpulver 100 ml bidestilliertes Wasser

## 2.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto II (3 Laser: blau=488nm, rot=633nm und violett=405nm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
ELISA-Reader Milenia Kinetic Analyzer	Milenia Biotec GmbH, Gießen
Handzähler	Infactory
Inverses Mikroskop, Axiovert 135	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera AxioCam MR colour	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera Canon EOS 550D	Canon GmbH, Krefeld
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer Ikamog RH	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Leica DMI1	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Multipipette (Multipette Xstream)	Eppendorf AG, Hamburg
Odyssey Fc Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Photometer (BioPhotometer D30)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu Integra	Bioscience AG, Chur, Schweiz
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polyacrylamidgel-Gießstand	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage LP2200	Sartorius, Göttingen
Rollenmischgerät RM5	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön
Sterilbank (Msc-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Stickstofftank CryoSystem 4000 Chart	MVE BioMedical, Ball Ground, USA
Taschenrechner (Sharp EL-243S)	Sharp Devices Europe GmbH, München
Thermo-shaker PHMT SC20	Grant Instruments, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
UV-Spectrophotometer NanoDrop2000	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Vakuumpumpe EcoVac	Schuett-biotec GmbH, Göttingen
Vortexer VF2	Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg

### 2.1.7 Verwendete Software

Programm	Anbieter, Firmensitz
Adobe Reader	Adobe Systems, München
AxioVision 3.1	Carl Zeiss, Oberkochen
AxioVision Viewer 3.0	Carl Zeiss, Oberkochen
BD FACS Diva Software Version 8.0.1	Becton Dickinson, Heidelberg
EndNote X9	Clarivate Analytics, Boston, USA
EOS Utility	Canon GmbH, Krefeld
GraphPadPrism Version 7.00	GraphPad Software, La Jolla, USA
FACSCanto II System Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSDiva Software Version 8.0	Becton Dickinson, Heidelberg
LI-CORE Image Studio	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Office 365 Education Plus	Microsoft, München

## 2.1.8 Wirkstoffe und Zytostatika

Wirkstoff und Konzentration	Bezugsquelle
Carboplatin (10 000 µg/ml)	Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke
Doxorubicin (2000 µg/ml)	Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke
Istaroxim	National Hellenic Reserch Foundation, Institute of Biology, Medical Chemistry and Biotechnology, Athen, Griechenland
Vincristin (1000 µg/ml)	Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte zur Kultivierung oder zum Anlegen von Versuchen wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Die benötigten Verbrauchsmaterialien waren entweder steril verpackt, zuvor autoklaviert oder zumindest gründlich desinfiziert worden. An der Sterilbank selbst wurde zudem nur mit desinfizierten Handschuhen gearbeitet.

#### Auftauen

Die verwendeten Zellen waren im Stickstofftank der Abteilung der Kinderchirurgie und Kinderurologie der Universitätsklinik Tübingen bei etwa -160 bis -170 °C in Kryoröhrchen, in welchen sie sich in Einfriermedium (Zusammensetzung siehe unter „2.1.5.1 Zellkultur“) befanden, gelagert.

Die Kryoröhrchen wurden unter den vorgegebenen Sicherheitsbedingungen aus dem Stickstofftank entnommen und schnellstmöglich in einem Wasserbad (37 °C) solange geschwenkt, bis die Suspension vollständig aufgetaut war. Anschließend erfolgte eine Überführung der Suspension in 10 ml Medium. Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 12 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

#### Subkultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Reinkulturen in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Der Gasaustausch erfolgte mit Hilfe entsprechender Filter in



den Zellkulturflaschen. Um den Zustand der Zellen zu beurteilen wurde eine tägliche Kontrolle in Form einer Betrachtung unter dem Mikroskop durchgeführt. Besonderes Augenmerk galt dabei in erster Linie der Adhäsion der Zellen am Flaschenboden, der Konfluenz des Zellrasens, der Zellform sowie der Farbe des Zellkulturmediums.

Von diesen Faktoren war die regelmäßige Versorgung der Zellen abhängig. Etwa alle drei bis vier Tage mussten die Zellkulturen abhängig von deren individuellen Proliferationsverhalten passagiert werden (siehe Tab. 1). Voraussetzung für das Passagieren war eine Konfluenz des Zellrasens zwischen 80 und 90 %. Lag diese nicht vor, wurde lediglich das Zellkulturmedium ausgetauscht.

**Tabelle 1: Anteile der beibehaltenen Zellsuspension zum Passagieren der Zellen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Verbleibender Anteil</b>
Rh30	1/10
RD	1/5
A204	1/10

Das Passagieren diente der Reduktion der Zellzahl, dem Austausch des mittlerweile nährstoffarmen Zellkulturmediums und dem Entfernen abgestorbener Zellen und Zellbestandteile. Hierzu wurde das Zellkulturmedium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen anschließend einmalig mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden der am Flaschenboden adhärierende Zellrasen mittels Trypsin/EDTA-Lösung gelöst. Dabei handelt es sich um ein, aus verschiedenen Proteasen bestehendes Gemisch, das Peptidbindungen aufbricht und somit die Bindungen der Zellen an die Zellkulturflasche löst. Das Trypsin inkubierte solange im Brutschrank, bis die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche sichtbar in Suspension gegangen waren. Durch die nachfolgende Zugabe von Zellkulturmedium wurde die Trypsinwirkung aufgehoben, sodass die Zellen der Proteasewirkung nicht zu lange ausgesetzt waren.

Von der Zellsuspension wurde ein bestimmter Volumenanteil (vgl. Tab. 1) zur weiteren Kultivierung verwendet. Dieser wurde mit einem der Zellkulturflaschenkapazität entsprechenden Volumen an Zellkulturmedium aufgestockt (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2: Gesamtvolumen an Medium/Zellsuspension pro Zellkulturflasche

Zellkulturflasche	Gesamtvolumen: Medium/Zellsuspension
Cellstar 125cm <sup>2</sup>	13 ml
Cellstar 175cm <sup>2</sup>	25 ml

Um die Zellzahl ermitteln zu können, wurden 10µl Zellsuspension mit 10µl Trypanblau vermischt. Von der entstandenen Suspension wurde anschließend wiederum ein Volumen von 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Am Mikroskop konnten die Zellen unter dem 10er-Objektiv mit Hilfe eines Handzählers gezählt werden. Berücksichtigt wurden dabei nur diejenigen vitalen Zellen, die sich innerhalb eines der in 16-Felder aufgeteilten Zählquartals befinden. Zellen, die auf dem Rand eines Zählquartals liegen, werden nicht berücksichtigt. Die toten Zellen ließen sich von den vitalen Zellen durch ihre vollständige Blaufärbung durch das Trypanblau abgrenzen.

#### Zellzahlermittlung

Folgende Formel wurde zur Ermittlung der Gesamtzellzahl angewandt:

$$\frac{\sum(\text{Zellen})}{4} * 2 * 10 \mu\text{l} * V = \text{Gesamtzellzahl}$$

$\sum(\text{Zellen})$ : Anzahl gezählter Zellen

4: Anzahl der Zählquadrate

2: Verdünnungsfaktor der zur Zellzahlermittlung verwendeten Probe: 10 µl Suspensionsprobe + 10 µl Trypan-Blau, daraus folgt ein 1:1-Verhältnis und ein Verdünnungsfaktor von 2

10: Volumen des Zählquadrates, das ausgezählt wurde:

$$1\text{mm}^2 (\text{Flächeninhalt}) * 0,1 \text{ mm (Höhe)} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$$

Um die Rechnung zu vereinfachen, wird generell nicht mit 1/0,1, sondern mit dem entsprechenden Kehrwert, also 10 multipliziert.

V: Volumen der Gesamten Suspension in µl

Ausgehend von der Gesamtzellzahl kann eine gewünschte Verdünnung der Tumorzellen für die Experimente hergestellt werden.

## 2.2.2 Western Blot

### Hintergründe

Mit diesem molekularbiologischen Verfahren kann gezielt der Nachweis bestimmter Proteine anhand ihres spezifischen Molekulargewichts erfolgen. Der Western Blot erlaubt dabei eine qualitative und semiquantitative Beurteilung der zu detektierenden Proteine.

### Herstellung von Proteinlysaten

Es wurden RD, Rh30 und A204 mit einer Zellzahl von  $8 \times 10^5$  Zellen pro Well in einer 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät.

Sobald die Zellen eine 80 %-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden diese mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Zell-Lyse-Puffer inkubiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit auf Eis wird die lysierte Zellsuspension in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 1500 rpm für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand, der anschließend abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert wurde, enthielt das Proteinlysat. Dieses wurde zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### Proteingehaltmessung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen und die Proben später auf eine Proteinkonzentration einstellen zu können, muss zunächst anhand des photometrischen Bradford-Tests eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proteinlysate erfolgen.

Der dabei eingesetzte Coomassie-Brillantblau-G-250 Farbstoff (Abb. 12), der im Bradford-Reagenz enthalten ist, bildet in seiner anionischen Form mit den unpolaren Proteinseitenketten blau erscheinende Komplexe aus.

Diese verschieben das Absorptionsmaximum von 470 nm des ursprünglich roten Farbstoffes auf ein Maximum von 595 nm. Der sich damit veränderte Extinktionskoeffizient lässt demzufolge Rückschlüsse auf den Proteinanteil des Lysates zu [107, 108].

Zur Extinktionsmessung wurden die Proben wie folgt vorbereitet: In eine Küvette wurden 795  $\mu\text{l}$  bidest. Wasser, 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz und 5  $\mu\text{l}$  des zu untersuchenden Proteinlysats pipettiert. Alles wurde gründlich vermischt und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

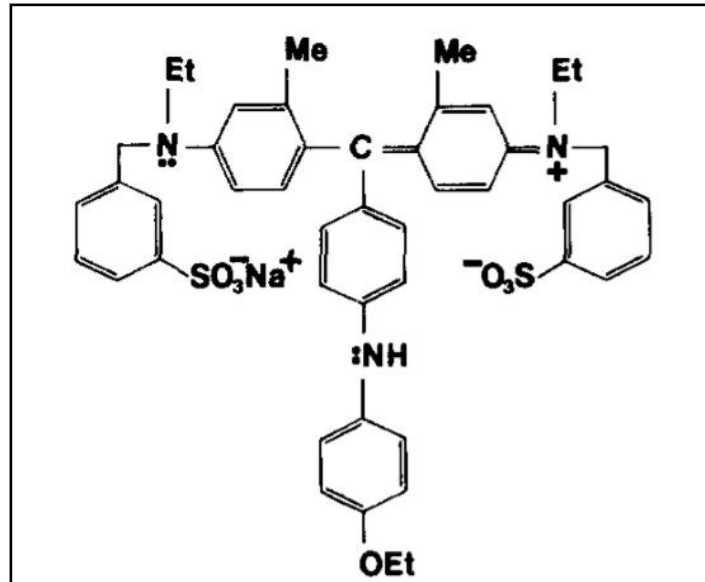


Abbildung 12: Strukturformel des Coomassie-Brillantblau G-250 Farbstoffes [107]

Im nächsten Schritt wurde die Lichtabsorption der Proben bei einer Wellenlänge von 596 nm im Spektralphotometer gemessen. Vor der Messung der ersten Probe erfolgte eine Kalibrierung des Gerätes mit einer Küvette, die 795  $\mu\text{l}$  bidest. Wasser, 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz und 5  $\mu\text{l}$  Zell-Lyse-Puffer enthielt.

### Probenvorbereitung

Von jedem Proteinlysats wurden 30  $\mu\text{g}$  Proteine in einem Probenvolumen von 35  $\mu\text{l}$  zur Untersuchung im Western Blot benötigt. Das mit 30  $\mu\text{g}$  korrelierende Volumen wurde mithilfe der BSA-Standardkurve errechnet.

Für die Probenherstellung wurden die Proteinlysate langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die errechnete Menge an Proteinlysats zum entsprechenden Volumen an Ladepuffer (Roti load) pipettiert. Nun konnte die Probe mit Lysepuffer (RIPA-Buffer) auf das Gesamtvolumen von 35  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und kräftig resuspendiert werden. Bei 96  $^{\circ}\text{C}$  wurden die Proteinproben nachfolgend für 5 min denaturiert.

## Herstellung der Gele für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) angewendet [109]. Die Diskontinuität dieser Methode geht auf die Anwendung zweier verschiedener Gele mit unterschiedlichen Porengrößen und pH-Werten zurück. Durch diese Unterschiede kann eine schärfere Auftrennung der Proteinbanden erfolgen [110].

Bevor die Gele gegossen werden, müssen die Gießstände vorbereitet und aufgebaut werden. Zunächst musste das Trenngel hergestellt werden. Die Bestandteile wurden der Auflistungsreihenfolge nach, wie in Tabelle 3 gezeigt, in ein Falcon pipettiert. Es war darauf zu achten, dass die letzten drei Komponenten mit kurzen zeitlichen Abständen zusammengeführt wurden, da der Aushärtungsvorgang mit Zugabe des SDS einsetzt. Das Trenngel wurde nun unmittelbar und möglichst blasenfrei in den Gießstand überführt und mit Isopropanol bedeckt, um eine glatte Oberfläche gewährleisten zu können.

Nach dem Aushärten des Trenngels konnte das Sammelgel nach demselben Prinzip hergestellt werden. Bevor es in den Gießstand auf das Trenngel pipettiert wurde, musste das Isopropanol abgeschüttet und dessen Reste vorsichtig mit einem Papiertuch abgenommen werden. Nach dem Überschichten des Trenngels wurde ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesetzt, welcher die Taschen für die Proteinproben formte.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE**

<b>Gel</b>	<b>Verwendete Reagenzien und Chemikalien</b>
Trenngel (20 ml)	7,9 ml Aqua bidest. Millipore 6,7 ml 30% Acrylamid Mix 5,0 ml TRIS 1,5M (pH 8,8) 0,2 ml 10% SDS 0,2 ml 10% Ammonium Persulfat 0,008 ml TEMED
Sammelgel (6 ml)	4 ml Aqua bidest. Millipore 1ml 30% Acrylamid Mix 0,75 ml TRIS 1M (pH 6,8) 0,06 ml 10% SDS 0,06 ml 10% Ammonium Persulfat 0,006 ml TEMED

### Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zunächst wurden die Proben auf Eis langsam aufgetaut und resuspendiert. Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresevorrichtung eingesetzt. Die Kammern der Elektrophoresevorrichtung wurden mit SDS-Laufpuffer (1x) gefüllt und die Kämme für die Formgebung aus den Probestaschen gezogen. Anschließend wurden die Proben (35 µl) und die Proteinleiter (5 µl) jeweils in separate Taschen des Sammelgels pipettiert. Der Elektrophoresevorgang erfolgte etwa für 90 min unter einer konstanten Spannung von 120 V.

### Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran

Um die Proteinbande vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen, wurde das Gel auf die entsprechend zugeschnittene Membran gelegt und mit Transferpuffer (1x) befeuchteten Filterpapierzuschnitten umhüllt. Alles zusammen musste nun zwischen zwei Schwämme in eine Kassette für die Blotkammer eingebracht werden (siehe Abb. 13). Vor dem Proteintransfer musste sichergestellt werden, dass sich keine Lufteinschlüsse zwischen der Membran und dem Gel befinden. Die Blotkammer wurde vor dem Einsetzen der Kassette mit Transferpuffer (1x) gefüllt und mit Eis gekühlt. Der Proteintransfer erfolgte über einen Zeitraum von 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA.

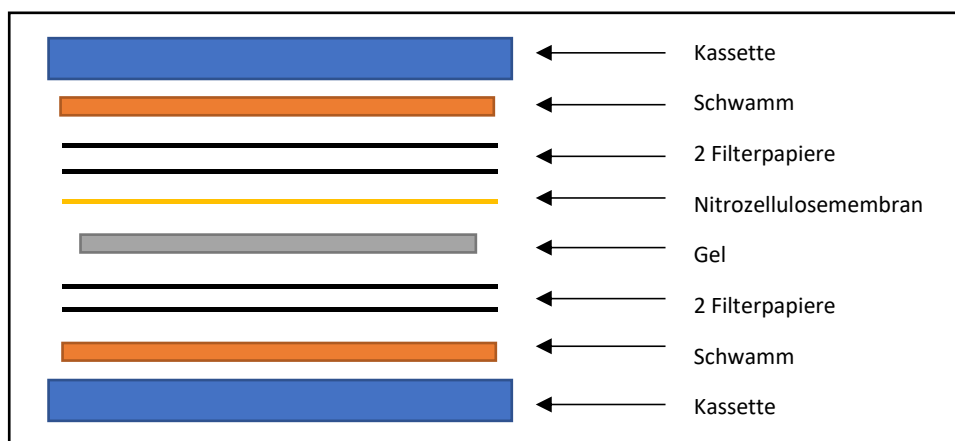


Abbildung 13: Aufbau der zusammengesetzten Blottingkassette

### Immundetektion der Zielproteine

Unmittelbar nach dem Proteintransfer wurden die freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran mittels einer einstündigen Inkubation in Milchpulverlösung (10 %) geblockt. Daraufhin konnte die Membran mit dem Primärantikörper (siehe unter 2.1.5) inkubiert werden. Dies erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur.

Die Membran wurde nachfolgend dreimal für jeweils 15 min mit frischem Tris-Puffer mit Tween20 (TBS-T) gewaschen und im Anschluss für 1 h mit dem Zweitantikörper (siehe unter 2.1.5) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach schlossen sich drei weitere 15-minütige Waschschrte mit TBS-T an.

Im finalen Arbeitsschritt wurde die Membran 5 min lang mit Luminol-Lösung beträufelt. Das Luminol wird von der Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt war, oxidiert. Bei dieser Reaktion wird ein Photon im blauen Lichtspektrumsbereich emittiert. Dieses kann vom CCD Kamera System Odyssey® Fc erfasst und von der zugehörigen LI-CORE Image Studio-Software verarbeitet werden.

## 2.2.3 Viabilitäts-Assay

### Hintergründe

Der an dieser Stelle beschriebene MTT-Assay [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assay] dient dem Metabolismuskachweis. Da mitochondriale Stoffwechselaktivitäten allerdings eng mit den Vitalparametern verknüpft sind, gibt dieser Test Hinweise auf die Viabilität, Proliferationsrate und Stoffwechsellage einer Zelle z.B. unter Einfluss eines Medikaments. Der gelbliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird dabei unter Einfluss zellulärer Reduktionsäquivalente, die primär von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums und zum Teil von der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase abhängig sind, zu violetten Formazankristallen verstoffwechselt (siehe Abb. 14). Diese Reduktion findet proportional zur Zellzahl statt, weshalb sie ein Indiz für die Viabilität sein kann [111, 112].

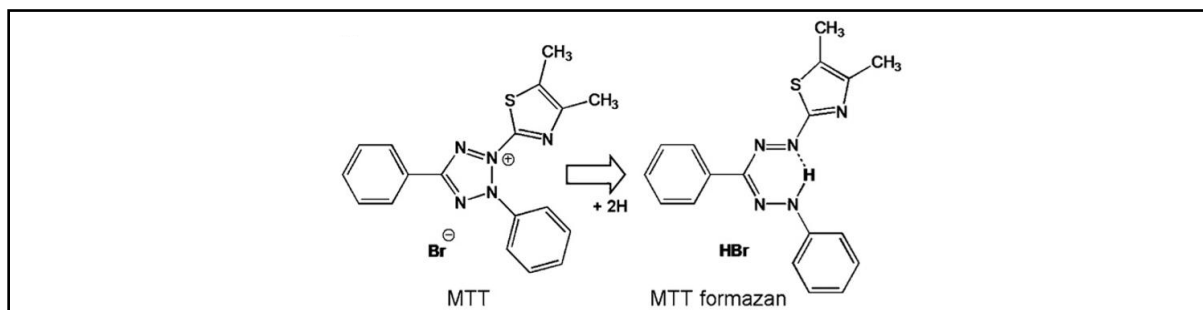


Abbildung 14: Reaktionsablauf des Viabilitäts-Assays mit chemischen Strukturformeln des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) - Formazans [112]

### Herstellung des MTT-Reagenz

Der Farbstoff MTT liegt zunächst als Pulver vor, welches in PBS gelöst wurde. Die Rezeptur setzt sich wie folgt zusammen:

5 µg/ml MTT-Reagenz wurden in PBS gelöst und durch einen Filter mit der Partikelgröße von 0,22 µm filtriert. Nun wurde das Filtrat aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### Lyse-Puffer: Herstellung und Funktion

Durch den Lyse-Puffer ist es möglich, die wasserunlöslichen Formazankristalle zu lösen und somit eine aussagekräftige Lichtabsorptionsmessung durchführen zu können. Hergestellt werden 200ml Lyse-Puffer wie folgt:

1,2 ml Essigsäure, 198,8 ml DMSO und 20 g SDS werden zusammen gelöst.

### Vorgehen

Zunächst wurden  $8 \times 10^5$  Zellen in 100 µl Zellsuspension in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und über Nacht inkubiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte anschließend mit den Zytostatika Doxorubicin und Carboplatin sowie Istaroxim in unterschiedlichen Konzentrationen, Kombinationen und über verschieden lange Zeiträume (24 h, 48 h und 72 h), wie in Abb. 15 beschrieben. Es ist zu beachten, dass einige Wells zur Lösungsmittelkontrolle (Zellkulturmedium mit Zusätzen und DMSO) und zur Negativkontrolle (Zellkulturmedium mit Zusätzen) dienen. Nach der Inkubationszeit wurden 25 µl MTT-Reagenz zu jedem Well hinzupipettiert und 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im nachfolgenden Arbeitsschritt wurde das Medium aus den Wellplatten durch vorsichtiges Umstülpen verworfen. Danach wurde jedes Well mit 100 µl Lyse-Puffer versehen. Die 96-Well-Platten wurden für etwa 2 Minuten gerüttelt, um eine gleichmäßige Lösung der Formazankristalle zu erhalten.

Es entstand dabei eine homogene Färbung innerhalb der einzelnen Wells. Nun konnte die Platte mit Hilfe der spektrophotometrischen Messung (ELISA-Reader) bei 560 nm gemessen werden.



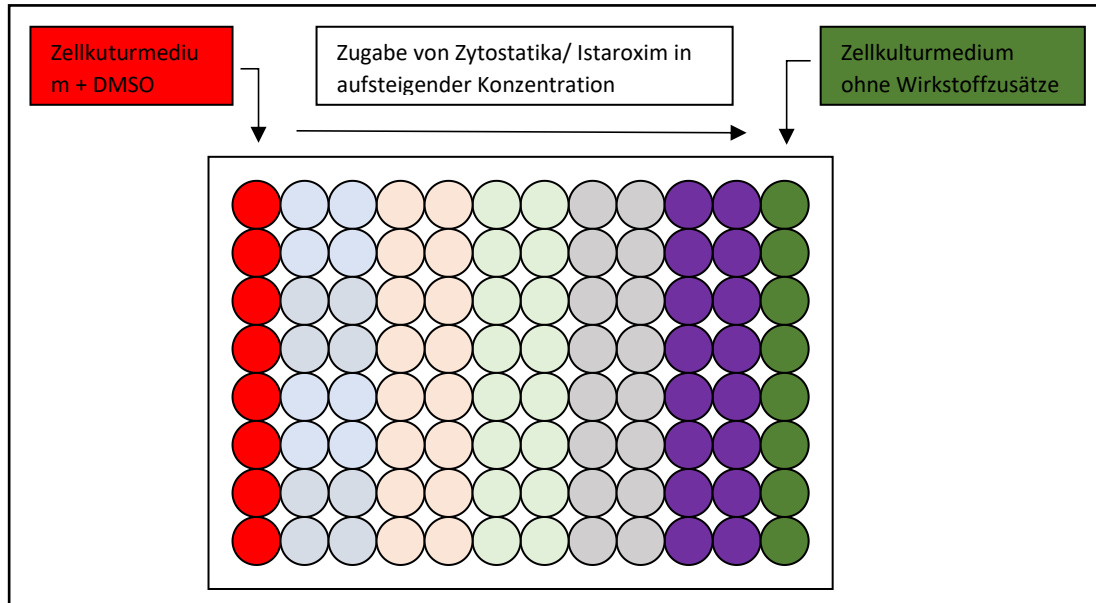


Abbildung 15: Einteilung der 96-Well Zellkulturplatten für die Viabilitäts-Assays

## 2.2.4 Wound-Healing-Assay

### Hintergründe

Beim Wound-Healing-Assay soll ermittelt werden, wie sich die Zellmigration unter Einfluss eines Wirkstoffes im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle verhält. Es kann dadurch eine annähernde Prognose des Migrationsverhaltens der Zellen *in vivo* getroffen werden.

Beobachtet wird im Versuch die Wiederbesiedelung der Zellen eines konfluierenden, adhärenen Zellrasens, dem ein Defekt zugefügt wurde. Die Heilung dieses Defektes erfolgt durch eine Modifikation der interzellulären Kontakte und der Regulierung des Interaktionsverhaltens zwischen den Zellen und ihrer extrazellulären Matrix [113].

### Vorgehen

Zunächst wurde eine bestimmte Zellzahl in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Im Falle dieser Versuche wurden die Zellzahlen für die einzelnen Zelllinien nach vorheriger Austitration wie in Tabelle 4 gewählt. Das wesentliche Kriterium war ein zu 80 % konfluenter Zellrasen beim Zufügen des Defektes.

Tabelle 4: Zellzahl pro Well im Wound-Healing-Assay

Zelllinie	Ausgesäte Zellzahl pro Well
RD	$6 \times 10^5$
Rh30	$8 \times 10^5$
A204	$8 \times 10^5$

Auf der Rückseite des Bodens der Zellkulturplatte wurden zuvor drei horizontale Markierungslinien gezogen (dargestellt in Abb. 16). Diese dienten im weiteren Verlauf zur Orientierung, um stets die gleichen Stellen des Defektes zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander vergleichen zu können. Es wurde dafür gesorgt, dass sich in jedem Well etwa 2 ml Zellsuspension befanden.

Mit einer 100 µl-Pipettenspitze wurde vorsichtig ein zu den Markierungen orthogonaler Defekt von etwa 1 mm Breite dem Zellrasen zugefügt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und mit Istaroxim (A204 mit 5 µM Istaroxim, RD und Rh30 mit 10 µM Istaroxim) behandelt, sodass sich erneut 2 ml Volumen in den Wells befanden.

Zudem wurden eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO in äquivalenter Konzentration zur jeweiligen Istaroximbehandlung) und eine Negativkontrolle (nur Zellkulturmedium mit Zusätzen) angesetzt.

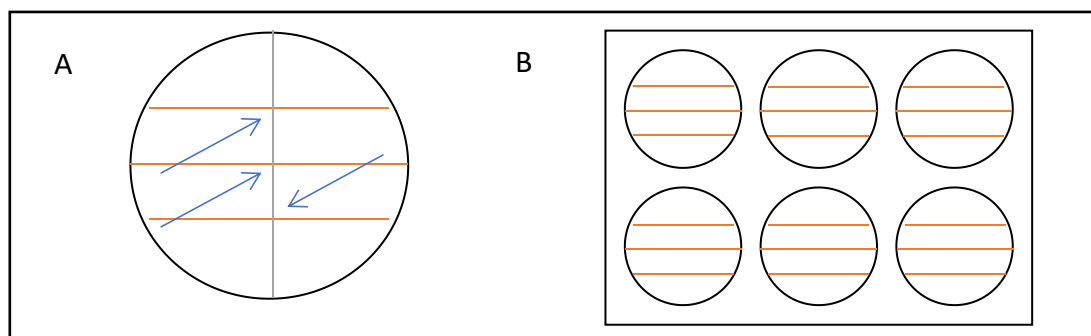


Abbildung 16: Schematische Darstellung der vorbereiteten Zellkulturplatten für Wound-Healing-Assays

(A) Darstellung der Bildaufnahme für die Wound-Healing-Assays mit vertikalem Defekt im Zellrasen.

(B) Markierung der Zellkulturplatten für die Wound-Healing-Assays

Der dem dichten Zellrasen zugefügte mechanische Defekt wird im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle und einer Negativkontrolle über einen Zeitraum von 24 h in 8-stündigen Intervallen (0 h, 8 h, 16 h, 24 h) auf eine Wiederbesiedelung mit Zellen untersucht. Hierzu wurden mit Hilfe einer Kamera Bilder der Defekte im Zellrasen an den zu Beginn gekennzeichneten Stellen aufgenommen (dargestellt in Abb. 16). Bei der Zelllinie A204 wurde zudem nach 30 h ein letztes Kontrollbild angefertigt.

Mittels der AxioVision Software konnte ermittelt werden, inwieweit sich die Defektfläche an den drei Beobachtungsstellen im Zeitverlauf eingengt hatte. Die Mittelwerte der Flächeninhalte des Defektes aus den drei Beobachtungsstellen pro Well nach 24 h bzw. 30 h (bei der Zelllinie A204) wurden mit den Mittelwerten selbiger zu Versuchsbeginn in Relation gesetzt.

## 2.2.5 Durchflusszytometrie

### Hintergründe

Dieses Verfahren dient der Identifikation und Quantifikation von Einzelzellen in einer zu analysierenden Zellsuspension. Dabei können neben der Zellzahl und -population auch die Größe und die Dichte der Granula in den Zellen in sehr kurzer Zeit erfasst werden [114, 115].

Zunächst werden die Zellen hydrodynamisch in einem Hüllstrom vereinzelt. Dem eigentlichen Analyseverfahren liegt die Messung der Streulichtemission der Einzelzellen zugrunde, welche diese beim Passieren eines Laserstrahls aussenden. Diese Lichtsignale werden von entsprechenden Photodetektoren registriert und in elektrische Signale umgewandelt (dargestellt in Abb. 17).

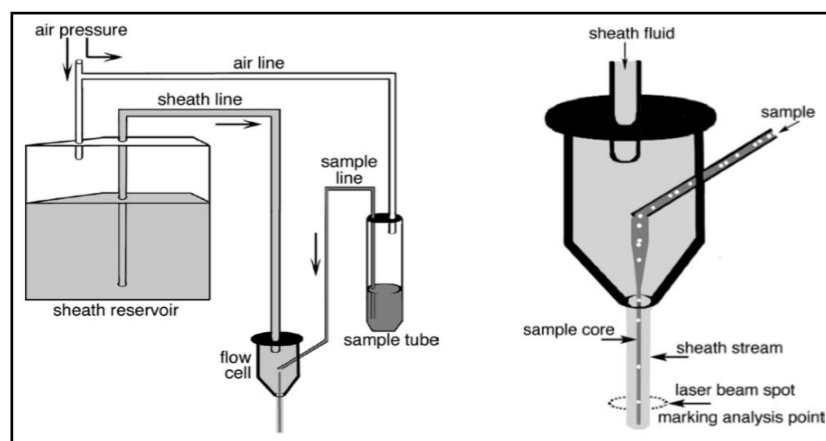


Abbildung 17: Vereinfachte Schemadarstellung der Durchflusszytometrie [116]

Dazu erfolgt eine Einteilung des Streulichtes abhängig von dessen Streuwinkel in Vorwärtsstreulicht, das in einem flachen Winkel zum Laserstrahl emittiert wird (sog. *FCS = forward light scatter*) und in Seitwärtsstreulicht, das orthogonal zum Laserstrahl gestreut wird (sog. *SSC = side light scatter*) (siehe Abb. 18). Die Intensität des Vorwärtsstreulichts (FCS) steht in direkter Relation zur Zellgröße, während eine hohe Seitwärtsstreulichtintensität (SSC) mit der höheren Dichte der Granula einer Zelle korreliert [117].

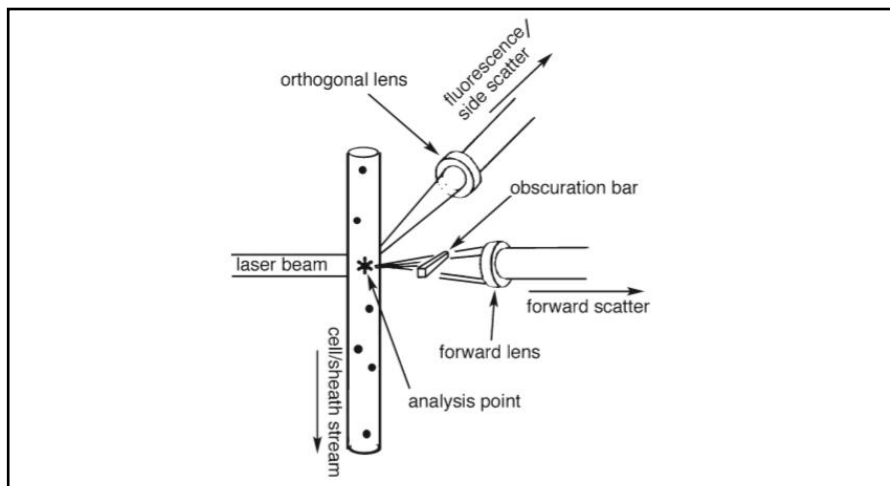


Abbildung 18: Übersicht über die Streulichtwinkel bei der Durchflusszytometrie [116]

Simultan kann auch die Fluoreszenz der Zellen gemessen werden. Die verschiedenen Zellsuspensionen werden hierzu vor der Durchflusszytometrie mit entsprechenden, an Antikörper gekoppelten, fluoreszierenden Farbstoffen inkubiert, die an bestimmte Zellbestandteile wie etwa Oberflächenantigene oder intrazelluläre Proteine binden. Diese sog. Fluorochrome werden durch die Laserbestrahlung zur Absorption der durch den Laser emittierten Lichtenergie angeregt, welche sie kurz darauf ihrerseits wieder abgeben. Die Wellenlänge dieses Lichts wird dabei von den Detektoren erfasst und verarbeitet [116].

#### Differenzierungsnachweis zwischen Apoptose und Nekrose

Um zwischen Nekrose und Apoptose differenzieren zu können, wurden die Substanzen Annexin V (APC = Allophycocyanin) und Propidiumiodid (PI) eingesetzt.

Im Immunsystem erkennen Makrophagen apoptotische Zellen unter anderem daran, dass sie das Phosphoglycerid Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Markierung kann sich bei der Detektion apoptotischer Zellen bei der Durchflusszytometrie ebenfalls zunutze gemacht werden, indem man fluorchrom-markiertes Annexin V einsetzt, welches als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein eine hohe Bindungsaffinität zu

Phosphatidylserin aufweist. Da sich das Phosphatidylserin an lebenden Zellen nicht auf der Außenseite der Zellmembran finden lässt, kann durch die Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V zwischen lebenden und apoptotischen Zellen differenziert werden [118-120].

Da der Zelluntergang bei der Apoptose das Resultat eines kontrollierten physiologischen Programmes ist, während er im Falle einer Nekrose auf Grundlage eines mechanischen Defektes geschieht, können morphologische und biochemische Faktoren zu deren Unterscheidung bei der Analyse herangezogen werden. PI lagert sich an die DNA einer Zelle an und kann somit nekrotische Zellen markieren. Bei Zellen, deren Membran noch intakt ist – so auch frühapoptotische Zellen – kann die PI-Färbung der DNA nicht erfolgen, da der Farbstoff die Membran nicht passieren kann. PI-positive Zellen sind demzufolge nekrotisch oder in einer späten Apoptosephase, in welcher die Zellmembran bereits nicht mehr vollständig intakt ist (vgl. Abb. 18) [121].

**Tabelle 5: Übersicht über mögliche Messergebnisse bei der FACS-Messung hinsichtlich Apoptose und Nekrose**

	<b>APC Annexin V</b>	<b>PI</b>
Lebende Zellen	-	-
Frühe Apoptose	+	-
Späte Apoptose	+	+
Nekrose	-	+

### Vorgehen

In einer 12-Well-Zellkulturplatte wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubationszeit im Brutschrank zu den unter 2.2.1 angegebenen Bedingungen erfolgten die in den Tabellen 6 und 7 angegebenen Behandlungen. Im Falle der Lösungsmittelkontrolle wurde an DMSO das Konzentrationsäquivalent zur höchsten Istaroximkonzentration eingesetzt.

**Tabelle 6: Behandlung der Zelllinie A204 für die durchflusszytometrische Zelltodanalyse**

*Jede Spalte in der Tabelle repräsentiert eine Behandlungsvariante im Versuch.*

<b>A204</b>								
<b>Carbo- platin</b>	-	-	-	15 µM	15 µM	15 µM	-	-
<b>Ista- roxim</b>	5 µM	7,5 µM	10 µM	12,5 µM	-	-	-	-
<b>DMSO</b>	+	+	+	+	-	+	-	+

**Tabelle 7: Behandlung der Zelllinie RD & Rh30 für die durchflusszytometrische Zelltodanalyse**

*Jede Spalte in der Tabelle repräsentiert eine Behandlungsvariante im Versuch.*

<b>RD/Rh30</b>						
<b>Carbo- platin</b>	-	-	15 µM	15 µM	-	-
<b>Ista- roxime</b>	10 µM	12,5 µM	15 µM	-	-	-
<b>DMSO</b>	+	+	+	-	-	+

Nach 72 h Behandlungsdauer wurden die Zellen geerntet, mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation mit 1500 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und das verbliebene Zellpellet mit 2 ml Annexin-binding-Puffer (1x) resuspendiert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Proben erneut bei Raumtemperatur für 5 min mit 1500 rpm zentrifugiert, woraufhin der Überstand abermals verworfen und das Zellpellet mit 200 µl Annexin-Binding-Puffer resuspendiert wurde.

Nachfolgend wurden die Proben jeweils mit 3,5 µl APC Annexin V und 3,5 µl PI versetzt, gevortext und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. In jede Probe wurde noch vor der Messung 200 µl CellWASH-Lösung pipettiert.

## 2.2.6 Colony-Forming-Assay (CFA)

### Hintergründe

Der Colony-Forming-Assay stellt eine Möglichkeit zur *in vitro*-Untersuchung des klonogenen Wachstumsverhaltens einzelner Zellpopulationen dar. Anhand der Fähigkeit der Zellen durch Zellteilung neue Zellkolonien auszubilden, können Rückschlüsse auf den Einfluss des zu untersuchenden Wirkstoffes gezogen werden [122].

### Vorgehen

Die Zelllinien RD, Rh30 und A204 wurden jeweils in einer Zellzahl von  $7,5 \times 10^2$  Zellen pro Well in einer 2 ml-Suspension in einer 6-Well-Zellkulturplatte angelegt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Im nächsten Arbeitsschritt des Versuches erfolgte eine Behandlung mit Istaroxim in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 8), sowie eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO entsprechend der höchsten Istaroxim-Konzentration im jeweiligen Versuch und einer Negativkontrolle (nur Zellkulturmedium mit Zusätzen).

Tabelle 8: Istaroxim-Konzentrationen für den Colony-Forming-Assay (CFA)

Zelllinie	Verwendete Istaroxim-Konzentrationen
A204	0,75 $\mu\text{M}$
	1,25 $\mu\text{M}$
	2,5 $\mu\text{M}$
	5 $\mu\text{M}$
	DMSO: 5 $\mu\text{M}$
RD & Rh30	1,25 $\mu\text{M}$
	2,5 $\mu\text{M}$
	5 $\mu\text{M}$
	7,5 $\mu\text{M}$
	DMSO: 7,5 $\mu\text{M}$

Nach 72 h erfolgte ein einmaliger Waschschrift mit PBS. Nach einer anschließenden Zugabe von Zellkulturmedium ohne Wirkstoff- oder Lösungsmittelzusätze wurde die Behandlung beendet. Das Kolonienwachstum wurde weiterhin regelmäßig unter dem Mikroskop geprüft.

Sobald die Kolonien im Kontrollversuch deutlich ausgebildet waren (i.d.R. nach 10-14 Tagen), erfolgte die Färbung der einzelnen Zellkolonien.

Zunächst wurde das Medium abgenommen und anschließend die Zellen vorsichtig mit etwa 5 ml PBS gewaschen. Es wurde darauf geachtet das PBS langsam am Rand der Zellkulturplatte einfließen zu lassen, um ein mögliches Ablösen der adhätierenden Zellkolonien vom Plattenboden zu verhindern. Die Wells wurden im nächsten Schritt mit 80-prozentigem Methanol für 5 min unter leichtem Schwenken der Platte inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Daraufhin wurde das Methanol abgenommen. Die Platten wurden danach für weitere 5 min offen aufgestellt, um eine Verdunstung des übrigen Methanols gewährleisten zu können.

Nachfolgend wurden die Kolonien der RD-Zellen für 30 min und die der Rh30- und A204-Zellen für 120 min in einer 1 %igen Kristallviolettlösung inkubiert. Die Färbelösung wurde daraufhin abgenommen und die Platten mit demineralisiertem Wasser gewaschen.

Für die Auswertung wurde auf jeder Platte unter dem Mikroskop eine Kolonie von 40-60 Zellen gesucht, die als Referenz für die Größe eine Kolonie diente. Anhand dieser Referenzkolonie wurde die Anzahl der Kolonien aus den jeweiligen Versuchsansätzen ausgezählt und mit ihrer Kontrolle in Relation gesetzt.

### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Die Graphen- und Datenauswertung der, in dieser Arbeit angeführten Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Version 8.00 Software.

Alle erhobenen Daten, die diese Arbeit umfasst, wurden einer statistischen Prüfung durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Der Dunnett-Test wurde zur Signifikanzanalyse in Bezug auf einen Kontrollversuch eingesetzt. Der Bonferroni-Test diente darüber hinaus zur Untersuchung der statistischen Signifikanz in Bezug auf mehrere



Relationswerte. Das Signifikanzniveau wurde als  $p < 0,05$  festgelegt. Der Grad der Signifikanz ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Signifikanzkennzeichnung

$p \leq$	Signifikanzkennzeichnung
0,05	*
0,01	**
0,001	***
0,0001	****

Alle Versuche wurden mindestens in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Anzahl (n) der Einzelversuche einer Versuchsreihe ist in dieser Arbeit in der Abbildungsbeschreibung des zugehörigen Graphen hinterlegt.

Die dargestellten Graphen sind darüber hinaus mit dem zugehörigen Standardfehler (SEM) der Werte abgebildet.

Für die Analyse der Zellviabilität bei Kombinationstherapien wurde geprüft, ob synergistische oder additive Effekte vorlagen. Diese wurden nach folgender Formel berechnet [123]:

$$CDI = [(A + B) - (A \times B)]$$

CDI = Koeffizient für die Wirkstoffinteraktion (*coefficient of drug interaction*)

A = Verhältnis der Veränderung eines untersuchten Parameters (z.B. Zellviabilität) durch Wirkstoff 1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

B = Verhältnis der Veränderung eines untersuchten Parameters (z.B. Zellviabilität) durch Wirkstoff 2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

AB = Verhältnis der Veränderung eines untersuchten Parameters (z.B. Zellviabilität) durch die Wirkstoffkombination aus 1 und 2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

Es wird sich bei der Berechnung immer auf den gleichen Parameter bezogen.

Die vorliegenden Effekte können Tabelle 10 entnommen werden:

**Tabelle 10: Erklärungen des Koeffizienten für die Wirkstoffinteraktion (coefficient of drug interaction)**

CDI < 1	Synergistischer Effekt
CDI = 1	Additiver Effekt
CDI > 1	Antagonistischer Effekt

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expressionsprofil der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Eine zentrale Frage zu Beginn dieser Forschungsarbeit bestand darin, ob und in welcher Ausprägung die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auf den verwendeten Tumorzelllinien exprimiert wird. Hierzu erfolgten Analysen mittels Western Blot. Dabei wurden je ein Vertreter der alveolären (Rh30) und embryonalen (RD) RMS-Zelllinien, sowie eine mRT-Zelllinie A204 und die benignen Skelettmuskelzellen (SkMC) untersucht.

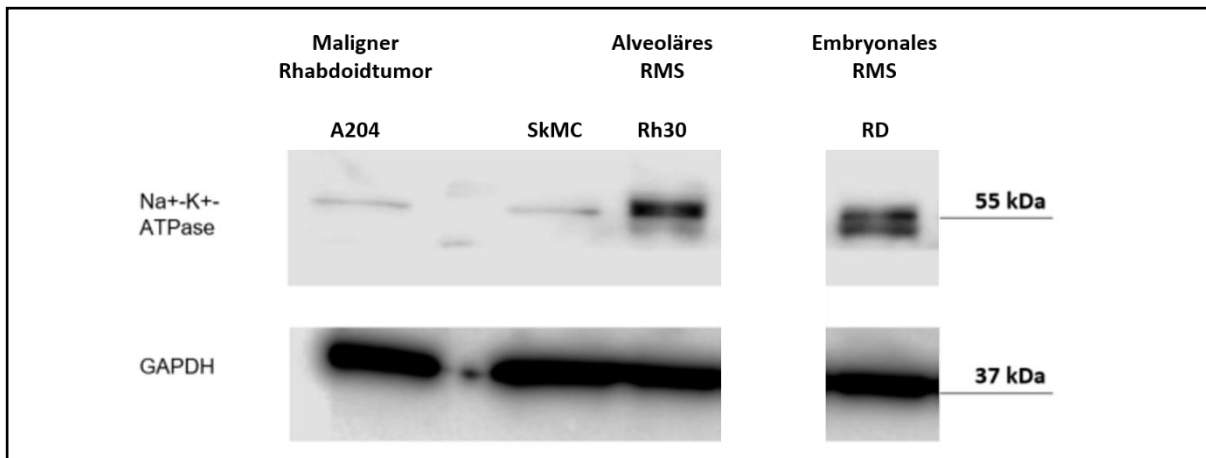


Abbildung 19: Expressionsprofil der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in den Zelllinien kindlich solider Tumoren und der Skelettmuskelzelle SkMC. Aus Tumorzellen bzw. aus den Skelettmuskelzellen (SkMC) wurden Proteinlysate gewonnen und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (spezifische Molekulargewicht: 55 kDa) mittels Western Blots detektiert. Als *housekeeping gene* diente GAPDH. A204 = Maligner Rhabdoidtumor; SkMC = humane Skelettmuskulatur; Rh30 = alveoläres Rhabdomyosarkom (ARMS); RD = embryonales Rhabdomyosarkom (ERMS).

Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnte die Expression der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in allen untersuchten Zelllinien gezeigt werden. Die kräftigsten Expressionen ließen sich bei den ERMS-Zelllinien RMS 33-2, SRH und RD und bei der ARMS-Zelllinie Rh30 erkennen. Die schwächste Expression der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase stellte sich bei der Zelllinie A204 (mRT) und SkMC dar.

## **3.2 Analysen der Zellviabilität mittels MTT**

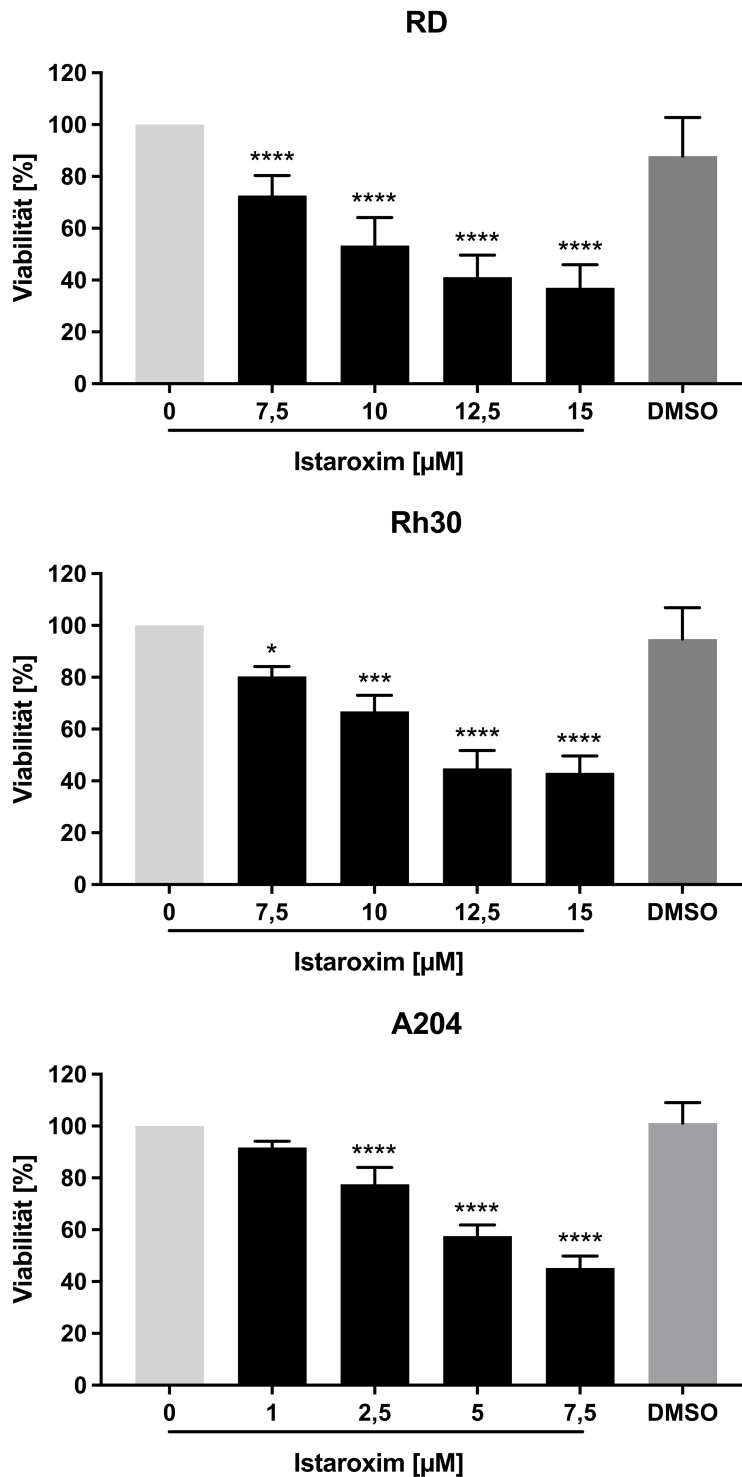
Durch Zellviabilitätsassays können Aussagen darüber getroffen werden, ob Veränderungen des Zellmetabolismus der untersuchten Tumorzelllinien unter Einfluss eines bestimmten Wirkstoffes oder Wirkstoffkombinationen, eintreten. In Relation zu einer unbehandelten Kontrolle wurde eine unveränderte Stoffwechselaktivität mit 100 % festgelegt.

Die Auswirkungen von Istaroxim sind bei den Zelllinien RD, Rh30 und A204 jeweils in Abwesenheit und anschließend auch in Anwesenheit von Doxorubicin oder Carboplatin gemessen und analysiert worden.

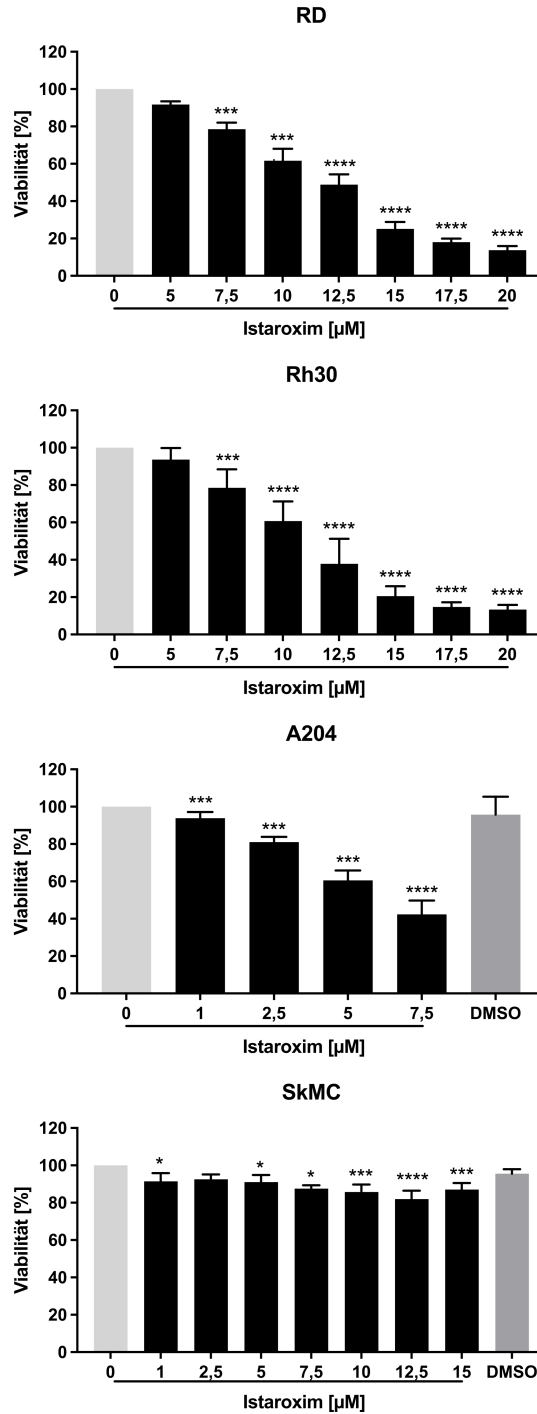
### **3.2.1 Zellviabilität nach einer Istaroximbehandlung**

Zunächst wurden mit einer Reihe ansteigender Istaroximkonzentrationen austitriert, ab welcher Konzentration eine signifikante Reduktion der Aktivität des Zellstoffwechsels oder Zellstoffmetabolismus der untersuchten Zelllinien zu beobachten ist. Dies erfolgte über Behandlungszeiträume von 24 h und 72 h (siehe Abb. 20 und 21).

Als Kontrolle wurden für den längeren Therapiezeitraum von 72 h humane Skelettmuskelzellen (SkMC) auf die gleiche Weise wie die Tumorzelllinien behandelt, um die Auswirkungen auf nicht-pathologische Zellen zu analysieren (siehe Abb. 21).



**Abbildung 20: Modulation der Zellstoffwechselaktivität bei 24-stündiger Behandlung mit Istaroxim in Rhabdoid-Tumor- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien** Zur Untersuchung der Zellviabilität wurden MTT-Assays durchgeführt. Die drei Zelllinien A204 (mRT), RD (ERMS) und Rh30 (ARMS) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Istaroxim über einen Zeitraum von 24 h behandelt. DMSO wurde als Lösungsmittel für Istaroxim und für die Lösungsmittelkontrolle verwendet. Die angegebenen Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardfehler (SEM) aus folgender Anzahl an Einzelversuchen: RD: n = 8, Rh30: n = 3, A204: n = 4. Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf den Prozentwert 100 gesetzt. Die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse ANOVA (Dunnett), \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.



**Abbildung 21: Effekte auf die Zellstoffwechselaktivität der Rhabdoid-Tumor-, Rhabdomyosarkom- und Skelettmuskel-Zellen bei 72-stündiger Behandlung mit Istaroxim** Die Zellviabilitäts-Analyse erfolgte mittels 72-stündiger MTT-Assays. Die Zelllinien A204 (mRT), RD (ERMS), Rh30 (ARMS) und SkMC (Skelettmuskelzellen) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Istaroxim (A204: 0; 1; 2,5; 5; 7,5 μM bzw. RD und Rh30: 0; 7,5; 10; 12,5; 15 μM bzw. SkMC: Alle Konzentrationen, die für die mRT- und RMS-Zelllinien eingesetzt wurden) behandelt. DMSO wurde als Lösungsmittel für Istaroxim und für die Lösungsmittelkontrolle verwendet. Die angegebenen Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardfehler (SEM). Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf den Prozentwert 100 gesetzt. Es wurden für die Zelllinien A204: n = 4 und SkMC, RD, Rh30 n = 3 Einzelversuche durchgeführt. Die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (Dunnett), \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

Sowohl über 24-stündige, als auch über die 72-stündige Versuchsdauer zeigte sich bei den Zelllinien RD und Rh30 eine signifikante Reduktion der nachgewiesenen Zellstoffwechselaktivität ab einer Behandlung mit der Istaroximkonzentration von 7,5  $\mu\text{M}$ . Bei der mRT-Zelllinie A204 konnte eine signifikante Reduktion schon ab der Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim (Versuchszeiträume von 24 h und 72 h) beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  sank die Aktivität des Zellstoffwechsels nach 72 h bis auf unter 50 %. Bei der Zelllinie SkMC konnte eine signifikante Reduktion bereits ab 1  $\mu\text{M}$  Istaroxim beobachtet werden. Jedoch betrug die Abnahme der Zellviabilität nur knapp 9 % und stieg über die weiteren höheren Konzentrationen nicht über 16 % an. Mit Ausnahme der Versuche mit den Skelettmuskelzellen nahm die Zellviabilität mit steigender Istaroximkonzentration bei allen übrigen untersuchten Zellen dosisabhängig kontinuierlich ab. Die Lösungsmittelkontrollen waren in allen Versuchen nicht signifikant.

### **3.2.2 Zellviabilität nach einer Behandlung mit Carboplatin und Istaroxim**

Auf Grundlage der ermittelten Ergebnisse aus 3.2.1 wurden Kombinationstherapien an den Tumorzelllinien RD, Rh30 und A204 mit Istaroxim und Carboplatin durchgeführt. Die Ergebnisse sind graphisch in der Abbildung 22 dargestellt.

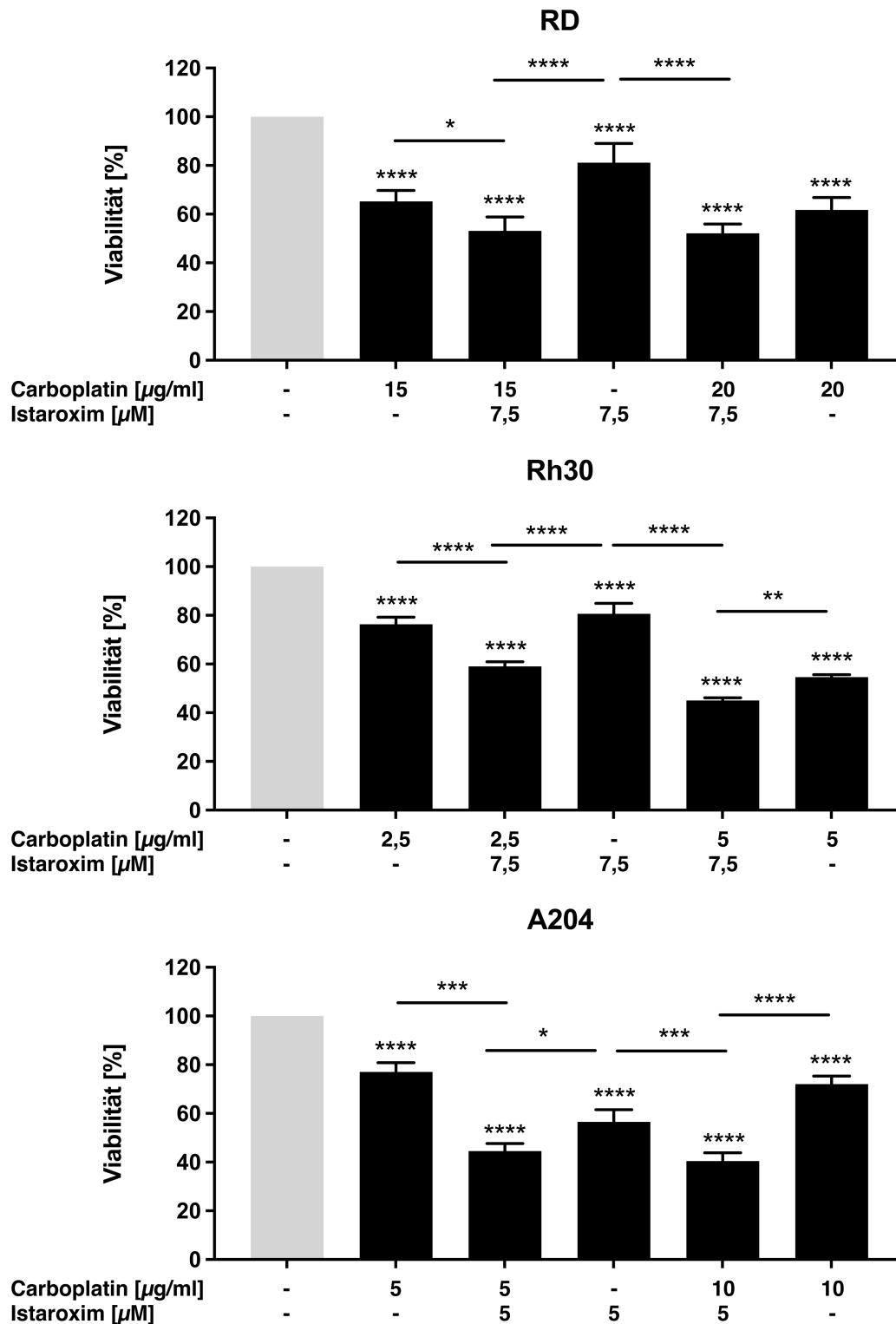
Wie in den Graphen für alle drei Zelllinien gezeigt wird, nimmt die Viabilität durch die Kombination von Carboplatin und Istaroxim ab. Bei der ERMS-Zelllinie RD besteht eine signifikante Reduktion der Viabilität um 18,5 % beim Einsatz von 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carboplatin und 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim in Relation zu den Einzelbehandlungen mit 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carboplatin (Reduktion um 34,8 % im Vergleich zur Kontrolle) und 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim (Reduktion um 18,9 % im Vergleich zur Kontrolle). Es liegt allerdings kein additiver oder synergistischer Effekt vor. Die Zellviabilität bei der Kombinationsbehandlung mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carboplatin und 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim war signifikant geringer als bei Einzelbehandlung mit Istaroxim, jedoch höher als bei Einzelbehandlung mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carboplatin.

Die Zelllinie Rh30 (ARMS) zeigte bei einer zusätzlichen Istaroximbehandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$  sowohl bei einer Behandlung mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , als auch mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carboplatin eine signifikante Reduktion der Viabilität im Vergleich zur jeweiligen Carboplatinbasistherapie.

Für die Kombination von 2,5 µg/ml Carboplatin und 7,5 µM Istaroxim (Viabilitätsreduktion um 40,9 %) konnte ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden. Die Viabilitätsreduktion der Kombinationstherapie lag bei über 22 % im Vergleich zur Einzeltherapie mit Carboplatin (Reduktion um 23,6 % im Vergleich zur Kontrolle). Bei einer Verdoppelung der Carboplatinkonzentration war der Effekt auf die Viabilität weder synergistisch noch additiv. Dennoch lag hier die Reduktion bei etwa 17,5 % in Relation zur Carboplatin-Einzeltherapie und knapp 14 Prozentpunkte niedriger als die Kombinationstherapie mit 5 µg/ml Carboplatin.

In A204 Zellen war eine Reduktion durch Istaroxim um über 40 % zu erkennen. Durch den zusätzlichen Einsatz von Carboplatin konnte die Reduktion um etwa weitere 20 Prozentpunkte gesteigert werden. Die Ergebnisse zeigten einen synergistischen Effekt bei der Ergänzung der Basisbehandlung von 10 µg/ml Carboplatin mit 5 µM Istaroxim von 72 % bei alleiniger Carboplatinbehandlung auf 40 % in Kombinationstherapie. Bei der Carboplatinkonzentration von 5 µg/ml lag eine signifikante Viabilitätsreduktion vor.





**Abbildung 22:** Auswirkungen der Kombinationsbehandlung mit Carboplatin und Istaroxim auf die Tumorzelllinien A204, RD und Rh30. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von MTT-Assays. Die mRT-Zelllinie A204 und die RMS-Zelllinien RD und Rh30 wurden mit 2,5; 5; 10; 15 oder 20  $\mu\text{g/ml}$  Carboplatin und/ oder 5 bzw. 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim für 72 h behandelt. Die angegebenen Daten sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM) aus 4 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf den Prozentwert 100 gesetzt.

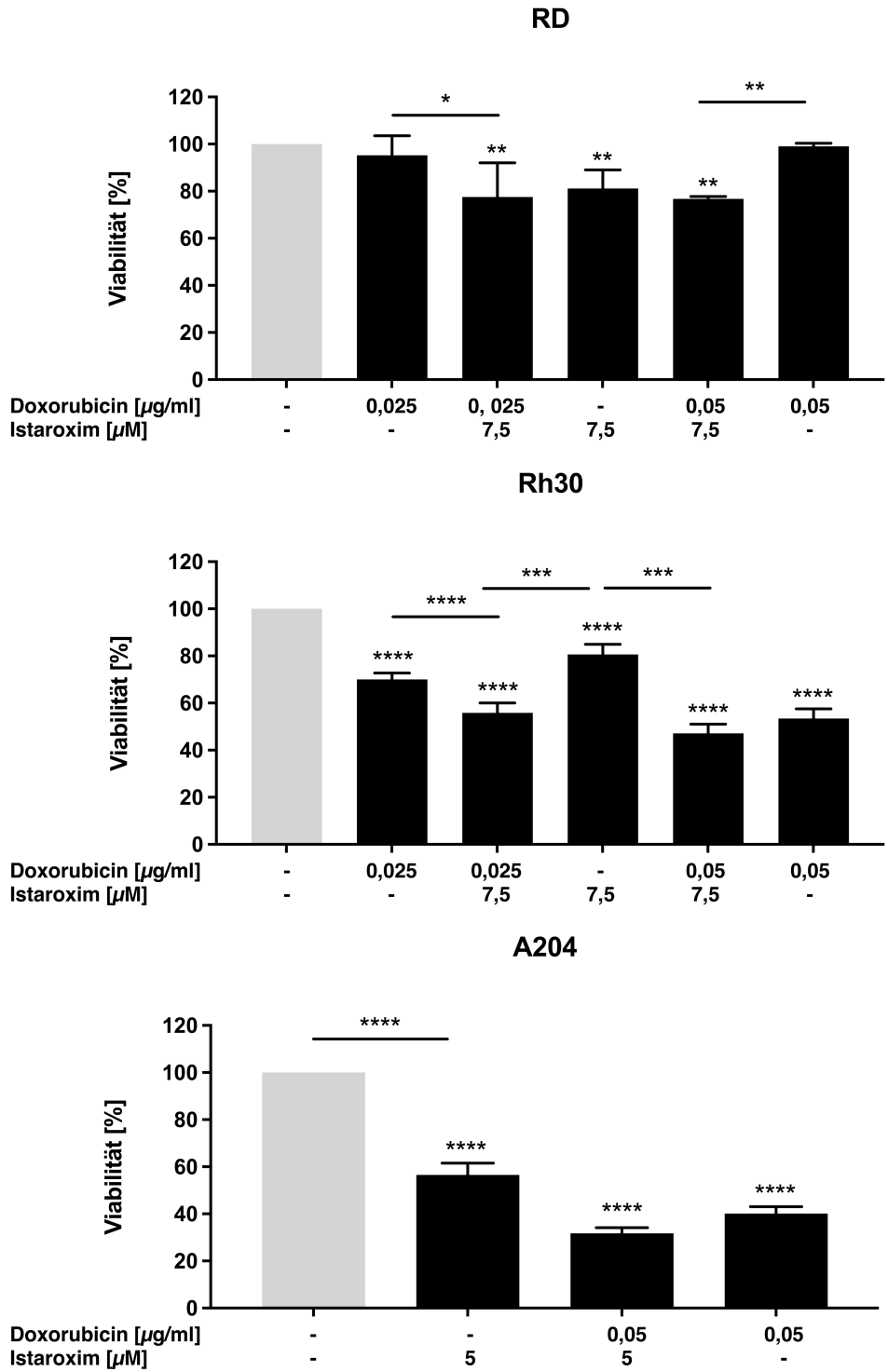
### **3.2.3 Zellviabilität nach einer Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Istaroxim**

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Auswirkungen einer Therapieergänzung des Zytostatikums Doxorubicin mit Istaroxim bei mRT- und RMS-Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zu sehen.

Bei der Zelllinie RD zeigte sich keine signifikante Reduktion der Viabilität zwischen einer reinen Istaroximbehandlung und der Ergänzungstherapie mit Doxorubicin in den Konzentrationen 0,025 und 0,05 µg/ml und Istaroxim (7,5 µM). Die Viabilitätsreduktion der Kombinationstherapien im Vergleich zur alleinigen Istaroximtherapie lag bei 4,1 % (mit 0,025 µg/ml Doxorubicin) bzw. 5,4 % (mit 0,05 µg/ml Doxorubicin).

Die A204-Zellen zeigten zwar eine signifikante Reduktion der Kombinationsbehandlung aus Doxorubicin (0,05 µg/ml) mit 5 µM Istaroxim (31,7 %) im Vergleich zur reinen Istaroximbehandlung (56,5 %), jedoch keine signifikante Veränderung der Viabilität gegenüber der alleinigen Behandlung mit Doxorubicin (40,1 %).

Einzig bei der ARMS-Zelllinie Rh30 konnte bei der Ergänzungstherapie mit 7,5 µM Istaroxim eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in Relation zu den Einzeltherapien von 70 % (0,025 µg/ml Doxorubicin) auf 55,9 % (0,025 µg/ml Doxorubicin + 7,5 µM Istaroxim) erzielt werden. Dies zeigte sich allerdings nicht mehr bei der Ergänzung mit der höheren Doxorubicinkonzentration von 0,05 µg/ml. Es lag kein additiver oder synergistischer Effekt vor.



**Abbildung 23: Auswirkungen der Therapieergänzung von Doxorubicin mit Istaroxim bei malignen Rhabdoid Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien** Die Analyse erfolgte mit Hilfe von MTT-Assays. Die mRT-Zelllinie A204 und die RMS-Zelllinien RD und Rh30 wurden mit 0,025 oder 0,05  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin und/ oder 5 bzw. 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim für 72 h behandelt. Die angegebenen Daten sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM) aus 4 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf den Prozentwert 100 gesetzt.

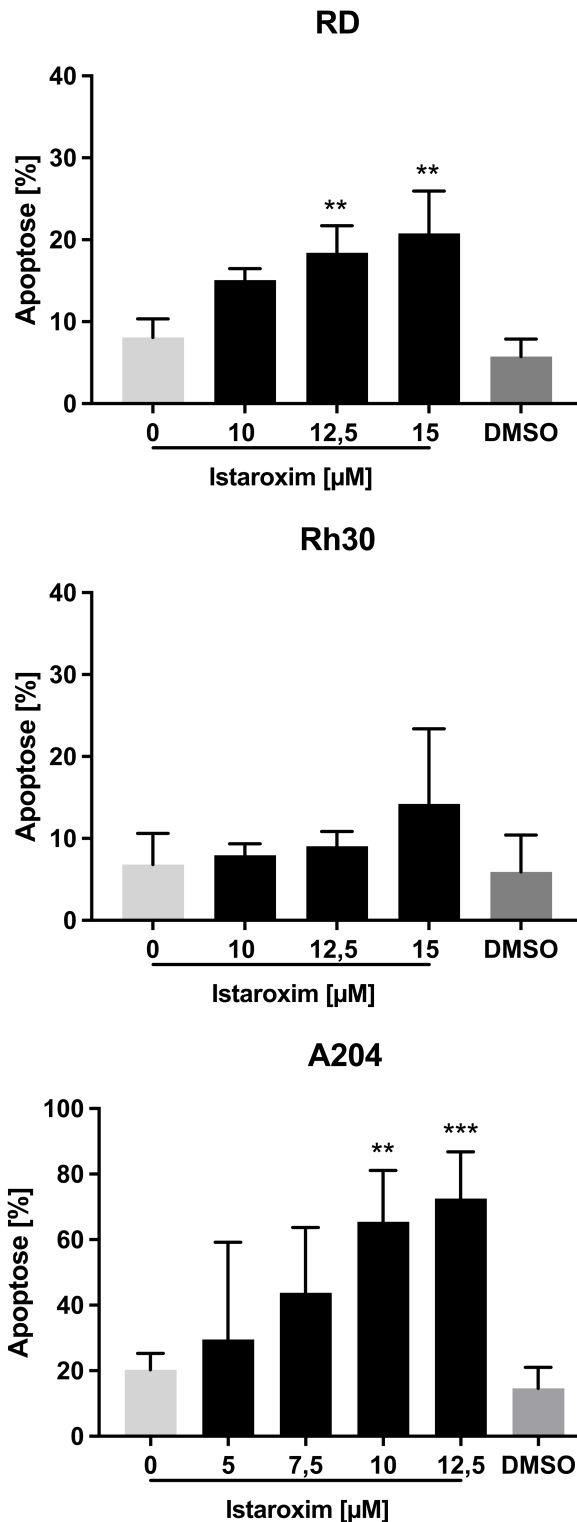
### **3.3 Analyse des Apoptoseverhaltens**

Auf der Grundlage der Viabilitäts-Assays sollte im Anschluss ergründet werden, ob es sich bei der Reduktion der Zellviabilität um die Folge eines apoptotischen Zelltodes handelt. Es wurden dafür durchflusszytometrische Messreihen nach den Istaroximbehandlungen durchgeführt, mit deren Hilfe die Apoptoserate und eine Differenzierung zwischen Nekrose und induzierter Apoptose erfolgen konnte. Die Versuche wurden wie in 2.2.5 beschriebend durchgeführt.

#### **3.3.1 Apoptoseverhalten nach Istaroximbehandlung**

Zunächst wurde das Apoptoseverhalten der Tumorzelllinien (RD, Rh30, A204) bei aufsteigenden Istaroximkonzentrationen austitriert. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 24 dargestellt.

Wie in Abb. 24 gezeigt, kam es in Relation zur unbehandelten Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg des apoptotischen Zelluntergangs bei mRT-Zellen der mit Istaroxim behandelten Zelllinie A204 um etwa 45 Prozentpunkte ab einer Istaroximkonzentration von 10  $\mu$ M. Die Zellen der RMS-Zelllinie RD reagierten ab einer Istaroximkonzentration von 12,5  $\mu$ M mit einer signifikanten Veränderung der Apoptoserate um etwa 10 Prozentpunkte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei den Zellen der Zelllinie Rh30 nahm die Apoptose nach Istaroximbehandlung nicht signifikant zu. Darüber hinaus nahm der Anteil an durch Nekrose zugrunde gegangenen Tumorzellen (RD, Rh30, A204) unter Istaroximeinfluss im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant zu (Daten hier nicht gezeigt).

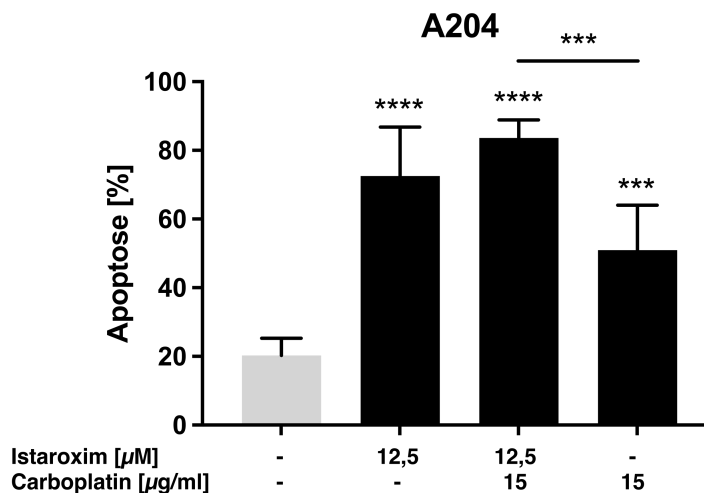
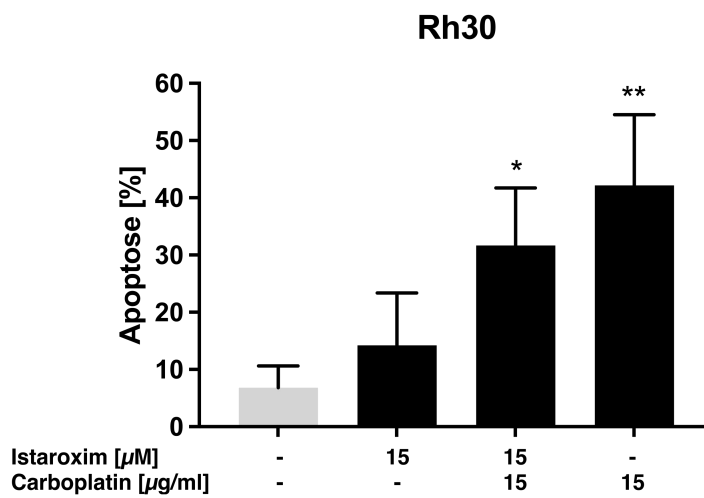
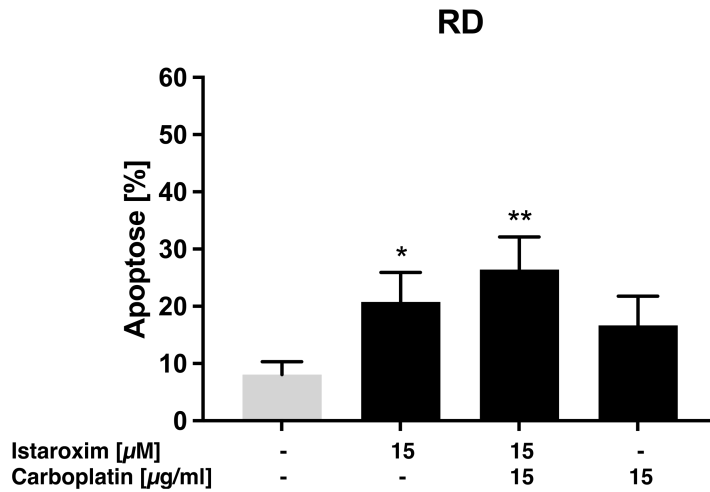


**Abbildung 24: Apoptoseverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss von Istaroxim** Die Analyse erfolgte mittels durchflusszytometrischem Verfahren. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM) aus je 3 Einzelversuchen mit den Zelllinien A204 (mRT), RD (ERMS) und Rh30 (ARMS). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit Istaroxim in aufsteigender Konzentration behandelt. Bei allen Versuchen wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO durchgeführt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der in Apoptose gegangenen Zellen in Relation zur Gesamtzahl der eingesetzten Zellen. Zur statistischen Prüfung wurde die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (Dunnett) eingesetzt. Die statistische Signifikanz stellt sich wie folgt dar: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

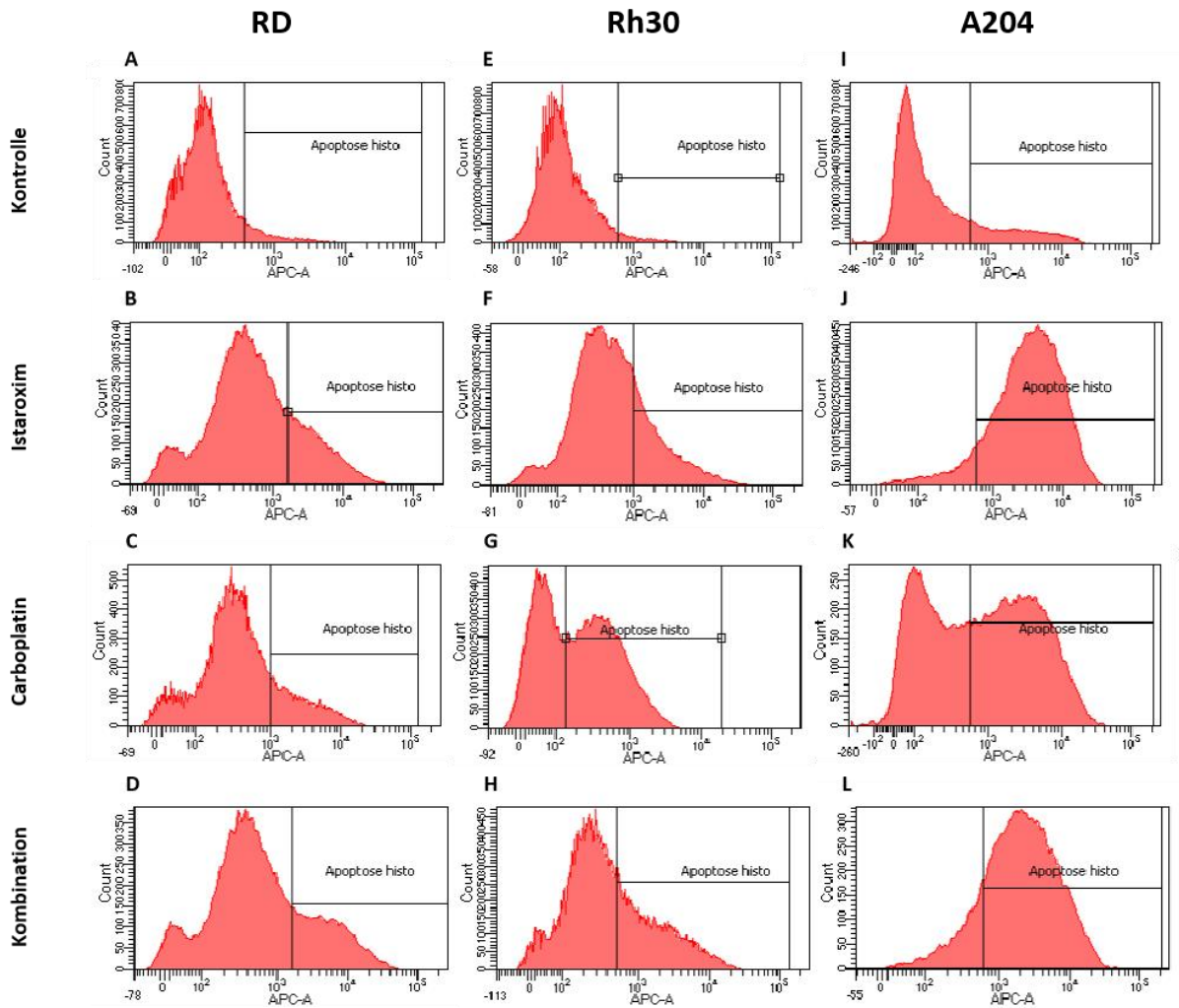
### 3.3.2 Apoptoseverhalten nach Kombinationstherapie

Um das Apoptoseverhalten der Tumorzellen (RD, Rh30 und A204) in einer Kombinationstherapie zu untersuchen, wurde in Anlehnung an die Ergebnisse aus den Viabilitäts-Assays, die Behandlung mit Istaroxim durch die zusätzliche Behandlung mit dem Zytostatikum Carboplatin ergänzt. Damit sollte festgestellt werden, ob synergistische oder additive Effekte vorliegen, die zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose in Relation zu den Einzelbehandlungen führen. Die eingesetzten Istaroximkonzentrationen (5 – 12,5  $\mu\text{M}$ ) wurden nach einer Versuchsreihe mit nicht signifikanten Veränderungen auf 15  $\mu\text{M}$  erhöht. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Abb. 25 dargestellt.

Wie in Abb. 25 und Abb. 26 gezeigt, konnte eine tendenzielle, jedoch keine signifikante Zunahme der Apoptose der Kombinationsbehandlung (Istaroxim mit Carboplatin) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Istaroxim oder Carboplatin in RD-Zellen festgestellt werden. Bei den Rh30-Zellen war die Zahl der durch Apoptose zugrunde gegangenen Zellen durch eine reine Carboplatinbehandlungen höher als bei der Kombinationstherapie (Istaroxim mit Carboplatin). Die mRT-Zelllinie A204 zeigte eine um etwa 30 % höhere, signifikante Apoptoserate der Kombinationsbehandlung verglichen mit der Carboplatinbehandlung. Ein additiver oder synergistischer Effekt lag jedoch nicht vor. In Relation dieser Kombinationstherapie zur reinen Istaroximtherapie konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Zahl der durch Nekrose zugrunde gegangenen Zellen (Daten hier nicht gezeigt) war in keiner Behandlungsvariante signifikant erhöht.



**Abbildung 25: Apoptoseverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss Kombinationsbehandlung von Carboplatin und Istaroxim** Die Analyse erfolgte mittels durchflusszytometrischem Verfahren. Die mRT-Zelllinie A204 sowie die RMS-Zelllinien RD und Rh30 wurden mit 15  $\mu$ g/ml Carboplatin und/ oder 12,5 bzw. 15  $\mu$ M Istaroxim für 72 h behandelt. Die angegebenen Daten sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM) aus 3 Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni), \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.



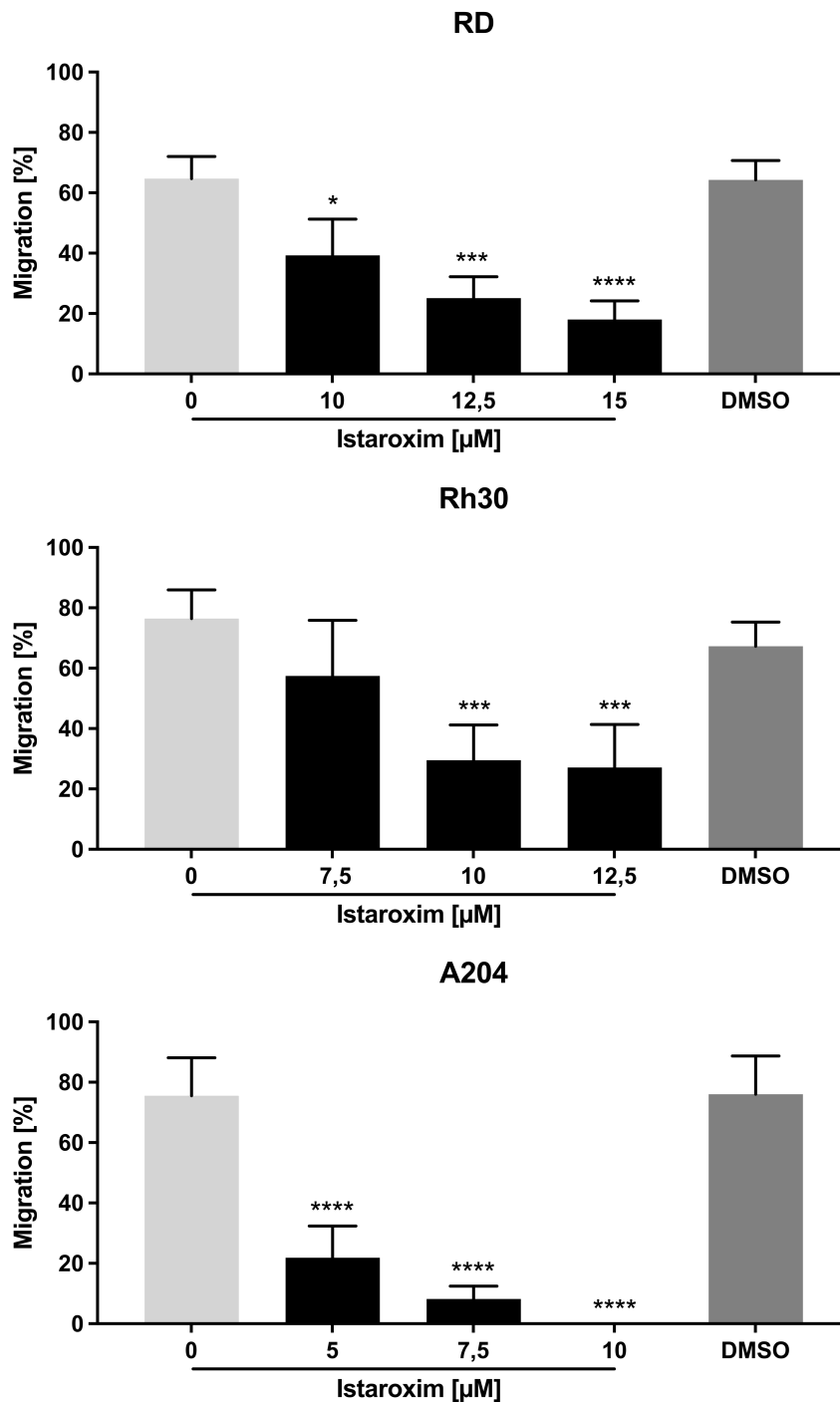
**Abbildung 26: Histogramme zum Apoptoseverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss von Istaroxim, Carboplatin und der Kombinationsbehandlung aus Carboplatin und Istaroxim** Die Analyse erfolgte mittels durchflusszytometrischem Verfahren nach einem Behandlungszeitraum von 72 h. Die behandelte Tumorzelllinie sowie die Behandlung und Dosierung des jeweiligen Wirkstoffs der angegebenen Histogramme lautet wie folgt: Durchflusszytometrie der unbehandelten Zellen der Zelllinie RD (A), Rh30 (E) und A204 (I); Durchflusszytometrie der mit 15  $\mu$ M Istaroxim behandelten Zellen der Zelllinie RD (B), Rh30 (F) sowie mit 12,5  $\mu$ M Istaroxim behandelten Zellen der Zelllinie A204 (J); Durchflusszytometrie der mit 15  $\mu$ g/ml Carboplatin behandelten Zellen der Zelllinie RD (C), Rh30 (G), A204 (K); Durchflusszytometrie der mit 15  $\mu$ M Istaroxim und 15  $\mu$ g/ml Carboplatin behandelten Zellen der Zelllinie RD (D), Rh30 (H) sowie mit 12,5  $\mu$ M Istaroxim und 15  $\mu$ g/ml Carboplatin behandelten Zellen der Zelllinie A204 (L)



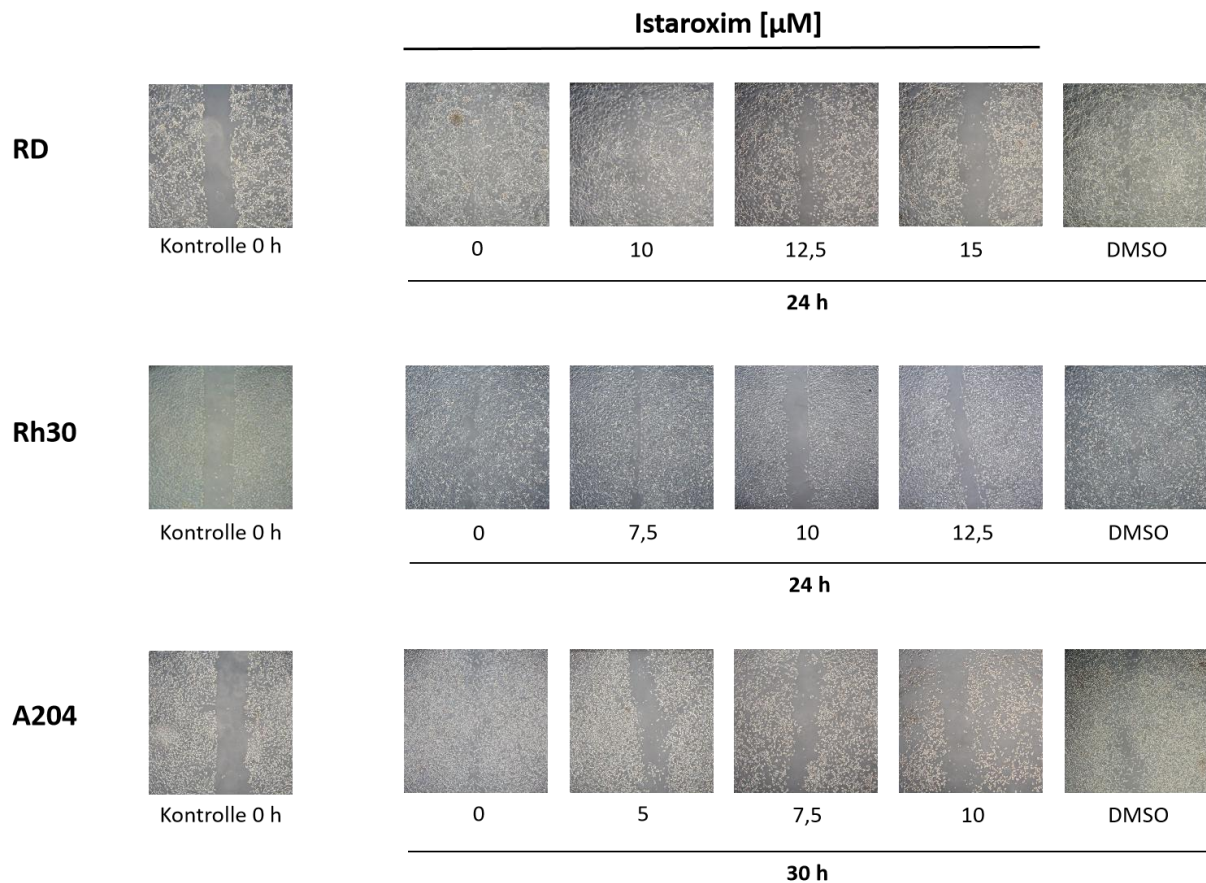
### 3.4 Einflüsse auf das Migrationsverhalten kindlich solider Tumorzellen

Durch die Inhibition der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und den Einfluss auf das Membranprotein SERCA nimmt Istaroxim Einfluss auf den zellulären Calciumhaushalt. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Istaroxim auch die Zellmigration beeinflusst. Aus diesem Grund wurden zur Untersuchung des Migrationsverhaltens der Tumorzellen, unter Einfluss von Istaroxim, Wound-Healing-Assays wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Im Vorfeld der Versuchsreihen fand eine Austitration statt, die zur Feststellung der allgemeinen Wundheilungsdauer *in vitro* ohne Einfluss von pharmakologischen Wirkstoffen diente. Der unbehandelte Zellrasen war bei den RMS-Zelllinien RD und Rh30 nach 24 h, bei der Zelllinie A204 nach 30 h wieder vollständig zugewachsen. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse graphisch und in Abbildung 28 fotografisch dargestellt.

In allen drei Zelllinien zeigte sich zunächst eine signifikant verminderte Migration unter dem Einfluss von Istaroxim. Bei den RMS-Zelllinien RD und Rh30 wurde ab einer Konzentration von 10 µM Istaroxim eine signifikante Reduktion der Zellmigration um etwa 39 % (RD) bzw. 65 % (Rh30) festgestellt. Ab einer Konzentration von 5 µM Istaroxim wurde eine signifikante Abnahme der Migration bei der mRT-Zelllinie A204 um 71 % verzeichnet.



**Abbildung 27: Einfluss von Istaroxim auf das Migrationsverhalten von malignen Rhabdoid-Tumor- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien** Das Migrationsverhalten der mRT-Zelllinie RD, der ERMS-Zelllinie Rh30 und der ARMS-Zelllinie A204 wurde mittels Wound-Healing-Assays untersucht. Einem konfluenten Zellrasen wurde mit einer Pipettenspitze (etwa 1 mm Durchmesser) ein Defekt zugefügt. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Istaroxim in aufsteigenden Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 h (RD und Rh30) bzw. 30 h (A204). Gemessen wurde das Verhältnis zwischen der Größe des zellfreien Defekts zu Beginn (0 h) und am Ende (24 bzw. 30 h) des Versuches. Die ermittelten Daten wurden in Relation zu einer unbehandelten Kontrolle gesetzt. Die angegebenen Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM) aus n = 3 ((Rh30 und RD) bzw. n = 4 (A204) Einzelversuchen, die statistische Prüfung der Hypothese erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA), \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf den Prozentwert 100 gesetzt.



**Abbildung 28: Fotografische Darstellung des Migrationsverhaltens von malignen Rhabdoid-Tumor- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Einfluss von Istaroxim** Dargestellt sind die Fotografien eines Versuchs zu den in Abb. 27 veranschaulichten CFA-Versuchen. Am linken Bildrand ist jeweils die dargestellte Zelllinie hinterlegt. Die Bilder links außen wurden von der jeweils unbehandelten Kontrollplatte zu Versuchsbeginn unmittelbar nach dem Zufügen des Defektes im Zellrasen aufgenommen. Alle weiteren Bilder wurden bei den Zelllinien RD und Rh30 nach 24 h und bei der Zelllinie A204 nach 30 h aufgenommen. Die eingesetzte Istaroximkonzentration in den jeweiligen Zellkulturplatten ist unter den einzelnen Fotografien angeführt. Die Konzentration an DMSO der Lösungsmittelkontrolle entspricht der für die Zelllinie jeweilig höchsten Istaroximkonzentration.

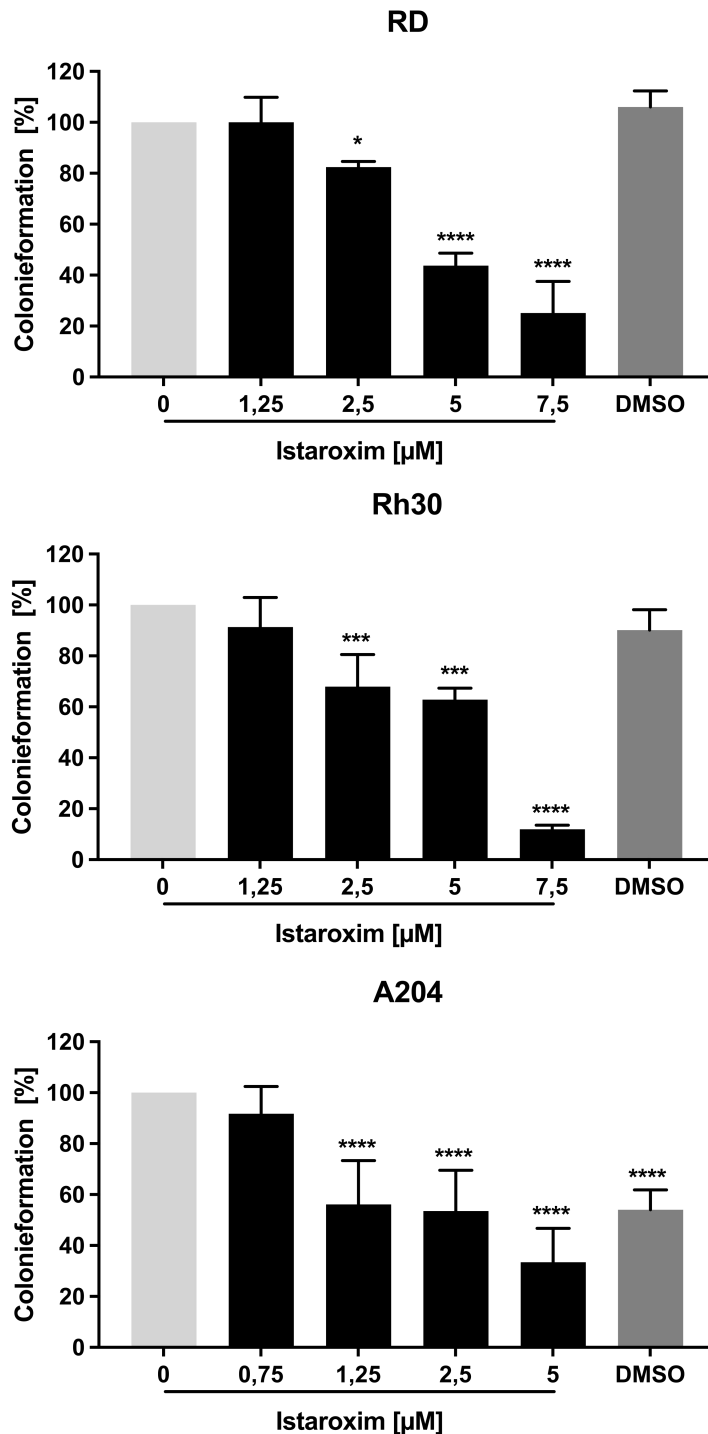
### **3.5 Untersuchung des klonogenen Zelltods in RMS- und mRT-Zelllinien nach Behandlung mit Istaroxim**

Zur Untersuchung des klonogenen Zelltodes der Tumorzellen wurden Colony-Forming-Assays durchgeführt.

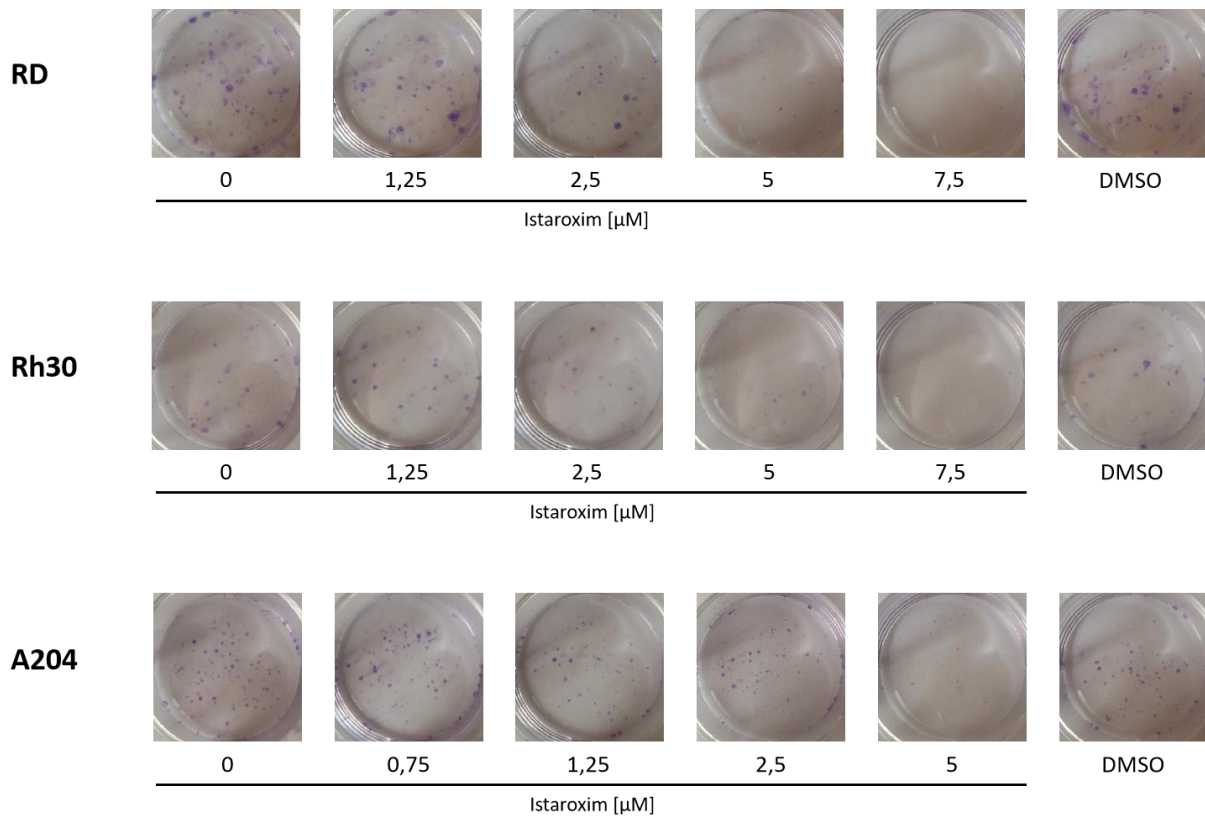
Tumorzellen können sich aus rein genetischer Sicht unbegrenzt teilen. Daher ist es bedeutsam den Einfluss eines Medikaments auf die Reproduktionsfähigkeit der Tumorzellen festzustellen. Die Methode wurde wie in 2.2.6 beschrieben durchgeführt und mit je einer Kontrolle ohne Wirkstoff verglichen. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse grafisch und in Abbildung 30 fotografisch dargestellt. Unter der Behandlung mit Istaroxim war eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der Kolonienbildung der untersuchten RMS- und mRT-Zelllinien festzustellen.

Bei den Zelllinien RD und Rh30 kam es ab einer Istaroximkonzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  zu einer signifikant reduzierten Kolonienbildung. In beiden Fällen lag diese bei der maximal eingesetzten Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  bei über 70 %. Bei einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim lag die Anzahl der Kolonien am Ende des Beobachtungszeitraumes bei nur noch knapp 12 % (Rh30) bzw. 25 % (RD) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die A204 Zellen zeigten bereits bei einer Behandlung mit 1,25  $\mu\text{M}$  Istaroxim eine signifikante Reduktion der Kolonienbildung um etwa 40 %. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Istaroxim sank die Anzahl der Kolonien im Vergleich zur Kontrolle weiter auf 36 %. Die Lösungsmittelkontrolle der Zelllinie A204 zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Kolonienbildung auf knapp 60 %.



**Abbildung 29: Induktion des klonogenen Zelltodes durch Istaroxim an Zelllinien des malignen Rhabdoid-Tumors und Rhabdomyosarkoms** Es wurde der Colony-Forming-Assay (CFA) zur Analyse des klonogenen Zelltodes eingesetzt. Die Tumorzellen der ERMS-Zelllinie RD, der ARMS-Zelllinie Rh30 und der mRT-Zelllinie A204 wurden mit Istaroxim (Konzentrationen: 0,75; 1,25; 2,5; 5; 7,5 μM) behandelt und für 10-14 Tage inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch die Zählung der gewachsenen Kolonien in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Messdaten in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Die aufgeführten Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardfehler (SEM) aus n = 3 (RD) bzw. n = 6 (Rh30 und A204) Einzelversuchen. Die Mittelwerte der Kontrolle wurden auf den Prozentwert 100 gesetzt. Zur statistischen Prüfung wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Dunnet) eingesetzt. Die statistische Signifikanz stellt sich wie folgt dar: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001



**Abbildung 30: Fotografien der Zellkulturplatten zur Induktion des klonogenen Zelltodes durch Istaroxim an Zelllinien des malignen Rhabdoid-Tumors und Rhabdomyosarkoms** Dargestellt sind die Fotografien eines Versuchs zu den in Abb. 29 veranschaulichten CFA-Versuchen. Am linken Bildrand ist jeweils die dargestellte Zelllinie hinterlegt. Die eingesetzte Istaroximkonzentration in den jeweiligen Zellkulturplatten ist unter den einzelnen Fotografien angeführt. Die Konzentration an DMSO der Lösungsmittelkontrolle entspricht der für die Zelllinie jeweilig höchsten Istaroximkonzentration.

## 4. Diskussion

Das Rhabdomyosarkom (RMS) gilt mit knapp 4 % als häufigstes solides Weichteilsarkom im Kindes- und Jugendalter [1]. Während mittels innovativer, multimodaler Therapiekonzepte in den letzten 30 Jahren eine 5-Jahresüberlebensrate von knapp 75 % erreicht werden konnte, sind fortgeschrittene und rezidivierende RMS in der Kinderonkologie nach wie vor mit einer schlechten Prognose assoziiert [15, 30, 33]. Insbesondere Metastasen sowie Chemosensibilitäten stellen große Herausforderungen bei der Tumorthherapie dar [124]. Da die herkömmlichen Therapiekonzepte in den letzten Jahren keine weiteren Verbesserungen der Therapieergebnisse erzielen konnten, sind neue Ansätze erforderlich.

Der als sehr aggressiv geltende maligne Rhabdoid-Tumor (mRT) tritt vermehrt bei Kleinkindern und Säuglingen auf. Lokalisiert ist er zumeist in der Niere oder im zentralen Nervensystem [39-42]. Die Überlebensraten für die erkrankten Patienten waren in den letzten Jahren unverändert schlecht [43, 45, 64].

Der antikanzerogene Einfluss von Istaroxim konnte *in vitro* an diversen Tumoren (Melanom und Lungen-, Ovarial-, Nieren-, ZNS-, Pankreas-, Colon-, Mamma- und Prostatakarzinom) und *in vivo* an einer Prostatakarzinomzelllinie (PC-3-Zelllinie) nachgewiesen werden. Angriffspunkte von Istaroxim waren dabei neben der Hemmung von Proliferation, Zellmotilität und Migration auch die Induktion verschiedener apoptotischer Signalwege [74, 77].

Die vorliegende Forschungsarbeit zeigt erste Erkenntnisse zur Wirkung von Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Istaroxim und den Chemotherapeutika Carboplatin und Doxorubicin an den RMS-Zelllinien RD und Rh30, sowie der malignen Rhabdoid-Tumorzelllinie A204.

Basierend auf den bestehenden Forschungsergebnissen zur Wirkung von Istaroxim auf andere Tumorentitäten wurden Ansätze zu möglichen Wirkmechanismen hinsichtlich der Apoptose, Tumorzellmigration und des klonalen Zelltods bei kindlichen RMS und mRT untersucht. Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse bestätigen die Hypothese eines potenziellen Nutzens der Behandlung mit Istaroxim als Erweiterungsoption für die derzeit angewandte multimodale Therapie.

#### **4.1 Expressionslevel der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in RMS- und mRT-Zelllinien sowie in der Skelettmuskelzelllinie SkMC**

Die Expression von verschiedenen Isoformen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wurde auf unterschiedlichen Zelllinien diverser Tumorentitäten bereits untersucht. So konnte Li et al. (2017) beispielsweise zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen einer höheren Expression der  $\beta$ 3-Untereinheiten der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und einem schlechteren klinischen Behandlungsergebnis bei Magenkarzinomen besteht [125]. Bei kolorektalen Karzinomen zeigte sich laut Sakai et al. eine Herabregulation der  $\alpha$ 1-Isoform, während die  $\alpha$ 3-Isoform überexprimiert war [126].

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auf ARMS- (Rh30), ERMS (RD) und mRT-Zelllinien (A204) mit der Expression auf der humanen Skelettmuskelzelllinie SkMC mittels Western Blot verglichen. In Relation zur Kontrollzelllinie SkMC fiel auf, dass die Banden auf Höhe des spezifischen Molekulargewichtes der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (55 kDa) bei allen Tumorzelllinien, mit Ausnahme der A204, deutlich stärker ausgeprägt waren. Daraus lässt sich schließen, dass insbesondere bei den Zelllinien Rh30 und RD eine deutlich stärkere Expression der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase vorliegt. Ob eine bestimmte Untereinheit des Enzyms dabei vorwiegend stärker exprimiert ist, muss noch abschließend geklärt werden. Im Hinblick darauf, dass dieses Enzym einen potenziellen Angriffspunkt von Istaroxim darstellt, wurde ein möglicher Zusammenhang des Expressionsmusters mit den Ergebnissen der weiteren Versuche berücksichtigt.

#### **4.2 Zytotoxische Auswirkungen der Istaroxim- und Istaroxim-Zytostatika-Kombinationsbehandlung**

Um die Auswirkungen der Behandlung mit Istaroxim alleine und in Kombination mit den Zytostatika Doxorubicin oder Carboplatin untersuchen zu können, wurden Zellviabilitäts- und Apoptose-Assays durchgeführt.

Durch Viabilitäts-Assays (MTT-Assays) konnten zunächst Veränderungen der Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen gemessen werden. Für die verwendeten Tumorzelllinien A204 (mRT), RD (ERMS) und Rh30 (ARMS) konnte eine signifikante Abnahme der Zellviabilität unter dem Einfluss von Istaroxim bei einer Behandlungsdauer von 24 h und



72 h nachgewiesen werden. Ab einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim war in beiden Versuchsreihen (24 h und 72 h), eine signifikante Reduktion der Viabilität bei den RMS-Zelllinien RD und Rh30 festzustellen. Im direkten Vergleich konnte gezeigt werden, dass für die getestete mRT-Zelllinie A204 lediglich ein Drittel der für einen signifikanten Effekt notwendigen Istaroxim-Dosis (2,5  $\mu\text{M}$ ) benötigt wurde. In den Untersuchungen von Alevizopoulos et al. zur antikanzerogenen Wirkung von Istaroxim an Prostatakarzinomzellen (Zelllinie DU-145) wurden 5  $\mu\text{M}$  Istaroxim eingesetzt [74]. Demnach zeichnet sich nach den MTT-Assays bereits ab, dass die mRT-Zelllinie A204 sensibler und die RMS-Zelllinien Rh30 und RD etwas weniger sensibel auf Istaroxim reagieren als die Zelllinie DU-145. Mögliche Ursachen hierfür können in den unterschiedlichen Zellursprüngen der Tumore liegen, was verschiedene Expressionsmuster bestimmter Signalwege zur Folge haben kann. Dies kann sich auch auf die Sensitivität hinsichtlich unterschiedlicher Wirkstoffe wie auch Istaroxim auswirken. Genauere Untersuchungen können erfolgen, sobald mehr über die Angriffspunkte und Wirkungsweise von Istaroxim als antikanzerogenes Therapeutikum bekannt ist.

Auch bei der Kontrollzelllinie SkMC, die Aufschluss über die Auswirkungen von Istaroxim bei nicht pathologischen Zellen geben soll, wurde eine statistisch signifikante Reduktion der Zellstoffwechselaktivität nachgewiesen. Diese Reduktion belief sich allerdings auch bei einer Istaroximkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  nur auf knapp 14 % bei einer Behandlungsdauer von 72 h. Im Vergleich hierzu wurde bei der gleichen Behandlung eine Reduktion der RD-Zellen um etwa 75 % und bei der Zelllinie Rh30 um ca. 79 % nachgewiesen. Bei der Zelllinie A204 lag die Viabilität der Zellen nach 72 h bereits bei einer Dosis von 7,5  $\mu\text{M}$  Istaroxim bei nur noch 37 %. Hinzu kommt, dass die Aktivitätsreduktion der SkMC-Zelllinie unter dem Einfluss einer steigenden Istaroximkonzentration (von 1  $\mu\text{M}$  bis 15  $\mu\text{M}$ ) konstant blieb, während die Zellviabilität der mRT- und RMS-Zelllinien sukzessive mit zunehmenden Istaroximkonzentrationen abnahm. An dieser Stelle muss darauf verwiesen werden, dass Istaroxim bereits die zweite klinische Forschungsphase durchlaufen hat, wobei keine gravierenden Nebenwirkungen auftraten [68, 127].

In der Kombinationsbehandlung mit dem Zytostatikum Doxorubicin und Istaroxim konnten keine synergistischen oder additiven Effekte auf die Aktivität des Zellstoffwechsels der drei untersuchten Zelllinien (RD, Rh30, A204) festgestellt werden. Untersuchungen bezüglich des

Apoptoseverhaltens bei dieser Kombinationsbehandlung sind demnach nicht erfolgt. Nach den Studien von Tomlinson et al. (2005) hat Doxorubicin ohnehin zumindest beim mRT keine signifikanten Auswirkungen auf die Tumorreduktion [45]. Im Gegensatz dazu konnten synergistische Effekte der Kombinationsbehandlung von Istaroxim und Carboplatin bei den Zelllinien Rh30 und A204 nachgewiesen werden. Die Aktivität des Zellmetabolismus der RD-Zellen wies eine signifikante Reduktion bei einer Kombination aus 15 µg/ml Carboplatin und 7,5 µM Istaroxim im Vergleich zu den Einzelbehandlungen auf. Die Kombination beider Wirkstoffe weist demnach das Potential für eine Erweiterung der Chemotherapieoptionen auf. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen lassen sich vor allem durch die verschiedenen Wirkungsweisen der Zytostatika begründen. Während Carboplatin durch eine Vernetzung der Guaninbasen in der Erbinformation der Zellen einen Replikationsstopp verursacht, beruht die Wirkung von Doxorubicin primär auf einer Hemmung der Topoisomerase II. Warum Doxorubicin in Kombination mit Istaroxim keine additive oder synergistische Inhibition der Viabilität hervorruft, kann auf kompetitive Wirkungsmechanismen zurückzuführen sein, bei welchen im Zuge einer Hemmung durch Istaroxim keine weitere Hemmung durch Doxorubicin erfolgen kann. Der genaue Mechanismus ist bislang aber noch nicht entschlüsselt.

Daher ist davon auszugehen, dass Istaroxim keine oder eine vernachlässigbare Wirkung auf nicht pathologische Zellen hat. Die durchgeführten MTT-Assays dienen zwar als Indikator für Veränderungen des Zellstoffwechsels, dadurch können allerdings noch keine differenzierten Aussagen über die genauen Umstände des veränderten Zellmetabolismus gemacht werden. Somit kann nicht nachvollzogen werden, ob eine Reduktion der Zellviabilität, der apoptotische oder nekrotische Zelluntergang oder etwa eine Herabregulation des Zellstoffwechsels der untersuchten Zellen vorliegt. Letztendlich kann aber nachgewiesen werden, dass die jeweilige Behandlung eine Auswirkung auf die Stoffwechselaktivität hat. Aus diesem Grund wurden im Folgenden weitere Untersuchungen vorgenommen, die die Einflüsse von Istaroxim auf Apoptose und Nekrose nachweisen sollten.

Die Ergebnisse der Apoptose-Assays zeigen, dass bei den Zelllinien A204 und RD ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate durch eine Istaroximbehandlung erreicht werden konnte. Verglichen mit den Ergebnissen von Alevizopoulos et al. aus dem Jahr 2016 zeigt sich, dass die Zellen der Zelllinien RD und A204 wie die Prostatakrebszelllinie DU-145 ebenfalls im

Zuge einer Istaroximbehandlung signifikant vermehrt durch Apoptose zugrunde gehen [74]. Auch bei den Rh30-Zellen konnte mit steigender Istaroximkonzentration ein tendenzieller Anstieg der Apoptoserate verzeichnet werden. Insgesamt zeichnet sich durch den doppelt- bzw. 2,5-fach- höheren Dosisbedarf an Istaroxim ab, dass Istaroxim einen schwächeren Effekt auf die mRT- (A204) und RMS-Zelllinien (RD und Rh30) ausübt, als auf die Prostatakrebszelllinie DU-145 [74]. Demzufolge wäre eine signifikante Änderung der Apoptoserate für die Zelllinie Rh30 bei einer weiteren Steigerung der Istaroximdosis denkbar. Natürlich muss berücksichtigt werden, dass dabei auch stärkere Nebenwirkungen auftreten können. Eine vorsichtige Steigerung der Konzentration ist somit ratsam. Darüber hinaus sollte dennoch untersucht werden, inwiefern der Ursprung der jeweiligen Tumorentitäten Einfluss auf das Ansprechen auf die Istaroximbehandlung hat. Eine mögliche Ursache für die schlechtere Apoptoserate der Rh30-Zellen könnte allerdings auch in den Unterschieden der genetischen Konfiguration zwischen den untersuchten Zelllinien liegen. Bei den Rh30-Zellen handelt es sich um einen alveolären RMS-Typen, der gemeinhin als aggressiver als der embryonale Typ gilt [30]. Die wichtigsten Unterschiede zwischen den Zelllinien der ARMS und ERMS liegen nach derzeitigem Forschungsstand in der Hochregulation des PAX7-Gens [11] und dem Allelverlust 11p15.5 am kurzen Arm des Chromosoms 11 [13], was jeweils nur beim ERMS zu beobachten ist. Das ARMS hingegen weist in knapp 80 % der Fälle eine Gentranslokation zwischen Chromosom 1 oder 2 und dem Chromosom 13 auf [t(2;13)(q35;q14) bzw. t(1;13)(p36;q14)] [14]. Diese führen zu den Fusionsgenen PAX3-FKHR oder PAX7-FKHR [10, 15], welche das tumorgenetische Verhalten der Zellen auch hinsichtlich des Apoptoseverhaltens prägen [5, 14]. Der in dieser Arbeit als Vertreter der ARMS untersuchten Zelllinie Rh30 wurde das PAX3-FOXO1-Fusionsgen bereits nachgewiesen [128].

Durch eine Behandlung mit Carboplatin konnten bei den Zelllinien RD und A204 ebenfalls signifikante Steigerungen der Apoptosezahlen um über 20 Prozentpunkte verzeichnet werden. Da aus den Kombinationsbehandlungen mit Carboplatin und Istaroxim keine signifikanten Veränderungen in Relation zu den jeweiligen Einzelbehandlungen hervorgehen, lässt sich schlussfolgern, dass die kombinierte Verabreichung keine Vorteile in der klinischen Therapie in Hinblick auf die Reduktion der Tumorgöße mit sich bringen könnte. Diese These müsste jedoch *in vivo* durch Tierversuche bestätigt werden, zumal isolierte Zelllinien in Zellkulturen mitunter anders verhalten, als Zellen in komplexen Organismen. Aus den erhobenen Daten geht darüber hinaus hervor, dass die Apoptoserate der Rh30-Zelllinie

unter Istaroximeinfluss geringer als bei einer Behandlung mit Carboplatin ist. Möglicherweise liegen dem eine genetische Mutation oder andere Signalwege zugrunde, die bei den anderen untersuchten Tumorzelllinien nicht vorliegt. Weiteren Aufschluss könnten an dieser Stelle die Signalwege geben, die Istaroxim in den verschiedenen Tumorzellen und weiteren Zelllinien induziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den „Zellviabilitäts-Assays“ erstmals eine deutliche, dosisabhängige Reduktion der Aktivität des Zellmetabolismus einer ERMS-, ARMS- und mRT-Zelllinie unter Istaroximeinwirkung nachgewiesen werden konnte. Weiterhin war ein Apoptoseanstieg durch Istaroxim bei den Zelllinien RD und A204 zu beobachten. Bedeutsame Vorteile einer Kombinationsbehandlung mit einem Zytostatikum konnten hinsichtlich des Apoptoseverhaltens noch nicht festgestellt werden. Eine Langzeitwirkung, die über den Behandlungszeitraum von 72 h hinausgeht, wurde allerdings noch nicht untersucht. Auf welcher Ebene des Zellstoffwechsels eine Wirkung von Istaroxim auf die Zelllinie Rh30 besteht, war aus den MTT- und Apoptose-Assays nicht ersichtlich. Da eine synergistische Wirkung von Istaroxim und Carboplatin auf die Rh30-Zellen in den MTT-Assays festgestellt werden konnte, besteht allerdings Anlass neben den Apoptosemechanismen weitere Zellstoffwechselforgänge zu untersuchen.

### **4.3 Auswirkungen von Istaroxim auf das Migrationsverhalten von RMS und mRT-Zelllinien**

Der Begriff der Zellmigration fasst unterschiedliche Bewegungsformen von Einzelzellen und ganzen Zellverbänden zusammen. Letztgenanntes ist die im Organismus bevorzugt auftretende Migrationsart, wenn es um Wundheilungsprozesse und Metastasierungen maligner Gewebsneubildungen geht. Die Mechanismen, derer sich Zellverbände zur Migration bedienen, unterscheiden sich von denen einzelner Zellen nicht [129].

Zur Analyse der Auswirkungen einer Istaroximbehandlung auf das Migrationsverhalten der Zelllinien A204, RD und Rh30 wurden Wound-Healing-Assays durchgeführt, die zur zweidimensionalen Untersuchung der Zellmigration dienen [130]. Bei allen drei Zelllinien konnte eine signifikante Reduktion der Migration nachgewiesen werden. Am stärksten war dieser Effekt bei der mRT-Zelllinie A204 festzustellen. Hierbei wurde auch die geringste Dosis

an Istaroxim (5  $\mu$ M) benötigt, um eine signifikante Reduktion der Migration zu erzielen. Diese Feststellung schließt sich den Ergebnissen aus den vorausgegangenen MTT-Assays für A204 an.

Dieses unter Einfluss von Istaroxim festgestellte Migrationsverhalten konnte bereits von Stagno et al. (2017) an der Prostatakrebszelllinie DU-145 beobachtet werden [77]. Darüber hinaus zeigten die von Magpusao et al. (2015) publizierte Versuchsergebnisse, dass die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Inhibitoren Ouabain und Digitoxin ebenfalls zu einer reduzierten Zellmigration bei Brustkrebszellen (MDA-MB-231) führen [131]. Ein Mechanismus, der für die reduzierte Migration verantwortlich ist, konnte noch nicht ergründet werden. Einen möglichen Anhaltspunkt bietet die Untersuchung der Veränderung der Aktinstrukturen der mit Istaroxim behandelten Zellen. Der Nachweis einer verstärkten Verschiebung des Verhältnisses von filamentärem hin zu globulärem Aktin wäre eine Erklärung für die eingeschränkte Zellmotilität. Eine weitere denkbare Ursache steht im Zusammenhang mit dem Calciumhaushalt der Zellen und den an dessen Regulation beteiligten Strukturen STIM1 und Orai1. Stagno et. al. konnte nachweisen, dass Tumorzellen der Zelllinie DU-145 unter Istaroximeinfluss signifikant weniger STIM1 und Orai1 exprimieren. Zudem zeigte sich, dass der Calciumioneneinstrom nach der Istaroximbehandlung deutlich reduziert war [77]. Diesbezüglich muss das Verhalten der RMS- und mRT -Zelllinien noch untersucht werden. Bislang ist lediglich bekannt, dass die Zelllinie Rh30 mehr Orai1 exprimiert als die RD-Zelllinie [132]. Ausgehend davon müsste, bei einem möglichen Angriffspunkt von Istaroxim an Orai1, eine stärkere Reaktion der Rh30-Zellen im Vergleich zu den RD-Zellen feststellbar sein. In den in dieser Arbeit durchgeführten Wound-Healing-Assays ist diesbezüglich allerdings kein gravierender Unterschied zwischen den RD- und den Rh30-Zelllinien festzustellen.

Mit Untersuchungen des Migrationsverhaltens wird im Allgemeinen versucht, Prognosen hinsichtlich der Metastasierungsveränderungen zu machen. Auch wenn durch Wound-Healing-Assays kein dreidimensionales Zellmigrationsverhalten simuliert werden kann, ist die eindeutigen Reduktion der Tumorzellmigration in den durchgeführten Versuchsreihen ein klares Indiz für eine potenzielle Entschleunigung eines Metastasierungsvorganges durch Istaroxim. Für die weiteren Nachforschungen auf diesem Gebiet wäre zudem das Migrationsverhalten der Tumorzellen nach einer Kombinationsbehandlung von Istaroxim mit verschiedenen Zytostatika interessant.

#### **4.4 Auswirkungen auf die Kolonienbildung**

*Colony formation assays* (CFA) wurden ursprünglich für die Radiobiologie entwickelt, um Zusammenhänge zwischen Bestrahlung und dem Reproduktionsverhalten der bestrahlten Zellen feststellen zu können. Mittlerweile konnte sich der CFA als grundlegende *in vitro*-Methode zur Untersuchung des Kolonienwachstums unter Einfluss diverser potenzieller Tumortheraeutika und Antikanzerozene etablieren. Die Wirkung von Istaroxim in CFAs der Zelllinien RD, Rh30 und A204 wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht.

Der sogenannte klonogene Zelltod unterscheidet sich insofern von der Apoptose, als dass die Zelle nicht sofort durch ein bestimmtes Programm zugrunde geht, sondern ihre Reproduktionsfähigkeit eingestellt wird. Dabei behält die Zelle ihre Fähigkeit zur Protein-Synthese und DNA-Reproduktion zwar bei, ist allerdings nicht mehr in der Lage, sich zu teilen. Die Zelle wird demnach ohne Tochterzellen produziert zu haben, untergehen [122, 133].

Die konzentrationsabhängige Induktion des klonogenen Zelltodes durch Istaroxim an den untersuchten mRT- (A204) und RMS-Zelllinien (RD und Rh30) konnte in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass signifikante Ergebnisse bereits bei einem Bruchteil, der für die Viabilitäts-Assays eingesetzten Dosen erzielt werden. Demzufolge ist davon auszugehen, dass durch Istaroxim entscheidende Prozesse der Zellteilung der RMS- und mRT-Zelllinien gestört oder blockiert werden. Die Erforschung der zugehörigen Signalwege zu diesem Mechanismus sollte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

#### **4.5 Klinische Relevanz**

Eines der Hauptprobleme des Krankheitsbilds eines RMS besteht in der Therapie des starken Metastasenbefalls in besonders schweren Fällen. Trotz erheblicher klinischer Fortschritte in den vergangenen 30 Jahren haben solche Patienten eine vergleichsweise geringe Überlebenschance [15]. Eine Metastasierung der RMS tritt bei etwa 15-20 % der Patienten auf. Die Prognose für eine Heilung stagniert in diesen Fällen seit mehreren Jahren bei unter 30 % [134-137]. In vielen Fällen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate sogar bei unter 10 % [137, 138]. Im Allgemeinen werden Knochen- oder Knochenmarksmetastasen mit einer schlechteren Prognose als Metastasen anderer Lokalisationen in Verbindung gebracht [137].

Der histologische Subtyp spielt nach neueren Erkenntnissen hierbei nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr wird nach jetziger Studienlage die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung primär mit der Präsenz eines Fusionsonkoproteins (PAX-FOXO1) in Verbindung gebracht [138, 139]. Das in beiden in dieser Arbeit untersuchten histologischen RMS-Subtypen auftretenden Fusionsgen konnte in Expressionsstudien an Myoblasten u.a. als Grund für eine erhöhte Invasionskapazität festgestellt werden [138, 140]. Die derzeit angewandten verschiedenen Therapieoptionen für einen mRT führen laut Angaben der Fachliteratur in deutlich weniger als 50 % der Fälle zur Heilung der Patienten [43, 45, 64]. Da die betroffenen sich zumeist im Kleinkind- bzw. Säuglingsalter befinden, führen auch erfolgreiche kurative Therapien oft zu Folgeschäden in neurokognitiven und vaskulären Bereichen [44]. Auch die Letalität von mRT hängen, wie Vujanic et al. (1996) zeigte, mit der Abwanderung von Metastasen in lebenswichtige Organe zusammen [55]. Des Weiteren müssen bei tumorchirurgischen Eingriffen oft mutilierende Faktoren in Kauf genommen werden.

In den letzten Jahren wurde die antikanzerogene Wirkung von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase-Inhibitoren als Gegenstand verschiedener Forschungsprojekte untersucht. So wurden bereits 1978 verstärkte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivitäten ausgehend von neoplastischem Mammaepithel in Mäusen festgestellt [141]. Dem Wirkstoff Istaroxim konnten in der folgenden Zeit bis heute bei unterschiedlichen Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften nachgewiesen werden, die den Verlauf einer Tumorthherapie begünstigen können. So konnte Alevizopoulos et al. (2016) unter anderem die Größenzunahme der Tumoren, welche sich aus PC-3-Prostatakarzinomzellen im Mausmodell gebildet hatten, inhibieren [74]. Die Untersuchungen von Stagno et al. (2017) führte aufgrund der induzierten Reduktion der Orai1/STIM1-Expression in DU-145-Zellen (Prostatakarzinomzelllinie) zu der Annahme, dass die Modulation der Calciumkonzentration ein entscheidender Angriffspunkt von Istaroxim in Hinblick auf die antikanzerogene Wirkung des Medikaments ist [77]. Der intrazelluläre Calciumhaushalt spielt vor allem bei der Regulation der Proliferation, Widerstandsfähigkeit gegenüber apoptotischen Signalen und der Migration von Tumorzellen eine entscheidende Rolle [142]. Die zugrunde liegenden Ergebnisse weisen ebenfalls einheitlich auf eine Istaroxim-induzierte Reduktion der Zellmigration und die Einleitung eines verstärkten klonogenen Zelltods hin. Zudem deckt sich das nachgewiesene apoptotische Potenzial von Istaroxim mit den Ergebnissen der aktuellen Datenlage aus den Untersuchungen mit anderen Tumorzelllinien [74].

Eine derzeit nach wie vor wesentliche Herausforderung in der Behandlung von RMS und mRT ist die Reduktion der Metastasierung und TumorgroÙe. Mit Hilfe von multimodalen Therapieansätzen wie etwa der hyperthermalen intraperitonealen Chemotherapie oder der Brachytherapie wird versucht diese klinischen Herausforderungen zu bewältigen. Dabei könnte Istaroxim, gerade als Therapeutikum für die HIPEC-Behandlung in Zukunft eine entscheidende Therapieverbesserung mit seiner Potenz zur Reduktion von Tumorzellmigration und -proliferation spielen. Diese Option birgt die Möglichkeit chirurgische Tumorresektionen in ihrem Gesamtausmaß und -aufwand zu verringern und damit auch mutilierenden Faktoren und Folgeschäden für die Patienten weitgehend zu vermeiden. Ob Istaroxim für eine HIPEC-Behandlung in Frage kommt hängt auch von der Hitzebeständigkeit des Stoffes ab. Diese Eigenschaft muss im Vorfeld untersucht werden.

#### **4.6 Limitationen**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und Experimente wurden allesamt *in vitro* an Zellkulturen durchgeführt. Die daraus entstandenen Ergebnisse dienen somit als Anhaltspunkte für mögliche weiterführende Forschungsansätze. Trotz sorgfältiger Durchführung und genauer Prüfung der Experimente können die Ergebnisse nicht direkt auf einen klinischen Fall übertragen werden, da die Auswirkungen unzähliger parallel verlaufender physiologischer Prozesse nicht vorhergesagt werden können. Eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse *in vivo* ist für die weitere Forschung auf diesem Gebiet daher unerlässlich. Die in den MTT-Assays gezeigten signifikanten Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel der skelettalen Muskelzellen (SkMC) geben hierzu Anlass. Es gilt genaustens zu untersuchen, in welcher Form und welchem Ausmaß Nebenwirkungen auftreten können, zumal die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase eine wichtige Proteinstruktur darstellt, die für den osmotischen Ausgleich der Zelle mit ihrer Umgebung und den elektrischen Gradienten an der Zellmembran von essenzieller Bedeutung ist [142, 143]. Dennoch sollte berücksichtigt werden, dass die reduzierte Aktivität des Zellmetabolismus der SkMC-Zelllinie auch bei steigender Istaroximkonzentration konstant blieb. Zudem befindet sich Istaroxim bereits zu Testzwecken in der klinischen Forschungsphase II und wies dabei eine vergleichsweise geringere Toxizität auf, als der bereits etablierte ionotropische Wirkstoff Digoxin [68]. Der Umfang dieser Arbeit erlaubte nur eine begrenzte Zahl an Experimenten an drei Zelllinien.



Um ein verifizierteres Bild über die Wirkungsweise von Istaroxim an RMS und mRT zu erhalten, ist es notwendig weitere Zelllinien, die unter anderem auch andere Gentranslokationen als die, in dieser Arbeit eingesetzten ARMS-Zellen bzw. andere Mutationen, als die hier eingesetzten ERMS-Zellen zu untersuchen. Selbes gilt auch für die Ausweitung der Kombinationstherapie auf andere, als die hier eingesetzten Chemotherapeutika. Diesbezüglich gilt es zudem zu klären, wie es zu einer Inhibition der apoptotischen Wirkung von Carboplatin durch Istaroxim bei der ARMS-Zelllinie Rh30 kommt. Eine denkbare Option besteht in der Annahme, dass Istaroxim die Vernetzung der Guanin-Basen durch Carboplatin in der Erbinformation hemmt. In weiteren Untersuchungen sollte zunächst festgestellt werden, ob sich andere ARMS-Zelllinien unter den gleichen Behandlungsbedingungen ähnlich verhalten. Zudem sollte geklärt werden, ob sich die Versuchsergebnisse mit anderen Chemotherapeutika aus der Gruppe der Platinverbindungen, wie etwa Cisplatin, wiederholen lassen.

#### **4.7 Ausblick**

Die Erforschung der antikanzerogenen Wirkweise des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Inhibitors Istaroxim befindet sich derzeit noch in ihren Anfängen. Um ein grundlegendes Verständnis über potenzielle Einsatzgebiete in der klinischen Therapie zu erlangen, gilt es in erster Linie zu ergründen, an welchen Ansatzpunkten im Zellstoffwechsel Istaroxim angreift und wie sich die Auswirkungen auf nicht-pathologische Zellen und Prozesse auswirkt.

Während die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase als Zielstruktur für Istaroxim als am naheliegendsten gilt, verdichten sich die Hinweise darauf, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen ATPasen SERCA eine entscheidende Rolle spielen. Diese könnte durch die Modulation des intrazellulären Calciumhaushaltes an der Proliferation und Migration der Tumorzellen beteiligt sein. Die Nachforschung zur Regulation von Orai1 und STIM1 unter Istaroximeinfluss bietet, wie an der Zelllinie DU-145 bereits gezeigt, einen vielversprechenden Ansatz Signalkaskaden, die die Motilität, Migration und Proliferation betreffen, nachvollziehen zu können [77]. Mittels real-time PCR-Untersuchungen kann ermittelt werden, ob und in welchem Maß sich die Expression von Orai1, STIM1 und des SOCE in den einzelnen Zellkulturen unter Istaroximeinfluss verändert. Bei einer zu erwartenden, abnehmenden Expression, würde der Calciumhaushalt der Zelle als Angriffspunkt für die verminderte Zellmigration und

Proliferation durch Istaroxim bestätigt werden. Dies könnte zudem durch eine Untersuchungsreihe unter Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-Acetoxy-methylesters, der einen Komplex mit dem intrazellulären Calcium bilden kann, bestätigt werden [144]. Mit Hilfe weiterer Western Blots können zudem das Verhältnis von G- zu F-Aktin [74, 77] und die Expression von RhoA unter Istaroximeinfluss ermittelt werden. RhoA ist ein Mitglied der GTPasen-Familie, das mitunter eine wichtige Rolle in der Aktinreorganisation spielt [145]. Im Zuge dieser weiteren Untersuchungen könnte sich zudem klären, weshalb für die A204-Zelllinie eine deutlich geringere Istaroximkonzentration eingesetzt werden musste als für die RMS-Zelllinien. Auf Grundlage der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse und der derzeitigen Literatur konnte bislang kein sinnvoller Zusammenhang zwischen der geringen Dosis des eingesetzten Istaroxims und der in Relation zu den RMS-Zelllinien schwachen Expression der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bei der A204-Zelllinie hergestellt werden. Da die hier eingesetzten A204-Zellen aus dem Muskelgewebe stammen, dieser Tumor allerdings auch anderweitig lokalisiert sein kann, wie etwa im Gehirn, ist nicht vorhersagbar, ob aufgrund anderer Verhältnisse der Blutversorgung die gleichen Effekte der Istaroxims erzielt werden könnten. Diese Fragestellung kann allerdings erst im Zuge von *in vivo-Versuchen* abschließend beantwortet werden.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals systematisch die Wirkung des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Inhibitors Istaroxim in singularer Behandlung, sowie in Kombination mit dem Zytostatikum Doxorubicin oder Carboplatin auf einzelne Rhabdomyosarkom- und maligne Rhabdoid-Tumorzelllinien untersucht. Die in den Experimenten erhobenen Daten sind in der folgenden Tabelle 11 nochmals als vereinfachte Übersicht dargestellt.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine mögliche Angriffsstruktur für die Tumorthherapie mit Istaroxim auf den Zelllinien Rh30 (ARMS), RD (ERMS) und A204 (mRT) vorhanden ist.

Im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeiten konnte eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität der untersuchten Zelllinien unter dem Einfluss von Istaroxim festgestellt werden. In der Kombinationsbehandlung mit Carboplatin zeigten sich zudem synergistische Effekte an den A204- und Rh30-Zellen. Die Kombinationsbehandlungen aus Istaroxim und Doxorubicin zeigte hingegen keine synergistischen oder additiven Effekte. Weiterführend konnte eine signifikant verstärkte Apoptoserate durch Istaroxim bei den Zelllinien RD und A204 festgestellt werden.

In den Experimenten zum Migrationsverhalten zeigten sich bei allen drei untersuchten Tumorzelllinien signifikante Reduktionen unter Istaroximeinfluss. Auch eine signifikante Induktion des klonogenen Zelltodes konnte im Zuge der Colony-Forming-Assays (CFA) bei den mRT- (A204) und RMS-Zellen (RD und Rh30) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die These einer antikanzerogenen Wirkung des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Inhibitors Istaroxim, auch wenn dessen Wirkweise bei den einzelnen Tumorzelllinien teilweise variiert. Die hier vorliegenden Resultate fügen sich ins Bild der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage zur Untersuchung der potenziellen Etablierung von Istaroxim in der Tumorthherapie. Insbesondere in Bezug auf die Bedeutung für die Migrations- und Kolonienbildungsfähigkeit konnten vielversprechende Ansätze erarbeitet werden. Welche Haupt- und Nebenfaktoren bei der Wirkweise von Istaroxim dabei eine Rolle spielen, gilt es noch weiter zu ergründen.

Tabelle 11: Übersicht über die Ergebnisse der einzelnen Experimente

Behandlung	A204	RD	Rh30
Zellstoffwechselaktivität/ „Viabilität“ [24 h]			
Istaroxim	↓	↓	↓
Zellstoffwechselaktivität/ „Viabilität“ [72 h]			
Istaroxim	↓	↓	↓
Carboplatin	↓	↓	↓
Doxorubicin	↓	↓	↓
Istaroxim + Carboplatin	↓↓ ++	↓	↓↓ ++
Istaroxim + Doxorubicin	↓	↓	↓
Apoptoseinduktion			
Istaroxim	↑	↑	→
Carboplatin	↑	→	↑
Istaroxim + Carboplatin	↑	↑	↑
Migrationsverhalten			
Istaroxim	↓	↓	↓
Induktion des klonogenen Zelltods			
Istaroxim	↑	↑	↑

Tabelle 12: Legende zu Tabelle 11

↓	Signifikante Abnahme
↓↓	Signifikante Abnahme bei Kombinationstherapie verglichen mit der Abnahme solitärer Therapie mit dem entsprechenden Zytostatikum
↑	Signifikante Zunahme
↑↑	Signifikante Zunahme bei Kombinationstherapie verglichen mit der Zunahme solitärer Therapie mit dem entsprechenden Zytostatikum
→	Keine signifikante Veränderung
+	Additiver Effekt
++	Synergistischer Effekt

## Literaturverzeichnis

1. Ognjanovic, S., et al., *Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005*. *Cancer*, 2009. **115**(18): p. 4218-26.
2. Huh, W.W. and S.X. Skapek, *Childhood rhabdomyosarcoma: new insight on biology and treatment*. *Curr Oncol Rep*, 2010. **12**(6): p. 402-10.
3. Ries, L.A.G., et al., *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, N.C. Institute, Editor. 1999, Cancer Statistics Branch: Bethesda, Maryland. p. 111-123.
4. Leaphart, C. and D. Rodeberg, *Pediatric surgical oncology: management of rhabdomyosarcoma*. *Surg Oncol*, 2007. **16**(3): p. 173-85.
5. Radzikowska, J., et al., *Rhabdomyosarcoma of the head and neck in children*. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015. **19**(2): p. 98-107.
6. Lychou, S.E., G.G. Gustafsson, and G.E. Ljungman, *Higher rates of metastatic disease may explain the declining trend in Swedish paediatric rhabdomyosarcoma survival rates*. *Acta Paediatr*, 2016. **105**(1): p. 74-81.
7. Newton, W.A., Jr., et al., *Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification--an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*. *Cancer*, 1995. **76**(6): p. 1073-85.
8. Hollowood, K. and C.D. Fletcher, *Rhabdomyosarcoma in adults*. *Semin Diagn Pathol*, 1994. **11**(1): p. 47-57.
9. Tiffin, N., et al., *PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(2): p. 327-32.
10. McDowell, H.P., *Update on childhood rhabdomyosarcoma*. *Arch Dis Child*, 2003. **88**(4): p. 354-7.
11. Egas-Bejar, D. and W.W. Huh, *Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives*. *Adolesc Health Med Ther*, 2014. **5**: p. 115-25.
12. Stout, A.P., *Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles*. *Ann Surg*, 1946. **123**: p. 447-72.
13. Xia, S.J., J.G. Pressey, and F.G. Barr, *Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma*. *Cancer Biol Ther*, 2002. **1**(2): p. 97-104.
14. Sorensen, P.H., et al., *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(11): p. 2672-9.
15. Skapek, S.X., et al., *Rhabdomyosarcoma*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 1.
16. Anderson, J., et al., *Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999. **26**(4): p. 275-85.
17. Taylor, A.C., et al., *P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines*. *Med Pediatr Oncol*, 2000. **35**(2): p. 96-103.
18. Sung, L., et al., *Neurofibromatosis in children with Rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma study IV*. *J Pediatr*, 2004. **144**(5): p. 666-8.
19. Carnevale, A., E. Lieberman, and R. Cardenas, *Li-Fraumeni syndrome in pediatric patients with soft tissue sarcoma or osteosarcoma*. *Arch Med Res*, 1997. **28**(3): p. 383-6.
20. O'Neal, J.P., et al., *Parameningeal rhabdomyosarcoma in a patient with Costello syndrome*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2004. **26**(6): p. 389-92.
21. Jung, A., et al., *Orbital rhabdomyosarcoma in Noonan syndrome*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2003. **25**(4): p. 330-2.
22. Smith, A.C., et al., *Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome*. *Pediatr Dev Pathol*, 2001. **4**(6): p. 550-8.
23. Grufferman, S., et al., *Parents' use of cocaine and marijuana and increased risk of rhabdomyosarcoma in their children*. *Cancer Causes Control*, 1993. **4**(3): p. 217-24.

24. Koscielniak, E. and T. Klingebiel, *Leitlinienprogramm der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie S1-Leitlinie 025/007: Weichteilsarkome*. AWMF online 2017.
25. Dasgupta, R., J. Fuchs, and D. Rodeberg, *Rhabdomyosarcoma*. *Semin Pediatr Surg*, 2016. **25**(5): p. 276-283.
26. Enterline, H.T. and R.C. Horn, Jr., *Alveolar rhabdomyosarcoma; a distinctive tumor type*. *Am J Clin Pathol*, 1958. **29**(4): p. 356-66.
27. Hayes-Jordan, A. and R. Andrassy, *Rhabdomyosarcoma in children*. *Curr Opin Pediatr*, 2009. **21**(3): p. 373-8.
28. Raney, R.B., et al., *Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2001. **23**(4): p. 215-20.
29. Dasgupta, R. and D.A. Rodeberg, *Update on rhabdomyosarcoma*. *Semin Pediatr Surg*, 2012. **21**(1): p. 68-78.
30. Amer, K.M., et al., *Epidemiology, Incidence, and Survival of Rhabdomyosarcoma Subtypes: SEER and ICES Database Analysis*. *J Orthop Res*, 2019. **37**(10): p. 2226-2230.
31. Sultan, I., et al., *Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: an analysis of 2,600 patients*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(20): p. 3391-7.
32. Seitz, G., et al., *Outcome, Treatment, and Treatment Failures in Patients Suffering Localized Embryonal Paratesticular Rhabdomyosarcoma: Results From the "Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe" Trials CWS-86, -91, -96, and -2002P*. *Ann Surg*, 2016. **264**(6): p. 1148-1155.
33. Mattke, A.C., et al., *Does the time-point of relapse influence outcome in pediatric rhabdomyosarcomas?* *Pediatr Blood Cancer*, 2009. **52**(7): p. 772-6.
34. Gesche, J., 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): p. e27517.
35. Schmidt, A., et al., *The Role of Reconstructive Surgery and Brachytherapy in Pediatric Bladder/Prostate Rhabdomyosarcoma*. *J Urol*, 2020. **204**(4): p. 825-834.
36. Beckwith, J.B. and N.F. Palmer, *Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study*. *Cancer*, 1978. **41**(5): p. 1937-48.
37. Haas, J.E., et al., *Ultrastructure of malignant rhabdoid tumor of the kidney. A distinctive renal tumor of children*. *Hum Pathol*, 1981. **12**(7): p. 646-57.
38. Biggs, P.J., et al., *Malignant rhabdoid tumor of the central nervous system*. *Hum Pathol*, 1987. **18**(4): p. 332-7.
39. Geller, J.I., J.J. Roth, and J.A. Biegel, *Biology and Treatment of Rhabdoid Tumor*. *Crit Rev Oncog*, 2015. **20**(3-4): p. 199-216.
40. Oda, Y. and M. Tsuneyoshi, *Extrarenal rhabdoid tumors of soft tissue: clinicopathological and molecular genetic review and distinction from other soft-tissue sarcomas with rhabdoid features*. *Pathol Int*, 2006. **56**(6): p. 287-95.
41. Packer, R.J., et al., *Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: report on workshop*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2002. **24**(5): p. 337-42.
42. Sultan, I., et al., *Soft tissue sarcomas in the first year of life*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(13): p. 2449-56.
43. Brennan, B., C. Stiller, and F. Bourdeaut, *Extracranial rhabdoid tumours: what we have learned so far and future directions*. *Lancet Oncol*, 2013. **14**(8): p. e329-36.
44. Seeringer, A., et al., *Feasibility of intensive multimodal therapy in infants affected by rhabdoid tumors - experience of the EU-RHAB registry*. *Klin Padiatr*, 2014. **226**(3): p. 143-8.
45. Tomlinson, G.E., et al., *Rhabdoid tumor of the kidney in the National Wilms' Tumor Study: age at diagnosis as a prognostic factor*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(30): p. 7641-5.

46. Heck, J.E., et al., *Epidemiology of rhabdoid tumors of early childhood*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(1): p. 77-81.
47. Shashi, V., et al., *Malignant rhabdoid tumor of the kidney: involvement of chromosome 22*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994. **10**(1): p. 49-54.
48. Biegel, J.A., et al., *The role of INI1 and the SWI/SNF complex in the development of rhabdoid tumors: meeting summary from the workshop on childhood atypical teratoid/rhabdoid tumors*. *Cancer Res*, 2002. **62**(1): p. 323-8.
49. Versteeg, I., et al., *Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer*. *Nature*, 1998. **394**(6689): p. 203-6.
50. Kim, K.H. and C.W. Roberts, *Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth*. *Cancer Genet*, 2014. **207**(9): p. 365-72.
51. Roberts, C.W., et al., *Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13796-800.
52. Eaton, K.W., et al., *Spectrum of SMARCB1/INI1 mutations in familial and sporadic rhabdoid tumors*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011. **56**(1): p. 7-15.
53. Sevenet, N., et al., *Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers*. *Am J Hum Genet*, 1999. **65**(5): p. 1342-8.
54. Frühwald, M.C., et al., *Non-linkage of familial rhabdoid tumors to SMARCB1 implies a second locus for the rhabdoid tumor predisposition syndrome*. *Pediatr Blood Cancer*, 2006. **47**(3): p. 273-8.
55. Vujanic, G.M., et al., *Rhabdoid tumour of the kidney: a clinicopathological study of 22 patients from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) nephroblastoma file*. *Histopathology*, 1996. **28**(4): p. 333-40.
56. Ahmed, H.U., et al., *Part I: Primary malignant non-Wilms' renal tumours in children*. *Lancet Oncol*, 2007. **8**(8): p. 730-7.
57. Provenzi, V.O., et al., *[Tumor size and prognosis in patients with Wilms tumor]*. *Rev Paul Pediatr*, 2015. **33**(1): p. 82-7.
58. Parham, D.M., D.A. Weeks, and J.B. Beckwith, *The clinicopathologic spectrum of putative extrarenal rhabdoid tumors. An analysis of 42 cases studied with immunohistochemistry or electron microscopy*. *Am J Surg Pathol*, 1994. **18**(10): p. 1010-29.
59. Kohashi, K., et al., *Reclassification of rhabdoid tumor and pediatric undifferentiated/unclassified sarcoma with complete loss of SMARCB1/INI1 protein expression: three subtypes of rhabdoid tumor according to their histological features*. *Mod Pathol*, 2016. **29**(10): p. 1232-42.
60. Judkins, A.R., *Immunohistochemistry of INI1 expression: a new tool for old challenges in CNS and soft tissue pathology*. *Adv Anat Pathol*, 2007. **14**(5): p. 335-9.
61. Wagner, L., et al., *Treatment of metastatic rhabdoid tumor of the kidney*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2002. **24**(5): p. 385-8.
62. Waldron, P.E., et al., *Successful treatment of a patient with stage IV rhabdoid tumor of the kidney: case report and review*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1999. **21**(1): p. 53-7.
63. Chi, S.N., et al., *Intensive multimodality treatment for children with newly diagnosed CNS atypical teratoid rhabdoid tumor*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(3): p. 385-9.
64. Woehrer, A., et al., *Incidence of atypical teratoid/rhabdoid tumors in children: a population-based study by the Austrian Brain Tumor Registry, 1996-2006*. *Cancer*, 2010. **116**(24): p. 5725-32.
65. Gobbin, M., et al., *Novel analogues of istaroxime, a potent inhibitor of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: synthesis and structure-activity relationship*. *J Med Chem*, 2008. **51**(15): p. 4601-8.
66. Shah, S.J., et al., *Effects of istaroxime on diastolic stiffness in acute heart failure syndromes: results from the Hemodynamic, Echocardiographic, and Neurohormonal Effects of Istaroxime, a Novel Intravenous Inotropic and Lusitropic Agent: a Randomized Controlled Trial in Patients Hospitalized with Heart Failure (HORIZON-HF) trial*. *Am Heart J*, 2009. **157**(6): p. 1035-41.

67. Blair, J.E., et al., *Rationale and design of the hemodynamic, echocardiographic and neurohormonal effects of istaroxime, a novel intravenous inotropic and lusitropic agent: a randomized controlled trial in patients hospitalized with heart failure (HORIZON-HF) trial*. Am J Ther, 2008. **15**(3): p. 231-40.
68. Alemanni, M., et al., *Role and mechanism of subcellular Ca<sup>2+</sup> distribution in the action of two inotropic agents with different toxicity*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(5): p. 910-8.
69. Gobbin, M., et al., *Novel analogues of Istaroxime, a potent inhibitor of Na(+),K(+)-ATPase: Synthesis, structure-activity relationship and 3D-quantitative structure-activity relationship of derivatives at position 6 on the androstane scaffold*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(12): p. 4275-99.
70. Gobbin, M. and A. Cerri, *Digitalis-like compounds: the discovery of the O-aminoalkyloxime group as a very powerful substitute for the unsaturated gamma-butyrolactone moiety*. Curr Med Chem, 2005. **12**(20): p. 2343-55.
71. Zhihao, L., et al., *SERCA2a: a key protein in the Ca(2+) cycle of the heart failure*. Heart Fail Rev, 2019.
72. Micheletti, R., et al., *Istaroxime, a stimulator of sarcoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase isoform 2a activity, as a novel therapeutic approach to heart failure*. Am J Cardiol, 2007. **99**(2A): p. 24A-32A.
73. George, M., et al., *Novel drug targets in clinical development for heart failure*. Eur J Clin Pharmacol, 2014. **70**(7): p. 765-74.
74. Alevizopoulos, K., et al., *Functional characterization and anti-cancer action of the clinical phase II cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitor istaroxime: in vitro and in vivo properties and cross talk with the membrane androgen receptor*. Oncotarget, 2016. **7**(17): p. 24415-28.
75. Hall, A., *Rho family GTPases*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(6): p. 1378-82.
76. Nguyen, L.K., B.N. Kholodenko, and A. von Kriegsheim, *Rac1 and RhoA: Networks, loops and bistability*. Small GTPases, 2018. **9**(4): p. 316-321.
77. Stagno, M.J., et al., *Istaroxime Inhibits Motility and Down-Regulates Orai1 Expression, SOCE and FAK Phosphorylation in Prostate Cancer Cells*. Cell Physiol Biochem, 2017. **42**(4): p. 1366-1376.
78. Feske, S., *CRAC channelopathies*. Pflugers Arch, 2010. **460**(2): p. 417-35.
79. Lu, Q. and S. Rounds, *Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis*. Microvasc Res, 2012. **83**(1): p. 56-63.
80. Ruggiero, A., et al., *Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management*. Anticancer Drugs, 2013. **24**(10): p. 1007-19.
81. Lokich, J. and N. Anderson, *Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature*. Ann Oncol, 1998. **9**(1): p. 13-21.
82. Knox, R.J., et al., *Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA*. Cancer Res, 1986. **46**(4 Pt 2): p. 1972-9.
83. Pavelka, M., M.F. Lucas, and N. Russo, *On the hydrolysis mechanism of the second-generation anticancer drug carboplatin*. Chemistry, 2007. **13**(36): p. 10108-16.
84. O'Dwyer, P.J., J.P. Stevenson, and S.W. Johnson, *Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs*. Drugs, 2000. **59 Suppl 4**: p. 19-27.
85. Duffull, S.B. and B.A. Robinson, *Clinical pharmacokinetics and dose optimisation of carboplatin*. Clin Pharmacokinet, 1997. **33**(3): p. 161-83.
86. Lambert, M.P., C. Shields, and A.T. Meadows, *A retrospective review of hearing in children with retinoblastoma treated with carboplatin-based chemotherapy*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(2): p. 223-6.
87. Bertolini, P., et al., *Platinum Compound-Related Ototoxicity in Children: Long-Term Follow-Up Reveals Continuous Worsening of Hearing Loss*. J Pediatr Hematol Oncol, 2004. **26**(10): p. 649-655.



88. Qaddoumi, I., et al., *Carboplatin-associated ototoxicity in children with retinoblastoma*. J Clin Oncol, 2012. **30**(10): p. 1034-41.
89. Arcamone, F., et al., *Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius*. Biotechnol Bioeng, 1969. **11**(6): p. 1101-10.
90. Weiss, R.B., et al., *Anthracycline analogs: the past, present, and future*. Cancer Chemother Pharmacol, 1986. **18**(3): p. 185-97.
91. Cortes-Funes, H. and C. Coronado, *Role of anthracyclines in the era of targeted therapy*. Cardiovasc Toxicol, 2007. **7**(2): p. 56-60.
92. Simunek, T., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 154-71.
93. Thorn, C.F., et al., *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*. Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(7): p. 440-6.
94. Doroshow, J.H., *Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4514-8.
95. Finn, N.A., H.W. Findley, and M.L. Kemp, *A switching mechanism in doxorubicin bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity*. PLoS Comput Biol, 2011. **7**(9): p. e1002151.
96. Fachinformation, *Doxorubicinhydrochlorid Teva 2 mg/ml*. Available: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/012535> [Accessed: 26.02.2020], Stand: Mai 2016. **7**: p. 1-7.
97. McAllister, R.M., et al., *Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma*. Cancer, 1969. **24**(3): p. 520-6.
98. Hinson, A.R., et al., *Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 183.
99. Missiaglia, E., et al., *Genomic imbalances in rhabdomyosarcoma cell lines affect expression of genes frequently altered in primary tumors: an approach to identify candidate genes involved in tumor development*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(6): p. 455-67.
100. Felix, C.A., et al., *Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma*. Cancer Res, 1992. **52**(8): p. 2243-7.
101. Miyachi, M., et al., *Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(12): p. 4077-84.
102. Schaaf, G., et al., *Silencing of SPRY1 triggers complete regression of rhabdomyosarcoma tumors carrying a mutated RAS gene*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 762-71.
103. Douglass, E.C., et al., *A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma*. Cytogenet Cell Genet, 1987. **45**(3-4): p. 148-55.
104. Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless, *Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(2): p. 209-14.
105. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
106. Bouche, M., et al., *TGF-beta autocrine loop regulates cell growth and myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells*. FASEB J, 2000. **14**(9): p. 1147-58.
107. Compton, S.J. and C.G. Jones, *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Anal Biochem, 1985. **151**(2): p. 369-74.
108. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
109. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
110. Ornstein, L., *Disc Electrophoresis. I. Background and Theory*. Ann N Y Acad Sci, 1964. **121**: p. 321-49.

111. van Meerloo, J., G.J. Kaspers, and J. Cloos, *Cell sensitivity assays: the MTT assay*. *Methods Mol Biol*, 2011. **731**: p. 237-45.
112. Stockert, J.C., et al., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. *Acta Histochem*, 2012. **114**(8): p. 785-96.
113. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(2): p. 329-33.
114. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. *Crit Rev Biotechnol*, 2017. **37**(2): p. 163-176.
115. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. *Curr Protoc Immunol*, 2018. **120**: p. 5 1 1-5 1 11.
116. Givan, A.L., *Flow cytometry: an introduction*. *Methods Mol Biol*, 2011. **699**: p. 1-29.
117. Cho, S.H., et al., *Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer*. *Biomicrofluidics*, 2010. **4**(4): p. 43001.
118. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
119. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. *J Immunol Methods*, 1995. **184**(1): p. 39-51.
120. Pietkiewicz, S., J.H. Schmidt, and I.N. Lavrik, *Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining*. *J Immunol Methods*, 2015. **423**: p. 99-103.
121. Vermes, I., C. Haanen, and C. Reutelingsperger, *Flow cytometry of apoptotic cell death*. *J Immunol Methods*, 2000. **243**(1-2): p. 167-90.
122. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
123. Fouquier, J. and M. Guedj, *Analysis of drug combinations: current methodological landscape*. *Pharmacol Res Perspect*, 2015. **3**(3): p. e00149.
124. Koscielniak, E., M. Morgan, and J. Treuner, *Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management*. *Paediatr Drugs*, 2002. **4**(1): p. 21-8.
125. Li, L., et al., *Expression of the beta3 subunit of Na(+)/K(+)-ATPase is increased in gastric cancer and regulates gastric cancer cell progression and prognosis via the PI3/AKT pathway*. *Oncotarget*, 2017. **8**(48): p. 84285-84299.
126. Sakai, H., et al., *Up-regulation of Na(+),K(+)-ATPase alpha 3-isoform and down-regulation of the alpha1-isoform in human colorectal cancer*. *FEBS Lett*, 2004. **563**(1-3): p. 151-4.
127. Carubelli, V., et al., *Treatment with 24 hour istaroxime infusion in patients hospitalised for acute heart failure: a randomised, placebo-controlled trial*. *Eur J Heart Fail*, 2020.
128. Rodriguez-Perales, S., et al., *Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. **148**(1): p. 35-43.
129. Trepap, X., Z. Chen, and K. Jacobson, *Cell migration*. *Compr Physiol*, 2012. **2**(4): p. 2369-92.
130. Sahai, E., *Mechanisms of cancer cell invasion*. *Curr Opin Genet Dev*, 2005. **15**(1): p. 87-96.
131. Magpusao, A.N., et al., *Cardiac glycoside activities link Na(+)/K(+) ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR*. *ACS Chem Biol*, 2015. **10**(2): p. 561-9.
132. Schmid, E., et al., *Store-operated Ca(2+) entry in rhabdomyosarcoma cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **477**(1): p. 129-136.
133. Munshi, A., M. Hobbs, and R.E. Meyn, *Clonogenic cell survival assay*. *Methods Mol Med*, 2005. **110**: p. 21-8.
134. Crist, W.M., et al., *Prognosis in children with rhabdomyosarcoma: a report of the intergroup rhabdomyosarcoma studies I and II. Intergroup Rhabdomyosarcoma Committee*. *J Clin Oncol*, 1990. **8**(3): p. 443-52.

135. Koscielniak, E., et al., *Metastatic rhabdomyosarcoma and histologically similar tumors in childhood: a retrospective European multi-center analysis*. *Med Pediatr Oncol*, 1992. **20**(3): p. 209-14.
136. Maurer, H.M., et al., *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report*. *Cancer*, 1988. **61**(2): p. 209-20.
137. Oberlin, O., et al., *Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(14): p. 2384-9.
138. Ramadan, F., et al., *Signaling pathways in Rhabdomyosarcoma invasion and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2020. **39**(1): p. 287-301.
139. Breneman, J.C., et al., *Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(1): p. 78-84.
140. Loupe, J.M., et al., *Comparative transcriptomic analysis reveals the oncogenic fusion protein PAX3-FOXO1 globally alters mRNA and miRNA to enhance myoblast invasion*. *Oncogenesis*, 2016. **5**(7): p. e246.
141. Shen, S.S., et al., *Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation*. *Cancer Res*, 1978. **38**(5): p. 1356-61.
142. Alevizopoulos, K., et al., *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitors in cancer*. *Curr Drug Targets*, 2014. **15**(10): p. 988-1000.
143. Lingrel, J.B. and T. Kuntzweiler, *Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(31): p. 19659-62.
144. Yu, W., et al., *Chorein Sensitive Orai1 Expression and Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Rhabdomyosarcoma Cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **40**(5): p. 1141-1152.
145. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. *Nature*, 2002. **420**(6916): p. 629-35.

## **Eigenanteilserklärung**

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, in der Abteilung für Kinderchirurgie und -urologie unter der Betreuung durch meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Steven Warmann und meiner Betreuerin Laborleiterin Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid innerhalb der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Jörg Fuchs durchgeführt und erarbeitet.

Das der Studie zugrundeliegende Konzept wurde von Frau Dr. Evi Schmid erdacht.

Alle zu dieser Arbeit zugehörigen Experimente wurde eigenständig von mir durchgeführt. Eine Einarbeitung zur Durchführung der Versuche erfolgte durch Herrn Matias Stagno (biologischer Doktorand) und Frau Dr. Evi Schmid.

Die Daten der Colony Forming Assays wurden von Frau Bettina Kirchner (MTA) erhoben. Teile der Western Blot-Versuchsreihen, wurden mit der Unterstützung von Frau Melanie Haut (MTA) durchgeführt.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte nach Unterweisung durch Frau Dr. Evi Schmid in eigenständiger Arbeit.

Ich versichere dieses Manuskript in eigenständiger Arbeit ohne weitere, als die von mir angegebenen Quellen verfasst zu haben.

Nordheim, den 30.05.2022

Hannes Weil

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie der Forschungsgruppe der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Fuchs unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid am Universitätsklinikum Tübingen für die Möglichkeit meine Doktorarbeit erstellen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Evi Schmid für ihr herausragendes Engagement, ihre unermüdliche Unterstützung und ihr offenes Ohr für alle Fragen, die im Laufe der Laborarbeiten, Präsentationen und des Schreibprozesses anfielen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Warmann, der sich in seiner Funktion als Doktorvater durch konstruktive Beiträge und Literaturempfehlungen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Matias Stagno bedanken, der mich trotz eigener zeitintensiver Projekte und dem beginnenden Vaterdasein weit über die Einarbeitung in die einzelnen Versuche hinaus unterstützt hat und stets Rede und Antwort stand, sofern sich Fragen auftaten.

Eine überaus große Hilfe waren zudem Melanie Hauth, Julia Wenz und Bettina Kirchner, die Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe, die mir geduldig und wachsam bei den Laborarbeiten zur Seite standen und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Weiterhin danke ich meiner Promotionskollegin Anna Hein, die mich durch alle Hoch- und Tiefphasen der Laborzeit begleitet hat.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und allen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, aber einen entscheidenden Teil – sei es durch aktive Hilfe, Ratschläge, ihr Vertrauen oder ermutigende Worte – zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen haben.