

Aus der

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

Die Wirkung von Curcumin beim Rhabdomyosarkom in vitro

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

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

vorgelegt von

Sorg, Christine

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. V. Ellerkamp

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 15.03.2023

Der Medizin und Mutter Erde

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kindliche Weichteiltumoren: Rhabdomyosarkom (RMS).....	1
1.2	Curcumin (CUR).....	10
1.3	Photodynamische Therapie (PDT).....	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Material.....	27
2.1.1	Zelllinien.....	27
2.1.2	Kulturmedium und Reagenzien.....	29
2.1.3	Puffer, Lösungen.....	30
2.1.3.1	Verwendete Medikamente zur Behandlung der Tumorzelllinien und SKMC-Zellen	30
2.1.3.2	Zellviabilität	31
2.1.3.3	Immunfluoreszenz	32
2.1.3.4	Colony-forming Assay (CFA).....	32
2.1.3.5	Durchflusszytometrie.....	33
2.1.3.6	Western Blot.....	33
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.5	Geräte	38

2.1.6 Software	41
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Generation von RMS- und SKMC-Zellen	41
2.2.2 Herstellung und Lagerung von CUR und Zytostatika	42
2.2.3 Aufbereitung von RMS- und SKMC-Zellen zur weiteren Verwendung.....	42
2.2.4 Viabilitäts-Assay bei RMS- und SKMC-Zellen	43
2.2.5 Analyse des Migrationspotentials von RMS-Zellen mithilfe des Wound Healing Assays.....	44
2.2.6 Analyse des koloniebildenden Potentials von RMS-Zellen mittels Colony-forming Assay.....	46
2.2.7 Durchflusszytometrie von RMS- und SKMC-Zellen.....	46
2.2.8 Analyse der CUR-Resistenzentwicklung mittels Viabili- täts-Assay bei RMS-Zellen.....	49
2.2.9 Herstellung von Proteinproben für den Western Blot.....	50
2.2.10 Analyse von relevanten Zellsignalproteinen mittels Western Blot	51
2.2.11 Analyse der CUR-Aufnahme in RMS-Zellen mithilfe des Immunfluoreszenzmikroskops.....	53
2.2.12 Statistik	54
3 ERGEBNISSE.....	55
3.1 Untersuchung der Zellviabilität (Bestimmung des IC50) von RMS- und SKMC-Zellen nach CUR- und/ oder Zytostatikagabe.....	55
3.1.1 Analyse des Effektes von CUR auf die Viabilität von RMS- Zelllinien.....	55

3.1.2 Analyse des Effektes von CUR auf die Viabilität von SKMC-Zellen	58
3.1.3 Analyse des Effektes von Zytostatika auf die Viabilität von RMS-Zelllinien.....	59
3.1.3.1 Analyse der Behandlung mit VCR auf die Viabilität von RMS-Zelllinien	59
3.1.3.2 Analyse der Behandlung mit DAC auf die Viabilität von RMS-Zelllinien	62
3.1.4 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und Zytostatika auf die Viabilität von RMS-Zelllinien.....	65
3.1.4.1 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR auf die Viabilität von RMS-Zelllinien	65
3.1.4.2 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC auf die Viabilität von RMS-Zelllinien	69
3.1.5 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und PDT auf die Viabilität von RMS-Zelllinien	75
3.1.6 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und PDT auf die Viabilität von SKMC-Zellen.....	77
3.2 Untersuchung der Migration von RMS-Zellen nach CUR- und Zytostatikagabe mittels Wound Healing Assay	78
3.2.1 Analyse des Effektes von CUR und/oder Zytostatika auf das Migrationspotential von RMS-Zelllinien	78
3.3 Untersuchung des Einflusses von CUR auf das Metastasierungspotential von RMS-Zellen mittels Colony-forming Assay.....	81
3.3.1 Analyse des Effektes von CUR auf das koloniebildende Potential von RMS-Zelllinien	81

3.4	Untersuchung des CUR-Influx und -Efflux bei RMS-Zellen im zeitlichen und räumlichen Verlauf.....	83
3.4.1	Darstellung der Eigenfluoreszenz von CUR in der Durchflusszytometrie	83
3.4.2	Vergleich von CUR-Influx und –Efflux bei RMS-Zelllinien im zeitlichen Verlauf in der Durchflusszytometrie.....	83
3.4.3	Darstellung der Eigenfluoreszenz von CUR in der Immunfluoreszenz.....	85
3.5	Untersuchung der Apoptoseinduktion bei RMS- und SKMC-Zellen nach CUR- und Zytostatikagabe.	86
3.5.1	Analyse des Effektes von CUR auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien	86
3.5.2	Analyse des Effektes von CUR auf die Apoptoseinduktion von SKMC-Zellen	87
3.5.3	Analyse des Effektes von VCR auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien	88
3.5.4	Analyse des Effektes von DAC auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien	89
3.5.5	Analyse des Effektes der Kombinationsbehandlung mit CUR und Zytostatika auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien.....	90
3.6	Untersuchung einer möglichen Resistenzentwicklung bei RMS-Zellen unter Langzeitbehandlung mit CUR.....	92
3.6.1	Beobachtungen während der langfristigen CUR-Gabe.....	93
3.6.2	Analyse des Effektes von CUR auf die Viabilität von vorbehandelten RMS-Zelllinien	93

3.7	Untersuchung des Einflusses von CUR auf relevante Zellsignalwege von RMS-Zellen	95
3.7.1	Analyse des Effektes von CUR und VCR auf den WNT-Signalweg bei RMS-Zelllinien	95
3.7.2	Analyse des Effektes von CUR und VCR auf den NF-kB-Signalweg bei RMS-Zelllinien	98
4	DISKUSSION.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	119
7	ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL	133
8	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	134

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: DIE HÄUFIGSTEN KREBSERKRANKUNGEN BEI KINDERN UND JUGENDLICHEN IN DEUTSCHLAND	1
ABBILDUNG 2: RHIZOM VON CUR UND DARAUS GEWONNENES PULVER	11
ABBILDUNG 3: CHEMISCHE STRUKTUREN DER CURCUMINOIDE	11
ABBILDUNG 4: KETO-ENOL-TAUTOMERIE VON CUR	13
ABBILDUNG 5: MICHAEL-ADDITION VON CUR	14
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHT ÜBER MÖGLICHE ZIELSTRUKTUREN VON CUR	17
ABBILDUNG 7: MECHANISMEN DER APOPTOSE	18
ABBILDUNG 8: MOLEKULARE TARGETS VON CUR IN VITRO	19
ABBILDUNG 9: WIRKPRINZIP DER PDT	22
ABBILDUNG 10: RH30-ZELLEN IN KULTUR	27
ABBILDUNG 11: RD-ZELLEN IN KULTUR	28
ABBILDUNG 12: SRH-ZELLEN IN KULTUR	28
ABBILDUNG 13: CHEMISCHE STRUKTUR VON VCR	30
ABBILDUNG 14: CHEMISCHE STRUKTUR VON DAC	31
ABBILDUNG 15: SCHEMAZEICHNUNG FÜR DAS ANLEGEN EINES WOUND HEALING ASSAYS	45
ABBILDUNG 16: VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 24 H	56
ABBILDUNG 17: VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 48 UND 72 H	57
ABBILDUNG 18: VIABILITÄTS-ASSAY BEI SKMC-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 48 UND 72 H	59

ABBILDUNG 19:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER VCR-BEHANDLUNG FÜR 24 H	60
ABBILDUNG 20:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER VCR-BEHANDLUNG FÜR 48 UND 72H	61
ABBILDUNG 21:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER DAC-BEHANDLUNG FÜR 48 H UND 72 H	64
ABBILDUNG 22:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG MIT CUR UND VCR FÜR 48 H	66
ABBILDUNG 23:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG MIT CUR UND VCR FÜR 72 H	68
ABBILDUNG 24:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG MIT CUR UND DAC FÜR 48 H	71
ABBILDUNG 25:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG MIT CUR UND DAC FÜR 72 H	74
ABBILDUNG 26:VIABILITÄTS-ASSAY BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG MIT CUR UND PDT FÜR 48 H	76
ABBILDUNG 27:VIABILITÄTS-ASSAY BEI SKMC-ZELLEN UNTER KOMBINATIONS-BEHANDLUNG MIT CUR UND PDT FÜR 48 H	77
ABBILDUNG 28:WOUND HEALING ASSAY BEI RH30-ZELLEN ZU VERSCHIEDENEN MESSZEITPUNKTEN	79
ABBILDUNG 29:WOUND HEALING ASSAY BEI RD-ZELLEN ZU VERSCHIEDENEN MESSZEITPUNKTEN	80
ABBILDUNG 30:CFA BEI RMS-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG	82
ABBILDUNG 31:DARSTELLUNG DES INFLUX UND EFFLUX VON CUR BEI RMS-ZELLEN	84
ABBILDUNG 32:IMMUNFLUORESCENZ VON RH30-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG	85

ABBILDUNG 33:APOPTOSE-ASSAY VON RMS-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 48 H	87
ABBILDUNG 34:APOPTOSE-ASSAY VON SKMC-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 48 H	88
ABBILDUNG 35:APOPTOSE-ASSAY VON RMS-ZELLEN UNTER VCR-BEHANDLUNG FÜR 48 H	89
ABBILDUNG 36:APOPTOSE-ASSAY VON RMS-ZELLEN UNTER DAC-BEHANDLUNG FÜR 48 H	90
ABBILDUNG 37:APOPTOSE-ASSAY VON RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT CUR UND VCR BZW. DAC FÜR 48 H	91
ABBILDUNG 38:VIABILITÄTS-ASSAY VON RMS-ZELLINIEN MIT UND OHNE VORBEHANDLUNG UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 72 H	94
ABBILDUNG 39:WESTERN BLOT VON RMS-ZELLEN AUF DIE B-CATENIN-EXPRESSION	96
ABBILDUNG 40:WESTERN BLOT VON RH30-ZELLEN AUF DIE B-CATENIN-EXPRESSION	97
ABBILDUNG 41:WESTERN BLOT VON RMS-ZELLEN AUF DIE NF-KB-EXPRESSION	99

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1:	PRÄ- UND POSTOPERATIVES STAGING VON RMS NACH DER TNM- UND IRSG-KLASSIFIKATION	4
TABELLE 2:	RISIKOSTRATIFIKATION NACH EUROPÄISCHEN RMS-STUDIEN- GRUPPEN	6
TABELLE 3:	EUROPÄISCHE RICHTLINIE ZUR RADIOTHERAPIE DES KINDLICHEN RMS	8
TABELLE 4:	REAGENZIEREN UND KULTURMEDIUM FÜR DIE ZELLKULTUR	29
TABELLE 5:	VERWENDETE SUBSTANZEN ZUR TUMORBEHANDLUNG	30
TABELLE 6:	REAGENZIEREN ZUR UNTERSUCHUNG DER ZELLVIABILITÄT	31
TABELLE 7:	REAGENZIEREN ZUR IMMUNFLUORESCENZDARSTELLUNG	32
TABELLE 8:	REAGENZIEREN FÜR DEN CFA	32
TABELLE 9:	REAGENZIEREN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	33
TABELLE 10:	VERWENDETE SUBSTANZEN IM APOPTOSE-ASSAY IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	33
TABELLE 11:	REAGENZIEREN FÜR DEN WESTERN BLOT	33
TABELLE 12:	ANSATZ FÜR ZWEI TRENNGELE (10 %) BZW. ZWEI SAMMELGELE (4 %) FÜR DEN SDS-PAGE	35
TABELLE 13:	VERWENDETE PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER FÜR DEN WESTERN BLOT	36
TABELLE 14:	VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN	36
TABELLE 15:	VERWENDETE GERÄTE UND DEREN HERSTELLER	38
TABELLE 16:	VERWENDETE SOFTWARE UND DEREN HERSTELLER	41
TABELLE 17:	DEFINIERT ZELLZAHLEN ZUM ANLEGEN EINER 96-WEILL PLATTE FÜR DEN MTT-ASSAY	43

TABELLE 18:	DEFINIERT ZELLZAHLEN FÜR DAS ANLEGEN EINES WOUND HEALING ASSAYS	45
TABELLE 19:	DEFINIERT ZELLZAHLEN ZUM ANLEGEN VON ZELLKULTUR-PLATTEN BEI DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	47
TABELLE 20:	DARSTELLUNG DER EX/EM _{MAX} . VERSCHIEDENER KANÄLE IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	47
TABELLE 21:	VERWENDETE FARBFILTER UND BELICHTUNGSZEIT IN DER IMMUNFLUORESCENZ-MESSUNG	53
TABELLE 22:	BEDEUTUNG DER P-WERT-FORMATE ALS * IN DEN GRAPHEN	54
TABELLE 23:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 48 UND 72 H	55
TABELLE 24:	LISTE DER IC50-WERTE BEI SKMC-ZELLEN UNTER CUR-BEHANDLUNG FÜR 48 UND 72 H	58
TABELLE 25:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN UNTER VCR-BEHANDLUNG FÜR 48 UND 72 H	60
TABELLE 26:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN UNTER DAC-BEHANDLUNG FÜR 48 H UND 72 H	63
TABELLE 27:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT CUR UND VCR FÜR 48 H	65
TABELLE 28:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT CUR UND VCR FÜR 72 H	67
TABELLE 29:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT CUR UND DAC FÜR 48 H	70
TABELLE 30:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN UNTER KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT CUR UND DAC FÜR 72 H	72
TABELLE 31:	LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN MIT UND OHNE PDT FÜR 48 H	75

TABELLE 32: LISTE DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN MIT UND OHNE
VORBEHANDLUNG FÜR 72 H 93

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
aRMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
CFA	Colony-forming Assay
CUR	Curcumin
DAC	Actinomycin D
dd.	Doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
eRMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
et al.	Et alii, et aliae, und andere
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
inkl.	Inklusive
IRS(G)	“Intergroup Rhabdomysarcoma Study Group”
K/H	Kopf/Hals
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Molare Masse
max.	Maximal
MDR	Multiple Drug Resistance (“multidrug resistance”)

MFI	Mean Fluorescence Intensity
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mTOR	“mammalian target of rapamycin”
n. b.	nicht bestimmbar
NF-κB	„nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells”
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
o. g.	oben genannte(n)
PDT	Photodynamische Therapie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RMS	Rhabdomyosarkom
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s. o.	Siehe oben
SEM	Standardfehler
SIOP	„Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique“
sog.	Sogenannte(n)
TBS-T	Tris-buffered Saline with Tween20
TNF	Tumornekrosefaktor
u. a.	Unter anderem
UGT	Urogenitaltrakt
VCR	Vincristin; Vincristinsulfat
vs.	Versus (gegen; im Gegensatz zu)
λ	Anregungswellenlänge
z. B.	Zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Kindliche Weichteiltumoren: Rhabdomyosarkom (RMS)

Epidemiologie

Das Rhabdomyosarkom (RMS) ist der häufigste Tumor aus der Gruppe der Weichteilsarkome im Kindes- und Jugendalter und macht drei bis sechs Prozent aller kindlichen Tumoren aus (Abbildung 1) [1, 2]. Damit ist es der dritthäufigste solide, extrakraniale Tumor nach dem Wilms Tumor und dem Neuroblastom [3].

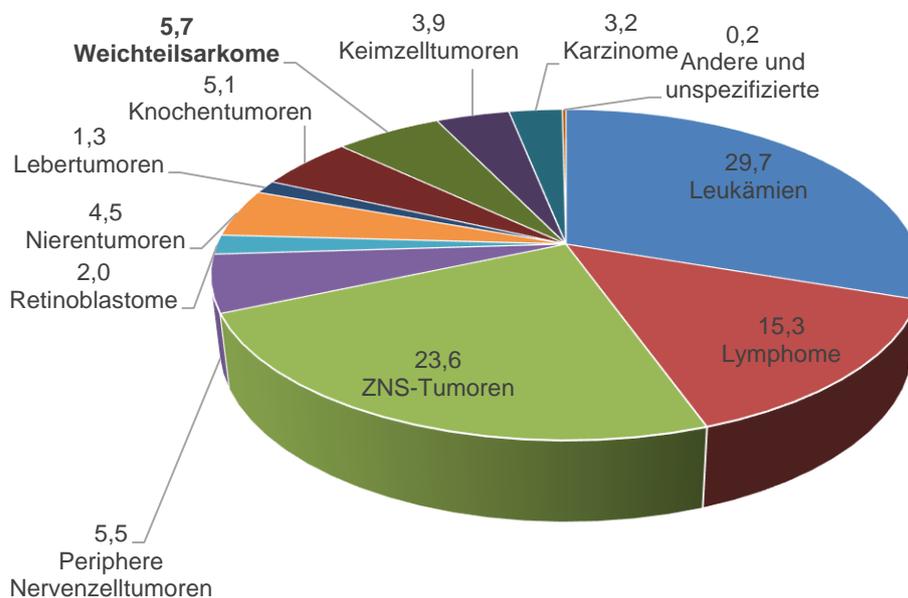


Abbildung 1: Die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland

Relative Häufigkeiten der an das deutsche Kinderkrebsregister gemeldeten Erkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen (in %) von 2009 – 2018 bei Patienten < 18 Jahren; modifiziert nach dem *Deutschen Kinderkrebsregister* [4].

Nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters lag die Inzidenz in den Jahren 1980 bis 2015 in Deutschland bei 5,2/1000000 Einwohner unter 15 Jahren, das Inzidenzverhältnis (m/w) bei 1,3 und der Altersmedian bei Diagnose betrug ca. fünf Jahre [5].

Histologie und Pathogenese

Diese maligne Tumorart ist mesenchymalen Ursprungs und wird histologisch nach der „International classification of rhabdomyosarcoma (ICR)“ [6] in mehrere Subtypen klassifiziert:

Das embryonale Rhabdomyosarkom (eRMS) mit einem Altersgipfel zwischen zwei und sechs Jahren bei Erstdiagnose [7], zu dem auch das botryoide und das spindelzellige RMS gehören [6], macht mit ca. 60-70 % die häufigere histologische Diagnosegruppe aus [8, 3]. Charakteristisch hierfür sind spindelförmige oder runde Zellen mit kleinen Zellkernen und einem lockeren Chromatinmuster, die entweder kompakt oder lose vor einem myoiden Hintergrund erscheinen und teilweise eine typische Querstreifung aufweisen [9, 6]. Der botryoide und der spindelzellige Typ sind histologisch abgrenzbare Untergruppen des eRMS. Ersterer zeigt charakteristisch traubenförmig angeordnete Zellen, während letzterer, entsprechend seiner Namensgebung, fast ausschließlich spindelförmige Zellen zeigt [6]. Beide Varianten gehen mit einer besseren Prognose und niedrigem Metastasierungsrisiko einher [9]. Molekulargenetisch zeigt sich beim eRMS gehäuft ein „*loss of heterozygoty*“ (LOH) bei Chromosom 11 [10].

Die zweite große histologische Gruppe macht das alveoläre Rhabdomyosarkom (aRMS) mit einem späteren Altersgipfel zwischen zehn und achtzehn Jahren aus [7]. Sie macht 20 % der RMS aus und geht mit einer deutlich schlechteren Prognose einher [11, 3]. Die Zellen weisen fibrovaskuläre Septen auf, die zu Alveolen-ähnlichen Räumen führen, in denen monomorphe, runde Zellen mit reichlich eosinophilem Zytoplasma und größeren Zellkernen mit grobem Chromatin liegen [9, 6]. In der molekulargenetischen Untersuchung zeigt sich hier in der Mehrzahl der Fälle (80 %) eine chromosomale Translokation [t(2; 13)(q35; q14)] welche die Gene PAX3 in Bande 2q35 und FKHR in Bande 13q14 fusioniert [9, 11]. Als Folge entsteht ein chimäres Fusionsprotein, welches die De-Differenzierung und Proliferation von myogenen Zellen fördert und damit zu onkogener Aktivität führen kann [7, 12]. Die Transfusion von PAX7 und FKHR durch die Translokation [t(1; 13) (q36; 14)] geht mit einem ähnlich schlechten Outcome bei lokalisierten

aRMS einher, jedoch mit einem deutlich besserem bei metastasierten Formen [11, 10].

Als weitere, seltene Variante des RMS wird das undifferenzierte Sarkom beschrieben, welches keine Anzeichen einer myogenen Differenzierung aufweist und ebenfalls mit einer schlechten Prognose einhergeht [6].

Die Pathogenese des RMS bleibt unklar, vermutet wird jedoch die Entstehung durch Störung des Wachstums und der Differenzierung einer skelettmuskulären Progenitorzelle [7, 13]. Häufige genetische Aberrationen, die sowohl bei aRMS- als auch eRMS-Zellen gefunden wurden, betreffen die Tumorsuppressorgene p53 und Rb1 sowie Dysregulationen von CDKN2A, MYCN, MyoD und MET. RAS-Mutationen zeigen sich vor allem beim eRMS und Dysregulation der mRNA- und ALK-Expression vor allem beim aRMS [14]. Diese molekulargenetischen Targets könnten für die Therapie von prognostisch ungünstigen Tumorvarianten in Zukunft noch relevant werden.

Symptome und Lokalisation

Symptomatisch äußert sich das RMS aufgrund seiner unterschiedlichen Primärlokalisierung sehr variabel aber meist als asymptomatische, sicht- oder tastbare Tumormasse [7], wenn die Skelettmuskulatur betroffen ist. Gelegentlich kann es zu Ausfallerscheinungen oder Schmerzen durch die Invasion in umliegende Strukturen kommen wie zum Beispiel Nervenläsionen bei Primärlage des RMS am Kopf/Hals (K/H) oder Miktionsstörungen bei einem RMS des Urogenitaltraktes (UGT). Die Primärlokalisationen sind vielfältig, am häufigsten tritt das RMS jedoch im K/H-Bereich (35 %), UGT (24 %) und an den Extremitäten (19 %) auf [9, 7]. Das eRMS geht gehäuft mit einer Lokalisation im K/H- oder UGT einher [14], während bei dem histologischen aRMS-Typ die Extremitätenlokalisierung häufiger auftritt [15]. Die Untergruppe des botryoiden RMS tritt gehäuft als subepitheliale Tumorzellaggregate in mit Schleimhaut ausgekleideten Organen wie im Nasopharynx, in der Orbita und im UGT auf [9], die spindelzellige Variante fast ausschließlich paratestikulär [6]. Die K/H-Region lässt sich wiederum aufteilen in Tumoren der Orbita (9 %), parameningeale (16 %) und nicht-parameningeale

(10 %) K/H-Tumore. Diese Einteilung ist in der späteren Gruppierung von prognostischer Relevanz. Andere Lokalisationen (22 %) können sein: der Körperstamm, retroperitoneal oder biliär [9]. Die Häufigkeit des Auftretens einer Primärlokalisation kann sich regional unterscheiden (Deutschland siehe [3], USA siehe [16], China siehe [17]).

Diagnostik und Einteilung

Die Diagnose dieser Tumorentität erfolgt neben ausführlichen Laboruntersuchungen via Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie [18]. Der Lymphknotenstatus ist unbedingt klinisch und bildgebend zu evaluieren und fließt in die spätere Risikoabschätzung mit ein. Zum Ausschluss einer Metastasierung erfolgen, je nach Tumorlokalisierung und behandelndem Zentrum, zusätzlich eine Knochenmarkaspiration, Röntgen-/CT-Thorax sowie teilweise ein PET-CT bzw. eine Skelettszintigraphie und/oder eine Lumbalpunktion [7]. Zur Verlaufskontrolle kommt neben MRT/CT auch in manchen Studien das FDG PET zum Einsatz [15]. Die Einteilung des RMS, sowohl in eine prä- als auch postchirurgische Gruppierung nach der „Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group“ (IRSG), dient sowohl der effektiven Therapieplanung als auch der Risikostratifikation. Hierbei sind neben TNM-Status auch die Primärlokalisation, der Tumordurchmesser und der postoperative Resektionsstatus entscheidend [13, 16, 14] (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Prä- und postoperatives Staging von RMS nach der TNM- und IRSG-Klassifikation

In dieser Tabelle ist zuerst das präoperative Stadium nach der „Children’s Oncology Group“ (COG) 1-4 als erweiterte TNM-Klassifikation (modifiziert nach *Huh et al.* [13]) und anschließend die postoperative Gruppierung nach der IRSG I-IV (modifiziert nach *Crist et al.* [16]) aufgeführt. Abkürzungen: \emptyset : Tumorgroße; a \leq 5 cm, b > 5 cm im Durchmesser. TNM: TNM-Klassifikation von bösartigen Tumoren; T: Tumor; T1: auf Primärlokalisation beschränkt; T2: Ausbreitung und/oder Fixierung im umliegenden Gewebe; N: Lymphknotenbefall; N0: keine Beteiligung von regionalen Lymphknoten; N1: regionale Beteiligung von Lymphknoten; Nx: Lymphknoten Status unbekannt. M: Metastasierung; M0: keine Fernmetastasierung; M1: Fernmetastasierung (inkl. pleurale, peritoneale oder Liquorflüssigkeit). PM= parameningeal; B/P= Blase/Prostata; „Andere“ beinhaltet u. a. Stamm und Retroperitoneum.

Stadium	Ort	T	\emptyset	N	M
1	Orbita; Kopf-Hals (nicht-PM); UGT (nicht B/P); Gallengangesystem	T1/T2	a/b	N0, N1 oder Nx	M0

2	B/P; Extremitäten; PM; Andere	T1/T2	a	N0 oder Nx	M0
3	B/P; Extremitäten; PM; Andere	T1/T2	a	N1	M0
			b	N0, N1 oder Nx	M0
4	Alle	T1/T2	a/b	N0 oder N1	M1

Gruppe	Definition
I	Lokalisierte Erkrankung, komplette Resektion A. Auf Ursprungsort beschränkt, komplette Resektion B. Infiltriert über den Ursprungsort hinaus, komplette Resektion
II	Primäre komplette Resektion mit Hinweis auf regionale Ausbreitung A. vollständig resezierter Tumor mit Hinweis auf mikroskopischen Tumorrest B. Regionale Ausbreitung mit Lymphknotenbeteiligung, vollständig reseziert ohne mikroskopischen Tumorrest C. Regionale Ausbreitung mit Lymphknotenbeteiligung, komplett reseziert aber mit Nachweis von mikroskopischem Tumorrest und/oder histologische Beteiligung des am meisten distalen, regionalen Lymphknoten (am Primärtumor) im Resektat
III	Unvollständige Resektion mit makroskopischen Tumorrest
IV	Fernmetastasen bei Erstdiagnose

Diese Risikostratifikation gilt nachweislich als prädiktiver Faktor für den Therapieerfolg. Eine weitere Risikostratifikation wurde durch die europäischen Studiengruppen (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP) und Cooperative Weichteilsarkomstudie (CWS)) aufgestellt, welche auf verschiedenen prognostischen Faktoren beruht (Tabelle 2) [7, 19]. Dabei gelten Metastasierungs- und FOXO1-Status als stärkste Prognosefaktoren [20].

Tabelle 2: Risikostratifikation nach Europäischen RMS-Studiengruppen

Darstellung der Risikostratifikation von SIOF und CWS RMS-Studiengruppen (mit Ausnahme Stadium IV). Einteilung in die Subgruppen A-H oder die Risikogruppen Niedrig, Standard, Hoch und Sehr hoch (modifiziert nach Dasgupta et al. [7]).

M-Status	N-Status	Histologie	IRS G	Ort	Größe/ Alter	Subgruppe	Risikogruppe
M0	N0	eRMS	I	Alle	≤ 5 cm /< 10 a	A	Niedrig
					> 5 cm/ ≥ 10 a	B	Standard
			II, III	ORB, UG- non. BP, KH- non. PM	Alle	C	Standard
				EXT, UG-BP, KH-PM, andere	≤ 5 cm & < 10 a	D	Standard
					> 5 cm/ ≥ 10 a	E	Hoch
	N1	eRMS	II, III	Alle		F	Hoch
	N0	aRMS	Alle			G	Hoch
	N1	aRMS	Alle			H	Sehr Hoch

a= Jahre; EXT= Extremitäten; ORB= Orbita; UG-non. BP= UGT, nicht Blase/Prostata; UG-BP= UGT, Blase/Prostata; KH-non. PM= K/H, nicht parameningeal; KH-PM= K/H, parameningeal.

Therapie

Die Therapiegrundlage des RMS ist ein multimodaler Ansatz. Hierbei stehen sowohl lokaltherapeutische Verfahren wie die chirurgische Resektion und Radio-

therapie als auch die systemische Chemotherapie im Vordergrund [9]. Die Therapieentscheidung wird entsprechend der regional unterschiedlichen Studiengruppen (COG in Nordamerika, SIOP in Europa und CWS in Deutschland) und der Einteilung in eine entsprechende Risikogruppe getroffen [21].

Chirurgische Resektion

Lokaltherapeutische Maßnahmen gelten als der prognostische Faktor bei der Behandlung des RMS und sind essentiell für das Überleben der Patienten [7, 21]. Die primäre chirurgische Resektion gilt weiterhin als Goldstandard, falls der Tumor klein, gut zugänglich und lokalisiert ist. Hierbei gilt die nicht mutilierende Exzision des Tumors mit großzügigen Schnitträndern im Gesunden [9]. Da die üblichen 2 cm Schnittränder bei Kindern aufgrund der anatomischen Größe oft nicht möglich sind, hat man sich auf 0,5 cm geeinigt. Falls Gebiete mit Tumorresten verbleiben, ist eine Clipmarkierung für eine spätere Radiotherapie oder Nachexzision sinnvoll [7]. In der Vielzahl der Fälle muss jedoch bei größeren Tumoren oder solchen, die schlecht zugänglich sind oder mit einer ausgeprägten funktionalen/kosmetischen Beeinträchtigung nach OP einhergehen [7], eine neoadjuvante Chemotherapie mit oder ohne Bestrahlung in Erwägung gezogen [9] und die Tumorentfernung als sekundäre OP [22] geplant werden.

Medikamentöse Maßnahmen

Die Therapie mittels Chemotherapeutika ist beim RMS in allen Studienprotokollen etabliert und richtet sich nach Studiengruppe und Risikostratifikation. Die aktuellen Studienprotokolle der COG empfehlen als Standard der Chemotherapie eine Kombination aus Vincristin, Actinomycin D und Cyclophosphamid (VAC) für alle Risikogruppen [16]. In spezifischen Fällen des „low risk“-RMS zeigt die alleinige Therapie mit Vincristin und Actinomycin D in Kombination mit Radiotherapie ähnliche Therapieerfolge wie die Dreifachtherapie [10]. Alternative Therapieregime werden für Patienten mit „high risk“-RMS oder Rezidiv eingesetzt und bestehen – bisher vorwiegend in Studien – aus Neukombinationen mit den Substanzen Doxorubicin, Etoposid oder Ifosfamid [23] sowie der Kombination aus Vincristin und Irinotecan [24]. Selbst in neueren Untersuchungen bleibt die VAC-Therapie den anderen Therapien bis jetzt überlegen [15, 24]. Auch die neueren

Ansätze der Targeted Therapy, wie die Blockade des VEGF (vascular endothelial growth factor)-Rezeptors mit Bevacizumab oder die Inhibition des mTOR (mammalian target of rapamycin)-Signalweges mittels Temsirolimus, stellen bisher keine etablierte therapeutische Alternative dar [15].

Radiotherapie

Neben der chemotherapeutischen Induktionstherapie stellt die darauffolgende Radiotherapie den aktuellen Standard für die Risikogruppen \geq IRSG II des eRMS sowie für alle Patienten mit aRMS dar. Diese beginnt in der Regel sechs bis zwölf Wochen nach der Induktionschemotherapie und wird dem Ausmaß der Erkrankung angepasst [14]. Die Strahlendosis richtet sich nach IRS-Gruppe (I (aRMS): 36 Gy, II: 41,4 Gy, III: 50,4 Gy) [10] sowie Resektionsausmaß und Therapieansprechen und ist in Tabelle 3 im Detail abgebildet.

Tabelle 3: Europäische Richtlinie zur Radiotherapie des kindlichen RMS

Darstellung der von der EpSSG (European Paediatric Soft tissue sarcoma Study Group) empfohlenen Leitlinie zur Radiotherapie des eRMS und aRMS entsprechend der IRS-Gruppierung, dem Ausmaß der chirurgischen Resektion und dem Ansprechen auf die Chemotherapie in Grey (Gy) und Fraktion (F). Modifiziert nach Dasgupta et al. [7].

IRS-Gruppe	Resektion und Therapieansprechen	eRMS	aRMS
I		-	41,4 Gy; 23 F
II		41,4 Gy; 23 F	41,4 Gy; 23 F
III	Sekundäre vollständige Resektion (R0) vor/nach Radiotherapie	36 Gy; 20 F („good response“); 41,4 Gy; 23 F („poor response“)	41,4 Gy; 23 F
III	Inkomplette sekundäre Resektion (R1 or R2)	50.4 Gy; 28 F	50.4 Gy; 28 F
III	Klinisch komplette Remission, keine sekundäre Resektion	41,4 Gy; 23 F	50.4 Gy; 28 F

III	Partiale Remission, keine sekundäre Resektion/ kein R0 erwartet	50.4 Gy; 28 F; Orbita und Prostata (> 2/3): 45 Gy; 25 F	50.4 Gy; 28 F
III	Schlechtes Ansprechen, Progression, keine sekundäre Resektion	50.4 Gy; 28 F (+ optional Boost: 5.4 Gy; 3 F)	50.4 Gy; 28 F (+ optional Boost: 5.4 Gy; 3 F)

Prognose

Die Prognose des kindlichen RMS richtet sich nach Patientenalter, Tumorlokalisierung und -größe sowie Resektabilität, Metastasierungsausmaß, regionaler Lymphknoteninvasion und Therapieansprechen (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2) [25]. Besonders die „low-risk“-Gruppe des RMS zeigt häufig eine komplette Remission nach multimodalem Therapiekonzept mit einem progressionsfreien Überleben („failure free survival“= FFS) von 88 %. Bereits in der „intermediate-risk“-Gruppe des RMS zeigt sich ein geringeres Therapieansprechen mit einem FFS von 55-76 % und die Prognose für Hochrisikopatienten ist besonders schlecht mit einem FFS von 10-30 % und wenig Besserung in den letzten 30 Jahren [14]. Das Auftreten eines Rezidivs zeigt sich gehäuft bei großen Tumorresten nach Primäroperation, ungünstiger Tumorlokalisierung, Tumorgöße über 5 cm, aRMS, Erkrankungsalter über zehn Jahre, Lymphknoteninvasion und Vorliegen einer metastasierten Erkrankung [25]. Besonders die Zeitspanne bis zum Auftreten des Rezidivs zeigt sich prognostisch ungünstig bei unter 18 Monaten oder während laufender Therapie. Das 5-Jahres-Überleben nach Auftreten eines Rezidivs zeigt sich je nach Studiengruppe zwischen 24,3 % in der „German Cooperative Group“ und 28,3 % in der SIOP Malignant Mesenchymal Tumor (MMT)“-Gruppe [26], wobei eine Resektion des Rezidiv das Überleben deutlich steigert (5-Jahres-Überleben 37 % vs. 8 %) [27].

Toxizität und Langzeitschäden:

Die Kurz- und Langzeitschäden aufgrund der Therapie des RMS ergeben sich aus den drei Säulen des multimodalen Therapiekonzeptes: Schädigung durch

operative Eingriffe, toxische Schäden der Chemotherapie und Schädigung durch Radiotherapie. Die Schäden durch operative Eingriffe betreffen meist Schädigung von Nachbarstrukturen, Funktionsverluste bis hin zum Organverlust/Verlust einer Extremität und ästhetische Beeinträchtigung und fallen überwiegend in die Kategorie der Langzeitschäden [7]. Ernsthafte akute Schädigung durch die Triple Chemotherapie sind Myelosuppression (> 90 %), schwere Infektionen (55 %), schwere Nierenschädigung (2 %) und Tod (< 1 %)[16]. Vincaalkaloide, speziell Vincristin sind häufig mit Neurotoxizität assoziiert, welche ebenfalls den häufigsten Grund für einen Therapieabbruch darstellt [28]. Die Schäden durch Radiotherapie sind lokalisationsabhängig und können u. a. endokrine Organe wie die Schilddrüse oder die Hypophyse bei Bestrahlung eines RMS im K/H-Bereich betreffen [29] aber auch das wachsende Skelett, z. B. Becken und Femur bei externer Bestrahlung des urogenitalen RMS, schädigen[30]. Langzeitschäden sowohl der Chemo- als auch Radiotherapie manifestieren sich besonders mit Auftreten einer Zweitneoplasie wie z. B. hämatologische Tumoren oder andere Sarkome [16]. Generell zeigt sich für Überlebende des RMS eine erhöhte Mortalität sowohl durch Zweitneoplasien als auch durch andere Ursachen [31].

1.2 Curcumin (CUR)

Chemie:

Curcumin (CUR) ist ein natürliches Polyphenol, welches aus der Pflanze *Curcuma longa*, einer aromatischen, rhizomartigen Pflanze aus der Familie der Ingwergewächse (Zingiberaceae), gewonnen wird [32].



Abbildung 2: Rhizom von CUR und daraus gewonnenes Pulver

Dargestellt ist eine Fotografie von Kurkuma-Rhizomen und dem daraus gewonnenen Pulver; Fotografie freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <https://www.formulatehealth.com/> [33].

Aufgrund seiner Verbreitung im indischen und südostasiatischen Raum wird Kurkuma schon lange als gelbfärbendes Gewürz in der indischen Küche sowie therapeutisch in der ayurvedischen Medizin eingesetzt. Neben CUR finden sich weitere sog. Curcuminoiden (siehe Abbildung 3) in der Pflanze, wobei vor allem Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR im kommerziell erwerblichen CUR zusätzliche Bestandteile sind [34].

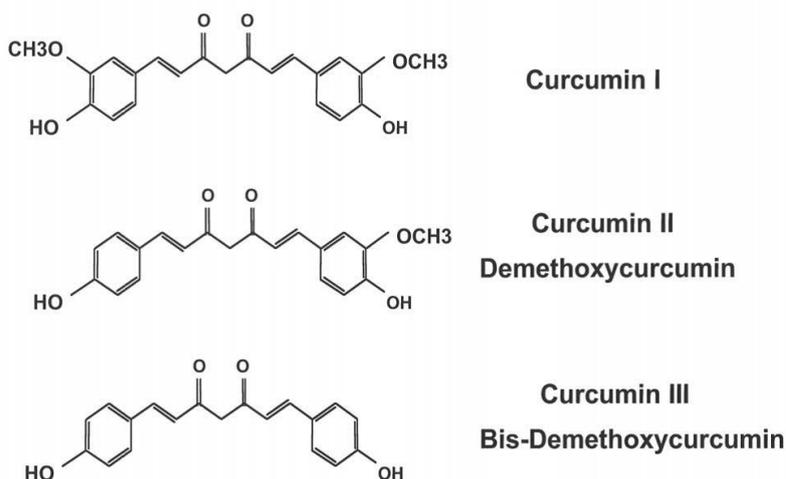


Abbildung 3: Chemische Strukturen der Curcuminoiden

Dargestellt sind die Strukturformeln der drei Hauptformen der Curcuminoiden: Curcumin (CUR I), Demethoxy-CUR (CUR II) und Bis-Demethoxy-CUR. Kommerziell erwerbliches CUR enthält in der Regel ca. 77 % CUR I, 17 % CUR II und 3 % CUR III [35].

CUR oder Diferuloylmethan ($C_{21}H_{20}O_6$, $M = 368,39$ g/mol, IUPAC-Name (1E, 6E)-1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion) ist ein gelb-oranges Pulver. Chemisch handelt es sich um ein bis- α,β -ungesättigtes β -Diketon und besteht aus zwei Ferulasäureresten, die mittels Methylengruppe miteinander verbunden sind [36]. Es ist lipophil und daher wasserunlöslich, zeigt jedoch eine gute Löslichkeit in Ethanol, Dimethylsulfoxid und Aceton. Der Schmelzpunkt liegt bei 183 °C. Spektrophotometrisch hat CUR, gelöst in Methanol, ein Absorptionsmaximum ($\lambda_{max.}$) von 430 nm und gelöst in Aceton ein Absorptionsmaximum von $425-420$ nm. Die Absorption (= optische Dichte) einer 1-prozentigen CUR-Lösung liegt bei 1650 Einheiten. Im sauren Bereich, bei einem pH von $2,5-7,0$, hat CUR einen leuchtend gelben Farbton, während im alkalischen, ab einem pH über $7,0$, dieser in Rot umschlägt [35]. Die Fluoreszenz von CUR umfasst einen breiten Bereich, abhängig vom jeweiligen Lösungsmittel und reicht von $\lambda_{max.} = 460, 488$ nm in Toluol über $\lambda_{max.} = 524$ nm in Acetonitril und $\lambda_{max.} = 549$ nm in Ethanol bis hin zu $\lambda_{max.} = 557$ nm in mizellarer Lösung. Die fluoreszenzspektroskopische Quantenausbeute variiert ebenfalls von wenig ($\phi = 0.011$) in Natriumlaurylsulfat (SDS) bis höher ($\phi = 0.104$) in Acetonitril. CUR setzt unter Bestrahlung ($\lambda > 400$ nm) reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Singulett-Sauerstoff (1O_2), Hydroperoxid-Anion (O_2^-) und C-zentrierte Radikale in Abhängigkeit vom Lösungsmittel frei [37]. Der phototoxische Effekt von CUR konnte ebenfalls für Säugerzellen nachgewiesen werden sowie die Tatsache, dass für diesen Effekt die Anwesenheit von Sauerstoff gegeben sein muss, und sich dieser für die photodynamische Therapie diverser Erkrankungen nutzen lässt [38-40]. So konnte die Fähigkeit von niedrig-dosiertem CUR als Radikalfänger für Singulett-Sauerstoff in wässrigen Systemen nachgewiesen werden [41]. Toniolo et al wiesen diese Eigenschaft ebenfalls für Hydroperoxide in organischer Lösung nach [42].

Reaktivität

Die Reaktivität von CUR wird vor allem durch seine molekulare Struktur vermittelt, welche aus dem α, β -ungesättigten β -Diketonanteil, inkl. dessen Carbonyl- und Enolgruppe sowie den Methoxy- und phenolischen Hydroxygruppen und den aromatischen Phenolringen besteht. CUR unterliegt einer Keto-Enol-Tautomerie

(β -Diketon oder Enol, siehe Abbildung 4) und kommt sowohl als Feststoff als auch in Lösung ausschließlich in letzterer Form vor [43, 44].

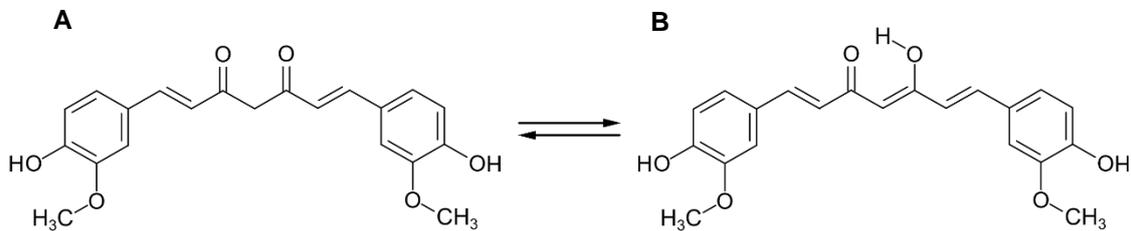


Abbildung 4: Keto-Enol-Tautomerie von CUR

Dargestellt sind die beiden Isomere von CUR: Links die β -Diketonform (A) und rechts die Enolform (B).

Damit einhergehend kann das Mittelstück des CUR-Moleküls sowohl Donor als auch Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen sein. Des Weiteren ist die Enolform ein ausgezeichneter Chelator für positiv geladene Metalle, welche häufig an den aktiven Zentren von Proteinen vorkommen [45, 46]. Darüber hinaus fungiert CUR durch diese Konfiguration als Michael-Akzeptor für nucleophile Angriffe und bindet dadurch u. a. Selenocystein (über Se^-) und Glutathion (über $-\text{RSH}$) [47, 48].

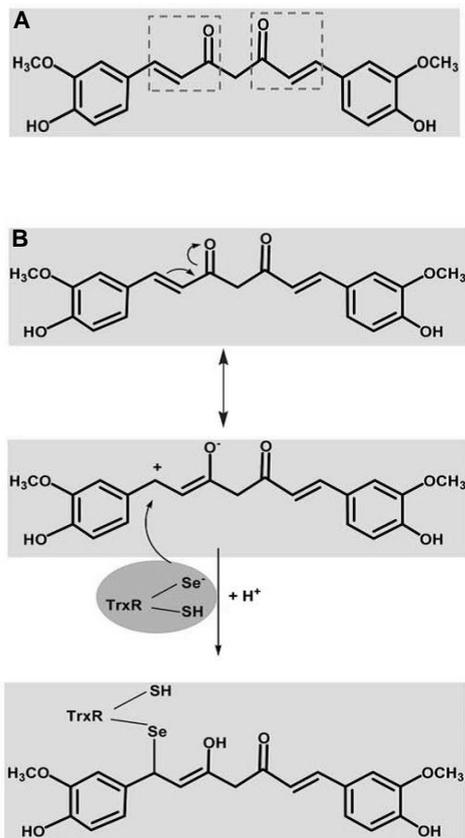


Abbildung 5: Michael-Addition von CUR

In A dargestellt ist die Strukturformel von CUR mit Hervorhebung der funktionalen Michael-Akzeptorgruppen. In B dargestellt ist eine Michael-Addition am Beispiel von CUR und der Thyoredoxin Reduktase, welche mit ihrem reduzierten Selenocysteinrest als Nucleophil reagiert und an die Ketoform von CUR bindet. Modifiziert nach Fang et al. (2005) und Gupta et al. (2011).

CUR bindet variabel durch kovalente, nicht-kovalente apolare (hydrophobe) und Wasserstoffbrückenbindungen [46]. Für die hydrophoben Bindungen verfügt es über die Fähigkeit, seine hydrophobe Konformation optimal an das zu bindende Protein anzupassen. Für den Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen sind die Carbonyl- und phenolische Hydroxygruppe am aromatischen Ring verantwortlich. So entsteht die Bindung von CUR an DNA zum Beispiel durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den AT-reichen Regionen

der kleinen Furche des DNA Strangs statt durch Anlagerung des Phenylrings [49].

Zusammengefasst bietet CUR eine breite Interaktionsfläche auf biologischer, chemischer und physikalischer Ebene. Diese lässt sich durch drei wesentliche Funktionen vermitteln: Die aromatische Methoxy-phenolische Gruppe, das verbindende α,β -ungesättigte β -Diketon und der Keto-Enol-Tautomerismus, wobei die aromatische Gruppe für die Hydrophobie und das Bindungselement für die Flexibilität im Reaktionsmuster verantwortlich ist. Auch die tautomere Struktur ist mitverantwortlich für die hydrophoben und polaren Eigenschaften des CUR-Moleküls. Die Schlüsselfunktion der Bindungsfähigkeit von CUR an vielzählige Makromoleküle liegt im β -Diketonanteil welcher sich häufig an Cysteinreste anlagert. Durch die Fähigkeit Transportproteine zu binden, verbessert dieses Molekül seine eigene Löslichkeit und Bioverfügbarkeit [46].

Metabolismus und Bioverfügbarkeit

CUR ist ein chemisch instabiles Produkt, dessen Degradation abhängig von pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Lösungsmittel, Strahlung (UV, sichtbares Licht) und Temperatur ist. Stabilität vermitteln ein pH-Wert < 6,5 und die Verwendung von serumhaltigen Medium/Blut. Die Abbauprodukte von CUR entsprechen dem Abbau-mechanismus [34]. Die durch Autooxidation entstehenden Hauptabbauprodukte sind Bicyclopentadione [50] und fraglich das von Wang et al. beschriebene trans-6-(4'-hydroxy-3'methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal [51]. Weitere Nebenabbauprodukte entstehen durch alkalische Hydrolyse oder Bestrahlung mit UV-/ sichtbarem Licht und sind Ferulasäure 4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-on und Vanillin. Besonders der Prozess der Autooxidation kann vorwiegend für die Instabilität von CUR verantwortlich gemacht werden [34]. Interessanterweise scheinen auch die Abbauprodukte antikanzerogene und weitere pharmakologische Eigenschaften zu besitzen [52].

Obwohl CUR *in vitro* pluripotente Eigenschaften besitzt, konnten diese Ergebnisse nach oraler CUR-Gabe *in vivo* häufig nicht in dem Ausmaß repliziert werden. Grund hierfür scheint die niedrige orale Bioverfügbarkeit in Plasma und Geweben zu sein, welche durch geringe Aufnahme und zügigen Metabolismus von CUR bedingt sind. Im Detail stellen dabei niedrige Serumspiegel, eine eingeschränkte Gewebedistribution, der schnelle Metabolismus und eine kurze Halbwertszeit die Probleme der Bioverfügbarkeit von natürlichem, oral substituiertem CUR dar [53].

Der Phase-I-Metabolismus von CUR findet in der Leber u. a. durch die Alkoholdehydrogenase statt und besteht aus der aufeinanderfolgenden Reduktion der vier Doppelbindungen des α , β - ungesättigten β -Diketonanteil. Hierbei entstehen die Metaboliten dihydro-CUR, tetrahydro-CUR, hexahydro-CUR und octahydro-CUR. Besonders bezüglich des Phase-I Metabolismus ist, dass dieser für CUR unabhängig von Cytochrom P450 stattfindet. Im Phase-II-Metabolismus von CUR unterliegt dieses oder seine Metaboliten (s. o.) diversen Konjugationsprozessen. Am häufigsten kommt es hierbei zur Konjugation mit Glucuronsäure oder Sulfat,

wobei die Glucuronidierung der Hauptkonjugationsprozess ist. Der Metabolit welcher am häufigsten in Körperflüssigkeiten, Organen und Zellen gefunden wird, ist das glucuronidierte Hexahydro-CUR [34]. Eine weitere Phase-II Reaktion ist die Konjugation mit Glutathion (GSH) via Michael Addition [54]. Auch die glucuronidierten Metaboliten von CUR zeigen jedoch nur eine geringe Stabilität und der Metabolismus von den Hauptabbauprodukten von CUR wurde bisher noch wenig erforscht. In Studien zur CUR-Aufnahme zeigt sich eine geringe intestinale Resorption von CUR nach oraler Gabe und der Hauptanteil wird mit dem Stuhl ausgeschieden. Der kleine Anteil, welcher vom Darm resorbiert wird, wird mit der Galle und dem Urin ausgeschieden und es findet keine Akkumulation in Organen statt. Selbst bei hochdosierter Gabe von oralem, nativem CUR finden sich nur geringe Spiegel in Blut, Galle und Urin. Diesem Effekt liegt vermutlich die chemische und metabolische Instabilität dieses Moleküls zugrunde [34].

Es gibt diverse Ansätze, um diese Limitationen zu umgehen. Diese beinhalten zum einen die Kombination mit Hilfsstoffen wie z. B. Piperin (der Wirkstoff von schwarzem Pfeffer) die den Metabolismus von CUR und damit dessen Abbau blockieren. Zum anderen die Entwicklung von Trägerstoffen wie z. B. Nanopartikel, Liposomen, Micellen und Phospholipidkomplexe, welche eine längere Zirkulation, bessere Permeabilität und geringeren Metabolismus bieten [53, 32].

Effekte

CUR ist ein hochgradig pleiotroper Wirkstoff mit dem Potential, die biologische Aktivität von vielen Signalmolekülen zu modulieren, wodurch es anti-inflammatorische, anti-oxidative, chemopräventive, chemosensibilisierende und radiosensibilisierende Aktivität besitzt [46]. Dies vermittelt CUR entweder direkt durch Bindung oder indirekt durch die Modulation der Expression anderer Proteine. Zielmoleküle für die Modulation durch Bindung (direkt) sind beispielsweise Proteinkinasen und -reduktasen, Histon-Acetyltransferase [55], DNA-Methyltransferasen 1, Transportproteine, inflammatorische Moleküle, „cell survival“-Proteine, die Xanthinoxidase oder Proteasome. Die indirekte Wirkung wird u. a. durch Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, inflammatorische

Mediatoren, Proteinkinasen, „drug resistance“-Proteine oder Chemokinrezeptoren vermittelt [46, 36]. Einen Überblick hierüber bietet Abbildung 6.

Aufgrund dieser breiten Wirkweise zeigt CUR ein enormes Potential als Therapeutikum und wurde in den letzten Dekaden bezüglich seiner Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin ausführlich untersucht. In mehr als 65 klinischen Studien mit über 1000 Patienten wurde die Effizienz dieses Wirkstoffes gegen diverse Krankheiten untersucht [56, 36].

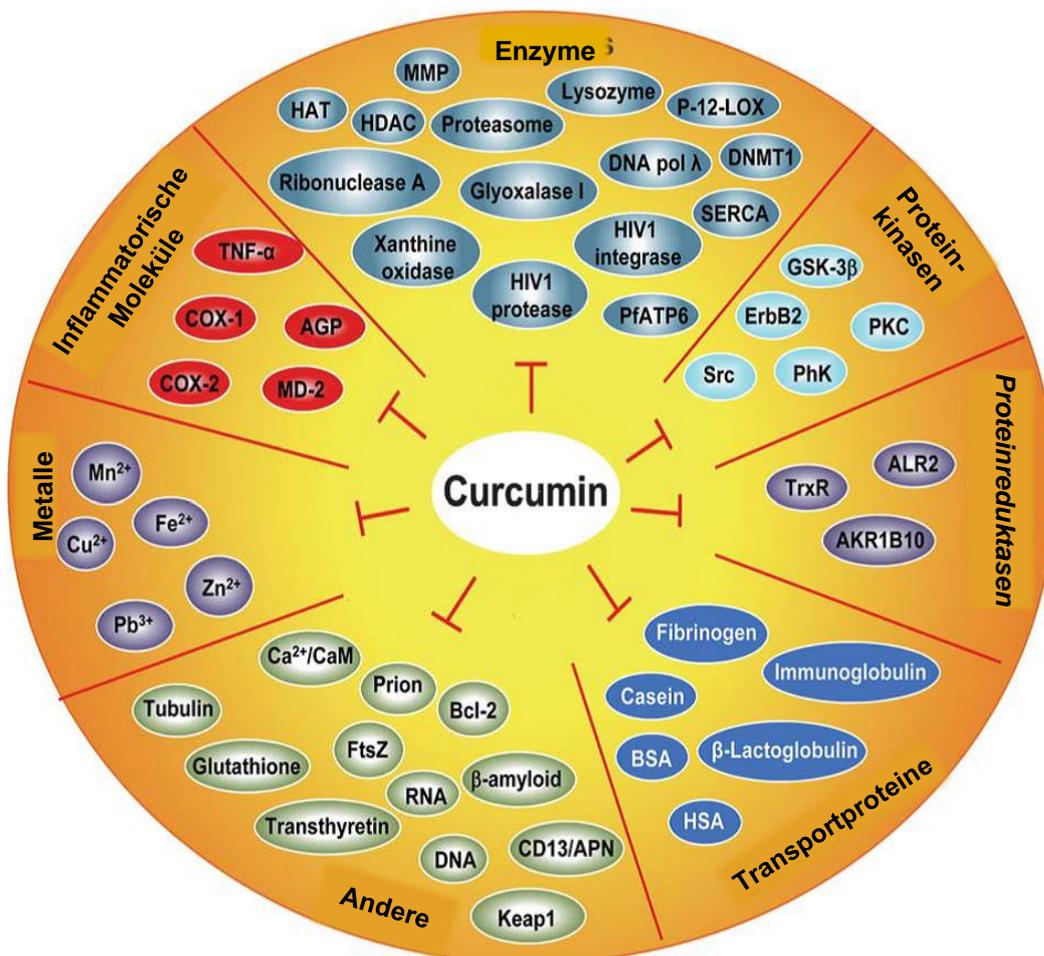


Abbildung 6: Übersicht über mögliche Zielstrukturen von CUR

Dargestellt ist eine Übersicht über die direkten und indirekten molekularen Ziele von CUR, welche in die Gruppen der Enzyme, Proteinkinasen und -reduktasen, Transportproteine, inflammatorische Moleküle, Metalle und andere eingeteilt sind. Modifiziert nach Gupta et al. [46].

Tumore

Die Wirkung von CUR ist in der medizinischen Forschung zur Therapie von Tumorerkrankungen gut untersucht und wurde, u. a. für Tumorarten wie das kolorektale Karzinom, Pankreaskarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom, hepatozelluläre Karzinom, multiple Myelom, Bronchialkarzinom, Mundhöhlenkarzinom sowie Plattenepithelkarzinom im K/H-Bereich *in vitro* und *in vivo* in den letzten drei Jahrzehnten erforscht [35, 36]. Dabei konnten verschiedene Mechanismen und Zielstrukturen für die antikanzerogene Wirkung von CUR festgestellt werden. So zeigen sich potente *antiproliferative Effekte*, welche u. a. durch Apoptoseinduktion (direkt über intrinsischen und indirekt über extrinsischen Weg der Apoptose, siehe Abbildung 7) und Wachstumshemmung vermittelt werden.

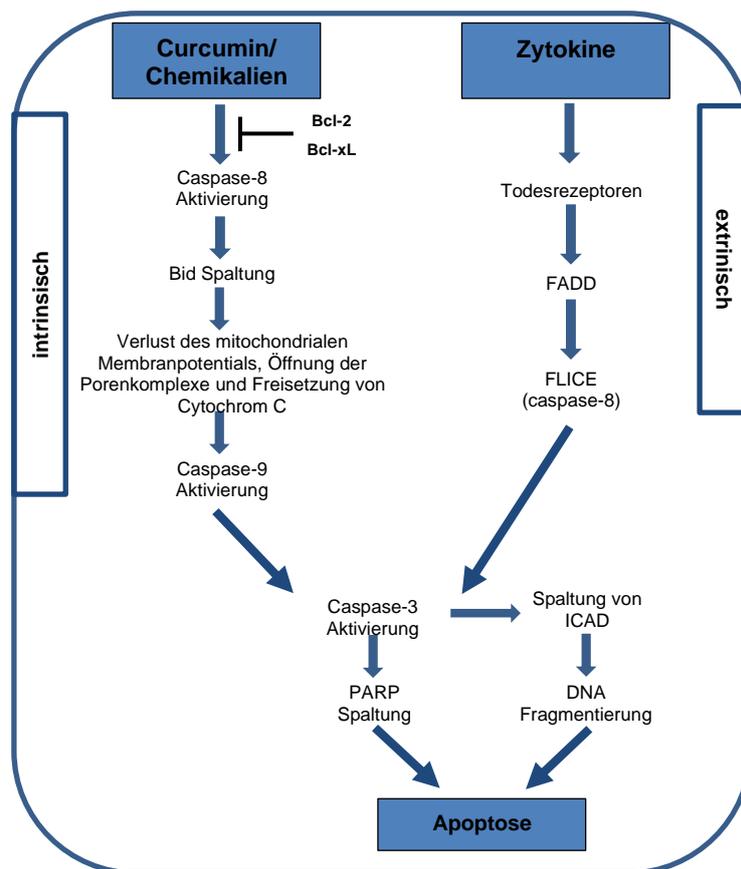


Abbildung 7: Mechanismen der Apoptose

Schematische Darstellung der Signalketten der Apoptose mit dem extrinsischen Weg (Mitochondrien-unabhängige Aktivierung durch Zytokine) und dem intrinsischen Weg (Mitochondrien-abhängige Aktivierung direkt durch u. a. CUR). Beide Signalwege münden in einer Caspase-3 Aktivierung, welche zur Apoptose der Zelle führt. Modifiziert nach Aggarwal et al. [35].

Das Tumormilieu wird durch *antiinflammatorische Effekte* beeinflusst, z. B. durch Suppression von MAPK („mitogen-activated protein kinase“) und NF- κ B („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“) und mittels *immunsuppressiver Effekte* durch Suppression von inflammatorischen Zytokinen, wie bereits weiter oben beschrieben. CUR zeigt sowohl *zytotoxische* also auch *zytoprotektive Einflüsse* in Abhängigkeit von der Konzentration. Weitere antikanzerogene Effekte sind die Hemmung von Zellmigration und –invasion durch *antiangiogene* und *antiadhäsive Effekte* und bergen damit einen potentiellen Ansatz zur Hemmung der Metastasenbildung. Einen besonderen Stellenwert zur kanzeropräventiven Wirkung von CUR nehmen *antimutagene Effekte*, u. a. bei lebertoxischen Schäden, DNA-Schäden, Schäden durch Strahlung und Tumormutationen ein. Des Weiteren zeigen sich *antioxidative* und *chemosensibilisierende Effekte* (bei *mdr-Phänotyp*). Einige Beispiele für die vielfältigen Effekte von CUR *in vitro* Studien zeigt die Abbildung 8 und eine detaillierte Übersicht über die Mechanismen und Zielstrukturen von CUR ist in diesem Review [35] zusammengefasst.

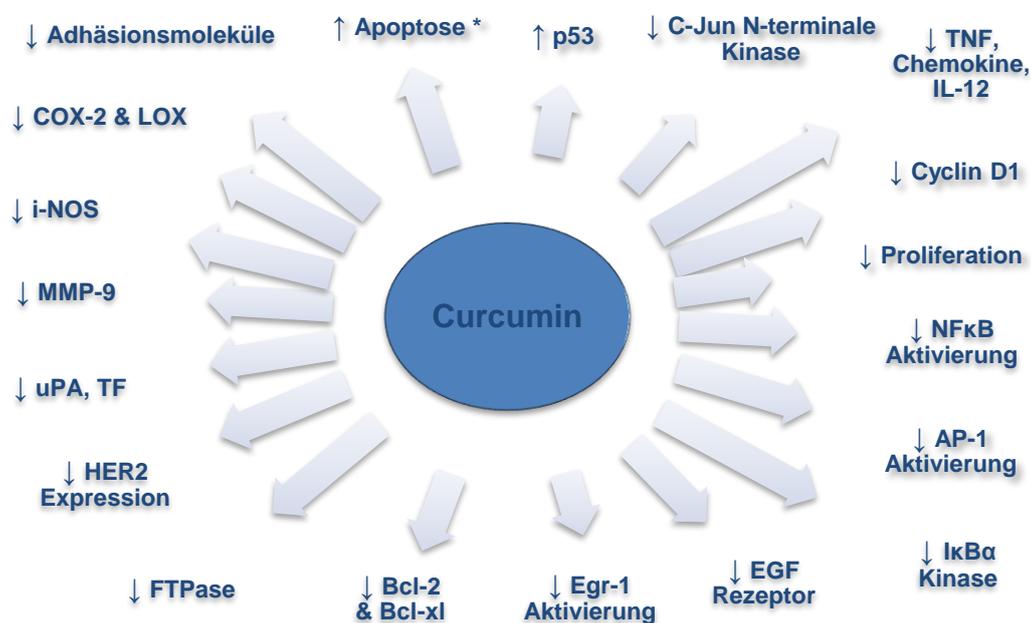


Abbildung 8: Molekulare Targets von CUR *in vitro*

Dargestellt sind einige der molekularen Ziele von CUR sowie deren Hoch- und Herunterregulierung (\uparrow/\downarrow) aus einer Metaanalyse diverser *in vitro* Studien mit CUR in der Tumorthherapie. *die Targets der Apoptose von CUR betreffen direkt den intrinsischen Weg der Apoptose (siehe Abbildung 7). Modifiziert nach Aggarwal et al. [35].

Dosis und Toxizität

In asiatischen Ländern wird CUR schon lange als Bestandteil der lokalen Küche genutzt und zeigte dabei keine Toxizität [46]. Laut einem FAO/WHO Bericht von 1974, nahmen Menschen in Indien täglich mit der Nahrung 2-2,5 g (bei ca. 60 kg KG) Kurkuma auf, was in etwa einer Dosis von 60-100 mg CUR entspricht [57]. Auch in frühen Tierversuchen mit Ratten, in denen hohe Dosen (angepasst an den normalen menschlichen Konsum und höher) von CUR oral verabreicht wurden, konnten keine negativen Effekte auf Wachstum, Blutbestandteile (Erythrozyten, Leukozyten) oder Laborparameter (wie Hämoglobin, Gesamteiweiß, Albumin, Globin AST, alkalische Phosphatase) festgestellt werden [58]. Die Aufnahme von CUR beim Menschen scheint auch in hoher Dosierung mit geringen bis keinen Nebenwirkungen einherzugehen. In mehreren Studien mit einer täglichen Aufnahme von 8 g pro Tag wurde CUR gut vertragen und zeigte keine Toxizität oder Nebenwirkungen [59-61]. In ihrem Bericht „EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS“ von 2004 beschreibt die FAO/WHO, dass kein Anhalt für Toxizität oder schwerwiegende Nebenwirkungen nach aktueller Studienlage besteht und legte die erlaubte Tagesdosis (ADI = acceptable daily intake) auf 0-3 mg/kg KG CUR fest. Bei Kindern mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte CUR erfolgreich mit bis zu 2 g pro Tag eingesetzt werden ohne signifikante Nebenwirkungen zu zeigen [62].

1.3 Photodynamische Therapie (PDT)

Geschichte und Namensgebung

Die Therapie mit Licht hat eine lange Tradition und wurde u. a. schon in den Kulturen des alten Ägypten oder Indien therapeutisch eingesetzt [63]. Die Erforschung dieser Methode in der westlichen Medizin begann etwa zum Ende des 19. Jahrhunderts, als Niels Finzen erstmalig Licht zur Therapie von Krankheiten nutzte und für diese Arbeit 1903 auch den Nobelpreis erhielt [64]. Oscar Raab fand etwa zur selben Zeit heraus, dass die Kombination von dem Farbstoff Acridinorange und Licht bestimmter Wellenlängen zytotoxische Effekte auf Mikroorganismen hat [65]. Herman von Tappeiner und A. Jesionek begründeten kurz

darauf den Begriff der „photodynamicaction“[66]. Damit war der Begriff der photodynamischen Therapie (PDT) geboren, welcher die Kombination von Reagenz (Photosensibilisator) und Licht beschrieb. Erstmals in Zusammenhang mit Krebs brachten Richard Lipson und Kollegen die PDT in den 1960er Jahren in der „Mayo Clinic“, als sie anhand eines Hämatoporphyrinderivates dessen selektive Akkumulation in Tumorzellen feststellten, wo diese Stoffe Fluoreszenz abgaben [67]. Daraufhin nahm die Erforschung der PDT als Tumorthherapie Fahrt auf und wurde exzessiv und erfolgreich an lokalen Haut- und Blasentumoren getestet [68, 69]. Die darauffolgenden Untersuchungen von PDT bei diversen weiteren Tumorarten wie Lungenkrebs, gynäkologischen Tumoren, Hirntumoren, K/H-Tumoren und weiteren brachten jedoch nicht den erwünschten Erfolg und zeigten limitierte Effekte. Diese ließen sich gut rückführen auf die lokale Wirkung der PDT, welche wenig geeignet für die Therapie einer systemischen Erkrankung – besonders in fortgeschrittenen Stadien – war. Die PDT wird weiterhin erforscht und mit der Entwicklung von neuen und potenteren Photosensibilisatoren in klinischen Studien untersucht [70].

Wirkprinzip

Das Prinzip der PDT beruht auf der Kombination zweier nicht-toxischer Komponenten, welche in ihrer Interaktion sauerstoffabhängige Effekte auf Zellen und Gewebe induzieren (siehe Abbildung 9). Eine Komponente stellt die Applikation von Licht unterschiedlicher Wellenlänge dar, welche die andere Komponente – den sog. Photosensibilisator – anregt. Photosensible Substanzen sind Stoffe, welche Licht absorbieren und diese Energie auf Sauerstoff übertragen können und dadurch ROS generieren [70-72].

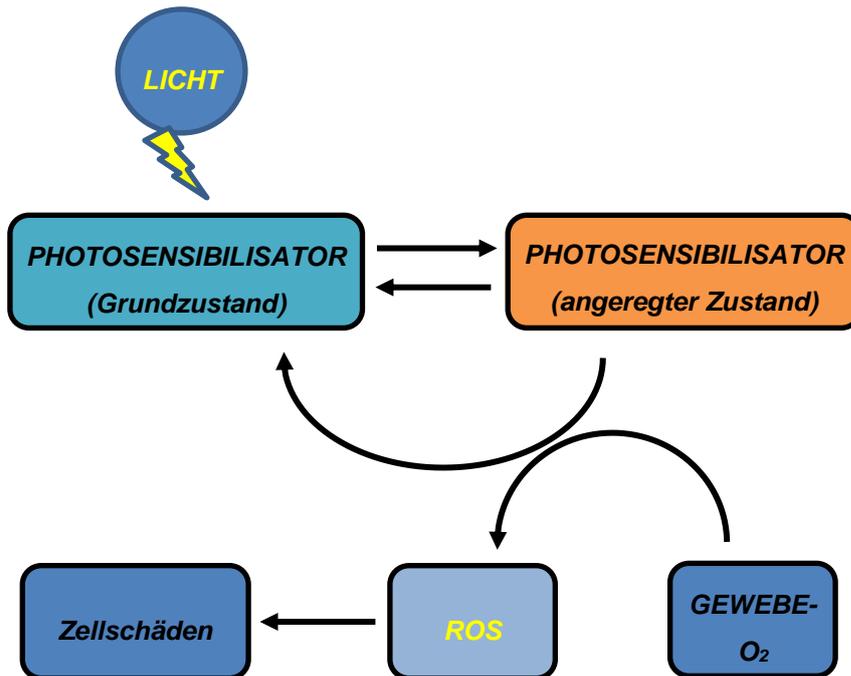


Abbildung 9: Wirkprinzip der PDT

Dargestellt ist in einem vereinfachten Schema das Wirkprinzip der PDT, welche die Elemente Licht, Photosensibilisator und Sauerstoff benötigt. Die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge transformiert den Photosensibilisator vom Grund- zu einem angeregten Zustand. Bei der Rückkehr in ihren Grundzustand wird die freigewordene Energie auf den im Gewebe vorkommenden Sauerstoff transferiert, welcher freie Radikale bildet. Diese ROS verursachen aufgrund des hohen Reaktionspotentials wiederum Schäden auf zellulärer Ebene in ihrer unmittelbaren Umgebung. Modifiziert nach *Dolmans et al.* [70].

Im Detail können hierbei zwei Reaktionsverläufe unterschieden werden: durch die Absorption von Licht in Form von Photonen, wird der Sensibilisator von seinem Grundzustand zu einem ersten angeregten Singulett-Zustand und im Verlauf spontan zu einem relativ langlebigen, angeregten Zustand (sog. Triplett Zustand) angehoben. Dieses angeregte Triplett kann in zwei verschiedenen Weisen weiterreagieren. Eine Variante ist die direkte Interaktion mit dem Substrat, wie einer Zellmembran oder einem Molekül, wobei es ein Wasserstoffatom (Elektron) transferiert und dabei Radikale generiert. Diese Radikale wiederum reagieren mit Sauerstoff zur Bildung von angeregten Sauerstoffmolekülen ($^1\text{O}_2$, Singulett-Sauerstoff), welche die Umgebung oxydieren (Typ-I-Reaktion). Eine zweite Variante ist der direkte Transfer von Energie auf Sauerstoff, wobei unmittelbar der hochreaktive Singulett-Sauerstoff entsteht, welcher mit der Umgebung reagiert und diverse Substrate oxydiert (Typ-II-Reaktion). Es finden beide Reaktionsvarianten während der PDT statt. In Abhängigkeit von Art des Sensibilisators, Konzentration

onen an Sauerstoff und Substrat (Gewebe) sowie Akkumulation des Sensibilisators im Substrat bzw. dessen Bindungsaffinität an das Substrat, wird eine der beiden Reaktionen bevorzugt [73, 70].

ROS sind sehr reaktionsfreudig und kurzlebig. Die Halbwertszeit von Singulett-Sauerstoff in biologischen Systemen ist $< 0,04 \mu\text{s}$, woraus sich ein effektiver Wirkradius von $< 0,02 \mu\text{M}$ ergibt. Daraus ableiten lässt sich dementsprechend ihre lokale Wirkung. Die photochemische Reaktion ist auf die unmittelbare Umgebung der photosensiblen Substanz beschränkt, welche jedoch häufig die Fähigkeit besitzt sich in bestimmten Geweben anzureichern. Die unmittelbare Exposition dieser Bereiche mit Licht führt zu den Effekten der PDT [74].

Die Effekte der Zytotoxizität sind multifaktoriell und abhängig von der Art, Dosis und Applikationsform des Photosensibilisators, der Lokalisation extra- oder intrazellulär, der Lichtexpositions-dosis und -flussrate sowie dem zeitlichen Abstand zwischen Gabe des Photosensibilisators und Lichtexposition und nicht zuletzt der Anwesenheit von Sauerstoff [70].

Beispiele und Effekte in der Tumorthherapie

Bei der Anwendung von PDT zur Tumorbekämpfung konnten drei Effekte von ROS auf Tumoren aufgezeigt werden. Zum einen eine direkte zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen, des Weiteren eine Aktivierung der Immunantwort und zuletzt eine Schädigung des Gefäßsystems des Tumors [75, 73, 76, 70]. Die lokale zytotoxische Wirkung von ROS wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen wie Apoptose, Nekrose und Autophagozytose vermittelt [77, 78].

Als Photosensibilisatoren gibt es zum einen die bekannteste und am längsten genutzte Gruppe der Porphyrine sowie Chlorine, Bakteriochlorine und Phthalocyanine [78]. Einiger dieser Substanzen wie z. B. Levulan, Photofrin oder Foscan sind auch bereits in der EU für bestimmte Tumorerkrankungen zugelassene Photosensibilisatoren [70]. In Studien untersuchte, alternative photosensible Moleküle sind u. a. synthetische Farbstoffe, Übergangsmetalle (z. B. Rhodium)

sowie Naturprodukte (z. B. Hypericin aus Johanniskraut, CUR). Zur sog. „targeted PDT“ werden Photosensibilatoren z. B. an monoklonale Antikörper oder andere Liganden mit spezifischen Zellrezeptoren gebunden um noch zielgerichteter wirken zu können. Mithilfe von Nanotechnologie assoziierten Photosensibilisatoren kann z. B. die Lichtpenetration des Gewebes verbessert werden. Weitere Photosensibilisatoren und Techniken der PDT sind aktuell in Erprobung und können die Zukunft der PDT maßgeblich beeinflussen [78].

Die PDT ist in der Dermatologie zur Behandlung der Aktinischen Keratose und dem Plattenepithelkarzinom in situ bereits etabliert (Photosensibilisator ist hier u. a. 5-Aminolävulinsäure) [79]. In Studien wurde die PDT bei diversen anderen soliden Tumoren wie zum Beispiel dem Ösophaguskarzinom, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, K/H-Karzinom, Gliom, Cholangiozellulären Karzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Blasenkarzinom, Paget Karzinom der Vulva und der Peritonealkarzinose entweder in Einzeltherapie oder in Kombination mit Chemotherapie oder chirurgischer Resektion in Früh- oder Palliativstadien getestet und ist in diesem Review von 2019 zusammengefasst [80].

CUR und PDT

CUR hat wie in 1.2 beschrieben phototoxische Effekte und eignet sich daher als potentieller Photosensibilisator in der PDT. Bei Bestrahlung mit Licht > 400 nm, zeigt sich eine Verstärkung der natürlichen zytotoxischen Effekte von CUR. Die phototoxischen Effekte dieser Kombination wurden bereits zum einen in der antibakteriellen Therapie nachgewiesen [38, 81] und zum anderen in der Tumorthherapie [40, 39]. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe bei kindlichen epithelialen Lebertumoren konnte durch die Kombination mit der PDT eine Verstärkung des Effekts von CUR um das 20-fache *in vitro* festgestellt werden [39, 82].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der dichten Studienlage zur Anwendung von CUR bei Tumorerkrankungen gab es bisher nur wenige Studien, welche die Wirkung von CUR an Sarkomzellen, insbesondere dem Rhabdomyosarkom, genauer betrachtet haben [83, 84]. Da CUR als Nahrungsergänzungsmittel und in Studien bisher eine ausgezeichnete Toleranz ohne großes Nebenwirkungspotential in hoher Dosierung zeigte, hat es großes Potential in der Therapie von tumorerkrankten Kindern. Die bisher in der Behandlung des RMS eingesetzten Chemotherapeutika wie Vincristin und Actinomycin D zeigen in vielfältigen Studien akute Nebenwirkungen und Langzeitschäden [28], welche es – besonders bei der zu erwartenden Lebensspanne von Kindern – zu vermeiden gilt. Ein Ziel dieser Studie ist es dementsprechend, die Wirkung dieses neuen und gleichzeitig alten Phytotherapeutikums CUR beim RMS, zunächst *in vitro*, zu erforschen bezüglich der bereits erwähnten antikarzinogenen Effekte (wie Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion, Hemmung der Migrationsfähigkeit und Chemosensibilität).

Weiteres Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Wirkung von CUR beim RMS in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika, um additive oder synergistische Effekte in der Tumorbehandlung nutzen zu können und therapieinduzierte Schäden durch Dosisreduktion zu minimieren.

Der Stellenwert der chirurgischen Resektion in der kurativen Therapie des RMS ist bereits in 1.1 ausführlich beschrieben. Ebenso die Problematik von R1- oder sogar R2-resezierten Kindern, welche zu Hochrisikoverläufen und Rezidiven neigen und ein sehr schlechtes Outcome haben. Um dieses Risiko zu minimieren, möchten wir CUR in Kombination mit der PDT, welche sich intraoperativ anwenden ließe, zunächst *in vitro* auf zytotoxische Effekte auf Tumor- und gesunde Zellen untersuchen. Die PDT zeigte bereits in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe – bei kindlichen epithelialen Lebertumoren – sehr gute Ergebnisse *in vitro* und wird in dieser Studie beim RMS ebenfalls untersucht [39].

Ein Nachteil der Chemotherapie, der besonders Kinder mit Tumorrezidiven betrifft, ist die Entstehung von sog. „multidrug resistances“ (MDR), welche das An-

sprechen des RMS auf die Therapie deutlich vermindert und die Überlebenschancen verringert. In diversen Studien wurde bereits die chemosensibilisierende Wirkung von CUR nachgewiesen [85]. Wenige Untersuchungen haben sich jedoch damit beschäftigt, ob CUR ebenfalls zur Entwicklung einer Therapieresistenz unter Langzeitanwendung neigt. Dies soll in dieser Studie erstmals untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Es wurden eine alveoläre Rhabdomyosarkom-Zelllinie (aRMS; RH30) und zwei embryonale RMS-Zelllinien (eRMS; RD, SRH) untersucht. Diese sind im Folgenden näher beschrieben.

RH30: Eine humane RMS-Zelllinie, die aus einer Knochenmarkmetastase eines 17-jährigen Jungen mit einem undifferenzierten aRMS etabliert wurde. Die Zellen zeigen neben einer p53-Mutation hohe Spiegel von Myogenin und myoD sowie eine Expression des Pax3/FKHR-Fusionsproteins, ausgelöst durch eine t(2;13)(q35; q14)-Translokation (erworben von DSMZ) [86-88].



Abbildung 10: RH30-Zellen in Kultur

Mikroskopische Aufnahme von RH30-Zellen der Passage 15 (links, 10x Vergrößerung) und 17 (rechts, 5x Vergrößerung) in Kulturmedium.

RD: Eine humane RMS-Zelllinie, die aus einer Beckenkammbiopsie bei einem 7-jährigen Mädchen mit eRMS-Rezidiv etabliert wurde. Die Zellen stellen sich morphologisch als Spindelzellen und große, vielkernige Zellen dar und weisen eine Myc-Amplifikation sowie Mutationen der Gene NRAS und p53 auf (erworben von ATCC) [89-92].

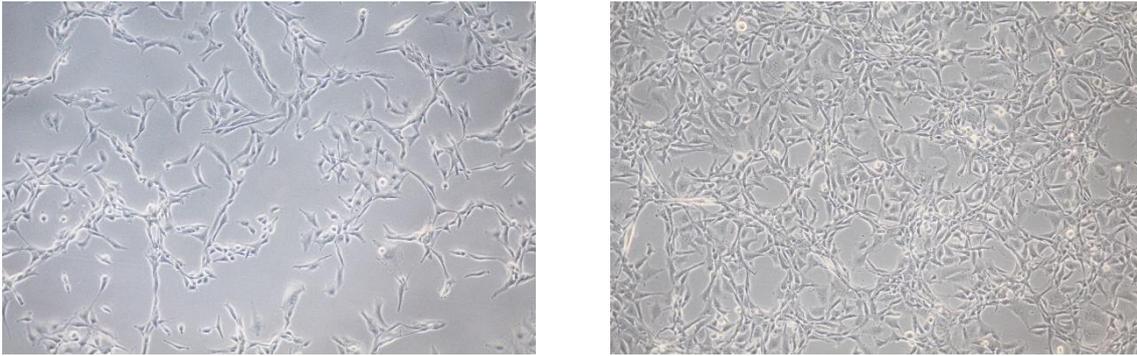


Abbildung 11: RD-Zellen in Kultur

Mikroskopische Aufnahme von RD-Zellen der Passage 33 (links 10x Vergrößerung; rechts 5x Vergrößerung) in Kulturmedium.

SRH: Eine humane RMS-Zelllinie, die an der Universitätskinderklinik in Tübingen aus einer Unterschenkelresektion bei einer 24-jährigen Frau mit einem spindelzellig sklerosierenden RMS des Erwachsenenalters etabliert wurde. Die Zellen weisen einen komplex aberranten Chromosomensatz, unter anderem mit Nachweis einer Trisomie 12q, auf. Des Weiteren wurde eine MYB-Deletion sowie eine biallelische Deletion des Locus 9p21 in 100 % der Zellen gefunden [93, 94]. Laut Tumorklassifikation nach Newton (1995) zählen die spindelzelligen RMS zu den eRMS.

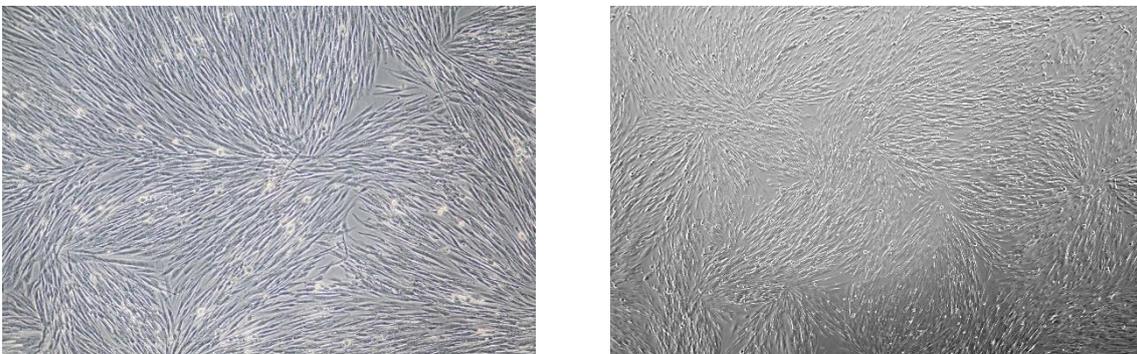


Abbildung 12: SRH-Zellen in Kultur

Mikroskopische Aufnahme von SRH-Zellen der Passage 18 (links 10x Vergrößerung; rechts 5x Vergrößerung) in Kulturmedium.

Als Kontrolle dienten Skelettmuskelzellen:

SKMC: Eine humane Muskelzelle, die aus gesunden Skelettmuskeln von Erwachsenen gewonnen wurde. Dabei werden die Zellen meist aus dem M. pectoralis major oder dem M. gluteus maximus entnommen. Die Zellen sind Myosin-

positiv (Skelettmuskulatur) und α -Aktin negativ (glatte Muskulatur) (erworben von PromoCell) [95, 94].

2.1.2 Kulturmedium und Reagenzien

Tabelle 4: Reagenzien und Kulturmedium für die Zellkultur

Reagenzien	Hersteller, Firmensitz
10x-PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) 1x-PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin
L-Glutamin (L-Glutamin, 200 mM)	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Trypanblau (0,4 %)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Trypsin (Trypsin/EDTA, 0.05 %, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Herstellung des Kulturmediums:

Zellkulturmedium: 88 % DMEM, 10 % FKS, 1 % L-Glutamin 200 mM,
1 % Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium: 90 % FKS, 10 % DMSO

2.1.3 Puffer, Lösungen

2.1.3.1 Verwendete Medikamente zur Behandlung der Tumorzelllinien und SKMC-Zellen

Tabelle 5: Verwendete Substanzen zur Tumorbehandlung

Reagenzien	Hersteller, Firmensitz
Actinomycin D (500 µg/ml)	Universitätsklinik-Apotheke Kinderklinik Tübingen
Curcumin 95 % nativ, Lot:1104/B-13	AquaNova AG, Darmstadt
Vincristin (1000 µg/ml)	Universitätsklinik-Apotheke Kinderklinik Tübingen

Vincristinsulfat (VCR) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide. Es wird als Salz des Alkaloids VCR aus der *Vinca rosea* L. gewonnen und ist ein klassisches Spindelgift, indem es an Tubulin bindet und dessen Polymerisation zu Mikrotubuli hemmt und damit die Metaphase der Zellteilung verhindert. Dies geschieht ebenfalls durch die Depolymerisation bereits gebildeter Mikrotubuli. Des Weiteren greift VCR in andere zelluläre Systeme wie die DNA- und RNA-Synthese sowie Lipidbiosynthese ein [21, 96-98].

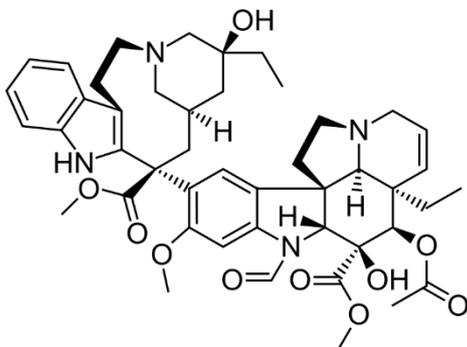


Abbildung 13: Chemische Struktur von VCR

Dargestellt ist die Strukturformel von Vincristinsulfat [99].

Actinomycin D (DAC) ist ein zytotoxisches Antibiotikum und hemmt selektiv die DNA-abhängige Synthese der Ribonukleinsäure, indem es mit Desoxyribonukleinsäure Komplexe bildet. Der zugrundeliegende Prozess scheint eine Hemmung der Proteinsynthese durch Inhibition der mRNA-Synthese zu sein. In hohen Konzentrationen kann DAC auch die DNA-Synthese hemmen [21, 98].

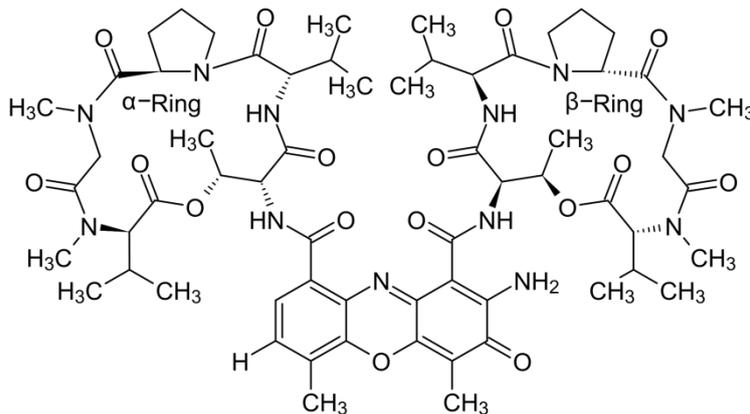


Abbildung 14: Chemische Struktur von DAC

Dargestellt ist die Strukturformel von Actinomycin D [100].

Curcumin (CUR) siehe Kapitel 1.2.

2.1.3.2 Zellviabilität

Tabelle 6: Reagenzien zur Untersuchung der Zellviabilität

Reagenzien	Hersteller, Firmensitz
1x-PBS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS) in Pelletform	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Thiazolylblau, Tetrazoliumbromid (MTT) Lot: 5P011404	AppliChem GmbH, Darmstadt

Herstellung der Lösungen:

MTT-Reagenz, Stocklösung 5 mg/ml: 250 mg Thiazolylblau + 50 ml 1x-PBS.
Nach Herstellung wurde die Lösung gefiltert, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Lysepuffer, Stocklösung 10 ml: 9,94 ml DMSO, 0,006 ml Essigsäure, 1 g SDS.

2.1.3.3 Immunfluoreszenz**Tabelle 7: Reagenzien zur Immunfluoreszenzdarstellung**

Reagenzien	Hersteller, Firmensitz
Paraformaldehyd reinst (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Prolong Gold Antifade reagent with DAPI	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Herstellung der Lösung:

4 % PFA (10 ml): 16 g Paraformaldehyd reinst (Pulver), 400 ml PBS.
Lagerung bei 4 °C.

2.1.3.4 Colony-forming Assay (CFA)**Tabelle 8: Reagenzien für den CFA**

Reagenzien	Hersteller, Firmensitz
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol (99,8 %)	VWR International GmbH, Darmstadt

Herstellung der Lösungen:

1 % Kristallviolettlösung: 1 g Kristallviolett Pulver + 100 ml dd H₂O.

2.1.3.5 Durchflusszytometrie

Tabelle 9: Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Lösungen	Hersteller, Firmensitz
2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
7-AAD	eBioscience Inc., San Diego, USA
CellWASH Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg

Apoptose-Assay:

Tabelle 10: verwendete Substanzen im Apoptose-Assay in der Durchflusszytometrie

Protein /Puffer	Fluorochrom	Bezugsquelle
Annexin V Lot: B217656	APC	BioLegend, Fell
Annexin V Binding Buffer Lot: EXB0019		Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching

2.1.3.6 Western Blot

Tabelle 11: Reagenzien für den Western Blot

Chemikalien	Hersteller, Firmensitz
Acrylamid Stammlösung	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovine Serum Albumin (BSA), Albumine Fraction V	Carl Roth, Karlsruhe
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling, Cambridge

Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Protein Assay Dye Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Assay Farbstoffkonzentrat (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteinauftragspuffer Roti-Load 1	Carl Roth, Karlsruhe
Protein-Marker IV10-170 kDa	Peqlab, Wilmington, USA
Protein-Marker Precision Plus All Blue Standards 10-250 kDa	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rotiphorese 10x SDS-Page	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base (Trizma base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Western Blot Detektionslösung (PREMIUM Chemiluminescent)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Western Sure Pen	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Herstellung der Pufferlösung:

Auffüllen der Lösungen auf 1000 ml mit dd. H₂O.

SDS-Laufpuffer (10x): 30,3 g Tris-Base, 144 g Glycerin, 10 g SDS

Transferpuffer (10x): 24 g Tris-Base, 173 g Glycin

TBS (10x): 24,2 g Tris-Base, 80 g Natriumchlorid

TBS-T: 100 ml TBS (10x), 1 ml Tween-20

Stripping Puffer (pH 2,2): 15 g Glycin, 1 g SDS, 10 ml Tween-20

Zellyse-Puffer (pH 7,4): 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % Triton X
100, 0,5 % Na₂HPO₄, 0,4 % β-Mercaptoethanol

5 % oder 10 % Milchpulver (in TBS-T gelöst), 10 % BSA (in TBS-T gelöst), 70 %
Ethanol (in dd.H₂O)

Herstellung der Gele:

Tabelle 12: Ansatz für zwei Trenngele (10 %) bzw. zwei Sammelgele (4 %) für den SDS-Page

Substanz	10% Trenngel	4% Sammelgel
1,0 M Tris (pH 6,8)		0,75 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,5 ml	
10 % APS	0,2 ml	0,06 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,06 ml
Acrylamid Mix	6,7 ml	1,0 ml

H ₂ O	7,9 ml	4,1 ml
TEMED	0,008 ml	0,006 ml

Verwendete AK:**Tabelle 13: verwendete primäre und sekundäre Antikörper für den Western Blot**

Primäre Antikörper	Spezies, Klon	Bezugsquelle
β-Catenin (6B3) Lot: 4	Rabbit mAK	Cell Signaling, Cambridge, GB
GAPDH	Rabbit anti-human GAPDH, mAK, clone 14C10	Cell Signaling, Cambridge, GB
NF-κB p65 (A) Lot: B2715	Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechno- logy Inc., Heidelberg
Sekundäre Antikörper		
Rabbit Lot: 24	Anti-rabbit IgG, HRP- linked AK	Cell Signaling, Cambridge, GB

2.1.4 Verbrauchsmaterialien**Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Materialien	Hersteller, Firmensitz
Aluminiumfolie 300 x 0.03 mm	Papstar, Kall
Deckgläser 24 x 50 mm	R.Langenbrinck, Emmendingen
Desinfektionsspray Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Einwegpinzetten, steril	Servoprax GmbH, Wesel
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim

FACS-Röhrchen (5 ml Rundboden)	Corning Incorporated, New York, USA
Falcon-Röhrchen (Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden) 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gefrierbehälter (5100 Cryo „Mr.Frosty“)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Handschuhe nitrile, powder-free	Abena GmbH, Zörbig
Handschuhe Peha-soft nitrile GU-ARD	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kryoröhrchen Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt AG&Co, Nürmbrecht
Neubauer-Zählkammer DHC-N01 (C-Chip)	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Nitrocellulose-Membran, 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Parafilm "M" 4 IN x 125 FT. Rolle	Bemis Europe, Braine-l'Alleud, Belgien
Pasteur-Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (Falcon Serologische Pipette) (2, 5, 10, 25 ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen (0,5 –20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen (10-200 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Pipettenspitzen mit Filter (0,5-10, 10-100, 100-1500 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 1,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0,5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Sterilfilter (Easystainer™ 40 µM)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatman Papier (Chromatographie Papier 3 mm)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
x-Well Zellkulturkammern	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkulturflaschen (Cellstar 175 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Corning incorporated, New York, USA
Zellkulturplatte (6-, 12-, 96-Well, TC-Treated)	Corning Incorporated, New York, USA
Zytostatika-Schutzmatte (56 cm x 41 cm)	Berner International GmbH, Elmshorn

2.1.5 Geräte

Tabelle 15: verwendete Geräte und deren Hersteller

Geräte	Hersteller, Firmensitz
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Computerbildschirm	LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen
Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Ipswich, GB

Hochleistungs-Laborgefriergerät Forma Scientific -86C Freezer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Immunfluoreszenzmikroskop Apo- Tome1	Carl Zeiss, Oberkochen
Inverses Mikroskop, Axiovert 135	Carl Zeiss, Oberkochen
Kaltlichtfontäne D-light C/AF SCB, Seriennr.: ZZ10262-C	Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Kamera AxioCam MR colour	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera Canon EOS 550D	Canon GmbH, Krefeld
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop Fluovert FS	Leitz GmbH, Wetzlar
LOGIC Shaker	NeoLab Migge Laborbedarf, Leonberg
Magnetrührer Ikamog RH	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer VarioMAG Mono- therm	H&P Labortechnik, München
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Multipipette (Multipipette Xstream)	Eppendorf AG, Hamburg
Odyssey Fc Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
PC MD Buisness Pentino G-Se- ries	Medion AG, Essen
pH-Meter Lab850	SI Analytics GmbH, Mainz
Photometer (BioPhotometer D30)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu Integra	Bioscience AG, Chur, Schweiz

Plattenspektralphotometer ELx 800	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
Polyacrylamidgel-Gießstand	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage LP2200	Sartorius, Göttingen
Rollenmischgerät RS-TR05	Phoenix-Instrument, Garbsen
Sterilbank (Msc-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank CryoSystem 4000 Chart	MVE BioMedical, Ball Ground, USA
Stoppuhr TachoSil	Inspirion GmbH, Bremen
Taschenrechner (Sharp EL-243S)	Sharp Devices Europe GmbH, München
Thermo-Schüttler PHMT SC20	Grant Instruments, Cambridgeshire, Großbritannien
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Vortex-Schüttler VF2	Janke & Kunkel, Labortechnik, Staufen
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wet/Tank Blotting System/Polyacrylamid-Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, Hanau

2.1.6 Software

Tabelle 16: verwendete Software und deren Hersteller

Software	Hersteller, Firmensitz
Adobe Reader, Adobe Photoshop	Adobe Systems, München
AxioVision 3.1	Carl Zeiss, Oberkochen
AxioVision Viewer 3.0	Carl Zeiss, Oberkochen
EOS Utility	Canon GmbH, Krefeld
FACSCanto II System Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSDiva Software Version 8.0	Becton Dickinson, Heidelberg
GraphPad Prism Version 7.20	GraphPad Software, La Jolla, USA
Office 365 Education Plus	Microsoft, Unterschleißheim

2.2 Methoden

2.2.1 Generation von RMS- und SKMC-Zellen

Auftauen und Einfrieren von Zellen:

Zum Zellen-Einfrieren wurden die Zellen (RD, RH30, SRH, SKMC) wie gewohnt gezählt (siehe 2.2.3) und auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die RMS- und SKMC-Zellen wurden dabei im Einfriermedium (siehe 2.1.2) resuspendiert, aliquotiert und mittels Easy Freezer in Isopropanol 24 h im -80°C Kühlschrank eingefroren und anschließend im Stickstofftank bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die o. g. Zellen aus dem Stickstofftank geholt und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension mit warmem Zellkulturmedium (siehe 2.1.2) gewaschen und abzentrifugiert (5' RT, 1500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Es erfolgte ein Mediumwechsel am nächsten Tag. Die Zellen benötigten ca. ein bis zwei Passagen zur Regeneration und konnten dann für Zellkulturversuche genutzt werden.

Zellen in Zellkultur halten:

Die o. g. Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (175 cm², 75 cm², 25 cm²) kultiviert und regelmäßig, sobald die Zellen 80 % konfluent waren, gesplittet. Das Gesamtvolumen je Flasche war bei den kleinen Flaschen (25 cm²) 4-5 ml, bei den mittelgroßen Flaschen (75 cm²) 12-13 ml und bei den großen Flaschen (175 cm²) 24-25 ml.

2.2.2 Herstellung und Lagerung von CUR und Zytostatika

Curcuminlösung

Die CUR-Stocklösung hatte eine Konzentration von 150 mg/ml. CUR (siehe 2.1.3) wurde als Pulver 95 % nativ mithilfe der Feinwaage in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abgewogen (150 mg), in 1 ml DMSO gelöst und anschließend aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Da CUR photosensibel ist, wurde die Stocklösung im Dunkeln bei RT aufgetaut. Weitere Verdünnungsstufen von CUR konnten aus der Stocklösung mit Zellkulturmedium hergestellt werden.

Zytostatika

Die Zytostatikalösungen wurden zeitnah nach Herstellung aus der Klinik-Apotheke abgeholt und im Dunkeln bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und nach Haltbarkeitsdatum verwendet.

2.2.3 Aufbereitung von RMS- und SKMC-Zellen zur weiteren Verwendung

Zum Splitten wurden die Zellen (RD, RH30, SRH und SKMC) zunächst mit warmem PBS gewaschen, anschließend trypsinisiert, vom Flaschenboden abgelöst und mit Zellkulturmedium (siehe 2.1.2) resuspendiert. Entsprechend der Verdünnung wurde die Menge Zellkulturmedium gewählt und zurück in die Flasche gegeben. Zum Beispiel wurden bei einer 1:10 Verdünnung die Zellen mit 9 ml Medium und 1 ml Trypsin resuspendiert und von dieser zehnfachen Verdünnung 1 ml zurück in die Zellkulturflasche gegeben. Der Rest der Zellen wurde in ein Falcon überführt und für weitere Versuche genutzt. Die Zellkulturflasche (75 cm²) wurde auf ein Gesamtvolumen von 12 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt, beschriftet und zur Inkubation im Brutschrank belassen.

Für die Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der o. g. frisch resuspendierten, vitalen Zellen auf ein C-Chip Zählkammer-System (Neubauer Zählkammer) mit Trypanblau in einer 1:2-Mischung angefärbt. Unter dem Mikroskop wurden diese Zellen, welche sich nicht mit Trypanblau anfärben lassen, in den 4 Großquadraten bei 10x-Vergrößerung gezählt. Mithilfe folgender Formel konnte daraus die Zellzahl bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 2 \times 10^4 \times \text{Gesamtvolumen}$$

4= Anzahl Großquadrate; 2= Verdünnungsfaktor; 10⁴= Zählkammerverdünnung

Danach wurden die Zellen für 5 min bei RT und 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde auf 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt und konnte für die Versuche genutzt werden.

2.2.4 Viabilitäts-Assay bei RMS- und SKMC-Zellen

Um den Einfluss der CUR- und Zytostatika-Behandlung auf Zellproliferation bzw. Stoffwechselaktivität zu detektieren wurde ein Viabilitäts-Assay mittels enzymatischer MTT-Reaktion genutzt. Dabei wird gelbes, wasserlösliches MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazoliumbromid) von vitalen und stoffwechselaktiven Zellen mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen in blaues Formazan umgewandelt, welches aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft ausfällt. Die Menge an wasserunlöslichem Formazan entspricht dabei in etwa der Anzahl vitaler Zellen in einer homogenen Zellpopulation. Die Analyse erfolgt mittels Plattenspektralphotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm [101-103]. Die Bestimmung des IC₅₀ ist ein fundamentaler Teil der Pharmakologie und wird genutzt, um die Eignung sowie die Leistung eines Wirkstoffes zu erfassen [104].

Die Zellen wurden wie in 2.2.3 beschrieben gesplittet, gezählt und anschließend in einer 96-Well-Platte mit entsprechend definierten Zellzahlen (siehe Tabelle 17) angelegt.

Tabelle 17: Definierte Zellzahlen zum Anlegen einer 96-Well Platte für den MTT-Assay

	Zelllinie	Zellzahl [Zellen/Well]
RMS-Zellen	RH30	8000

	RD	15000
	SRH	20000
Muskelzellen	SKMC	5000

Die Zellen wurden auf der 96-Well-Platte für den nächsten Tag im Brutschrank kultiviert bis sie adhärent waren. Daraufhin erfolgte die Behandlung mit CUR, VCR oder DAC in steigenden Konzentrationen (10 µl/Well) für 24, 48 und 72 h. Die Kombinationsbehandlung erfolgte mit CUR und VCR, CUR und DAC oder CUR und PDT. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit 0,01 % DMSO behandelte Zellen als Lösungsmittelkontrolle.

Bei der PDT wurden die Zellen für 1 h mit niedrigdosiertem CUR behandelt und anschließend mit einer Kaltlichtfontäne mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm für fünf Sekunden im abgedunkelten Raum bestrahlt (PDD-Modus (5-ALA), Leistung der Lichtquelle = 300 W, Farbtemperatur = 6000 K, Distanz von Ende des Optik-Kabels zu Zellen = 2 cm). Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 48 h bis zur Viabilitätsmessung.

Nach 24, 48 oder 72 h wurden pro Well 25 µl MTT-Reagenz (siehe 2.1.3.2 Zellviabilität) hinzugefügt, auf dem Plattenschüttler gemischt und danach für 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Platteninhalt abgekippt und zum Aufschließen der Zellen sowie zum Lösen der Formazankristalle 100 µl Lysepuffer (siehe 2.1.3.2) pro Well hinzugegeben. Danach wurde die Platte mittels Plattenspektralphotometer bei 560 nm Wellenlänge gemessen und mittels GEN0.9-Software analysiert. Die Daten wurden statistisch ausgewertet und der IC50 bestimmt (siehe 2.2.12).

2.2.5 Analyse des Migrationspotentials von RMS-Zellen mithilfe des Wound Healing Assays

Der Wound Healing Assay dient zur Analyse einer direkten, gerichteten Zellmigration *in vitro*. Die Ergebnisse können zur Quantifizierung der Migrationsrate von Zellen sowie zur Analyse von Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktionen genutzt werden [105]. Zur Durchführung des Assays wurden Zellen in einer 6-Well-Platte mit definierter Zellzahl (siehe Tabelle 18) ausgesät und über Nacht inkubiert, sodass

die Zellen adhären und eine 80 % konfluente Einzelzellschicht bilden konnten.

Tabelle 18: Definierte Zellzahlen für das Anlegen eines Wound Healing Assays

Zelllinie	Zellzahl [Zellen/Well]
RH30	1×10^6
RD	1×10^6

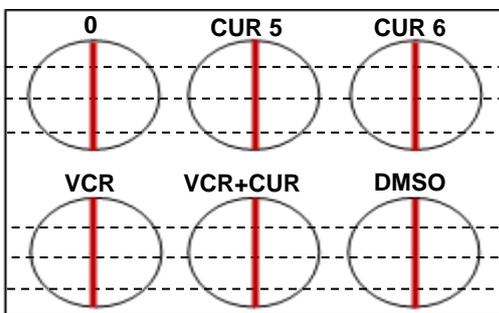


Abbildung 15: Schemazeichnung für das Anlegen eines Wound Healing Assays

In Rot ist der angelegte Scratch dargestellt. Behandlung mit CUR 5 µg/ml und 6 µg/ml, VCR 0,00075 µg/ml sowie der Kombination von 5 µg/ml CUR mit VCR und die Null- und Lösungsmittelkontrolle. Die Platte wurde mit 3 Linien (gestrichelt) zur Präzisierung des zu detektierenden Fotoareals markiert.

Nach Anlegen einer definierten „Wunde“ als Scratch mit einer 10-100 µl Pipettenspitze in der Mitte des Wells, wurden die Zellen (RD, RH30) mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Behandlung mit CUR, VCR und der Kombination von CUR und VCR durchgeführt. Details sind in Abbildung 15 aufgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO.

Zur Verlaufsdokumentation wurde zu definierten Messzeitpunkten (RH30: 0, 24, 30 und 48 h; RD: 0, 8, 24 und 30 h) mit der 5x-Vergrößerung am Phasenkontrast-Mikroskop fotografiert. Der Vergleich zwischen den Zeiträumen der Aufnahmen diente zur Quantifizierung der Migrationsrate der Zellen, indem die Fläche des Scratch einzelner Aufnahmen gemessen, mit dem Nullzeitpunkt ins Verhältnis gesetzt und statistisch ausgewertet (siehe 2.2.12) wurde. Die Berechnungen und Auswertungen erfolgten mit Axiovision, Excel und Graphpad Prism.

2.2.6 Analyse des koloniebildenden Potentials von RMS-Zellen mittels Colony-forming Assay

Der Colony-forming Assay (CFA) ist ein Assay, der eine Einschätzung über das Metastasierungspotential von Tumorzellen ermöglicht. Dies basiert auf der Fähigkeit von einzelnen Zellen, Kolonien zu bilden und sich unendlich zu teilen. Eine Kolonie ist definiert als eine Zellansammlung mit mindestens 50 Zellen. Der CFA ist die Methode der Wahl, um die Effektivität einer zytotoxischen Behandlung zu bestimmen [106]. Zur Durchführung des CFA wurden 750 Zellen je Well auf einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit CUR für 72 h.

Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Zellen (RD, RH30) mit PBS gewaschen mit frischem Zellkulturmedium für ca. 10 Tage im Brutschrank inkubiert. Es erfolgten regelmäßige Kontrollen zum Progress der Koloniebildung. Nach angemessener Ausbildung der Kolonien wurden die Kolonien mit Methanol (siehe 2.1.3.4) fixiert und mit einer 1 % Kristallviolettlösung für 30 min angefärbt. Im Anschluss wurde die überschüssige Farbe ausgewaschen und die Platten wurden über Nacht getrocknet. Zur Auswertung wurden die sichtbaren Kolonien gezählt und mit einer Nullkontrolle verglichen. Zur Ermittlung der Koloniebildungsrate wurden diese durch die Anzahl ausgesäter Zellen dividiert und mit 100 multipliziert [106]. Zur statistischen Überprüfung siehe 2.2.12.

2.2.7 Durchflusszytometrie von RMS- und SKMC-Zellen

Bei der Durchflusszytometrie macht man sich das Prinzip zu Nutze, einzelne Zellen einer Zellpopulation auf bestimmte Eigenschaften oder Marker quantitativ untersuchen zu können. Dies beruht auf den lichtstreuenden Eigenschaften von Zellen und der Möglichkeit einer Antikörper-Farbmarkierung von Oberflächenmarkern oder intrazellulären Proteinen einer Zellpopulation. Dabei passieren Zellen in Lösung in einem Durchflusszytometer (siehe 2.1.5) einzeln das Messinstrument, werden dabei mit Lasern unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt und das dadurch hervorgerufene Streulicht bzw. Fluoreszenzsignal wird mittels Photodetektoren gemessen [107]. Das Streulicht kann mittels „forward scatter“ (FSC) eine Aussage über Größe der Zelle und „side scatter“ (SSC) eine Aussage über

unterschiedliche Kompartimentierung (Granularität) einer Zelle machen [108]. Im weiteren Verlauf können spezifische Oberflächen- oder intrazelluläre Proteine mittels Fluoreszenz-Antikörpermarkierung detektiert werden [107].

Die Zellen wurden wie gewohnt gezählt und mit definierter Zellzahl in Zellkulturplatten überführt. Die Zellzahlen und Plattenarten waren dabei abhängig von dem durchgeführten Versuch und seiner spezifischen Fragestellung und sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Definierte Zellzahlen zum Anlegen von Zellkulturplatten bei der Durchflusszytometrie

Zelllinie	6-Well-Platte	12-Well-Platte
RH30	1×10^6	1×10^5
RD	1×10^6	1×10^5

Nach Inkubation über Nacht konnten die Zellen am nächsten Tag mit CUR und VCR behandelt werden. Die Art und Dauer der Behandlung werden in den nachfolgenden Abschnitten detailliert beschrieben. Bei jeder Behandlung wurde eine nicht-markierte, unbehandelte Kontrolle als Vergleichswert für die Fluoreszenzmarkierung angesetzt. Die Auswertung aller Versuche erfolgte mit der Software FACSDiva und die statistische Auswertung mittels Excel und Graphpad Prism.

Darstellung der Eigenfluoreszenz von CUR

Da CUR eine bekannte Eigenfluoreszenz besitzt [109], wurde diese mittels Durchflusszytometrie in mehreren Kanälen (siehe Tabelle 20) dargestellt.

Tabelle 20: Darstellung der Ex/ Em_{max} . verschiedener Kanäle in der Durchflusszytometrie

Darstellung der FACSCanto II-Kanäle und ihrer jeweiligen maximalen Emission (Em_{max} .) und Extinktion (Ex_{max} .) in nm.

Kanäle	FIT C	PE	PerC P	PE Cy7	APC	APC H7	BV42 1	BV51 0
Em- max.	520	578	678	785	660	785	421	510

Ex-	494	496	482	496	650	650	407	405
max.								

Dafür wurden RMS-Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/Well in eine 6-Well-Platte ausgesät, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit $5 \mu\text{g/ml}$ CUR behandelt. Nach einer Stunde Behandlungszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden $200 \mu\text{l}$ Cellwash hinzugefügt und die Zellen in den o. g. Kanälen am FACSCanto II gemessen und anschließend mit der FACSDiva Software ausgewertet.

Influx/Efflux-Messung

Da CUR ein natürlicher Farbstoff ist und dementsprechend eine Eigenfluoreszenz besitzt [109], konnte man die Aufnahme und Abgabe des Stoffes in die Zelle bzw. die Bindung an Oberflächenmoleküle über einen bestimmten Zeitraum mittels Durchflusszytometrie bestimmen.

Die in Tabelle 19 beschriebene Zellzahl wurde in einer 12-Well-Platte angelegt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit $5 \mu\text{g/ml}$ CUR behandelt. Die Messung für den Influx erfolgte direkt im Anschluss an die Behandlung sowie nach 1, 2, 4, 6, 24 und 48 h am FACSCanto II im PE-Kanal (siehe Tabelle 20). Um den Efflux darzustellen wurden die Zellen 2 h nach der CUR-Behandlung mit PBS gewaschen und ebenfalls zu den Messzeitpunkten 4, 6, 24 und 48 h gemessen. Die Daten wurden mittels Mean Fluorescence Intensity (MFI) dargestellt, normalisiert (nMFI) und statistisch ausgewertet (siehe 2.2.12).

Apoptose-Assay

Die Apoptose ist durch drei wesentliche Zellveränderungen charakterisiert: Abnahme des Zellvolumens, Kondensation des Kernchromatin und Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Der Apoptose-Assay mit Annexin V macht sich einen Effekt der frühen Apoptose zu Nutze, bei dem es zu einer Asymmetrie der Phospholipide an der Zellmembran kommt, durch Externalisierung von Phosphatidylserin an die äußere Zellmembran. Annexin V ist ein Protein, das in An-

wesenheit von Calcium Phospholipide bindet und eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin aufweist. Da Phosphatidylserin auch bei Nekrose an der äußeren Zellmembran exprimiert wird, soll diese mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbung ausgeschlossen werden. Bei der frühen Apoptose sind die Zellen nur Annexin V-positiv, bei der späten Apoptose Annexin V und PI positiv und bei der Nekrose nur PI positiv. Somit lassen sich spezifisch Zellen, die nach CUR und/oder Zytostatikagabe in Apoptose gegangen sind, nachweisen und unterscheiden [110, 111].

Die Annexin V-Messung wurde mit dem Fluorchrom Allophycocyanin (APC) durchgeführt, da CUR in Vorversuchen in diesem Kanal keine bzw. nur eine geringe Eigenfluoreszenz besaß. Die Nekrose-Messung, die bei Färbung mit PI nur im PE-Kanal messbar war, konnte wegen der Eigenfluoreszenz von CUR nicht durchgeführt werden. Dadurch entfiel die Unterscheidung zwischen früher/später Apoptose und Nekrose. Für den Assay wurden eine definierte Zellzahl (siehe Tabelle 19) in 12-Well Platten angelegt, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit verschiedenen Konzentrationen CUR und/oder VCR und/oder DAC behandelt. Nach einer Behandlungsdauer von 48 h wurden die Zellen sowie der Überstand überführt, und mit Annexin Binding Buffer (1:10 Verdünnung) gewaschen. Es erfolgte die Antikörperfärbung mit 3,5 µl APC Annexin V/50µl Cellwash-Lösung für 30 min im Dunkeln bei RT. Die Zellen wurden danach mit 200 µl Cellwash in Suspension gebracht und am FACSCanto II gemessen. Die Daten wurden wie in 2.2.12 beschrieben statistisch ausgewertet.

2.2.8 Analyse der CUR-Resistenzentwicklung mittels Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen

Um die Entwicklung einer Chemoresistenz bei Langzeitbehandlung mit einem Medikament einzuschätzen und mögliche Resistenzentwicklungen zu erkennen werden Zellen mit allmählich steigenden Konzentrationen eines Substrates behandelt und ausgewertet [112].

Es wurde eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) mit Zellen (RD oder RH30) angelegt und bis zur 80-90 % Konfluenz wachsen gelassen. Nachfolgend wurden die Zellen zu zwei Zeitpunkten in der Woche gesplittet und mit CUR behandelt. Die

CUR-Konzentration wurde dabei um jeweils 0,5 µg/ml gesteigert bis zu einer Endkonzentration von 8 µg/ml. Nachdem die Behandlung der Zellen die Endkonzentration erreicht hatte, wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und 72 h inkubiert. Anschließend wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Hierfür wurden auf einer 96-Well-Platte zur Hälfte die CUR-dauerbehandelten Zellen und zur Hälfte CUR-naive Zellen derselben Zelllinie angelegt. Die Zellzahl entsprach der Behandlung mit CUR (siehe Tabelle 17). Die Zellen wurden für 72 h inkubiert, mit MTT-Reagenz gefärbt und photometrisch gemessen (siehe 2.2.4). Die Auswertung und IC50-Bestimmung erfolgten ebenfalls wie in 2.2.4 beschrieben.

2.2.9 Herstellung von Proteinproben für den Western Blot

Proteinlysatproben für Western Blot

Zum Anlegen einer Gelelektrophorese und Durchführung des Western Blot wurden Zellen (RD oder RH30) mit einer Zellzahl von 8×10^5 Zellen in einer 6-Well Platte angelegt und über Nacht inkubiert. Dann erfolgte eine Behandlung mit CUR und/oder VCR für 2 oder 24 h. Im Anschluss an diese Behandlungszeit wurden die Zellen geerntet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Es wurden 100 µl Zellysepuffer (siehe 2.1.3.2) hinzugegeben und 15 min auf Eis inkubiert, sodass die Zellmembran zerstört wurde und die intrazellulären Proteine in Lösung gehen konnten. Um die gelösten Proteine ohne den entstandenen Zelldetritus zu gewinnen, wurden die Zellen 20 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Protein-Messung und Vorbereitung der Western Blot-Proben

Um die Gesamtproteinkonzentration der Proben zu bestimmen wurde der Bradford Protein Assay genutzt. Dabei wird eine kolorimetrische Messung durchgeführt, die auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 an das Protein beruht. Durch die Anwesenheit einer bestimmten Proteinkonzentration erhöht sich der Extinktionskoeffizient durch den gebildeten Farbstoff-Protein-

Komplex gegenüber freiem Farbstoff. Es kommt zur Verschiebung der Absorption von 465 nm zu 595 nm. Dies kann anschließend photometrisch bestimmt werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Probe [113-115].

Für die Messung wurden 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz in Küvetten pipettiert und 1 µl Proteinprobe hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min im Dunkeln bei RT wurden die Proben bei einer Absorption von 595 nm gemessen. Mittels Lowry-Standardkurve konnte die Proteinkonzentration der Ly-sate in Excel bestimmt werden. Die Proteinmenge für den Western Blot wurde auf 30 µg/µl Protein eingestellt. Zur Probenvorbereitung wurde der Proteinprobe RotiLoad Proteinauftragspuffer, zum Anhängen einer negativen Ladung für die SDS-Page hinzugefügt. Die Proben wurden bei 96 °C für 5 min erhitzt, sodass die Proteine denaturiert wurden, und im Anschluss für die Gelelektrophorese bei -20 °C gelagert oder direkt verwendet.

2.2.10 Analyse von relevanten Zellsignalproteinen mittels Western Blot

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung der gewonnenen Proteine nach ihrer molekularen Größe wird die Technik der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese genutzt. Dabei nutzt man die negative Ladung von ungefalteten Proteinen, die in einem angelegten elektrischen Feld zur Kathode wandern. Entsprechend ihrer Molekülgröße wandern kleine Proteine schneller und Große langsamer, wodurch diese auf dem Gel aufgetrennt werden können [116-118].

Die Gele wurden entsprechend der zu detektierenden Proteingröße gewählt (siehe Tabelle 12) und gegossen. Nach Entfernen des Kammes wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer gesetzt und mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Die Probetaschen wurden mit 5 µl Proteinmarker und 35 µl der Proteinproben beladen und bei 120 V konstant für 80-90 min im elektrischen Feld laufen lassen. Die Gele mit den aufgetrennten Proteinen konnten im Anschluss für den Western Blot weiterverwendet werden.

Western Blot

Um spezifische Proteine qualitativ und quantitativ zu detektieren, wird die Methode des Western Blot angewandt. Dabei werden die Proteine, die bereits nach molekularer Größe auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt sind, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und können mittels spezifisch markierter Antikörper sichtbar gemacht werden. Hierbei binden die Proteine zunächst unspezifisch an die Nitrocellulosemembran, auf der sie immobilisiert werden. Im zweiten Schritt binden monoklonale Antikörper spezifisch an die Proteine. Zum Sichtbarmachen werden Zweitantikörper genutzt, die chemilumineszent sind und wiederum spezifisch an die Erstantikörper binden. Dabei wird infolge einer chemischen Reaktion durch Meerrettich-gekoppelte-Peroxidase (HRP)-Zweitantikörper sichtbares Licht frei und kann detektiert werden [119, 116, 118, 120].

Es wurden verschiedene Ansätze auf die Proteinexpressionen von β -Catenin und NF- κ B (siehe 2.1.3.6) bei RD und RH30-Zellen gewählt. Zur Durchführung wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran mithilfe des Wet/Tank Blotting System bei konstanten 300 mA mit einer Laufzeit von 80-90 min geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran in 10 % Milchpulver mit TBS-T, für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C, überführt, um zusätzliche, freie Bindungskapazitäten der Membran zu blockieren. Mithilfe des aufgetragenen Proteinmarkers wurde die Membran entsprechend der Größe der Proteine zurechtgeschnitten. Die Erstantikörper (siehe 2.1.3.6) wurden nach Herstellerangaben in 5 % BSA mit TBS-T verdünnt und für 2 h bei RT mit den Membranstreifen inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit TBS-T für jeweils 10 min. Der HRP-Zweitantikörper (siehe 2.1.3.6) wurde entsprechend der Spezies gewählt und in 5 % Milchpulver mit TBS-T 1:3000 verdünnt und für 1 h bei RT auf dem Rollmischgerät inkubiert. Danach wurden die Membranstreifen erneut dreimal mit TBS-T für 15 min gewaschen. Mithilfe einer chemilumineszenten Lösung konnten die Banden durch die chemische Reaktion an dem Fc Odyssey Imaging System sichtbar gemacht und detektiert werden. Die Auswertung und Darstellung erfolgte mittels Fc Odyssey Imaging System und Excel.

2.2.11 Analyse der CUR-Aufnahme in RMS-Zellen mithilfe des Immunfluoreszenzmikroskops

Durch die unspezifische Eigenfluoreszenz von CUR, vor allem in Wellenlängenbereichen um die 420 nm, lässt sich die CUR-Aufnahme in die Zelle darstellen [109]. Zur Anfärbung der Zellkerne wird ein DNA-bindender Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) genutzt, der bereits in der Fixierlösung enthalten ist [121, 122]. Mittels eines Immunfluoreszenzmikroskopes (ApoTome) und dessen hochauflösender Kamera können fluoreszierende Farbstoffe unterschiedlicher Emissionen detektiert und spezifische Strukturen einer Zelle sichtbar gemacht werden [123].

Zur Durchführung wurden RH30-Zellen mit einer Zellzahl von 3×10^4 Zellen in einem x-Well Zellkulturkammer-Objektträger mit vier Kammern angelegt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden für 1 bzw. 48 h mit CUR behandelt und nach Ablauf der Behandlungsdauer fixiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 15 min bei RT mit kaltem, 4-prozentigem Paraformaldehyd inkubiert, wodurch die zellulären Strukturen durch Denaturierung fixiert wurden. Mit dem Eindeckmittel (Prolong Gold Antifade reagent with DAPI) und einem Deckglas wurde die Zelllösung luftblasenfrei eingedeckelt. Die Zellen konnten mittels Immunfluoreszenzmikroskop mit einem 25x, 40x und 63x Objektiv mit den Farbfiltern FITC und DAPI und entsprechender Belichtungszeit (siehe Tabelle 21) betrachtet und mittels hochauflösender Kamera festgehalten werden.

Die Darstellung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit dem Programm AxioVision.

Tabelle 21: verwendete Farbfilter und Belichtungszeit in der Immunfluoreszenz-Messung

Farbfilter	Belichtungszeit (ms)
DAPI	246
FITC	1472

2.2.12 Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm Graphpad Prism Version 7.20. Alle Daten wurden zu Beginn normalisiert.

Zur Varianzanalyse wurden beim Colony-forming Assay sowie den Einzelbehandlungen des Apoptose-Assay in der Durchflusszytometrie der *one-way* ANOVA genutzt. Bei dem Viabilitäts-Assay, dem Wound Healing Assay, der Untersuchung des Influx/Efflux und den Kombinationsbehandlungen im Apoptose-Assay wurde hingegen der *two-way* ANOVA verwendet.

Als Post-hoc Mehrfachvergleich diente der Dunnett (*one-way* ANOVA)- bzw. Tukey (*two-way* ANOVA)-Spannweitentest.

Die IC50-Bestimmung geschah mittels nicht-linearer Regressionsanalyse über eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve in Graphpad Prism Berechnet wurde bei der Behandlung mit einer Substanz zur akkuraten Darstellung der absolute IC50. Bei Kombinationsbehandlungen und der Resistenzprüfung wurden hingegen die relativen IC50-Werte ermittelt.

Die Signifikanzen ($p < 0,05$ $n \geq 3$) sind in den Graphen jeweils als * dargestellt (Details siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Bedeutung der p-Wert-Formate als * in den Graphen

Symbol	*	**	***	****
Bedeutung	$p > 0,05$	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,0001$

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Zellviabilität (Bestimmung des IC50) von RMS- und SKMC-Zellen nach CUR- und/oder Zytostatikagabe

3.1.1 Analyse des Effektes von CUR auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

Zur genaueren Untersuchung der zytotoxischen Effekte von CUR sowie zur IC50-Bestimmung wurden zunächst Viabilitäts-Assays mit RMS-Zellen (siehe 2.2.4) durchgeführt. Hierfür wurden exemplarisch sowohl eRMS-Zelllinien (RD, SRH) als auch die aRMS-Zelllinie RH30 bezüglich ihrer Viabilität unter CUR-Behandlung untersucht. Der Versuch wurde mit einer Behandlungsdauer von 24, 48 oder 72 h durchgeführt.

Bei der Zelllinie RH30 zeigten sich gleichwertig bei den Behandlungszeitpunkten von 48 und 72 h die niedrigsten IC50-Werte, während die Zelllinie SRH gegenüber den anderen Zelllinien deutlich höhere CUR-Konzentrationen benötigte, um die Viabilität auf die Hälfte zu senken (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Liste der IC50-Werte bei RMS-Zellen unter CUR-Behandlung für 48 und 72 h

IC50	48 h CUR	72 h CUR
<i>RH30</i>	6,070 µg/ml (≈16,477 µM)	5,270 µg/ml (≈14,306 µM)
<i>RD</i>	7,761 µg/ml (≈21,067 µM)	6,120 µg/ml (≈16,613 µM)
<i>SRH</i>	9,593 µg/ml (≈26,040 µM)	9,354 µg/ml (≈25,392 µM)

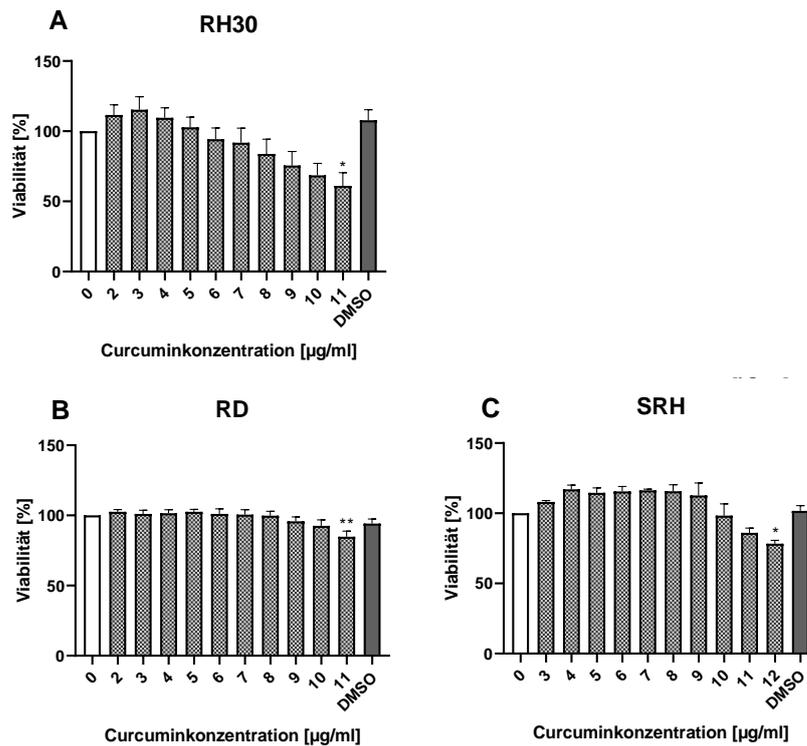


Abbildung 16: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter CUR-Behandlung für 24 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender CUR-Konzentration bei einer Behandlungsdauer von 24 h bei aRMS (A: RH30)- und eRMS (B: RD, C: SRH)-Zellen. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, ergab sich bei den eRMS-Zelllinien nach 24-stündiger Behandlungsdauer erst bei CUR-Konzentrationen von 11 $\mu\text{g/ml}$ (RD) bzw. 12 $\mu\text{g/ml}$ (SRH) eine signifikante Reduktion der Viabilität. Bei der aRMS-Zelllinie RH30 zeigte sich eine signifikante Abnahme bei 11 $\mu\text{g/ml}$ CUR. Vergleicht man die einzelnen Behandlungszeiträume untereinander, lassen sich bei allen Zelllinien signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsdauern von 24 h und 48 h mit zytotoxischen Effekten bei bereits geringeren CUR-Konzentrationen darstellen.

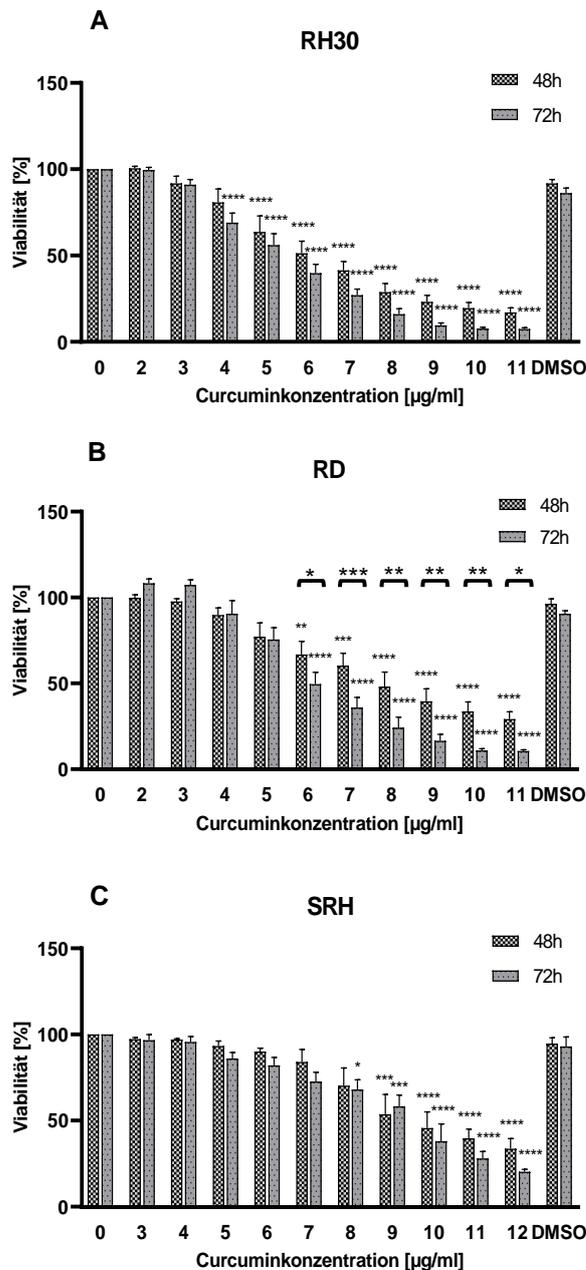


Abbildung 17: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter CUR-Behandlung für 48 und 72 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender CUR-Konzentration bei den RMS-Zelllinien RH30 (A), RD (B) und SRH (C). Zum Vergleich ist die Behandlungsdauer 48 h vs. 72 h abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Bei der aRMS-Zelllinie RH30 (Abbildung 17, A) präsentierte sich nach 48-stündiger CUR-Behandlung eine signifikante Abnahme der Zellviabilität um mehr als die Hälfte ab einer CUR-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$. Bei den eRMS-Zelllinien RD und SRH (Abbildung 17, B und C) bestanden deutliche interzelluläre Unter-

schiede der zytotoxischen Effekte nach einer CUR-Behandlung von 48 h. Während die Viabilität der RD-Zellen eine frühe signifikante Abnahme ab 6 µg/ml CUR aufwies, nahm sie bei SRH-Zellen erst ab 9 µg/ml CUR signifikant ab. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Messung der Viabilität von RMS-Zellen nach 72-stündiger CUR-Behandlung. Es resultierte eine signifikante Abnahme der Viabilität bei RH30 ab 4 µg/ml CUR-Konzentration. Die eRMS-Zelllinie RD zeigte auch nach 72 h Behandlungsdauer eine signifikante Abnahme der Zellviabilität ab 6 µg/ml CUR und die Reduktion der Viabilität war bei den SRH-Zellen ab 8 µg/ml CUR signifikant. Beim Vergleich von 48 und 72 h Behandlungszeit zeigten sich nur für die Zelllinie RD signifikante Unterschiede bei der längeren Behandlungsdauer ab 6 µg/ml CUR-Behandlung.

Zusammenfassend präsentierte sich bei den eRMS und aRMS-Zelllinien eine signifikante Abnahme der Zellviabilität unter CUR-Behandlung. Dieser Effekt war weitgehend unabhängig von der Behandlungsdauer, solange diese mindestens 48 h betrug, und signifikant abhängig von der CUR-Konzentration. Die zytotoxische Wirkung von CUR war am stärksten ausgeprägt bei den RH30-Zellen und am schwächsten bei der Zelllinie SRH.

3.1.2 Analyse des Effektes von CUR auf die Viabilität von SKMC-Zellen

Um herauszufinden, ob die Zytotoxizität von CUR auch gesundes Skelettmuskelgewebe angreifen würde, wurde die Viabilität zu den gleichen Bedingungen wie in 2.2.4 beschrieben bei Skelettmuskelzellen untersucht.

In der IC₅₀-Konzentration von CUR, ließ sich bei SKMC-Zellen kein vergleichbarer zytotoxischer Effekt wie bei RMS-Zellen nachweisen. Um dieselbe Zytotoxizität wie bei RMS-Zellen zu erreichen, wurde bei SKMC-Zellen fast die doppelte CUR-Konzentration benötigt (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Liste der IC₅₀-Werte bei SKMC-Zellen unter CUR-Behandlung für 48 und 72 h

IC₅₀	48 h CUR	72 h CUR
<i>SKMC</i>	9,651 µg/ml (≈26,198 µM)	9,396 µg/ml (≈25,506 µM)

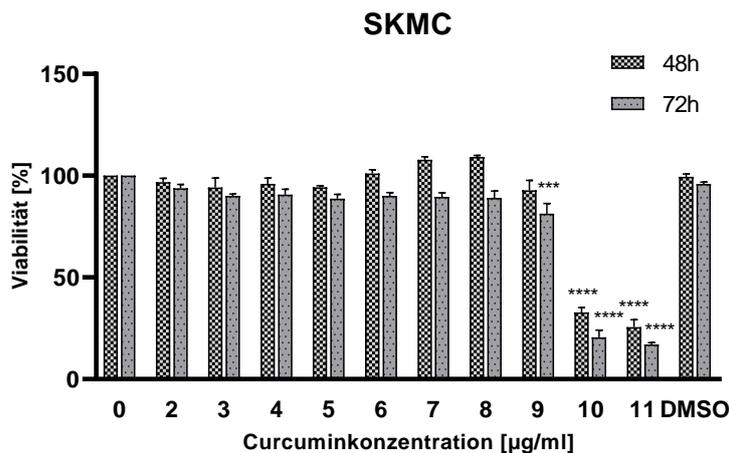


Abbildung 18: Viabilitäts-Assay bei SKMC-Zellen unter CUR-Behandlung für 48 und 72 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender CUR-Konzentration bei SKMC-Zellen. Zum Vergleich ist die Behandlungsdauer 48 h vs. 72 h abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigte sich erst bei sehr hohen Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ bei 48 h und 9 $\mu\text{g/ml}$ bei 72 h Behandlungszeit eine signifikante Abnahme der Zellviabilität.

Zusammenfassend ergab sich eine deutlich geringere Abnahme der Zellviabilität bei SKMC-Zellen im Vergleich zu RMS-Zellen erst unter hohen CUR-Konzentrationen von $> 9 \mu\text{g/ml}$ CUR.

3.1.3 Analyse des Effektes von Zytostatika auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

3.1.3.1 Analyse der Behandlung mit VCR auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

Da VCR als Standardchemotherapeutikum bei Kindern mit RMS eingesetzt wird, war es von besonderem Interesse die Wirkung von VCR bei RMS-Zellen *in vitro* zu bestätigen und insbesondere den Effekt einer Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR zu untersuchen. Zwei eRMS-Zelllinien (RD, SRH) und die aRMS-Zelllinie (RH30) wurden mit steigenden VCR-Konzentrationen für 24, 48 und 72 h behandelt und der IC50-Wert bestimmt.

Auch in dieser Untersuchung (siehe Tabelle 25) zeigte die Zelllinie RH30 bei beiden Behandlungszeitpunkten (48 und 72 h) die niedrigsten IC50-Werte und die

Zelllinie SRH benötigte deutlich höhere VCR-Konzentrationen zur Senkung der Viabilität bei einer Behandlungszeit von 72 h. Für die Behandlungsdauer von 48 h konnte bei den SRH-Zellen der IC50-Wert nicht bestimmt werden, da versuchsbedingt die Zellviabilität nie unter 50 % sank.

Tabelle 25: Liste der IC50-Werte bei RMS-Zellen unter VCR-Behandlung für 48 und 72 h

IC50	48 h VCR	72 h VCR
RH30	0,00119 µg/ml (≈1,443 nM)	0,00085 µg/ml (≈1,030 nM)
RD	0,00311 µg/ml (≈3,770 nM)	0,00162 µg/ml (≈1,964 nM)
SRH	-	0,01135 µg/ml (≈13,758 nM)

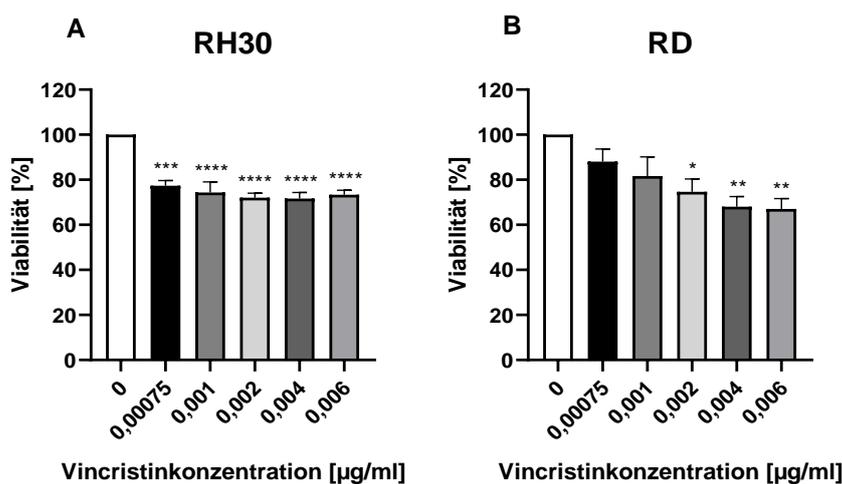


Abbildung 19: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter VCR-Behandlung für 24 h

Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender VCR-Konzentration bei einer Behandlungsdauer von 24 h bei aRMS (A: RH30)- und eRMS (B: RD)-Zellen. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 19 dargestellt, zeigte sich bei der Zelllinie RD erst bei 0,002 µg/ml VCR ein signifikanter Unterschied nach VCR-Behandlung von 24 h. Bei den RH30-Zellen nahm die Viabilität deutlich früher bereits bei 0,00075 µg/ml VCR signifikant ab. Vergleicht man die einzelnen Behandlungszeiträume untereinander, lassen sich bei beiden Zelllinien signifikante Unterschiede bei längerer Behandlungszeit darstellen. Die Zelllinie SRH wurde in dieser Versuchsreihe nicht untersucht.

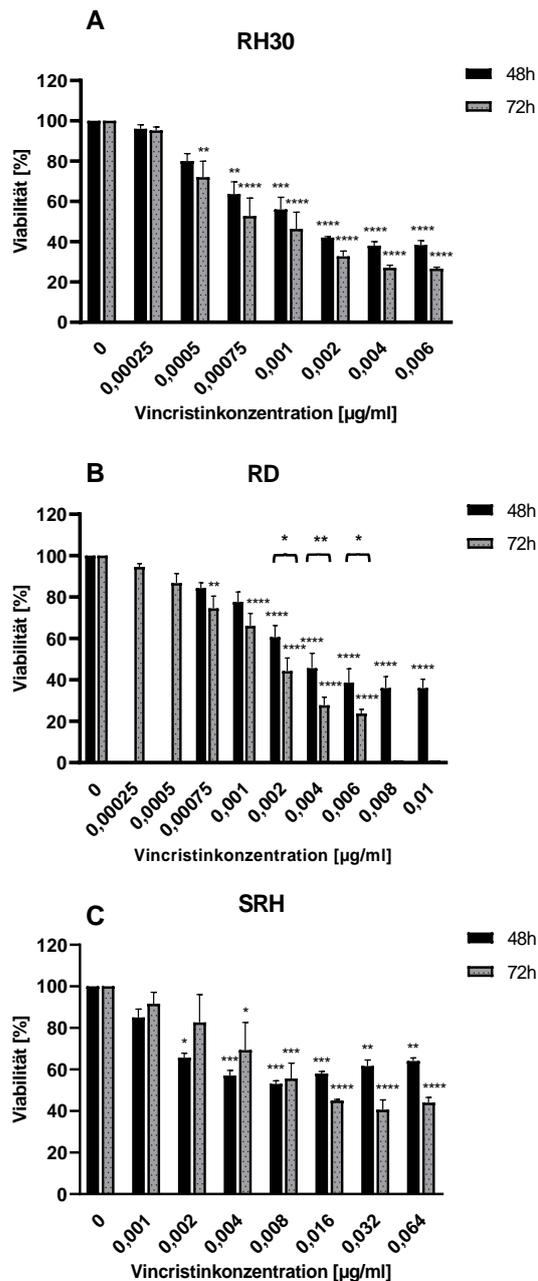


Abbildung 20: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter VCR-Behandlung für 48 und 72h

Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender VCR-Konzentration bei den RMS-Zelllinien RH30 (A), RD (B) und SRH (C). Zum Vergleich ist die Behandlungsdauer 48 h (schwarz) vs. 72 h (grau) abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, waren die Ergebnisse nach VCR-Behandlung über 48 h bei allen Zelllinien (RH30, RD und SRH) innerhalb ihrer histologischen Gruppe konstant. So ließ sich bei der aRMS-Zelllinie RH30 (A) eine frühe signifikante Abnahme der Zellviabilität ab 0,00075 µg/ml VCR nachweisen. Die eRMS-Zelllinien (B: RD, C: SRH) hingegen zeigten einen signifikanten zytotoxischen

Effekt ab 0,002 µg/ml VCR. Tendenziell niedrigere Konzentrationen – im Vergleich zur kürzeren Behandlungsdauer – wurden bei der Messung der Viabilität von RMS-Zellen nach 72-stündiger VCR-Behandlung benötigt. Die aRMS-Zelllinien zeigten nach einer Behandlungsdauer von 72 h bereits ab einer VCR-Konzentration von 0,0005 µg/ml eine signifikante Abnahme der Zellviabilität um ca. 30 %. Bei den eRMS-Zelllinien ließ sich ein signifikant zytotoxischer Effekt ab 0,00075 µg/ml VCR bei RD-Zellen und ab 0,004 µg/ml VCR bei SRH-Zellen nachweisen. Beim Vergleich von 48 h und 72 h Behandlungszeit zeigten nur RD-Zellen signifikante Unterschiede.

Zusammenfassend präsentierten sich bei der VCR-Behandlung von RMS-Zellen Unterschiede vor allem zwischen aRMS und eRMS-Zellen. Die RH30-Zellen reagierten besonders sensitiv auf die Behandlung, während die eRMS-Zellen, insbesondere die SRH-Zellen, höhere Konzentrationen zur Viabilitätsreduktion benötigten. Neben den konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekten, konnten bei der Zelllinie RD auch zeitabhängige Effekte aufgezeigt werden. Gegenüber der Behandlungszeit von 24 h ergab sich bei den beiden Zelllinien RD und RH30 ein Vorteil durch längere Behandlungsdauer.

3.1.3.2 Analyse der Behandlung mit DAC auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

Als weiteres Standardchemotherapeutikum in der Behandlung beim RMS wird DAC – in Kombination mit VCR und Cyclophosphamid – verwendet. Um eine möglichst große Bandbreite der Standardtherapie *in vitro* zu untersuchen, wurde der in 2.2.4 beschriebene Viabilitäts-Assay ebenfalls mit DAC bei den drei RMS-Zelllinien (RH30, RD, SRH) für 48 h und 72 h durchgeführt.

Auffällig war bei der Betrachtung der IC₅₀-Werte (siehe Tabelle 26) bezüglich der eRMS-Zelllinie RD, dass diese Zellen – im Gegensatz zu den anderen – bei

längerer Behandlungsdauer höhere Konzentrationen DAC für denselben zytotoxischen Effekt benötigten. Bei den Zelllinien RH30 und SRH zeigte die DAC-Behandlung sinkende inhibitorische Konzentrationen bei längerer Behandlungszeit.

Tabelle 26: Liste der IC50-Werte bei RMS-Zellen unter DAC-Behandlung für 48 h und 72 h

IC50	48 h DAC	72 h DAC
<i>RH30</i>	0,00801 µg/ml (≈6,380 nM)	0,00236 µg/ml (≈1,880 nM)
<i>RD</i>	0,00408 µg/ml (≈3,250 nM)	0,00688 µg/ml (≈5,480 nM)
<i>SRH</i>	0,00806 µg/ml (≈6,420 nM)	0,00487 µg/ml (≈3,879 nM)

Wie in Abbildung 21 dargestellt, sank die Viabilität der aRMS Zelllinie RH30 (A) signifikant bei sehr niedrigen Konzentrationen – bereits ab 0,0005 µg/ml DAC – auf ca. 85 % ab. Bei den eRMS-Zelllinien RD und SRH (B und C) stellten sich nach einer Behandlungsdauer von 48 h erst bei einer höheren Konzentration von 0,001 µg/ml DAC signifikante zytotoxische Effekte ein. Unter DAC-Behandlung für 72 h wurden bei den RH30-Zellen höhere Konzentrationen an DAC ab 0,001 µg/ml DAC als bei der kürzeren Behandlungsdauer benötigt. Anders verhielt es sich bei den eRMS-Zelllinien, wobei die SRH-Zellen schon ab 0,0005 µg/ml DAC signifikante zytotoxische Effekte zeigten. Die Zelllinie RD benötigte hingegen bei dieser Behandlungsdauer die höchste DAC-Konzentration von 0,002 µg/ml. Im Vergleich der beiden Behandlungszeiträume zeigte sich vor allem bei der aRMS-Zelllinie RH30 ein signifikanter Vorteil der längeren Behandlungsdauer ab einer Konzentration > 0,002 µg/ml DAC. Vereinzelt trat dieser Effekt auch bei den RD und SRH-Zellen auf.

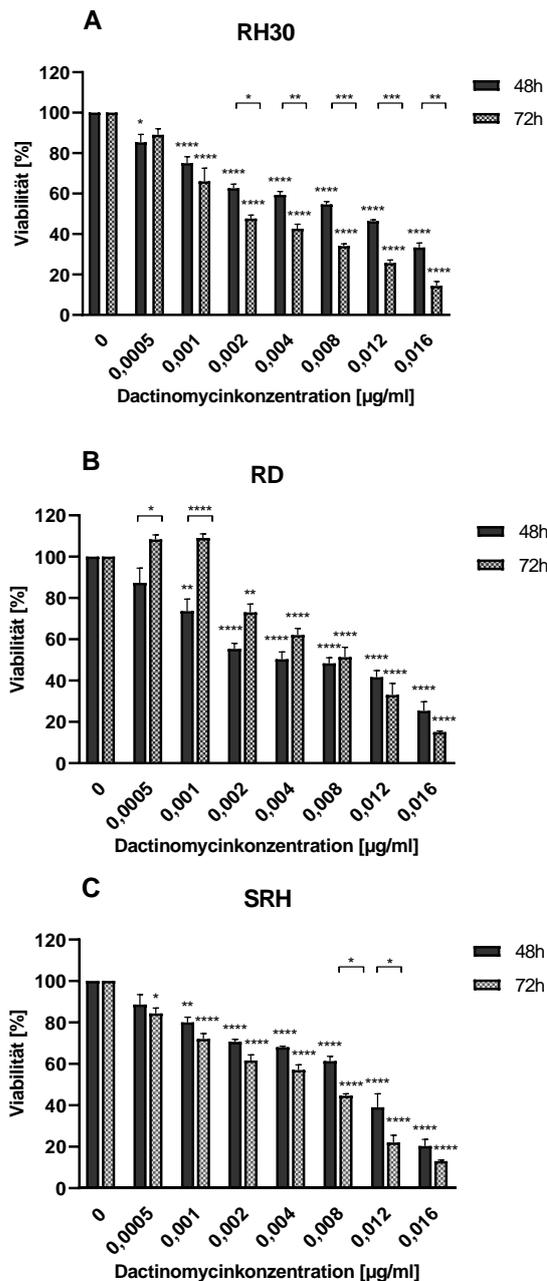


Abbildung 21: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter DAC-Behandlung für 48 h und 72 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender DAC-Konzentration bei den RMS-Zelllinien RH30 (A), RD (B) und SRH (C). Zum Vergleich ist die Behandlungsdauer 48 h (schwarz) vs. 72 h (grau) abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Zusammenfassend reagierten die eRMS-Zelllinien weniger sensitiv auf die Zytostatikabehandlung mit DAC als die aRMS-Zelllinie. Allerdings benötigten die SRH-Zellen bei dieser Behandlung niedrigere Konzentrationen als die RD-Zellen. Mehr Homogenität zeigte hier die aRMS-Zelllinie RH30, die zudem signifikante, zeitabhängige Effekte bei höheren DAC-Konzentrationen aufwies.

3.1.4 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und Zytostatika auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

In den vorherigen Kapiteln konnten die zytotoxischen Effekte von CUR, VCR und DAC als Einzelbehandlung nachgewiesen und deren IC₅₀-Wert bestimmt werden. Für den möglichen, klinischen Einsatz von CUR war es nun besonders relevant herauszufinden, ob CUR additive Effekte zu bereits etablierten zytostatischen Behandlungen zeigt. Dies könnte ermöglichen, dass niedrigere Konzentrationen an Zytostatika verabreicht und toxische Nebenwirkungen vermieden werden könnten.

3.1.4.1 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

Zur Überprüfung der Effektivität einer Kombinationsbehandlung von CUR mit dem Standardzytostatikum VCR wurden die o. g. RMS-Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an CUR und VCR für 48 h und 72 h behandelt. Die gewählten Konzentrationen entsprachen dabei den Ergebnissen der Behandlungen mit CUR und VCR (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.3). Als Kontrolle bezeichnet ist die alleinige Behandlung mit Curcumin.

Beim Vergleich der IC₅₀-Konzentrationen (siehe Tabelle 27) stellte sich unter Kombinationsbehandlung mit VCR für 48 h bei den Zelllinien RH30 und RD eine deutliche Abnahme der notwendigen IC₅₀-Konzentration an CUR dar. Geringere Effekte zeigten sich bei der Zelllinie SRH. Hier sank der IC₅₀-Wert nur um 0,6 µg/ml.

Tabelle 27: Liste der IC₅₀-Werte bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR für 48 h

Dargestellt sind die IC₅₀-Werte von CUR bei aRMS (RH30)- und eRMS (RD, SRH)-Zellen bei der Kontrolle (Behandlung mit CUR) und der kombinierten Inkubation mit VCR für 48 h.

IC₅₀	CUR	CUR + VCR
<i>RH30</i>	5,391 µg/ml (≈14,633 µM)	3,529 µg/ml (≈9,579 µM)
<i>SRH</i>	7,218 µg/ml (≈19,595 µM)	6,605 µg/ml (≈17,928 µM)
<i>RD</i>	5,830 µg/ml (≈15,826 µM)	3,620 µg/ml (≈9,827 µM)

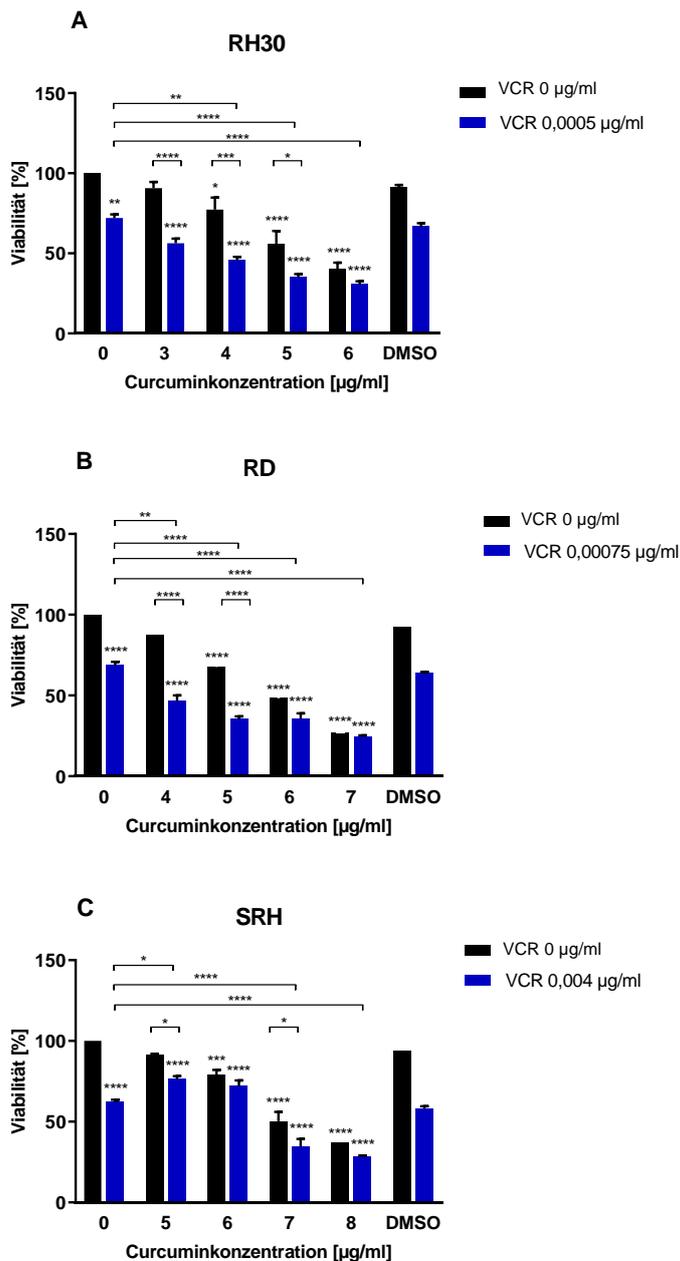


Abbildung 22: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender CUR-Konzentration mit VCR bei den RMS-Zelllinien RH30 (A), RD (B) und SRH (C) für eine Behandlungsdauer von 48 h. Zum Vergleich ist die Kontrolle mit CUR (schwarz) und die Kombinationsbehandlung (blau) abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 22 dargestellt, zeigten sich bei der aRMS-Zelllinie RH30 (A) nach einer Behandlungsdauer von 48 h sowohl signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Behandlung mit VCR als auch überwiegend zu der Behandlung mit CUR. Dabei ergaben sich signifikante Ergebnisse schon bei der Inkubation der

Zellen mit VCR und niedrigen CUR-Konzentrationen (3 µg/ml), welche zu einer Reduktion der Viabilität um mehr als 30 % führten. Bei den eRMS-Zelllinien RD (B) und SRH (C) zeigten sich nach einer Behandlungsdauer von 48 h signifikante Unterschiede im Vergleich zu einer Behandlung mit VCR sowie teilweise im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit CUR alleine. Eine signifikante Reduktion der Zellviabilität gegenüber der Behandlung mit CUR war bei der SRH Zelllinie nur bei der Kombination von VCR mit 5 oder 7 µg/ml CUR zu sehen und bei den RD-Zellen nur bei Applikation der beiden niedrigen CUR-Konzentrationen (4 und 5 µg/ml).

Beim Vergleich der IC50-Konzentrationen nach 72 Behandlungsdauer (siehe Tabelle 28) zeigte sich besonders bei den Zelllinien RH30 und RD eine deutliche Abnahme der IC50-Werte bei einer Kombinationsbehandlung mit VCR und unterschied sich dabei wenig von der kürzeren Behandlungszeit von 48 h. Im Vergleich zur 48-stündigen Inkubationsdauer stellte sich hier bei den SRH-Zellen kaum ein Unterschied zwischen Einfach- und Kombinationsbehandlung (<0,4 µg/ml) dar.

Tabelle 28: Liste der IC50-Werte bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR für 72 h

Dargestellt sind die IC50-Werte von CUR bei aRMS (RH30)- und eRMS (RD, SRH)-Zellen bei der Kontrolle (Behandlung mit CUR) und der kombinierten Inkubation mit VCR für 72 h.

IC50	CUR	CUR + VCR
<i>RH30</i>	5,183 µg/ml (≈14,071 µM)	3,373 µg/ml (≈9,155 µM)
<i>SRH</i>	8,222 µg/ml (≈22,318 µM)	7,857 µg/ml (≈21,328 µM)
<i>RD</i>	6,637 µg/ml (≈16,287 µM)	4,663 µg/ml (≈12,658 µM)

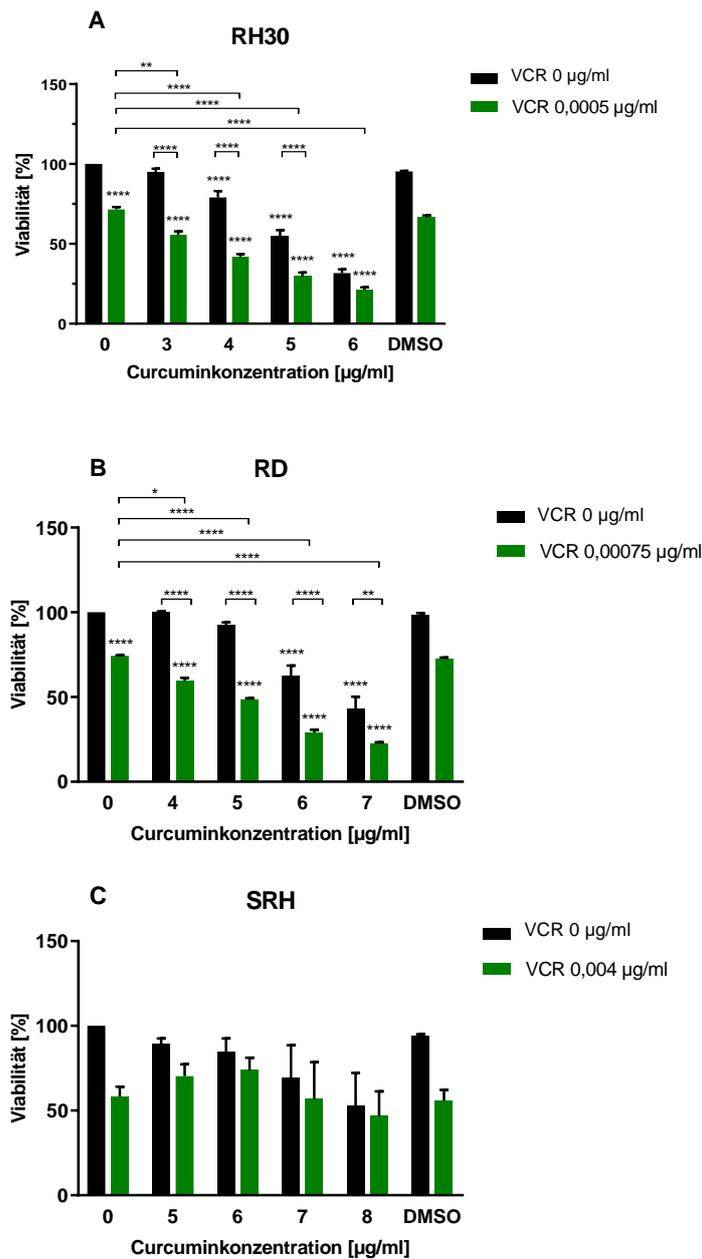


Abbildung 23: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR für 72 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender CUR-Konzentration mit VCR bei den RMS-Zelllinien RH30 (A), RD (B) und SRH (C) für eine Behandlungsdauer von 72 h. Zum Vergleich ist die Kontrolle mit CUR (schwarz) und die Kombinationsbehandlung (grün) abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Unter Kombinationsbehandlung von CUR und VCR für 72 h (siehe Abbildung 23), ergab sich bei den RH30-Zellen (A) schon bei der niedrigsten CUR-Konzentration (3 µg/ml) ein signifikanter Vorteil gegenüber der alleinigen Gabe von CUR oder VCR, wodurch sich die Viabilität auf 56 % senken ließ (vs. 95 % bei der Kontrolle

mit 3 µg/ml CUR alleine). Bei den eRMS-Zellen präsentierten sich für die Zelllinie RD (B) dosisabhängige, signifikante Ergebnisse der Kombinationsbehandlung gegenüber der alleinigen Gabe von CUR während die Zelllinie SRH (C) keinen signifikanten Vorteil der Kombinationsbehandlung aufwies. Bei der Zelllinie RD konnte schon bei der Kombination von VCR 0,00075 µg/ml mit der geringsten CUR-Konzentration (4 µg/ml) eine signifikante Reduktion der Viabilität gegenüber den Behandlungen mit CUR oder VCR alleine um 40 % aufgezeigt werden.

Zusammengefasst gab es zwischen der Behandlung mit VCR und der Kombination mit CUR und VCR einen signifikant stärkeren zytotoxischen Effekt bei allen Zelllinien bei der Kombinationsbehandlung über 48 h. Dieser konnte bei der Zelllinie RH30 durch eine längere Behandlungsdauer sogar noch gesteigert werden. Vergleicht man den Vorteil der Kombinationsbehandlung gegenüber einer Behandlung mit CUR alleine, so lassen sich hier ebenfalls stärkere zytotoxische Effekte signifikant nachweisen, wenn auch weniger ausgeprägt als im Vergleich zur Behandlung mit VCR. Dies galt insbesondere für die Zelllinien RH30 und RD bei der längeren Behandlungsdauer, aber nicht für die Zelllinie SRH. Bei der Betrachtung der IC50-Werte, spiegelten sich diese Ergebnisse anhand einer deutlichen Minimierung der Werte unter Kombinationsbehandlung bei allen Zelllinien wider.

3.1.4.2 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

Analog zur Kombinationsbehandlung mit VCR wurde die Kombination mit CUR und DAC für 48 h und 72 h untersucht. Zwar wird DAC in der Klinik häufiger in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt, jedoch konnten auch in der Einzelbehandlung (siehe 3.1.3) signifikante Effekte auf die Zytotoxizität bei RMS-Zelllinien nachgewiesen werden. Dadurch wurde eine Testung der Effektivität einer Kombinationsbehandlung relevant. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen auch hier den Ergebnissen der Behandlungen mit CUR und DAC (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.3). Als Kontrolle bezeichnet ist die alleinige Behandlung mit Curcumin.

Beleuchtet man gezielt die IC50-Konzentrationen von CUR der drei Zelllinien RH30, RD und SRH bei der Kombinationsbehandlung über 48 h (siehe Tabelle

29) stellte sich – besonders im Vergleich zur Kombination mit der höheren DAC-Konzentration – ein deutlicher Unterschied bei allen Zellreihen dar. Generell niedrige IC50-Werte (< 6 µg/ml) ließen sich bei den RH30-Zellen darstellen. Zwar wurden bei den SRH-Zellen höhere Konzentrationen zur Reduktion der Zellviabilität benötigt, allerdings zeigte sich auch für diese Zelllinie eine Absenkung des IC50-Wertes um 1,2 bzw. 1,9 µg/ml durch die Kombination mit DAC.

Tabelle 29: Liste der IC50-Werte bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC für 48 h

Dargestellt sind die IC50-Werte von CUR bei aRMS (RH30)- und eRMS (RD, SRH)-Zellen bei der Kontrolle (CUR) und der kombinierten Inkubation mit CUR und einer niedrigen (DAC I) bzw. einer höheren (DAC II) Konzentration DAC für 48 h.

IC50	CUR	CUR + DAC I	CUR + DAC II
<i>RH30</i>	5,991 µg/ml (≈16,263 µM)	5,181 µg/ml (≈14,064 µM)	4,623 µg/ml (≈10,858 µM)
<i>SRH</i>	7,644 µg/ml (≈19,002 µM)	6,437 µg/ml (≈16,287 µM)	5,713 µg/ml (≈13,573 µM)
<i>RD</i>	6,248 µg/ml (≈16,287 µM)	6,022 µg/ml (≈16,287 µM)	5,423 µg/ml (≈13,573 µM)

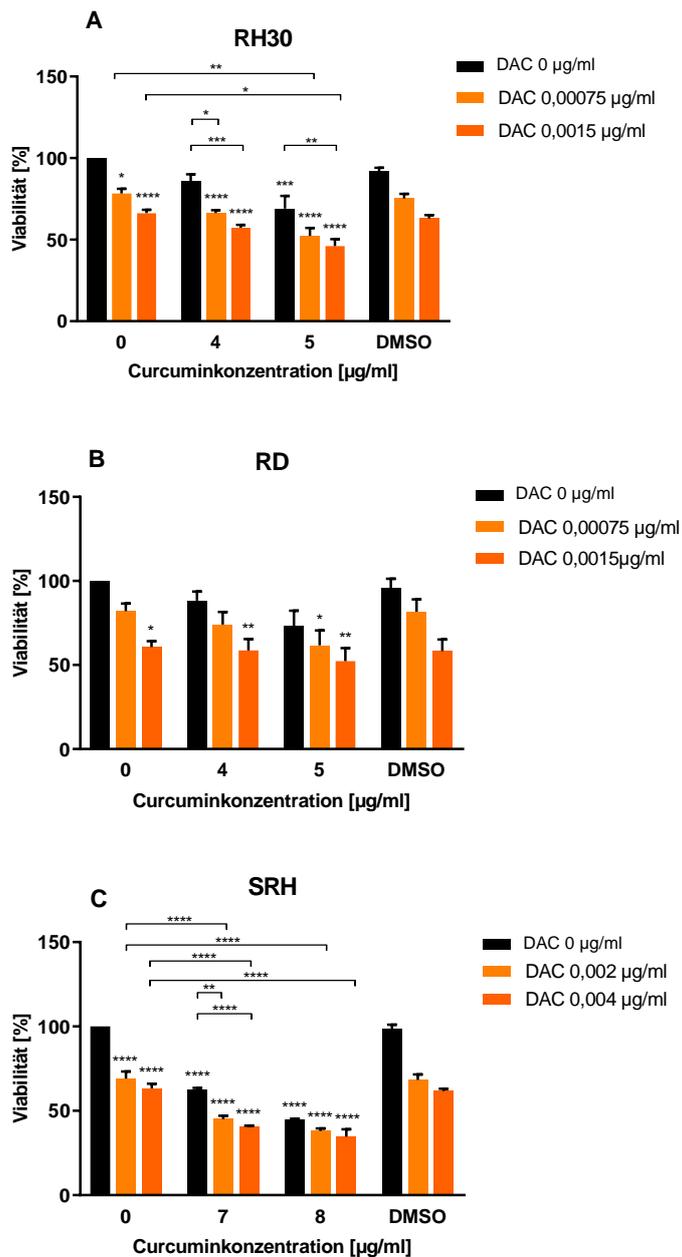


Abbildung 24: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigenden CUR- und DAC-Konzentrationen bei den RMS-Zelllinien RH30 (A), RD (B) und SRH (C) für eine Behandlungsdauer von 48 h. Zum Vergleich ist die Kontrolle mit CUR (schwarz) und die Kombinationsbehandlung mit CUR und zwei verschiedenen DAC-Konzentrationen (orange) abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, erwies sich die Kombinationsbehandlung bei der aRMS-Zelllinie RH30 (A) nach einer Behandlungsdauer von 48 h als signifikant

im Vergleich zur Behandlung mit DAC bzw. CUR alleine. Vergleich man die Kombination aus CUR und DAC mit der DAC-Einzelbehandlung, so zeigte die Kombinationsbehandlung mit 5 µg/ml CUR eine stärkere Viabilitätsabnahme. Bei der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu der Behandlung mit CUR alleine führten bereits 4 µg/ml CUR – bei beiden DAC-Konzentrationen – zu einer signifikant stärkeren Zytotoxizität (66 % und 57 % vs. 85 % Viabilitätsabnahme). Betrachtet man die Kombination von CUR mit DAC bei den eRMS-Zellen RD und SRH (B und C), so zeigten sich bei der Behandlungsdauer von 48 h nur bei der Zelllinie SRH stärkere zytotoxische Effekte. Diese waren sowohl gegenüber der jeweiligen DAC-Behandlung als auch der Behandlung mit 7 µg/ml CUR signifikant überlegen. Für die Zelllinie RD hingegen konnte bei einer 48-stündigen Inkubation lediglich nachgewiesen werden, dass die höherdosierte Kombinationsbehandlung einen signifikanten zytotoxischen Effekt gegenüber der Nullkontrolle, mit einer Abnahme der Zellviabilität auf 61 %, hatte.

Bei der längeren Behandlungsdauer von 72 h (siehe Tabelle 30) zeigten vor allem die RD-Zellen niedrige IC₅₀-Werte (<5,5 µg/ml), die sich durch die Kombination mit der höheren DAC-Konzentration um ca. 1,6 µg/ml senken ließen. Bei den Zelllinien RH30 und SRH wurden bei der Kontrolle hohe IC₅₀-Konzentrationen von ca. 7,5 und 8,2 µg/ml CUR benötigt, welche jedoch durch die Kombination mit DAC stark abnahmen. Besonders ausgeprägt war dies bei den SRH-Zellen und der höher dosierten Kombinationsbehandlung zu sehen (Senkung um 4,3 µg/ml). Der IC₅₀-Wert der niedrig konzentrierten DAC-Behandlung bei den SRH-Zellen ließ sich nicht bestimmen.

Tabelle 30: Liste der IC₅₀-Werte bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC für 72 h

Dargestellt sind die IC₅₀-Werte von CUR bei aRMS (RH30)- und eRMS (RD, SRH)-Zellen bei der Kontrolle (CUR) und der kombinierten Inkubation mit CUR und einer niedrigen (DAC I) bzw. einer höheren (DAC II) Konzentration DAC für 72 h. n. b. = nicht bestimmbar.

IC₅₀	CUR	CUR + DAC I	CUR + DAC II
<i>RH30</i>	7,523 µg/ml (≈19,002 µM)	5,916 µg/ml (≈13,573 µM)	4,000 µg/ml (≈10,858 µM)

<i>SRH</i>	8,190 µg/ml (≈21,716 µM)	n. b.	3,882 µg/ml (≈8,144 µM)
<i>RD</i>	5,419 µg/ml (≈14,710 µM)	5,228 µg/ml (≈13,573 µM)	3,826 µg/ml (≈8,144 µM)

In der Analyse von RH30-Zellen (A) bei der Kombinationsbehandlung von CUR und DAC für 72 h, wie in Abbildung 25 dargestellt, präsentierte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Diese war zwar gegenüber der Behandlung mit CUR bei beiden Kombinationen mit CUR und DAC signifikant überlegen, nicht jedoch gegenüber der Behandlung mit DAC. Bei der Behandlungsdauer von 72 h mit der Kombination von CUR und DAC zeigte sich bei der eRMS-Zelllinie RD (B) die Kombinationsbehandlung gegenüber den Behandlungen mit CUR oder DAC alleine signifikant. Für die SRH-Zellen (C) konnte nur der Vorteil der Kombination aus CUR und DAC als signifikant gegenüber der Behandlung mit CUR nachgewiesen werden. Außerdem konnten, im Vergleich zur kürzeren Behandlungsdauer von 48 h, niedrigere CUR-Konzentrationen genutzt werden.

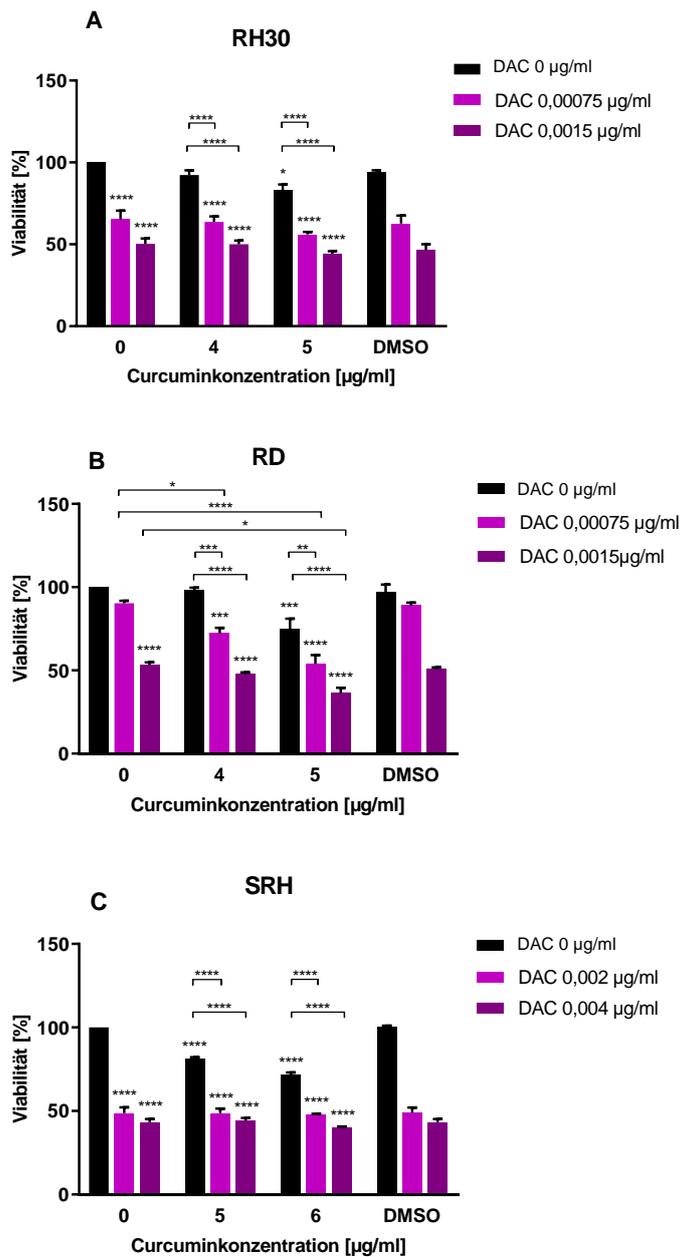


Abbildung 25: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC für 72 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigenden CUR- und DAC-Konzentrationen bei den RMS-Zelllinien RH30 (A), RD (B) und SRH (C) für eine Behandlungsdauer von 72 h. Zum Vergleich ist die Kontrolle mit CUR (schwarz) und die Kombinationsbehandlung mit CUR und zwei verschiedenen DAC-Konzentrationen (lila) abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Zusammenfassend zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC bei allen Zelllinien eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur alleinigen CUR-Behandlung. Bei den Zelllinien

RH30 und SRH zeigte die kombinierte Behandlung zudem Vorteile – im Sinne einer gesteigerten Viabilitätsabnahme – gegenüber der alleinigen Behandlung mit DAC und zeitabhängige Vorteile gegenüber der alleinigen Behandlung mit CUR bei längerer Behandlungsdauer. Bei der 72-stündigen Kombinationsbehandlung von RD-Zellen mit CUR und DAC zeigte sich ein signifikanter Vorteil sowohl gegenüber der DAC- als auch der CUR-Behandlung. Dies bildete sich auch beim Vergleich der IC50-Werte ab. Den stärksten Effekt zur Senkung der IC50-Konzentrationen durch die höher dosierte Kombination mit CUR und DAC hatte dabei die Zelllinie SRH.

3.1.5 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und PDT auf die Viabilität von RMS-Zelllinien

Da CUR, wie in 1.2 beschrieben, eine photoaktive Substanz ist und durch die Bestrahlung mit blauem Licht aktiviert werden kann, wurde dies mittels Viabilitäts-Assay an den RMS-Zellen RH30 (aRMS) und RD (eRMS) untersucht. Dabei wurden die Zellen, wie in 2.2.4 beschrieben, behandelt und analysiert. Als Kontrolle bezeichnet ist die alleinige Behandlung mit Curcumin.

Die Gegenüberstellung der IC50-Werte der Behandlung mit CUR aus Kapitel 3.1.1 und der Kombination mit PDT ist in Tabelle 31 aufgelistet. Die benötigte Konzentration zur Halbierung der Viabilität betrug bei den beiden Zelllinien RH30 und RD durch die zusätzliche Bestrahlung mit blauem Licht nur noch ca. 1/7 der Ausgangskonzentration an CUR. Da nur zwei verschiedene CUR-Konzentrationen genutzt wurden, können die IC50-Werte lediglich als Näherung gesehen werden.

Tabelle 31: Liste der IC50-Werte bei RMS-Zellen mit und ohne PDT für 48 h

Dargestellt sind die IC50-Werte von CUR bei aRMS (RH30)- und eRMS (RD)-Zellen im Vergleich ohne und mit PDT für 48 h.

IC50	- PDT	+ PDT
<i>RH30</i>	4,690 µg/ml (≈10,858 µM)	0,614 µg/ml (≈1,667 µM)
<i>RD</i>	5,610 µg/ml (≈15,228 µM)	0,710 µg/ml (≈1,927 µM)

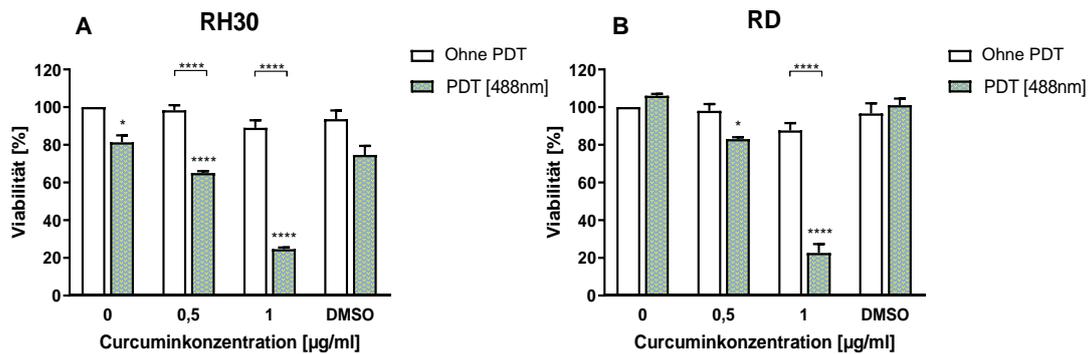


Abbildung 26: Viabilitäts-Assay bei RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und PDT für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter Kombination von steigender CUR-Dosis (0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$) und Licht (PDT; 488 nm) bei 48-stündiger Behandlung von aRMS (RH30, A)- und eRMS (RD, B)-Zellen. Die Kontrolle (ohne PDT) ist dabei in Weiß und die Kombination mit PDT in grün abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie der Abbildung 26 zu entnehmen ist, ergab die CUR-Behandlung mit 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$ CUR ohne PDT bei beiden Zelllinien keine signifikante Reduktion der Zellviabilität. In Kombination mit der PDT nach CUR-Behandlung ergab sich bei beiden Zelllinien eine signifikante Abnahme der Zellviabilität. Bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CUR in Kombination mit der PDT zeigte die Zelllinie RH30 (A) bereits eine signifikante Reduktion der Zellviabilität auf 65 % und die Zelllinie RD (B) auf 83 %. Bei einer Dosierung von 1 $\mu\text{g/ml}$ CUR ließ sich noch eine Stoffwechselaktivität von 25 % bei RH30 (A)- bzw. 23 % bei RD (B)-Zellen nachweisen. Im Vergleich zur Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CUR ohne PDT waren diese Ergebnisse bei beiden Zelllinien signifikant. Bei der Zelllinie RH30 zeigte bereits die PDT ohne CUR-Behandlung eine Viabilitätsreduktion auf 82 % und war signifikant gegenüber der Nullkontrolle.

Zusammenfassend zeigte sich bei dieser Kombinationsbehandlung ein signifikant zytotoxischer Effekt durch die Bestrahlung von CUR-vorbehandelten RMS-Zellen mit blauem Licht. Dabei betrug der IC₅₀-Wert bei beiden Zelllinien nur noch ungefähr 1/7 der ursprünglichen CUR-Konzentration.

3.1.6 Analyse der Kombinationsbehandlung mit CUR und PDT auf die Viabilität von SKMC-Zellen

Da die PDT einen möglichen Einsatz in der Prophylaxe von Tumorrezidiven durch lokale Bestrahlung von Gewebe bietet, wurde diese nicht nur an RMS-Zellen (siehe 3.1.5), sondern ebenfalls an humanen Skelettmuskelzellen getestet. Dadurch sollte eine mögliche Schädigung von gesundem Gewebe durch die Kombinationsbehandlung von CUR und PDT *in vitro* überprüft werden. Die Versuchsbedingungen waren wie in den Kapiteln 2.2.4 und 3.1.5 beschrieben. Als Kontrolle bezeichnet ist die alleinige Behandlung mit Curcumin.

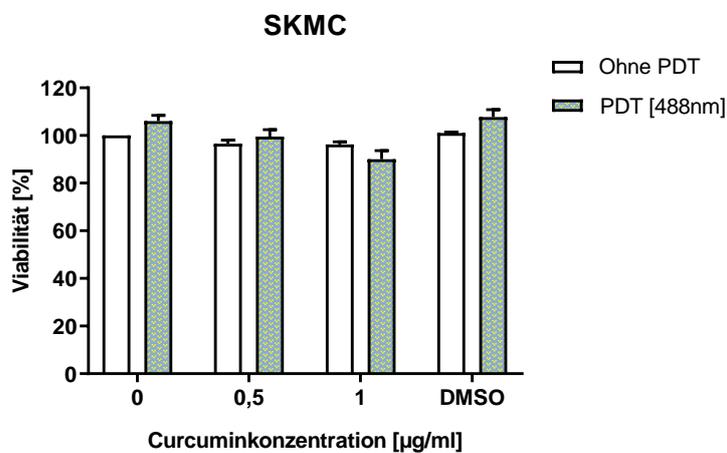


Abbildung 27: Viabilitäts-Assay bei SKMC-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und PDT für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] bei Kombination von steigender CUR-Dosis (0,5 und 1 µg/ml) und Licht (PDT; 488 nm) bei der 48-stündigen Behandlung von SKMC-Zellen. Die Kontrolle (ohne PDT) ist dabei in Weiß und die Kombination mit PDT in grün abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Weder die Behandlung mit CUR noch die Kombination mit der PDT (siehe Abbildung 27) wiesen eine signifikante Abnahme der Zellviabilität auf. Studierte man die Kombinationsbehandlung bei einer CUR-Konzentration von 1 µg/ml zeigte sich bei den SKMC-Zellen zwar eine geringfügige Abnahme der Viabilität auf 90 %, jedoch keine signifikante Verminderung.

Zusammenfassend ließ sich kein signifikant zytotoxischer Effekt der Kombinationsbehandlung von CUR und PDT auf Skelettmuskelzellen nachweisen.

3.2 Untersuchung der Migration von RMS-Zellen nach CUR- und Zytostatikagabe mittels Wound Healing Assay

Zur Erfassung des Einflusses von CUR und/oder Zytostatika auf das Migrationsverhalten von RMS-Zellen – im Sinne von Veränderungen der Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktion – wurde die Methodik des Wound Healing Assay angewendet (siehe 2.2.5).

3.2.1 Analyse des Effektes von CUR und/oder Zytostatika auf das Migrationspotential von RMS-Zelllinien

Für eine bessere Verständlichkeit werden neben den graphisch aufgearbeiteten Ergebnissen des Wound Healing Assays ebenfalls die fotografischen Aufnahmen der RMS-Zellen abgebildet. Die untersuchten Zellen beschränkten sich auf die aRMS-Zelllinie RH30 und die eRMS-Zelllinie RD.

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse des Wound Healing Assay bei RH30-Zellen im zeitlichen Verlauf fotografisch (A) und als Balkendiagramm (B) dargestellt. Nach einer Behandlungszeit von 24 h zeigten sich schon deutliche Unterschiede bezüglich des Migrationspotentials der verschiedenen Behandlungen. Eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle ergaben die Behandlungen mit 5 µg/ml und 6 µg/ml CUR sowie die Kombination aus CUR 5 µg/ml und VCR 0,00075 µg/ml. Letztere zeigte sich auch signifikant zytotoxischer gegenüber der Behandlung mit VCR alleine. Nach 30-stündiger Behandlungszeit erwies sich die Kombinationsbehandlung zusätzlich signifikant gegenüber CUR 5 µg/ml. Dieser Effekt verstärkte sich weiter nach der maximalen Behandlungsdauer von 48 h: Die Kombinationsbehandlung wies ein tendenziell vermindertes Migrationspotential gegenüber der Behandlung mit VCR und ein signifikant Vermindertes gegenüber der Behandlung mit CUR auf.

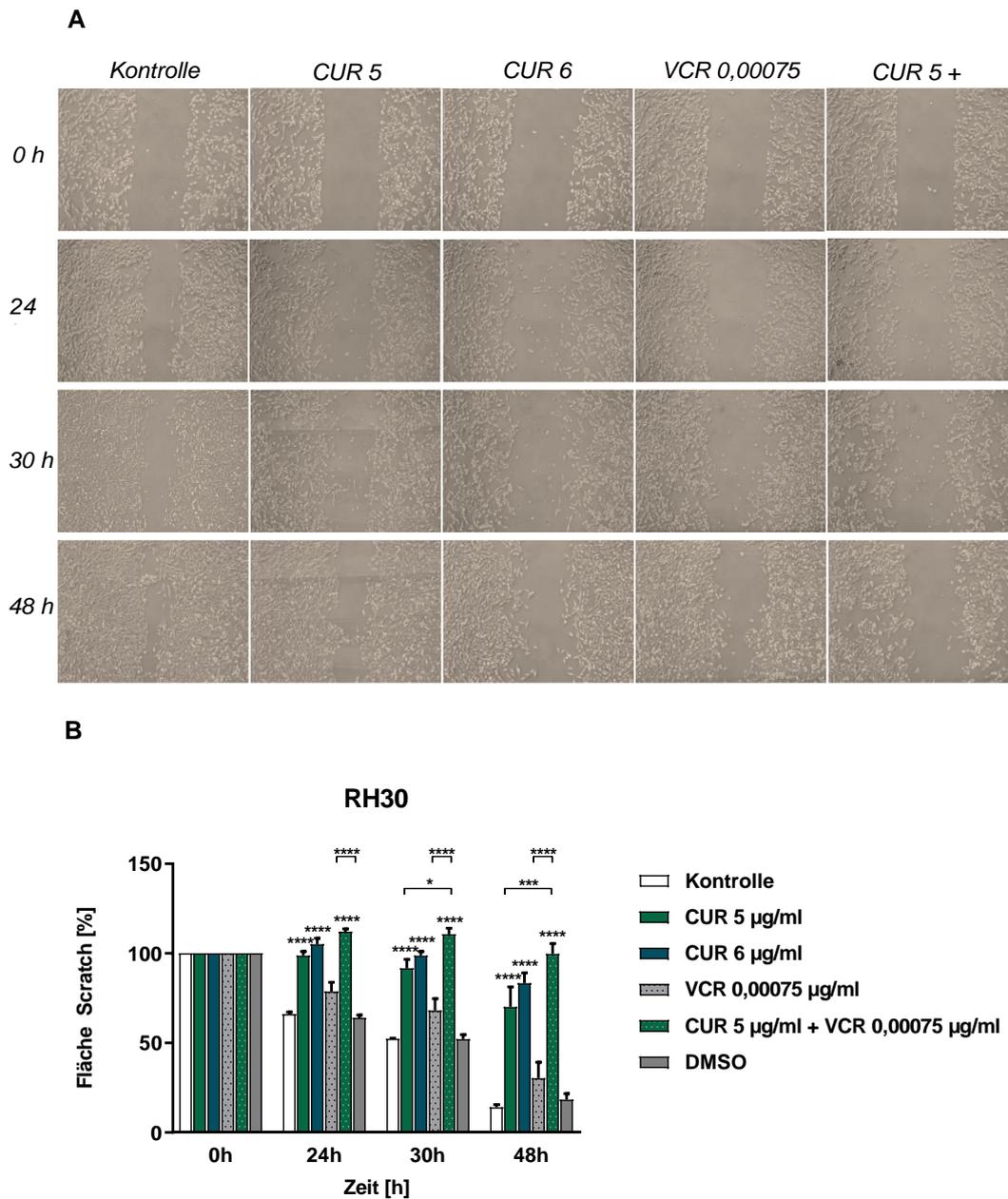


Abbildung 28: Wound Healing Assay bei RH30-Zellen zu verschiedenen Messzeitpunkten

A: Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen in der 5x Vergrößerung (**A**) und die Mittelwerte +/- SEM von den durchschnittlichen Flächenmaßen [in %] (**B**) beim Wound Healing Assay bei RH30-Zellen. Die abgebildeten Behandlungen sind die Kontrolle, Inkubation mit CUR (5 und 6 µg/ml; grün und blau), VCR (0,00075 µg/ml; grau-gepunktet) und der Kombination von 5 µg/ml CUR und 0,00075 µg/ml VCR (grün-gepunktet) zu den Messzeitpunkten 0, 24, 30 und 48 h. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

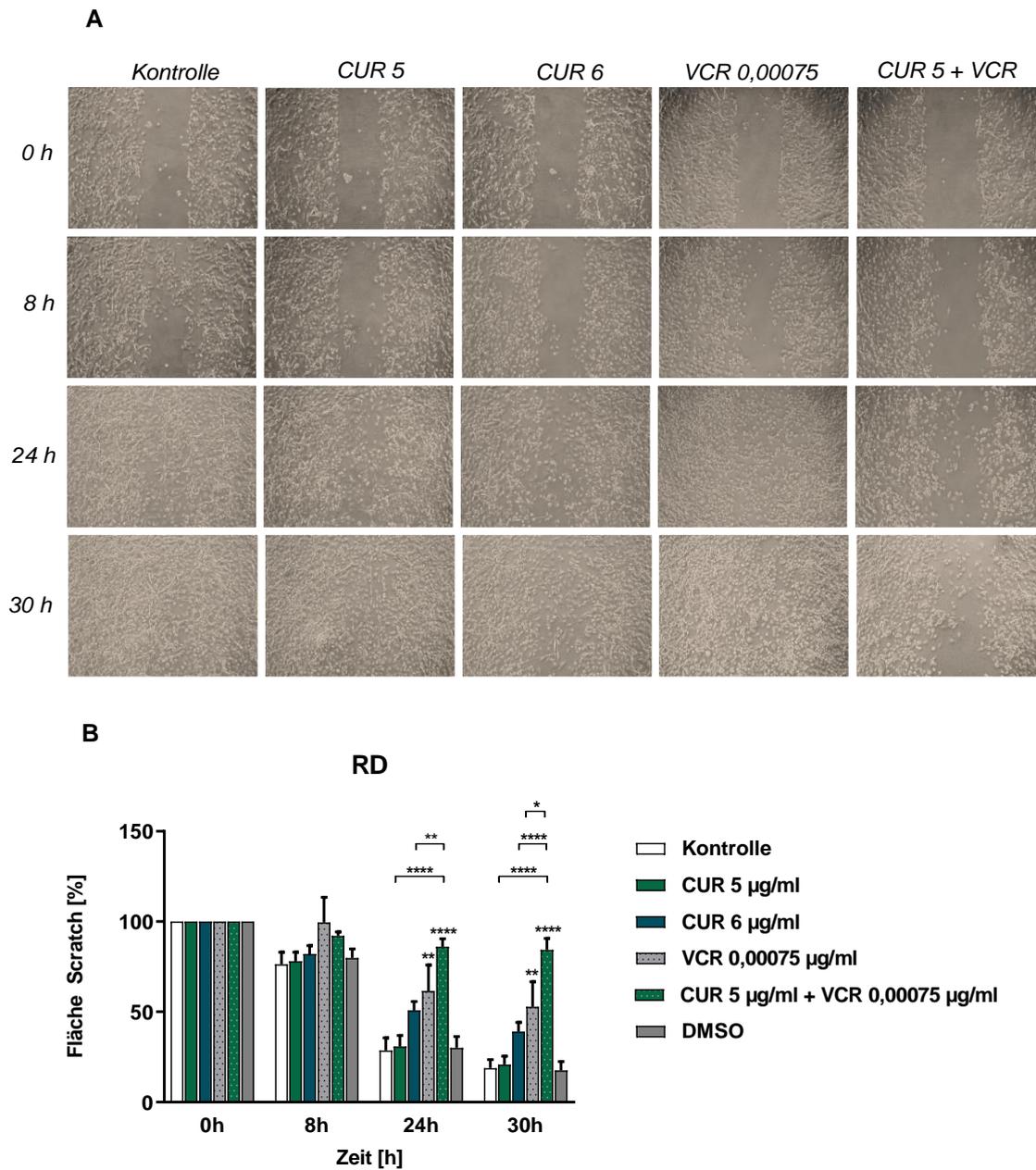


Abbildung 29: Wound Healing Assay bei RD-Zellen zu verschiedenen Messzeitpunkten

A: Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen in der 5x Vergrößerung (**A**) und die Mittelwerte \pm SEM von den durchschnittlichen Flächenmaßen [in %] (**B**) beim Wound Healing Assay bei RD-Zellen. Die abgebildeten Behandlungen sind die Kontrolle, Inkubation mit CUR (5 und 6 $\mu\text{g/ml}$; grün und blau), VCR (0,00075 $\mu\text{g/ml}$; grau-gepunktet) und der Kombination von 5 $\mu\text{g/ml}$ CUR und 0,00075 $\mu\text{g/ml}$ VCR (grün-gepunktet) zu den Messzeitpunkten 0, 8, 24 und 30 h. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Analog dazu ist in Abbildung 29 der Wound Healing Assay von der eRMS-Zelllinie RD dargestellt. Keine der Behandlungen wies nach 8-stündiger Inkubation ein signifikant verringertes Migrationspotential auf. Betrachtete man die Migration der

Zellen nach 24 h so zeigte sich hier bereits ein signifikanter Vorteil der Kombinationsbehandlung gegenüber der Kontrolle mit 5 und 6 µg/ml CUR. Nach weiteren 6 h Inkubation verdeutlichten sich diese Ergebnisse. Im Gegensatz zur kürzeren Behandlungszeit erwies sich das Migrationspotential der Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR nach 30 h zusätzlich signifikant übergelegen gegenüber der Behandlung mit 0,00075 µg/ml VCR.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Kombinationsbehandlung aus VCR und CUR bei beiden Zelllinien signifikant das Migrationspotential in Abhängigkeit zum zeitlichen Verlauf senkte. Bei der eRMS-Zelllinie RD war die Kombinationsbehandlung (≥ 24 h), bezüglich einer verminderten Migration, insbesondere gegenüber der Behandlung mit CUR signifikant, bei der aRMS-Zelllinie RH30 hingegen durchgehend gegenüber der Behandlung mit VCR.

3.3 Untersuchung des Einflusses von CUR auf das Metastasierungspotential von RMS-Zellen mittels Colony-forming Assay

3.3.1 Analyse des Effektes von CUR auf das koloniebildende Potential von RMS-Zelllinien

Um die Effektivität der zytotoxischen Behandlung mit CUR zu bestimmen und deren potentiellen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten zu erfassen wurde die Methodik des CFA angewendet. Beispielhaft, auf Basis der bisherigen Versuche, wurden die Zelllinien RD (eRMS) und RH30 (aRMS) ausgewählt sowie niedrige CUR-Konzentrationen unterhalb der ermittelten IC₅₀-Werte. Zu den Details der Behandlungs- und Wachstumsdauer und dem Versuchsaufbau siehe Kapitel 2.2.6.

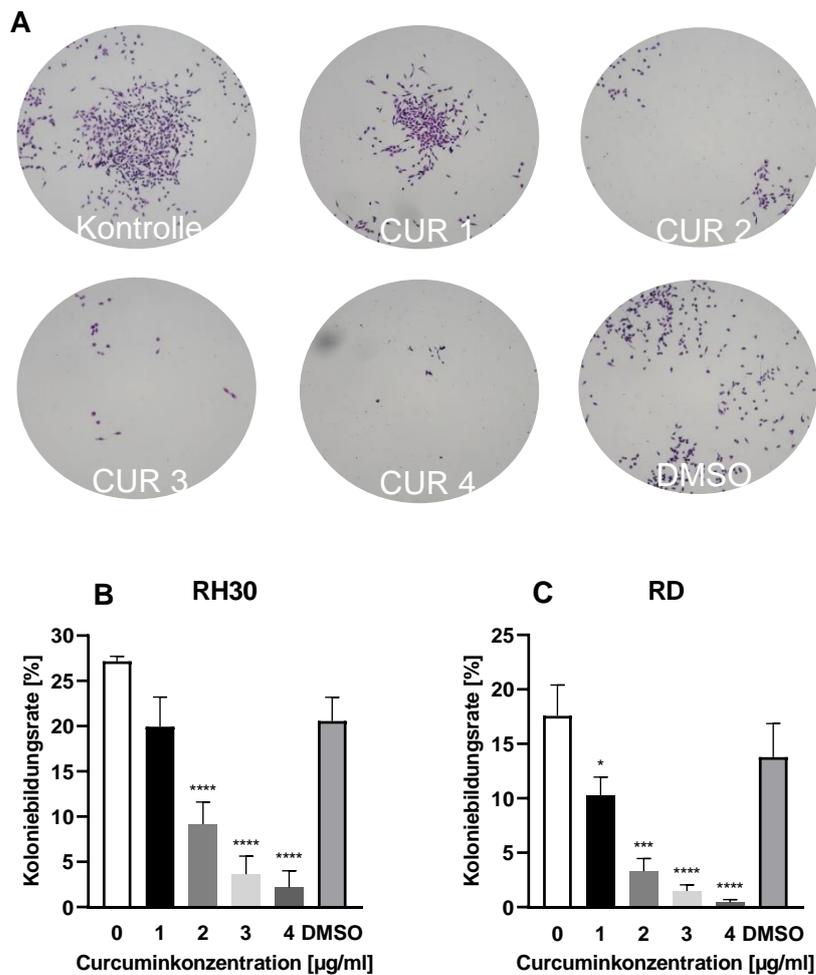


Abbildung 30: CFA bei RMS-Zellen unter CUR-Behandlung

Dargestellt sind fotografische Aufnahmen einzelner Kolonien (lila) unter dem Mikroskop (5x Vergrößerung) bei RH30-Zellen (A) und die Mittelwerte +/- SEM der Koloniebildungsrate [in %] von den RMS-Zelllinien RH30 (B) und RD (C) unter steigender CUR-Konzentration sowie die Null- und Lösungsmittelkontrolle (DMSO) im CFA. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Dunnett Spannweitentest) sind als * dargestellt. Von der Zelllinie RD ließen sich keine fotografischen Aufnahmen machen und diese sind daher nicht abgebildet.

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, zeigte sich bei der aRMS-Zelllinie RH30 (B) bereits ab 2 µg/ml eine signifikante Abnahme der Koloniebildungsrate. Bei der eRMS-Zelllinie RD (C) ließ sich ein statistisch signifikanter Einfluss von CUR auf die Koloniebildungsrate schon bei der niedrigsten Konzentration von 1 µg/ml CUR nachweisen. Exemplarisch sind die fotografischen Aufnahmen der aRMS Zelllinie RH30 abgebildet (A), in denen ebenfalls eine Abnahme der Kolonien erkennbar ist.

Zusammenfassend ließ sich also bereits bei CUR-Konzentrationen $< IC_{50}$ sowohl bei aRMS- als auch bei eRMS-Zellen eine konzentrationsabhängige, signifikante Verminderung der Koloniebildungsrate feststellen.

3.4 Untersuchung des CUR-Influx und -Efflux bei RMS-Zellen im zeitlichen und räumlichen Verlauf

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, besitzt CUR als Wirkstoff eine Eigenfluoreszenz mit einem Absorptionsspektrum von 350-500 nm und einem Maximum in organischer Lösung von 420 nm.

3.4.1 Darstellung der Eigenfluoreszenz von CUR in der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie ließen sich CUR-behandelte Zellen, ohne spezielle Bindung an einen fluoreszenzmarkierten Antikörper, in mehreren Kanälen darstellen. Dabei konnte anhand der aRMS-Zelllinie RH30 nachgewiesen werden, dass die Eigenfluoreszenz von CUR besonders in den ultravioletten Kanälen sowie im PE-Kanal als Störfaktor bei Versuchen mit Antikörpern, die im selben Kanal Strahlung emittieren, galt. Auch die Kanäle FITC, PerCP und PE Cy7 zeigten eine moderate Steigerung ($< 50\%$) bei CUR-behandelten Zellen. Lediglich in den Kanälen APC und APC H7 kam es zu keiner Veränderung durch die CUR-Behandlung ($< 1\%$). Dieser Umstand wurde nun zur Darstellung der CUR-Aufnahme und -Abgabe in die Tumorzellen genutzt.

3.4.2 Vergleich von CUR-Influx und -Efflux bei RMS-Zelllinien im zeitlichen Verlauf in der Durchflusszytometrie

Um die Dynamik der Aufnahme von CUR in die RMS-Zellen besser nachzuvollziehen, wurde diese in der Durchflusszytometrie mittels Histogramm und MFI-Analyse (nMFI) bestimmt und ausgewertet (siehe Kapitel 2.2.7). Verwendete RMS-Zelllinien waren erneut RH30 (aRMS) und RD (eRMS).

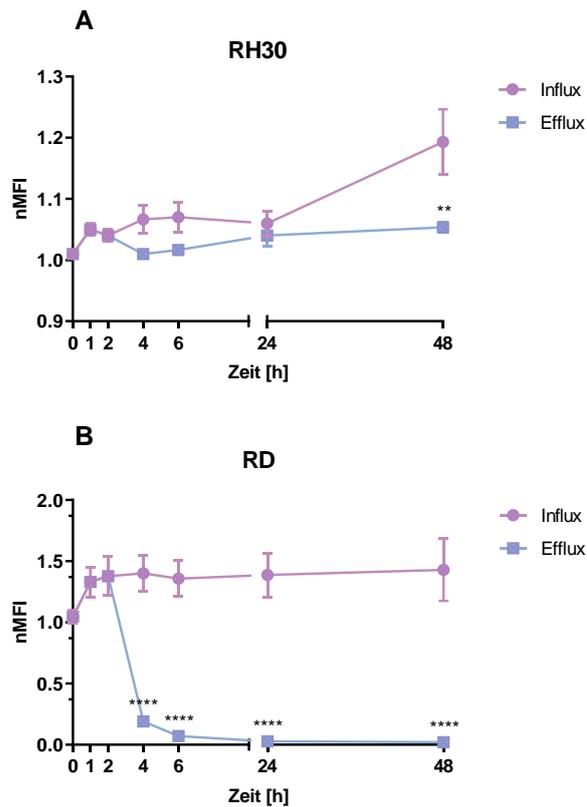


Abbildung 31: Darstellung des Influx und Efflux von CUR bei RMS-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte der nMFI \pm SEM von CUR im zeitlichen Verlauf [in h] bei den RMS-Zelllinien RH30 (A) und RD (B) im Histogramm des PE-Kanals. Dabei ist in lila der Influx dargestellt und in blau der Efflux. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) der beiden nMFI-Werte im Vergleich sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 31 abgebildet, zeigte sich – im Rahmen der Influx-Efflux-Untersuchung – bei RH30-Zellen (A) ein langsamer Anstieg des CUR-Influx über 48 h. Wie bereits am Kurvenverlauf zu sehen ist, waren die nMFI Werte bei den aRMS-Zellen bei der Messung des Ein- und Ausstroms von CUR ähnlich und ergaben erst nach einer Behandlungsdauer von 48 h einen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz zu der aRMS-Zelllinie RH30 zeigte sich bei RD-Zellen (B) ein schneller Influx von Curcumin bereits nach einstündiger Behandlungsdauer sowie ein signifikanter Unterschied nach Auswaschen von CUR nach 4 h und zu allen weiteren Messzeitpunkten. Die Ergebnisse der statistischen Untersuchung beider Zelllinien sowie die Darstellung als PE-Histogramm sind im Anhang aufgeführt.

Zusammenfassend zeigte sich bei der eRMS-Zelllinie RD ein signifikanter Unterschied zwischen Influx und Efflux nach Auswaschen von CUR ab einer vierstündigen Behandlungszeit, während die aRMS-Zelllinie RH30 diesen signifikanten Unterschied erst nach 48 h aufwies.

3.4.3 Darstellung der Eigenfluoreszenz von CUR in der Immunfluoreszenz

Die Eigenfluoreszenz von CUR sollte räumlich mittels Immunfluoreszenz anhand der aRMS-Zelllinie RH30 näher dargestellt werden. Hierfür wurden die aRMS-Zellen (RH30) wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben behandelt und untersucht.

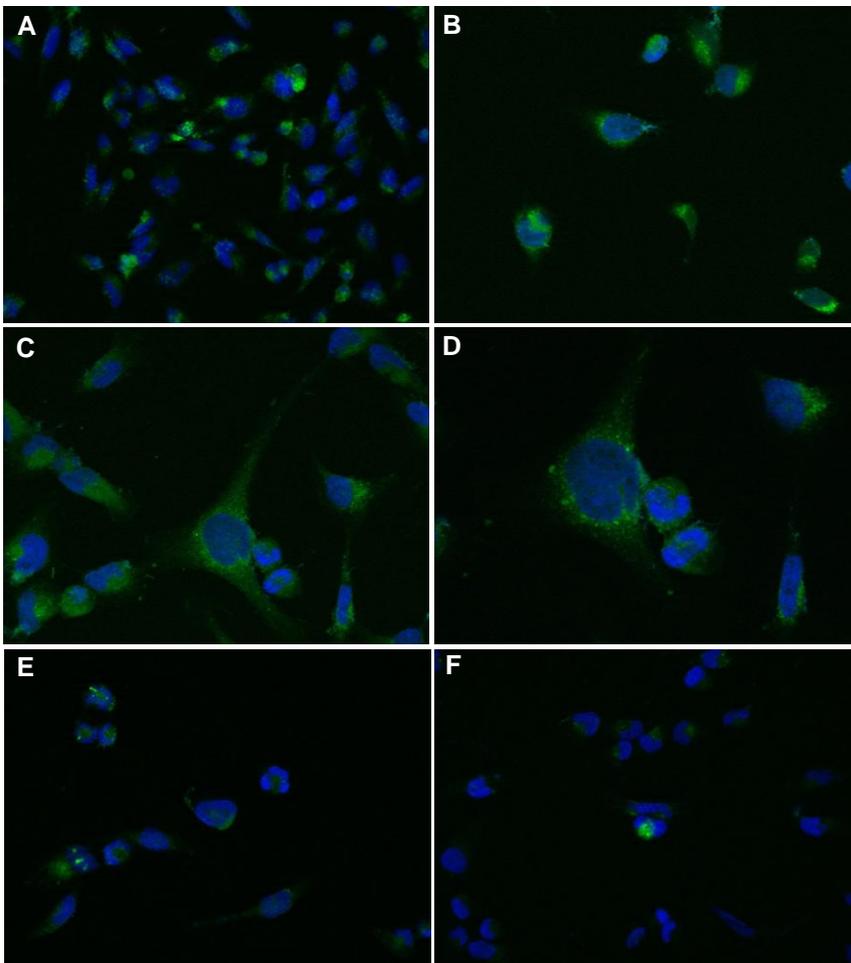


Abbildung 32: Immunfluoreszenz von RH30-Zellen unter CUR-Behandlung

Dargestellt sind RH30-Zellen nach einstündiger (A-D), 48stündiger (E) und ohne (F) CUR-Behandlung. Man sieht die Zellkerne im DAPI Kanal (blau) und CUR im FITC Kanal (gelb-grün). In A, E und F sind die Zellen in der 25x Vergrößerung, in B und C in 40x Vergrößerung gezeigt. In D ist die zentrale RH30 Zelle aus C in der 63x Vergrößerung dargestellt.

Wie in Abbildung 32 abgebildet, manifestierte sich nach einer Stunde eine homogene Anreicherung von CUR (gelb-grün) im gesamten Zytosol der RMS-Zellen, welche häufig sogar bis in die Zellausläufer sichtbar war. Bei hoher Vergrößerung konnte man erkennen, dass CUR sich teilweise in Vesikeln und um den Zellkern verstärkt angesammelt hatte. Die Anreicherung von CUR nach 48-stündiger Inkubation war wesentlich geringer, ebenfalls hauptsächlich im Zytosol lokalisiert sowie in einer RMS-Zelle intranukleär. Hier zeigte sich außerdem eine ausgeprägte Fragmentierung der Zellkerne. In der Kontrolle ohne CUR konnte überraschenderweise ebenfalls eine geringe Gelbfärbung, vorwiegend in der Extrazellularflüssigkeit und geringfügig auch im Zytosol der aRMS-Zellen, dargestellt werden. Dies ließ sich auf die Nutzung von DMEM Zellkulturmedium zurückführen, welches Phenolrot enthält, das ebenfalls geringfügig im FITC-Kanal emittierte.

3.5 Untersuchung der Apoptoseinduktion bei RMS- und SKMC-Zellen nach CUR- und Zytostatikagabe

Nachdem in den vorherigen Kapiteln bereits die Zytotoxizität von CUR und Zytostatika sowie deren Effektivität gezeigt werden konnte, wurde mittels Apoptose-Assay in der Durchflusszytometrie der zugrunde liegende Mechanismus untersucht. Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 2.2.7 genauer erläutert. Die verwendeten Zelllinien waren RH30 beispielhaft für das aRMS und RD für das eRMS.

3.5.1 Analyse des Effektes von CUR auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien

In diesem Kapitel wurde die Behandlung mit CUR bezüglich einer Apoptoseinduktion bei RD und RH30-Zellen untersucht. Hierfür wurden die genannten Zelllinien wie in 2.2.7. beschrieben für 48 h behandelt und Annexin V-positive Zellen detektiert.

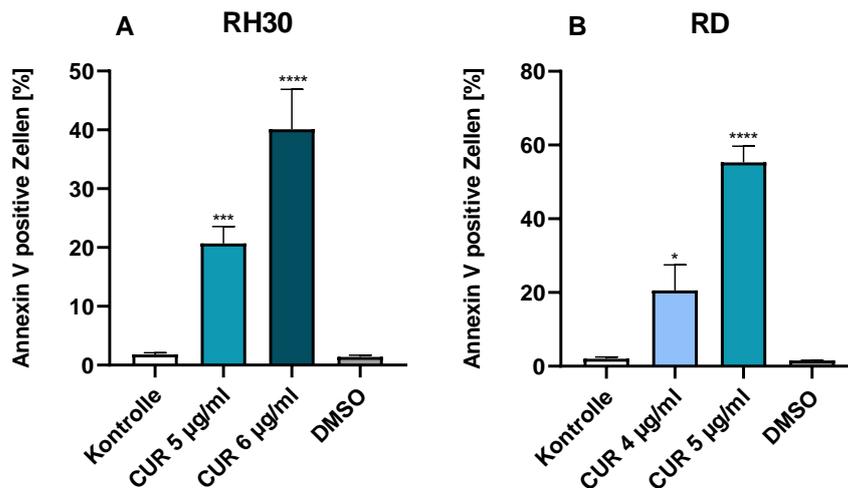


Abbildung 33: Apoptose-Assay von RMS-Zellen unter CUR-Behandlung für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von Annexin V-positiven Zellen [in %] in der Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die RMS-Zellen RH30 (A) und RD (B) unter Behandlung mit CUR (4 μ g/ml und 5 μ g/ml bzw. 5 und 6 μ g/ml; blau) sowie einer Null- und Lösungsmittelkontrolle bei 48-stündiger Behandlungszeit. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Dunnett Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie aus Abbildung 33 ersichtlich, konnte nach 48 h bei beiden Zelllinien RH30 und RD bereits bei niedrigerer CUR-Konzentration von 5 μ g/ml bzw. 4 μ g/ml eine signifikante Steigerung der Annexin V-positiven Zellen nachgewiesen werden. Bei der aRMS-Zelllinie RH30 war die Induktion der Apoptose bei 6 μ g/ml CUR bei ca. 40 %. Bei den RD-Zellen erreichte die Induktion der Apoptose sogar einen Wert von 56 % (bei einer Konzentration von 5 μ g/ml CUR).

3.5.2 Analyse des Effektes von CUR auf die Apoptoseinduktion von SKMC-Zellen

Da bereits die Apoptose-fördernde Wirkung von CUR im Apoptose-Assay bei RMS-Zellen gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden dieser Effekt bei humanen Skelettmuskelzellen untersucht. Hierfür wurden die SKMC-Zellen wie in 2.2.7 beschrieben untersucht.

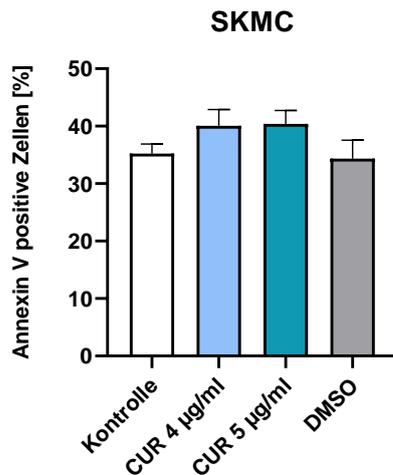


Abbildung 34: Apoptose-Assay von SKMC-Zellen unter CUR-Behandlung für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von Annexin V-positiven Zellen [in %] in der Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die Skelettmuskelzellen SKMC unter Behandlung mit CUR (4 μ g/ml hellblau; 5 μ g/ml blau) sowie einer Null- und Lösungsmittelkontrolle bei 48-stündiger Behandlungszeit. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Dunnett Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 34 graphisch dargestellt. Im Vergleich zur Nullkontrolle zeigte sich bei den SKMC-Zellen keine signifikante Steigerung der Annexin V-positiven Zellen unter CUR-Behandlung für 48 h.

3.5.3 Analyse des Effektes von VCR auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien

Auch die Inkubation mit VCR wurde im Verlauf bezüglich eines möglichen Apoptosemechanismus anhand der o. g. Zelllinien genauer beleuchtet.

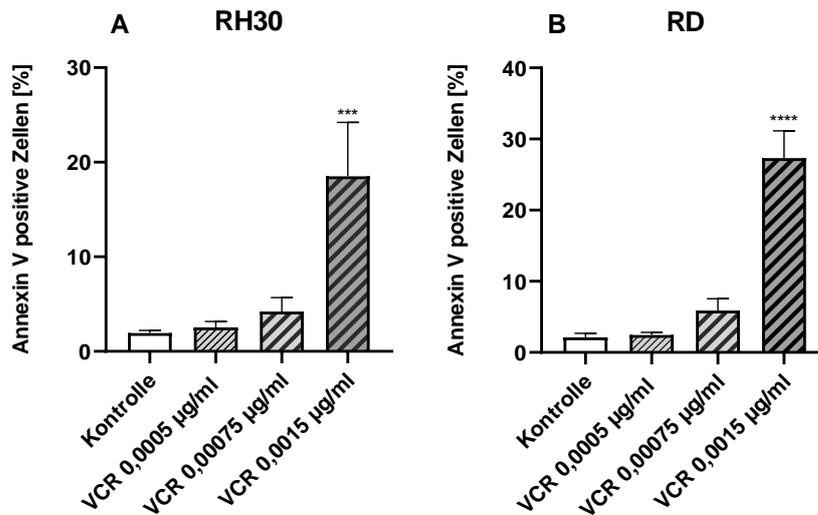


Abbildung 35: Apoptose-Assay von RMS-Zellen unter VCR-Behandlung für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von Annexin V-positiven Zellen [in %] in der Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die RMS-Zellen RH30 (A) und RD (B) unter Behandlung mit VCR (0,0005 μ g/ml; 0,00075 μ g/ml und 0,0015 μ g/ml; grau /) sowie einer Nullkontrolle (Weiß) bei 48-stündiger Behandlungszeit. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Dunnett Spanweitentest) sind als * dargestellt.

Bei der Behandlung mit VCR für 48 h, wie sie in Abbildung 35 dargestellt ist, war lediglich eine hohe Konzentration von 0,0015 μ g/ml VCR signifikant für den Anstieg von Annexin V-positiven Zellen auf 20 % (RH30) bzw. 28 % (RD).

3.5.4 Analyse des Effektes von DAC auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien

Analog zur Behandlung mit VCR wurde im Folgenden die Behandlung mit DAC und deren Auswirkungen auf die Induktion von Apoptose untersucht.

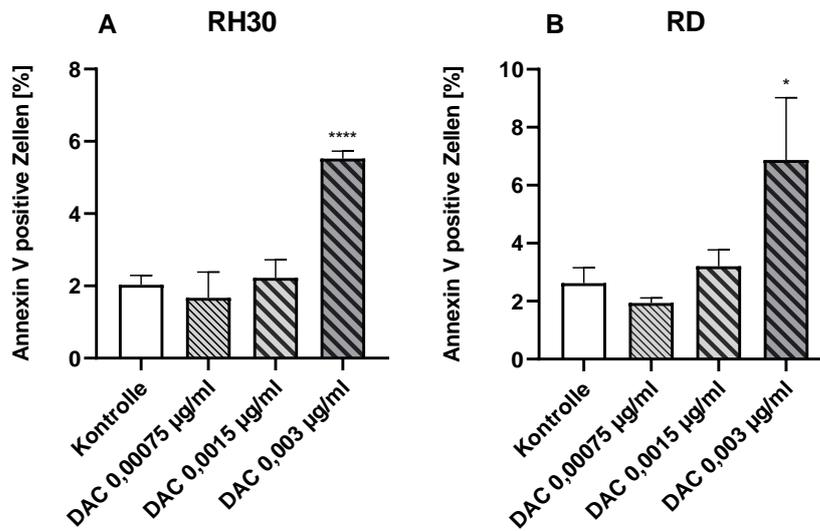


Abbildung 36: Apoptose-Assay von RMS-Zellen unter DAC-Behandlung für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von Annexin V-positiven Zellen [in %] in der Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die RMS-Zellen RH30 (A) und RD (B) unter Behandlung mit DAC (0,00075 µg/ml; 0,0015 µg/ml und 0,003 µg/ml; grau \) sowie einer Nullkontrolle (Weiß) bei 48-stündiger Behandlungszeit. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Dunnett Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Wie in Abbildung 36 abgebildet ließ sich für die RMS-Zelllinien RH30 und RD auch bei der Behandlung mit DAC eine statistisch signifikante Erhöhung des Apoptosemarkers erst bei der höchsten Konzentration von 0,003 µg/ml nachweisen (5 % vs. 7 %).

3.5.5 Analyse des Effektes der Kombinationsbehandlung mit CUR und Zytostatika auf die Apoptoseinduktion von RMS-Zelllinien

Besonders relevant war der Nachweis der Zytotoxizität durch Apoptoseinduktion bei der Kombination mit CUR und einem Standard-Zytostatikum (VCR oder DAC). Hierfür wurden die RMS-Zellen RH30 und RD für 48 h mit zwei verschiedenen Kombinationen behandelt, welche auf der Basis von Vorversuchen festgelegt wurden.

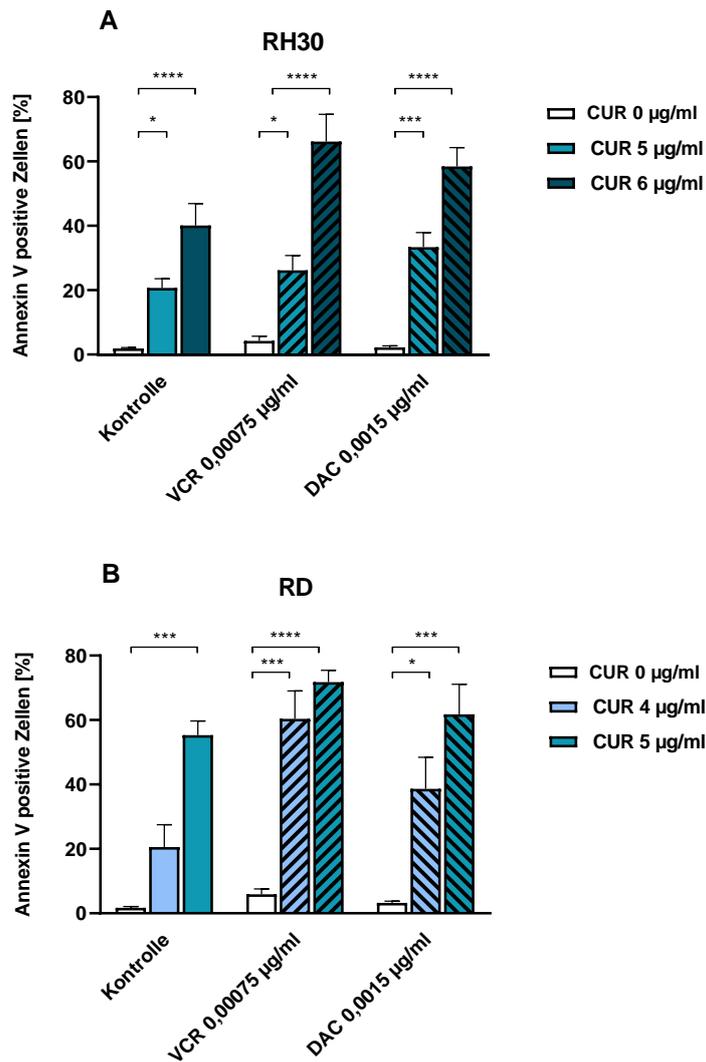


Abbildung 37: Apoptose-Assay von RMS-Zellen unter Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR bzw. DAC für 48 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von Annexin V-positiven Zellen [in %] in der Durchflusszytometrie. Gezeigt ist die aRMS-Zelllinie RH30 (A) und die eRMS-Zelllinie RD (B) bei Kombinationsbehandlung für 48 h mit CUR (4 bzw. 5 µg/ml hellblau; 5 bzw. 6 µg/ml dunkelblau; /) oder DAC (0,0015 µg/ml; \) sowie einer Kontrolle ohne CUR (Weiß) bei 48-stündiger Behandlungszeit. Die Signifikanz (p < 0,05; n ≥ 3; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Verglichen wurde, wie in Abbildung 37 dargestellt, die Effektivität einer Kombinationsbehandlung aus CUR und VCR bzw. DAC mit alleiniger Gabe von Zytostatikum bzw. CUR bei den RMS-Zelllinien RH30 (A) und RD (B).

Wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben, ließ sich bei den RH30-Zellen (A) bereits bei alleiniger CUR-Behandlung eine signifikante Induktion der Apoptose bis zu 40 % (6 µg/ml CUR) nachweisen. Die aRMS-Zellen zeigten bei der Kombinationsbehandlung mit CUR und VCR bei beiden CUR-Konzentrationen (5 und

6 µg/ml) eine signifikante, dosisabhängige Steigerungen der Annexin V-positiven Zellen auf 26 % bzw. 66 %, im Vergleich zur einfachen Anwendung des Zytostatikums (ca. 6 %), nach einer Behandlungsdauer von 48 h. Bei der Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC ergaben beide Behandlungen eine signifikante Induktion der Apoptose um ca. 33 % (5 µg/ml CUR) bzw. 58 % (6 µg/ml CUR) im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit DAC (ca. 4 %).

Bei der eRMS-Zelllinie RD (B) zeigte sich bei alleiniger Gabe von 5 µg/ml CUR eine signifikante Induktion der Apoptose auf ca. 56 % (siehe Kapitel 3.5.1). Die Kombinationsbehandlung aus CUR und VCR ergab eine signifikante Steigerung der Apoptose von ca. 8 % auf über 70 % bei höherer CUR-Konzentration (5 µg/ml) gegenüber alleiniger Gabe von VCR. Die Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC für 48 h zeigte eine signifikante Steigerung der Apoptose von ca. 3 % auf 62 % (bei einer Konzentration von 5 µg/ml CUR) gegenüber alleiniger DAC-Behandlung.

Zusammenfassend zeigte sich sowohl bei der Zelllinie RH30 als auch bei der Zelllinie RD ein signifikant stärkerer Anstieg des Apoptosemarkers unter Behandlung mit CUR und VCR/DAC gegenüber der Behandlung mit einem Zytostatikum alleine. Bei beiden Zelllinien und beiden Kombinationen war diese Steigerung an Annexin V-positiven Zellen bereits bei niedriger CUR-Konzentration signifikant höher als bei alleiniger Zytostatikabehandlung. Besonders sensitiv reagierten die RD-Zellen bereits auf niedrige Konzentrationen von CUR in Kombination mit VCR.

3.6 Untersuchung einer möglichen Resistenzentwicklung bei RMS-Zellen unter Langzeitbehandlung mit CUR

Durch verschiedene Mechanismen kann es im Verlauf einer kontinuierlichen, zytostatischen Therapie zur Entwicklung einer *Multiple Drug Resistance* (MDR) kommen. Dies ist eine mögliche Komplikation beim Einsatz von Zytostatika und warf die Frage auf, ob die Langzeitbehandlung mit CUR auch ähnliche Resis-

tenzeffekte bei RMS-Zellen auslösen könnte. Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurde der Versuchsaufbau wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben gewählt und bei den Zelllinien RD (eRMS) und RH30 (aRMS) untersucht.

3.6.1 Beobachtungen während der langfristigen CUR-Gabe

Die langsam gesteigerte, regelmäßige CUR-Gabe erfolgte über einen Zeitraum von acht Wochen. Während dieser Zeit wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl deutlich sichtbar, welche sich an einem dünneren Zellrasen und der verminderten Zellzahl lebender Zellen darstellte. Teilweise mussten einzelne Versuchsreihen deswegen abgebrochen werden. Daher wurden die Zellen nach Erreichen der Maximaldosis von 8 µg/ml CUR für 72 h ohne Splitten/Behandlung belassen und konnten sich vor Anlegen des Viabilitäts-Assays bezüglich ihrer Zellzahl erholen. Dies war notwendig, um den Versuch zu den Bedingungen, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, durchführen zu können.

3.6.2 Analyse des Effektes von CUR auf die Viabilität von vorbehandelten RMS-Zelllinien

Zur quantitativen Analyse wurde ein Vergleichs-Viabilitäts-Assay am Ende der langfristigen Behandlung angelegt. Hierfür wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben für 72 h mit CUR behandelt und untersucht. Als Kontrolle dienten nicht-vorbehandelte Zellen derselben RMS-Zelllinie.

Wie in Tabelle 32 dargestellt wurde in diesem Zusammenhang die IC₅₀-Konzentrationen beider Zellpopulationen bestimmt und verglichen. Auch hier zeigte sich bei beiden Zelllinien ein Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten von Zellen ohne bzw. mit Vorbehandlung, wobei dieser bei den vorbehandelten RMS-Zellen um 1,0 µg/ml (RH30) bzw. 1,7 µg/ml (RD) höher lag.

Tabelle 32: Liste der IC₅₀-Werte bei RMS-Zellen mit und ohne Vorbehandlung für 72 h

Dargestellt sind die IC₅₀-Werte von CUR bei aRMS (RH30)- und eRMS (RD)-Zellen im Vergleich ohne und mit Vorbehandlung bei CUR-Behandlung für 72 h.

IC₅₀	Unbehandelte Zellen	Behandelte Zellen
<i>RH30</i>	4,032 µg/ml (≈10,945 µM)	5,071 µg/ml (≈13,573µM)

<i>RD</i>	5,345 µg/ml ($\approx 14,509 \mu\text{M}$)	7,043 µg/ml ($\approx 19,118 \mu\text{M}$)
-----------	--	--

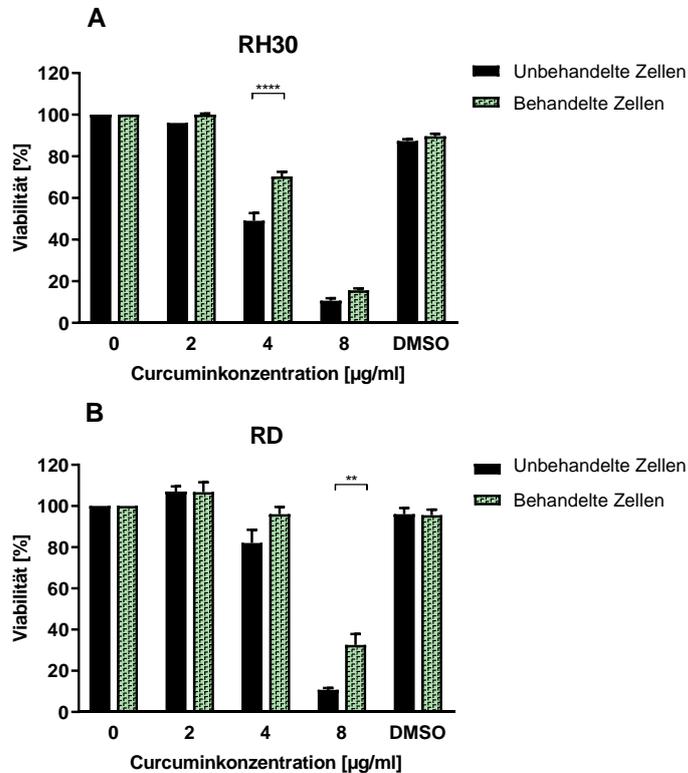


Abbildung 38: Viabilitäts-Assay von RMS-Zelllinien mit und ohne Vorbehandlung unter CUR-Behandlung für 72 h

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Viabilitäten [in %] unter steigender CUR-Konzentration für 72 h bei RH30-Zellen (A) und RD-Zellen (B). Zum Vergleich sind nicht vorbehandelte Zellen (unbehandelte Zellen, schwarz) und kontinuierlich mit CUR behandelte Zellen (behandelte Zellen, grün) abgebildet. Die Signifikanzen ($p < 0,05$; $n \geq 3$; Tukey Spannweitentest) sind als * dargestellt.

Sowohl bei der Kontrolle mit nicht-vorbehandelten als auch den vorbehandelten RH30-Zellen (A) zeigte sich, wie in Abbildung 38 dargestellt, eine konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität unter CUR-Behandlung. Bei der Konzentration von 4 µg/ml CUR konnte ein signifikanter Unterschied der beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden. Auch bei den eRMS-Zellen RD (B) konnte ein konzentrationsabhängiger Abfall der Zellviabilität unter CUR-Behandlung, sowohl der nicht vorbehandelten als auch der vorbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Zu einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Behandlungen kam es bei der höchsten Konzentration von 8 µg/ml CUR.

Zusammenfassend betrachtet konnte durch langsam gesteigerte CUR-Dauerbehandlung ein signifikanter Effekt – im Sinne einer resistenteren Konstitution – der RMS-Zellen RD und RH30 gegenüber einzelnen CUR-Konzentrationen aufgezeigt werden. Dieser führte im Trend zu geringfügig höheren IC50-Werten bei beiden Zelllinien.

3.7 Untersuchung des Einflusses von CUR auf relevante Zell-signalwege von RMS-Zellen

Nachdem sich der Einfluss von CUR auf RMS-Zellen durch Viabilitäts-Assay, Wound Healing Assay und Colony-forming Assay zeigte und quantifizieren ließ, sollten in diesem Schritt mögliche molekulare Grundlagen der Wirkweise von CUR untersucht werden. Hierfür wurden beispielhaft ausgesuchte Signalwege untersucht auf die CUR bereits in anderen Studien Einfluss hatte und die mit einer Verminderung von Proliferation, Migration und einer Induktion von Apoptose und Zelltod einhergehen. Ebenso wurde darauf Wert gelegt Signalwege zu untersuchen, die bekanntermaßen beim RMS hochreguliert sind. Es wurden, wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben, verschiedene Ansätze bei den aRMS-Zellen RH30 und eRMS-Zellen RD als Western Blot durchgeführt.

3.7.1 Analyse des Effektes von CUR und VCR auf den WNT-Signalweg bei RMS-Zelllinien

Da sich bereits in anderen Studien eine erhöhte Expression von β -Catenin und anderen WNT-Proteinen beim RMS zeigte [124], wurde der Einfluss von CUR sowie die Kombination mit VCR auf die Proteinexpression ebendieses Signalmoleküls mittels Western Blot untersucht. Die Zellen wurden wie in 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben behandelt und auf die relative Proteinexpression von β -Catenin untersucht. Als Referenz wurde GAPDH verwendet.

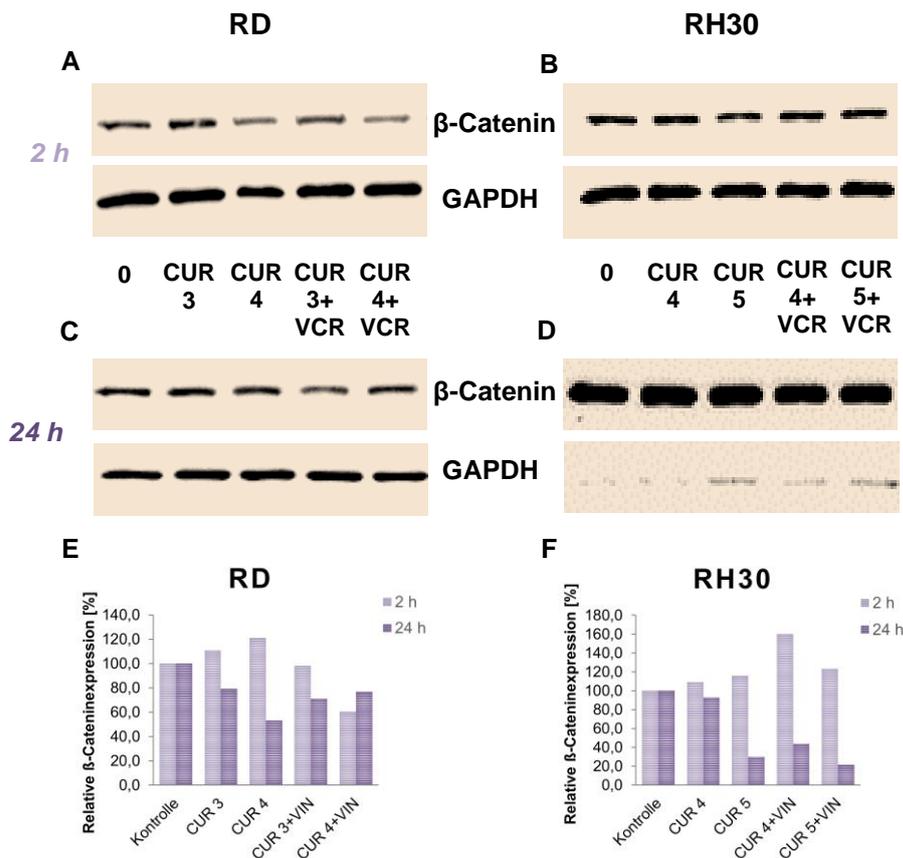


Abbildung 39: Western Blot von RMS-Zellen auf die β -Catenin-Expression

Dargestellt ist der Western Blot (A-D) und dessen graphische Auswertung (E-F) von RD (A,C,E) und RH30 (B,D,F) Zellen, welche für 2 h (oben, hellviolett) oder 24 h (unten, lila) neben der Nullkontrolle mit den Konzentrationen 3 und 4 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 4 und 5 $\mu\text{g/ml}$ CUR sowie deren Kombinationen mit VCR 0,00075 $\mu\text{g/ml}$ behandelt wurden. Verwendet wurde der Antikörper β -Catenin (93 kDa) und GAPDH als Referenz (n=1).

Wie aus Abbildung 39 ersichtlich, zeigte sich bei der eRMS-Zelllinie RD nach 2-stündiger Behandlung (A+E) lediglich in Kombination mit VCR eine Abnahme der relativen β -Cateninexpression um ca. 40 % bei höherer CUR-Dosis. Die aRMS-Zelllinie RH30 (B+F) wies stattdessen eine Hochregulierung ebendieser unter alleiniger CUR-Gabe und Kombinationsbehandlung (CUR 4 $\mu\text{g/ml}$: 116,1 % und CUR 3 $\mu\text{g/ml}$ + VCR: 160,2 %) auf. Auffällig war bei RH30-Zellen nach einer Behandlungsdauer von 24 h (D+F) bereits in der Kontrolle sowie im Verhältnis zum Referenzprotein eine ausgeprägte Expression von β -Catenin. Hier konnte unter Behandlung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CUR eine deutliche Abnahme des Transkriptionsfaktors β -Catenin um ca. 70 % nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde durch die Kombination mit VCR, in Abhängigkeit zur CUR-Konzentration, verstärkt. So wurde die relative Expression in etwa um die Hälfte bei der Kombination von

4 $\mu\text{g/ml}$ CUR und VCR gesenkt und besonders bei der höheren CUR-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich eine ausgeprägte Abnahme der Proteinexpression um ca. 1/5 des Ausgangswertes. Bei schwacher Ausprägung des Referenzproteins GAPDH ist die Auswertung dieses Western Blots jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig. Auch bei den RD-Zellen (C+E) präsentierte sich grundsätzlich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proteinexpression von β -Catenin unter Behandlung mit 3 und 4 $\mu\text{g/ml}$ CUR (79,2 % vs. 53,4 %). Jedoch ergab sich kein verstärkender Effekt durch die Kombinationsbehandlung mit VCR.

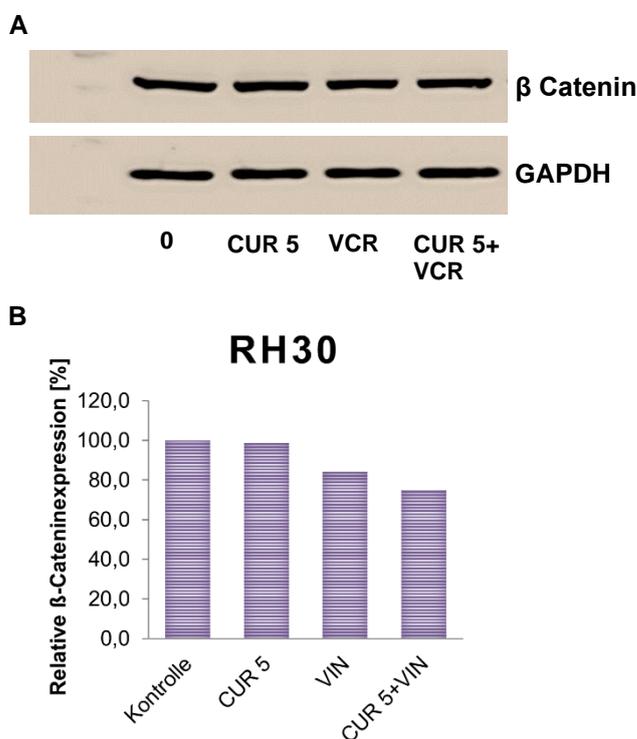


Abbildung 40: Western Blot von RH30-Zellen auf die β -Catenin-Expression

Dargestellt ist der Western Blot (A) und dessen graphische Auswertung (B) von RH30-Zellen, welche für 24 h neben der Nullkontrolle mit den Konzentrationen 5 $\mu\text{g/ml}$ CUR, 0,00075 $\mu\text{g/ml}$ VCR sowie der Kombination behandelt wurden. Verwendet wurde der Antikörper β -Catenin (93 kDa) zum Protein GAPDH als Referenz (n=1).

Bei der Betrachtung der Proteinexpression von β -Catenin bei RH30-Zellen für 24 h mit abweichendem Behandlungsschema (siehe Abbildung 40) zeigte sich unter Behandlung mit 0,00075 $\mu\text{g/ml}$ VCR eine geringfügige Abnahme der Proteinexpression von β -Catenin um 15 %, welche durch die Kombination mit CUR um weitere 10 % verstärkt wurde.

Zusammenfassend ließ sich bei der eRMS-Zelllinie RD nach kurzer Behandlungsdauer eine Abnahme der β -Catenin-Expression nur durch Kombination von CUR mit VCR nachweisen, während die aRMS-Zelllinie RH30 eine Hochregulierung ebendieser aufzeigte. Bei längerer Behandlungsdauer ergab sich eine dosisabhängige Reduktion der Expression von β -Catenin durch die Behandlung mit CUR um 20-50 % bei RD-Zellen und 10-70 % bei RH30-Zellen. Die Kombination hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von β -Catenin bei den eRMS-Zellen, während die aRMS Zellen mit einer Abnahme um 50-80 % auf eine kombinierte Behandlung mit CUR und VCR reagierten.

3.7.2 Analyse des Effektes von CUR und VCR auf den NF- κ B-Signalweg bei RMS-Zelllinien

Die NF- κ B-Expression hat einen wesentlichen Einfluss auf Apoptosemechanismen [125, 126] und soll daher als weiterer, potentieller molekularer Mechanismus untersucht werden. Die RMS-Zellen RD und RH30 wurden wie in 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben behandelt und auf die relative Proteinexpression von NF- κ B untersucht. Als Referenz wurde GAPDH verwendet.

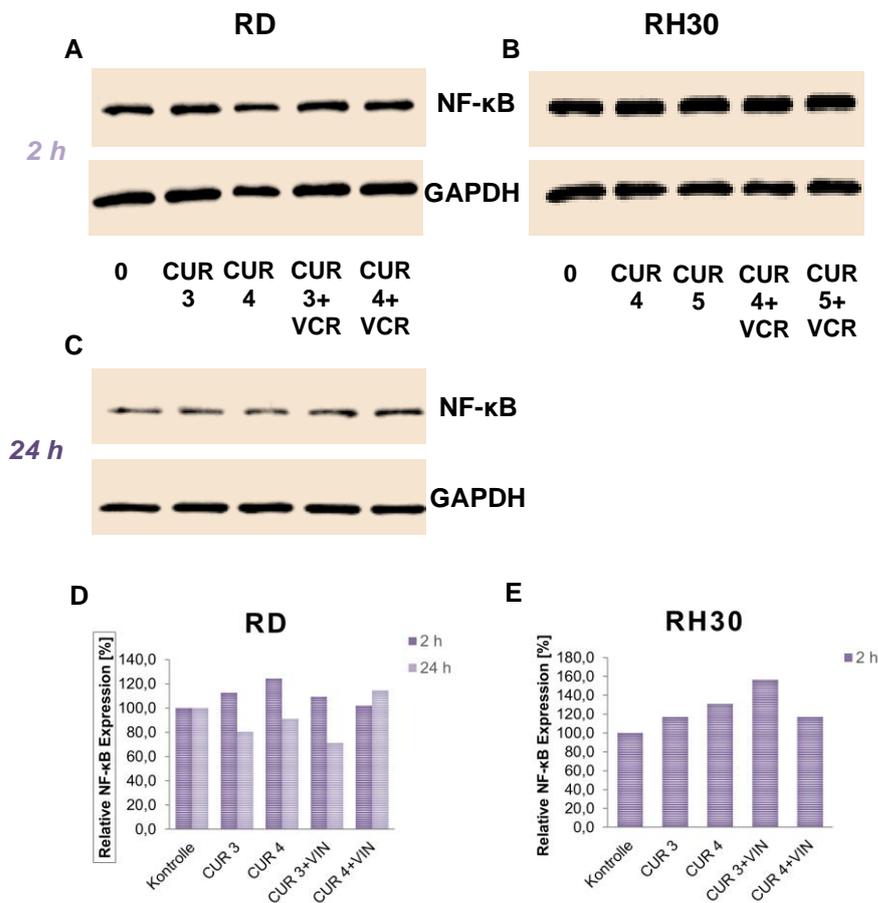


Abbildung 41: Western Blot von RMS-Zellen auf die NF-κB-Expression

Dargestellt ist der Western Blot (A-C) und dessen graphische Auswertung (D-E) von eRMS-Zellen RD (A, C, D) und aRMS-Zellen RH30 (B, E), welche für 2 h (oben, hellviolett) oder 24 h (unten, nur RD, lila) neben der Nullkontrolle mit den Konzentrationen 3 und 4 µg/ml bzw. 4 und 5 µg/ml CUR sowie deren Kombinationen mit VCR 0,00075 µg/ml behandelt wurden. Verwendet wurde der Antikörper NF-κB (65 kDa) und GAPDH als Referenz (n=1).

Bezüglich der relativen Proteinexpression von NF-κB manifestierte sich nach 2-stündiger Inkubation (Abbildung 41, A+B und D+E) bei beiden RMS-Zelllinien RD und RH30 unter Behandlung mit CUR alleine und der Kombinationsbehandlung mit VCR keine Reduktion derselben. Nach 24-stündiger Inkubation (C, D) zeigte die eRMS-Zelllinie RD eine Abnahme der relativen Proteinexpression um 20 % bei der Behandlung mit 3 µg/ml CUR sowie um ca. 30 % bei der Kombinationsbehandlung mit VCR.

Zusammenfassend zeigte die NF-κB-Expression bei den eRMS-Zellen RD eine geringfügig ausgeprägte Abnahme unter 3 µg/ml CUR und dessen Kombination mit VCR bei 24-stündiger Behandlungszeit.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von CUR an RMS-Zellen zu untersuchen, um eine Verbesserung der Prognoseaussichten und Therapiemöglichkeiten bei betroffenen Kindern mit sog. „high risk“-Tumoren und Tumorrezidiven zu schaffen. Trotz Verbesserung der Therapieoptionen ist die Prognose für diese Fälle weiterhin schlecht [2], mit einem 3-Jahres-Überleben für „high risk“-RMS von unter 30 % und einem 5-Jahres-Überleben für Tumorrezidive unter 20 % [127]. Da diese Fälle sowie die Tumorerkrankung selbst selten sind, verhindert die geringe Zahl erforderliche Randomisierungen und limitiert die Durchführung weiterer klinischer Studien zur Therapieoptimierung [82]. CUR hat sich als gut untersuchtes, nebenwirkungsarmes Phytotherapeutikum erwiesen, welches neben antiinflammatorischen und neuroprotektiven auch antikanzerogene Eigenschaften zeigt, wie in diversen Reviews zusammenfassend dargestellt wurde [128-130]. Durch diese vielseitigen Eigenschaften würde sich sein Einsatz bei soliden Tumoren im Kindesalter besonders gut eignen und damit Hoffnung auf eine mögliche Reduktion der nebenwirkungsreichen Standardchemotherapie geben. Dieses Potential von CUR sollte in unserer Studie daher im Hinblick auf Proliferation, Zellviabilität, Koloniebildung, Apoptoseinduktion, Resistenzbildung, zelluläres Uptake und Einfluss auf veränderte Zellsignalwege beim kindlichen RMS *in vitro* untersucht werden [82].

1. Einfluss von CUR auf das Zellüberleben (zytotoxische Effekte)

CUR hat einen konzentrationsabhängigen, zytotoxischen Effekt auf aRMS- und eRMS-Zelllinien

CUR zeigte in dieser Studie sowohl bei den eRMS-Zelllinien RD und spindelzelliger Variante SRH als auch bei der aRMS-Zelllinie RH30 dosisabhängige, zytotoxische Effekte durch Reduktion der Zellviabilität. Dieser Effekt ist aufgetreten sobald die Inkubation mehr als 48 h andauerte. In einer Untersuchung von Harati et al. zur Wirkung von Phytotherapeutika auf Weichteilsarkome zeigten hohe Dosen CUR ($20 \mu\text{M} \approx 7,4 \mu\text{g/ml}$) auf jeweils eine Zelllinie der Lipo- und Synovialsarkome eine geringe Abnahme der Zellviabilität und keine zytotoxischen Effekte auf

andere Sarkomzelllinien [84]. In unserer Studie war die zytotoxische Wirkung von CUR am stärksten ausgeprägt bei der aRMS-Zelllinie RH30 und am schwächsten bei der Zelllinie SRH. Dies stellte sich anhand der 50-prozentigen Viabilitätsabnahme bei optimaler Behandlungsdauer unter CUR-Konzentrationen von 14,3 μM (RH30) sowie von 16,6 μM (RD) und 25,4 μM (SRH) dar. Eine Studie, welche CUR anhand der RMS-Zelllinien RH1 und RH30 untersuchte, konnte in Zellproliferations-Assays über 6 Tage sogar sehr niedrige IC50-Konzentrationen von 2,7 μM für die eRMS-Zelllinie Rh1 und 5,1 μM für die aRMS-Zelllinie RH30 ermitteln [131]. Grund für diese differierenden Ergebnisse könnten im Unterschied von Behandlungsdauer und Zelllinie begründet sein sowie durch die Anwendung verschiedener Messtechniken (Viabilitäts-Assay vs. Proliferations-Assay) und Lösungsmittel (Ethanol anstelle DMSO). Es ist also relevant in weitergehenden Studien die IC50-Konzentration von CUR auch mit weiteren aRMS-Zelllinien, mit längerer Behandlungszeit und mittels Proliferations-Assays zu untersuchen, um die Effekte von geringeren Konzentrationen zu ermitteln. In dieser Studie galten die ermittelten IC50-Konzentrationen als Richtwerte für die weiteren Untersuchungen.

Bei den SKMC-Zellen, die als Kontrolle zu den RMS-Zellen dienten, präsentierten sich in unserer Untersuchung deutlich höhere Konzentrationen von CUR in der IC50-Bestimmung mit 25,5 μM . Dies ist vergleichbar mit der Wirkung von CUR auf humane Fibroblasten, in denen ebenfalls erst bei hohen Konzentrationen eine Abnahme von Proliferation und Zellviabilität auftrat [132, 84]. Diese Untersuchung an humanen Skelettmuskelzellen hat besondere Relevanz um sicherzustellen, dass die therapeutische Dosis von CUR nur zytotoxisch auf RMS-Zellen, nicht jedoch auf gesundes Gewebe wirkt.

Die Standardchemotherapie hat einen konzentrationsabhängigen, zytotoxischen Effekt auf aRMS- und eRMS-Zelllinien

In einem Xenograft-Modell mit immunsupprimierten Mäusen untersuchten Houghton et al. die Wirkung verschiedener etablierter und nicht etablierter Zytostatika beim kindlichen RMS. Unter anderem wurde dabei die Zelllinie RD als Beispiel für eine gut etablierte und häufig untersuchte Zelllinie für das eRMS genutzt.

Chemosensibel zeigte sich diese Zelllinie hierbei lediglich auf die Therapeutika VCR und Cyclophosphamid, nicht jedoch auf die Therapeutika DAC, Doxorubicin und andere [133]. Eine weitere Studie konnte zwar eine Induktion der Differenzierung von eRMS-Zellen *in vitro* anhand der Zelllinie RD nachweisen, jedoch ebenfalls eine Induktion chemoresistenter RD-Zellen bei Anwendung von DAC in niedriger Dosierung [134]. Da diese Ergebnisse jeweils aus *in vitro* und *in vivo* Studien stammen, ist zu bedenken, dass zwar eine gewisse Korrelation hergestellt werden kann. Jedoch ist die direkte Vergleichbarkeit, aufgrund des weitaus komplexeren Mechanismus der *in vivo*-Absorption eines Medikamentes, eingeschränkt [135].

In unserer Studie präsentierten sich die RMS-Zellen, besonders die Zelllinien RH30 und RD, insgesamt sensitiv auf geringe Konzentrationen VCR und benötigten deutlich höhere Konzentrationen des Zytostatikums DAC. Hingegen zeigte sich die Zelllinie SRH sensitiver gegenüber letzterem. Die Effekte waren auch hier dosis- und zeitabhängig mit guten Ergebnissen ab einer Behandlungsdauer von 48 h. Die IC₅₀-Konzentrationen der aRMS-Zelllinie RH30 lagen unter optimaler Behandlungsdauer (72 h) mit VCR bei 1,0 nM und DAC bei 1,9 nM. Die eRMS-Zelllinie RD demonstrierte höhere IC₅₀-Werte von 2,0 nM für die VCR-Behandlung über 72 h und 3,3 nM für die DAC-Anwendung über 48 h. Die spinzelzellige Variante SRH wies IC₅₀-Konzentrationen von 3,9 nM bei DAC und 13,8 nM bei VCR-Behandlung für 72 h auf.

Sehr ähnliche Ergebnisse zeigten auch Kang et al. in ihrer Untersuchung der Wirkung von VCR auf etablierte RMS-Zelllinien wie RD und RH30. Dabei konnte für RD-Zellen ein absoluter IC₅₀ von 1,3 nM und für RH30-Zellen von 0,3 nM unter 96-stündiger VCR-Behandlung bestimmt werden [136]. Während die IC₅₀-Konzentrationen der Zelllinie RD unseren Ergebnissen entsprach, was einen Hinweis auf eine mögliche Verkürzung der Behandlungsdauer geben könnte, waren RH30-Zellen etwas sensitiver bei längerer Inkubation. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die längere Verdopplungszeit von RH30-Zellen (37 h) gegenüber RD-Zellen (23 h) sein [136]. Diese sollte in zukünftigen Viabilitäts-Assays mit einer Anpassung der Inkubationsdauer berücksichtigt werden. Verglichen mit den

Zytostatika zeigten sich in dieser Studie die beiden Zelllinien RH30 und RD generell sensitiver auf die Behandlung mit CUR [82].

Die Kombination von CUR mit VCR oder DAC verstärkt die zytotoxischen Effekte der Behandlungen mit Zytostatika oder CUR alleine bei RMS-Zelllinien

Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe von CUR mit den Standard-Zytostatika VCR und DAC sowohl die notwendige Konzentration von CUR als auch die der eingesetzten Zytostatika senkte. Diese Ergebnisse waren bei allen Zelllinien ab einer Behandlungsdauer von 48 h signifikant und konnten, für die Zelllinien RH30 und RD bei VCR- und für die Zelllinie RD ebenfalls bei DAC-Behandlung, mit einer längeren Inkubation noch gesteigert werden. Die IC₅₀-Werte von CUR konnten bei kombinierter Gabe von CUR und VCR bei allen Zelllinien in etwa um 2/3 gesenkt werden, wobei lediglich bei der Zelllinie SRH hohe Konzentrationen an VCR verwendet wurden. Besonders effektiv erwies sich in diesem Sinne auch die Kombinationsbehandlung mit CUR und DAC bei den eRMS-Zellen, sodass die IC₅₀-Konzentrationen bei RD-Zellen nur noch die Hälfte und bei SRH-Zellen sogar nur etwa ein Drittel nach optimaler Behandlungszeit betragen. Die aRMS-Zelllinie RH30 hingegen zeigte – weniger ausgeprägt bei dieser Kombination – lediglich eine Reduktion um das 0,8-fache des IC₅₀-Wertes der Behandlung mit CUR.

Ähnliche Zytostatika-sparende Effekte durch Kombination mit CUR wurden bereits in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe mit den Zelllinien HC-AFW1 und HepG2 beim hepatozellulären Karzinom und der Chemotherapie mit Cisplatin und Doxorubicin gezeigt [137]. Während in jener Arbeit die IC₅₀-Konzentrationen der Zytostatikabehandlung und die additiven Effekte von CUR näher beleuchtet wurden, diente unsere Studie vorwiegend dazu, die möglichst niedrige CUR-Konzentration *in vitro* zu detektieren. Beleuchtet man nämlich die erreichbaren Serumkonzentrationen von CUR, so ließen sich in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe mit Mäusen max. Serumkonzentrationen von 2-3 µM nach oraler Gabe von mizellarem CUR messen [39]. Verglichen mit den benötigten IC₅₀-Werten, die bei uns *in vitro* bestimmt wurden, sind diese erreichten Serum-

konzentrationen ausgesprochen niedrig [82]. Jedoch führten bereits diese niedrigen Konzentrationen in dem beschriebenen Tumormodell unserer Arbeitsgruppe zu einer signifikanten Wachstumsinhibition [39, 82]. Auch in einem Xenotransplantat-Modell mit resistenten Kolonkarzinomzellen in Mäusen zeigte die Kombination aus CUR und VCR eine signifikante Wachstumshemmung [138]. Dieses Xenograft-Modell für kindliche Lebertumoren sowie die Zellkulturergebnisse dieser Studie auf ein *in vivo* Mäusemodell für RMS zu übertragen, ist daher ein weiteres Ziel unserer Arbeitsgruppe [82].

Aufgrund der signifikanten Ergebnisse bei den Zelllinien RD und RH30 und da diese Zelllinien als bereits etabliert und gut untersucht für das eRMS und aRMS gelten, wurden die anschließenden Versuche mit diesen Zelllinien fortgeführt. Für nachfolgende Untersuchungen wäre es jedoch von Vorteil weitere fusionspositive und –negative Zelllinien zu nutzen [82]. Da CUR laut verschiedener Untersuchungen chemoprotektive Effekte wie die Verminderung der VCR-induzierten Polyneuropathie besitzt [139, 140], wäre es außerdem in weiteren Analysen von Vorteil, die Verminderung der IC₅₀-Konzentrationen der etablierten Chemotherapeutika beim RMS unter CUR-Behandlung zu bestimmen.

Um das Potential der Kombination von CUR mit dem jeweiligen Chemotherapeutikum zu untersuchen, wurde für unsere Veröffentlichung dieser Studienergebnisse der Koeffizient der Medikamenteninteraktion (CDI) bestimmt [82]. Für eine konkretere Aussage zur Art der Medikamenteninteraktion zwischen CUR und den hier verwendeten Standardzytostatika wären hingegen neue Versuchsreihen mit umfangreichen Konzentrationen beider Substanzen nötig. Da unsere Datenlage begrenzt war wurde das Bliss-Independence-Modell genutzt, um zumindest näherungsweise Aussagen über synergistische oder additive Interaktionen im Rahmen einiger unserer Ergebnisse treffen zu können. Hierfür wurde die Berechnung $CDI = (A + B - A \times B) / AB$ genutzt, wobei AB das Verhältnis des Effektes von der Kombination der Medikamente zur Kontrolle beschreibt. A oder B gibt das Verhältnis des Effektes der Einzelbehandlung zur Kontrollgruppe an. CDI Werte < 1 sprechen für einen synergistische, = 1 für additive und > 1 für antagonistische Wirkung der Kombinationsbehandlung [141, 82]. Bestimmt wurde der Koeffizient für die Zelllinien RH30 und RD und die Kombinationsbehandlungen aus CUR mit

VCR und CUR mit DAC für 48 und 72 h. Hiermit konnte bestätigt werden, dass zwischen ersterer Kombination für beide Zelllinien zu jedem Behandlungszeitraum synergistische Effekte bestanden. Die Kombination mit DAC zeigte bei der Zelllinie RD antagonistische und der Zelllinie RH30 synergistische Effekte [82]. Hiermit konnte erstmalig, nach unserem Wissensstand, für das RMS die potentiell Chemotherapie-sparende Wirkung von CUR nachgewiesen werden.

Die Kombinationsbehandlung mit PDT vervielfacht die Effekte der alleinigen Gabe von CUR bei RMS-Zelllinien

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, liegt die Hoffnung in der Anwendung von CUR in Kombination mit blauem Licht – als PDT nach Tumorresektion – darin in Zukunft unsichtbare Mikrometastasen, ohne umliegendes gesundes Gewebe zu zerstören, beseitigen zu können [82].

In dieser Studie konnten wir erstmals, nach unserem Wissensstand, die Effizienz der PDT mit CUR für das RMS in Zellkultur nachweisen. Dabei ließ sich ein stark zytotoxischer Effekt der Kombinationsbehandlung bei beiden RMS-Zelllinien RD und RH30 feststellen. Entsprechend den Ergebnissen des CUR-Influx wurde der zeitliche Abstand zur PDT mit 1 h festgelegt. Diese schnelle Aufnahme von CUR in die Zelle passte zu dem schnellen Metabolismus von CUR mit geringen Plasmaspiegeln *in vivo* [137].

Durch den Einsatz der PDT wurde die Wirkung von einer niedrig-dosierten und kurzzeitigen – normalerweise nicht signifikanten – CUR-Behandlung signifikant zytotoxisch. Diese Effektpotenzierung durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht, wurde *in vitro* bereits in diversen Tumorstudien nachgewiesen [142, 143]. In unserer Studie waren die IC₅₀-Werte dabei 7- bis 8-fach (RH30, RD) niedriger als bei der CUR-Behandlung ohne PDT. Die niedrigen Konzentrationen von CUR könnten die Problematik der bereits erwähnten notwendigen, hohen Plasmaspiegel von CUR *in vivo* lösen. Ähnliche Resultate wurden bereits in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe mit einem bis zu 20-fach stärkeren, inhibitorischen Effekt von CUR auf pädiatrische Lebertumoren, bei nahezu gleichen Versuchsbedingungen, nachgewiesen [39]. Der zugrunde liegende Mechanismus der PDT wird in der Bildung von ROS gesehen und konnte in diversen Studien mit erhöhter

ROS-Bildung belegt werden [39, 144]. Um den biochemischen Mechanismus dieser Therapie besser nachzuvollziehen, wäre die Detektion von ROS unter der PDT mit CUR beim RMS in weiteren Untersuchungen notwendig. Zudem konnte in unserer Studie kein signifikant zytotoxischer Effekt der Behandlung mit PDT auf Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden, der dem von RMS-Zellen entspräche. Es lässt darauf schließen, dass bei Anwendung dieser Therapietechnik *in vivo*, umliegendes gesundes Gewebe nicht gefährdet werden würde. Wichtig für die Etablierung der PDT mit CUR in der Klinik wäre zunächst der Transfer *in vivo*, wie es z. B. in unserer Arbeitsgruppe an einem orthotopen Mäusemodell bereits geplant wird [82].

2. Die Behandlung mit CUR und VCR vermindert das Migrationspotential von RMS-Zelllinien

In der Analyse des Wound Healing Assay konnte bei beiden RMS-Zelllinien eine zeitabhängige, signifikante Senkung des Migrationspotentials durch die Kombinationsbehandlung von CUR und VCR dargestellt werden. Bemerkenswerterweise ergaben bei der Zelllinie RD in unserer Studie bereits Konzentrationen deutlich unter dem ermittelten IC50-Wert eine effektive Inhibition der Migration. Bei der eRMS-Zelllinie war die Kombinationsbehandlung, bezüglich einer verminderten Migration, der Behandlung mit CUR überlegen, bei der aRMS-Zelllinie hingegen der Behandlung mit VCR. Dies ist in dem Sinne überraschend, da sich die aRMS-Zellen in Viabilitäts-Assays sensitiver gegenüber der Behandlung mit VCR zeigten [82, 136] und gibt Hinweise auf andere, bisher unbekannte molekulare Mechanismen von CUR, welche weiterer Untersuchung bedürfen. Die Ergebnisse der effektivsten Behandlungszeit von 30 h (RD) bzw. 48 h (RH30) lassen sich gut im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Zellteilungsraten der RMS-Zelllinien erklären, wobei die Verdopplungszeit von RD-Zellen bei 23 h und die von RH30 bei 37 h liegt [136]. Roma et al. verwendeten ebenfalls die Zelllinie RH30 im Wound Healing Assay und zeigten bei gleichen Aufnahmezeiten ohne Behandlungserfolg eine qualitativ ähnliche Migration der Zellen [145]. Sie wiesen außerdem eine Korrelation zwischen dem Notch-Signalweg und der Invasivität sowie Mobilität von RMS-Zelllinien nach [145]. Bereits andere Studien belegten,

dass CUR den Notch-1-Signalweg in Tumoren wie dem Prostatakarzinom und dem Osteosarkom, inhibiert [146, 147].

In dieser Studie wurde keine molekulare Ursache der Inhibition der Migration untersucht, jedoch wäre die Analyse der Notch-Signalproteine für die Zukunft eine lohnenswerte Untersuchung. Die Ergebnisse unserer Untersuchung sehen wir als relevant, da die gerichtete Migration ein Bestandteil der Metastasenbildung ist [148] und die meisten Patienten bei einem Rückfall des RMS unter einem Lokalrezidiv leiden [82]. CUR als potentieller Regulator des Metastasierungspotentials vom RMS wäre ein erfolgversprechendes Medikament, um Rückfälle in Zukunft zu vermeiden.

3. CUR führt zur Abnahme des Koloniebildungspotentials bei RMS-Zelllinien

Ein weiterer Ansatz zur Einschätzung des Metastasierungspotentials von RMS-Zellen sowie zur Abschätzung der Effektivität der zytotoxischen Therapie mit CUR war in dieser Studie der CFA. Hier ließ sich bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen an CUR sowohl bei aRMS- als auch eRMS-Zellen eine konzentrationsabhängige, signifikante Verminderung der Koloniebildungsrate feststellen. Bemerkenswert ist der unterschiedliche zytotoxische Effekt verglichen mit den IC50-Konzentrationen der Viabilitäts-Assays – mit vielfach niedrigeren CUR-Konzentrationen im CFA. Zwar stellt ersterer eine Hauptkomponente zur Ermittlung der Effektivität einer zytotoxischen Behandlung dar, jedoch lässt der CFA Hinweise darauf zu, dass selbst niedrige Konzentrationen eines Medikamentes bereits Einflüsse auf Zellen – hier in Bezug auf Koloniebildung und damit Metastasierungspotential – haben können [82]. Ähnliche Ergebnisse der Inhibition der Koloniebildung, mit einer zehnfach geringeren CUR-Konzentration als der IC50-Wert, wurde auch bei Glioblastom-Stammzellen beobachtet [149]. Eine mögliche Hypothese hierfür könnte sein, dass CUR einen spezifischen Effekt auf Ziel-Membranproteine im Piko- bis Nanomolarbereich hat und unspezifische Effekte auf andere Membranproteine bei höherer Dosierung, welche mit einer anderen Pharmakologie einhergehen [150, 151].

Als Weiterentwicklung dieser Studie wäre es interessant, den Einfluss der Kombination von CUR und VCR auf die Koloniebildungsfähigkeit von RMS-Zellen zu

erforschen, da auch VCR in Studien einen deutlichen Effekt auf RH30- und RD-Zellen zeigte [152].

4. Die Eigenfluoreszenz von CUR stellt ein geeignetes Instrument zur Darstellung von zeitlichem Influx und Efflux bei RMS-Zelllinien dar

Ein großes Problem für den Einsatz von CUR als Tumormedikament stellt die geringe Bioverfügbarkeit dar. Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt sind dafür u. a. eine eingeschränkte Gewebedistribution Ursache [53]. Es wurden verschiedene Untersuchungen in dieser Studie durchgeführt, um die Mechanismen der Distribution von CUR zeitlich und räumlich *in vitro* bei RMS-Zelllinien zu visualisieren. Hierfür wurde die Eigenfluoreszenz von CUR in der Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz genutzt.

Mittels Durchflusszytometrie wurde für die aRMS-Zelllinie RH30 zuerst festgestellt, dass sich die Eigenfluoreszenz von CUR in Kanälen wie PE und FITC sowie besonders ausgeprägt in den ultravioletten Kanälen darstellen lässt und dementsprechend auch Störfaktor dieser Kanäle sein kann. Dies ergab ein Haupt-Fluoreszenzspektrum von CUR zwischen 420 bis 578 nm, wobei die Fluoreszenz in den aRMS-Zellen überwiegend zwischen 510 und 578 nm lag. Diese Ergebnisse bekräftigen die von Tsaplev et al. bestimmten Fluoreszenzwerte von in DMSO gelöstem CUR mit einem Emissionsmaximum bei 580 nm [153]. Ergänzend hatten Kunwar et al. festgestellt, dass die Aufnahme von CUR in Zellen auch dessen Fluoreszenzspektrum verändern kann, da dieses sehr sensitiv für spezifische Umgebungsbedingungen wie z. B. verschiedene Protein- und Lipidkomponenten ist [154]. Diese Ergebnisse legen nahe, für jede neue Zelllinie ein spezifisches Fluoreszenzspektrum anzulegen, bevor weitere Versuche oder eine PDT durchgeführt werden. Als weitere Konsequenz wurden für nachfolgende Versuche der Durchflusszytometrie Antikörper genutzt, welche keine Störsignale in den beschriebenen Kanälen verursachen.

Ebenso ließen sich die Ergebnisse der Influx-Efflux-Messung als zeitlicher Verlauf von CUR-Aufnahme und -Abgabe in RMS-Zellen interpretieren. Die aRMS-Zelllinie RH30 zeigte hierbei eine schnelle Aufnahme von CUR und späte Ab-

gabe, erst nach 48 h. Hingegen wies die eRMS-Zelllinie RD zwar auch eine zügige Aufnahme von CUR, jedoch ebenfalls eine schnelle Abgabe vier Stunden später auf. Die rasche zelluläre Aufnahme von CUR innerhalb von ein bis zwei Stunden in unserer Arbeit ist stimmig mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen eine Inkubationszeit von einer halben bis zwei Stunden bereits ausreichte, um die max. zelluläre Aufnahme zu erreichen [155, 154]. Die lange intrazelluläre Verweildauer von CUR in aRMS-Zellen könnte zu einer intrazellulären Akkumulation von dieser Substanz führen und damit das bessere Ansprechen in den Viabilitäts-Assays sowie die Abhängigkeit der Behandlungseffizienz zur -dauer erklären. Ebenso könnte der bereits untersuchte konzentrationsabhängige Effekt der zellulären Aufnahme von CUR [154] zu diesem Unterschied zwischen den Zellen geführt haben, da aRMS-Zellen stärkere Effekte bei niedrigerer Konzentration im Vergleich zu eRMS-Zellen zeigten. Wie Kunwar et al. bereits zeigten, nahmen Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen drei- bis achtmal so viel CUR auf, was eventuell den Effekt der niedrigen oralen Bioverfügbarkeit kompensieren könnte, da sich die zirkulierende Substanz vorzugsweise in Tumorgewebe ansammelt [154]. Mittels neuer Transportsysteme wie Micellen, lässt sich dieser Effekt auch auf andere Organsysteme ausweiten, wie in einer *in vivo* Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, bei der signifikante Werte an CUR in Blut, Organlysaten und Tumorgewebe gefunden werden konnten [137]. Diese Kombination aus mizellarem CUR und generell erhöhter Aufnahme ins Tumorgewebe lässt sich möglicherweise in Zukunft in der PDT als lokaltherapeutische Maßnahme zunutze machen, um besonders Tumorrestgewebe, angereichert mit dem Photosensibilisator CUR, zu zerstören und umliegendes gesundes Gewebe zu schonen [82].

Mittels zweiphasiger Immunfluoreszenzaufnahme konnten wir in dieser Studie einen ersten qualitativen Überblick über die räumliche Verteilung von CUR in RH30-Zellen, als Beispiel für das aRMS, geben. Auch hier zeigte sich die stärkste Intensität, verteilt über die ganze Zelle mit einer perinukleären Verstärkung, nach einstündiger CUR-Behandlung. Nach 48 h machte sich außerdem eine Kernfragmentierung bemerkbar, welche Hinweise auf die Einleitung von Apoptose oder Nekrose geben könnte. Da die Untersuchung qualitativ durchgeführt wurde und

zudem das Phenolrot des Zellkulturmediums ebenfalls im FITC Kanal emittierte, sind diese Ergebnisse lediglich ein Hinweis auf mögliche Verteilungsmuster von CUR intrazellulär in aRMS-Zellen. Eine Differenzierung zwischen Zellmembran und Zytosol lässt sich dabei kaum nachweisen. Auch in anderen Studien ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster von CUR mit absteigender Häufigkeit an der Zellmembran, dem Zytoplasma, dem Zellkern und den Mitochondrien sowie eine Intensität, die nach kurzer Zeit ihr Maximum erreichte und im zeitlichen Verlauf absank [154]. Sun et al. hatten ebenfalls eine schnelle Aufnahme von CUR in Tumorzellen mittels Fluoreszenzmikroskop feststellen können, mit einem Maximum nach bereits 10 min und einem vollständigen Auswaschen nach 12 h [155].

Die Verteilung von CUR über die Zeit in verschiedenen Zellkompartimente [154], könnte in nachfolgenden Studien entweder mittels Live Cell Imaging-Technik oder Aufnahmen mehrerer Behandlungszeiträume nachverfolgt werden, um eventuell eine sehr frühe Anreicherung an die Zellmembran zu detektieren, die für CUR als lipophiles Molekül typisch wäre. Die Fragmentierung der Zellkerne und eine generelle Abnahme der Zelldichte sind typische Veränderungen durch Apoptose, welche sich durch weitere fluoreszenzmikroskopische Färbungen (z. B. Hoechst Staining) spezifisch darstellen lassen könnten [156]. Dies wäre eine Weiterentwicklung dieses Versuchsaufbaus und für einen besseren Nachweis der Apoptoseinduktion, neben der Ausweitung auf andere RMS-Zelllinien und der Verwendung von phenolrot-freiem Zellkulturmedium für zukünftige Untersuchungen empfehlenswert.

5. CUR besitzt ein geringes Potential zur Resistenzbildung bei RMS-Zelllinien

Die sog. MDR ist auch beim RMS ein bekanntes Phänomen [18, 157], dessen Entstehung vielfältige Ursachen wie u. a. ein gesteigerter Medikamentenausstrom, Änderung der Medikamenten-Ziele, Resistenz gegenüber Apoptose, epigenetische Veränderungen oder Vorhandensein von Tumorstammzellen haben kann [158]. Für das RMS konnten u. a. für die Zelllinien RD und RH30 eine gesteigerte MDR für VCR, bedingt durch eine p53-Mutation oder Veränderungen der ABC Proteine P-GP, MRP und LRP, belegt werden, welche abhängig vom

histologischen Subtyp ist [159, 157, 160]. CUR zeigte hierbei in diversen Studien bereits eine Erhöhung der Chemosensitivität durch positiven Einfluss auf eine Vielzahl der genannten MDR-Mechanismen wie z. B. das Wiedererlangen der defekten Apoptosemechanismen, die Modulation von Medikament-Ziel-Interaktionen, die Beschränkung von überexprimierten Überlebens-Signalwegen sowie dem maßgeblichen Einfluss auf Tumorstammzellen [55]. In unserer Studie untersuchten wir, ob CUR unter Langzeitbehandlung ebenfalls das Potential der MDR-Induktion besitzt. Hierbei beobachteten wir bei beiden Zelllinien eine geringfügige Induktion einer Chemoresistenz mit 1,3-fach höheren IC50-Werten von CUR. Romiti et al. fanden eine ähnliche Abnahme der Zytotoxizität von CUR in ihrer Untersuchung mit Ratten-Hepatozyten, welche sich jedoch durch Kombination mit DMSO oder Verapamil vollständig reversibel zeigte [161]. Eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse könnte in der Fähigkeit von CUR zur P-GP Bindung liegen, die eine Medikamentenresistenz indizieren kann [161].

In weiterführenden Studien wäre es spannend, die beobachtete Resistenzentwicklung von CUR auch *in vivo* zu untersuchen, um einer MDR von CUR entgegenzuwirken. Die bisherigen Daten sprechen jedoch vorwiegend für eine generelle Abnahme der MDR von Chemotherapeutika wie u. a. VCR durch die Kombination mit CUR [162, 158].

6. CUR und die Kombination mit den Standardzytostatika VCR und DAC führt zur Apoptoseinduktion und Chemosensitivität bei RMS-Zelllinien

Wie bereits erwähnt hat neben der Modulation der ABC-Transporter auch die Resistenz gegen Apoptose einen maßgeblichen Anteil an der Entwicklung einer MDR und ist daher ein typisches Merkmal von RMS mit schlechtem Therapieansprechen [163]. Die Induktion von Apoptose durch bereits geringe Konzentrationen von CUR konnten wir in dieser Studie zeigen. Mehr noch zeigten weder VCR noch DAC in niedrigen Konzentrationen eine signifikante Apoptoseinduktion. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass die Kombination von CUR mit den Zytostatika VCR bzw. DAC zu einem zusätzlichen Anstieg des Apoptosemarkers führte [82], welcher der Behandlung mit VCR/DAC statistisch überlegen war. Besonders sensitiv zeigte sich die eRMS-Zelllinie RD auf die Kombination mit VCR,

was erwarten lässt, dass das bereits beschriebene, geringere Ansprechen dieses histologischen Subtyps [136] durch CUR verbessert werden könnte. Die Induktion von Apoptose als eine antikanzerogene Eigenschaft von CUR, wurde bereits mehrfach bei verschiedenen soliden Tumoren sowie bei den RMS-Zelllinien RH30 und RH1 beobachtet [82, 131, 164-166]. Während Beevers et al. einen proapoptotischen Effekt von CUR bei einer Konzentration von 20 μM beschrieben, konnten wir in dieser Studie ähnliche, konzentrationsabhängige Effekte bereits ab ca. der Hälfte (RD) bzw. ein Drittel (RH30) der o. g. CUR-Dosis nachweisen [131, 82]. Als Vergleich konnte in dieser Studie kein Anstieg des Apoptosemarkers durch CUR bei humanen Skelettmuskelzellen festgestellt werden, was mit den Ergebnissen von klinischen Studien, in denen keine Toxizität von CUR nachgewiesen werden konnte, übereinstimmt [61, 62].

Eine Limitation unseres Apoptose-Assays war die eingeschränkte Nutzung des Nekrosemarkers Propidiumiodid (PI) aufgrund einer Überlappung der Emissionen von CUR und des PI-Farbstoffes im PE-Kanal [82]. Dadurch konnte keine Differenzierung von Apoptose und Nekrose dargestellt werden, was jedoch von Relevanz wäre, da eine erhöhte Nekrosebildung mit der Gefahr eines Tumorlysesyndroms einhergehen könnte [167] und daher auch bei neuen Therapiekombinationen vermieden werden sollte. Ein weiterer Faktor, der in dieser Studie nicht weiterverfolgt wurde, ist der molekulare Mechanismus, welcher der Apoptoseinduktion durch CUR zugrunde liegt. Interessant wären hierbei molekulare Ziele wie Expression der ABC-Transporter (z. B. MDR1), Einfluss auf pro- und antiapoptotische Proteinexpression (z. B. Bcl-2, Bax) sowie ein möglicher Einfluss auf die p53-Regulation und Modulation von Signalwegen und Tumorstammzellen, da diese bereits in diversen Studien untersucht und die Ergebnisse in diesem aktuellen Review zusammengefasst wurden [158]. In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe wurde bereits der Einfluss von CUR auf den NF- κ B-Signalweg bezüglich einer Apoptosemodulation untersucht und zeigte eine verminderte Genexpression in der RT-PCR bei kindlichen epithelialen Lebertumoren [137]. Die oben erwähnten möglichen Targets sollen in nachfolgenden Studien weiter untersucht werden.

7. CUR beeinflusst die für das RMS relevanten Zellsignalwege NF- κ B und WNT

Betrachtet man die Vorgänge der Homöostasis einer gesunden Skelettmuskelzelle sowie deren Entwicklung (Myogenese), lassen sich diverse, wichtige Zellsignalwege charakterisieren. Einer davon ist der MAPK-Signalweg, welcher zur Aktivierung der Differenzierung beiträgt und über den JNK-Signalweg die Proliferationsförderung antagonisiert. Ferner wird über Insulin/Insulin-like growth factor (IGF) I und indirekt über mTOR der PI(3)K/AKT-Signalweg aktiviert, der die Proteinsynthese und myotubuläre Hypertrophie anregt. Zusätzlich stimuliert auch der WNT-Signalweg die Myogenese, myogene Differenzierung und Muskelregeneration, u. a. vermittelt durch β -Catenin. Eine negative Rückkopplung erfolgt vorwiegend durch den Notch-Signalweg und laut neueren Untersuchungen ebenfalls durch den klassischen NF- κ B-Signalweg [168]. Es wird vermutet, dass das RMS, aufgrund seines myogenen Phänotyps und der Expression bestimmter Marker (MyoD, Myogenin), häufig vom Skelettmuskel abstammt [169, 170], sich jedoch der vollständigen Differenzierung entzieht [171]. Eine mögliche Ursache hierfür – beim aRMS – betrifft die Folgen der Pax 3 bzw. 7-FKHR-Fusion, da diese die terminale Muskeldifferenzierung fraktioniert unterdrückt [171]. Zusätzlich kommt es zu einer Resistenz gegenüber AKT [172] sowie einer Hemmung der Apoptose durch die Hochregulierung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-xl [173]. Für die terminale Differenzierung der Skelettmuskelzelle entscheidend ist der – als Hauptschalter fungierende – skelettmuskelspezifische Transkriptionsfaktor MyoD, welcher beim RMS typischerweise verändert ist [171]. Die Aktivierung von NF- κ B durch den Transkriptionsfaktor AKT [174] verstärkt die negative Regulation der myogenen Differenzierung zudem epigenetisch durch Verminderung der miR-29 Expression [175, 176]. In Anbetracht dieser Ergebnisse wurden in dieser Untersuchung zunächst die Signalwege der NF- κ B und WNT anhand der fusionspositiven aRMS-Zelllinie RH30 und der MyoD-positiven eRMS-Zelllinie RD untersucht.

NF- κ B ist ein ubiquitär vorliegender Transkriptionsfaktor, der eine bedeutende Rolle für das angeborene Immunsystem sowie Zellüberleben, -proliferation und -differenzierung einnimmt [168]. Dabei handelt es sich um eine Familie von dimeren Transkriptionsfaktoren, die von fünf Genen codiert wird: NF- κ B1 (p105/

p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB und c-Rel [177]. Die Aktivierung von NF- κ B wird durch den I κ B-Kinase-Komplex gesteuert, welcher entweder den klassischen (kanonischen) Signalweg über TNF- α einleitet oder mittels alternativem (nicht-kanonischem) Signalweg die Transkription von diversen anderen NF- κ B-Zielgenen fördert [168]. Aktivatoren von NF- κ B sind vielzählige Stimuli, u. a. Zytokine, Infektionen, Apoptoseinduktoren (Chemotherapeutika), Stress [178] sowie Wachstumsfaktoren und Kinasen [177]. Wie bereits beschrieben, ist NF- κ B ein elementarer Bestandteil der Muskel-Homöostase und spielt dabei insbesondere bei Pathologien der Muskelentwicklung eine wesentliche Rolle. So ist er in den eRMS-Zellen RD12 und RD18 auch nach Induktion der Differenzierung nicht herunterreguliert und korreliert damit z. B. mit dem Potential zur Metastasenbildung [179, 180].

In unserer Studie zeigte die NF- κ B-Expression lediglich nach langfristiger Inkubation bei den eRMS-Zellen eine leichte Abnahme unter Einfach- und Kombinationsbehandlung mit CUR. Auch Berger et al. konnten in ihrer Studie zur Untersuchung des Einflusses von NF- κ B auf die myogene Differenzierung von eRMS-Zellen keinen Effekt von CUR auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B feststellen und vermuten, dass dessen Effekte der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion anderen Ursprungs seien [179]. Auf der anderen Seite wurde der inhibitorische Effekt von CUR auf den NF- κ B-Signalweg schon vielfach belegt und in Studien zusammengefasst [35]. Dass dieser Signalweg in PAX3/7-FKHR-positiven Zellen aufgrund einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges hochreguliert und damit dysfunktional ist [181], könnte eine mögliche Ursache des fehlenden Ansprechens auf CUR bei den fusionspositiven RH30-Zellen sein. Auch Deeb et al. fanden eine fehlende Inhibition von NF- κ B durch CUR bei überexprimiertem, konstitutiv aktivem AKT1 [182]. Eine andere Ursache könnte in der Methodik bzw. der Wahl des untersuchten Zielmoleküls liegen, da auch die fusionsnegative Zelllinie RD nur eine geringe Veränderung des Expressionsmusters zeigte. Möglich wäre daher eine Untersuchung der verschiedenen Akteure des NF- κ B-Signalweges z. B. der Modulation von den inhibitorischen Proteinen I κ B- α , I κ B- β und I κ B- ϵ [179] oder Veränderungen der Expression von Zielgenen wie z. B. COX2, NOS

oder MMP-9 [35]. Eine alternative Methode wäre, neben dem Western Blot, auch die Messung der mRNA mittels RT-PCR.

Der WNT-Signalweg ist maßgeblich an der Skelettentwicklung beteiligt. Hauptakteur dieses Signalweges ist der multifunktionale nukleäre Transkriptionsfaktor β -Catenin, welcher in Zellumwandlung und Myogenese sowie Zellproliferation, -migration, und -tod involviert ist [124]. Seine Dysregulation wiederum beeinflusst Tumorinvasion und -metastasierung in diversen Tumoren, u. a. dem RMS [183, 124]. In Abwesenheit von WNT-Liganden liegt das zytoplasmatische β -Catenin gebunden innerhalb eines Multiproteinkomplexes („destruction complex“) vor, worin es mit APC und Axin interagiert und von der Caseinkinase 1 α und der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) phosphoryliert ist. Durch die Phosphorylierung wird es nachfolgend ubiquityliert und im Proteasom abgebaut, wodurch der zytosolische β -Catenin-Spiegel niedrig gehalten und die Expression von WNT-spezifischen Zielgenen im Kern unterdrückt wird [183]. Mutationen von Proteinen, welche für die Stabilität des β -Catenin sorgen (z. B. APC) können daher mit Tumorprogression vergesellschaftet sein [183]. Bei Anwesenheit von kanonischen WNT-Liganden transloziert Axin an die Plasmamembran und inaktiviert somit den „destruction complex“. β -Catenin wird hierdurch im Zytoplasma stabilisiert und verlagert sich in den Zellkern, wo es indirekt die Expression der WNT-Zielgene aktiviert [183, 184]. Diese sind z. B. Cyclin D1, c-Myc und Matrix-Metalloproteasen [185]. Der hemmende Einfluss von CUR auf den Schlüssel-Transkriptionsfaktor β -Catenin wurde bereits bei einigen Tumorarten (z. B. kolorektales Karzinom, Prostatakarzinom, Mammakarzinom und Osteosarkom) untersucht und als potentiell Target zur Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung in der Tumorthherapie deklariert [186-189]. Annavarapu et al. beleuchteten die zentrale Rolle des WNT-Signalweges, mit dessen Hauptakteuren β -Catenin, GSK-3 β , Axin-1, LRP-6 und Cadherinen, u. a. auch bei den RMS-Zelllinien RD und RH30 [124]. Ob der WNT-Signalweg im RMS wirklich überexprimiert ist, steht im Konflikt verschiedener Quellen, welche diesen z. B. für das eRMS entweder belegen oder widerlegen [190, 191].

Auch in unserer Studie manifestierte sich – ausgeprägt nur bei langfristiger Inkubation von CUR alleine – eine konzentrationsabhängige Abnahme der β -Catenin-

Expression bei beiden RMS-Zelllinien RD und RH30. Bei letzterer verstärkte sich dieser Effekt außerdem durch die Kombination mit VCR. Die inhibitorische Wirkung von CUR auf β -Catenin zeigten ebenfalls Prasad et al. beim Mamma-Karzinom, wobei hier wesentlich höhere Konzentrationen von CUR mit 20 μ M genutzt wurden, bei signifikanter, zeitabhängiger Reduktion der Proteinexpression ab einer Inkubation von 3 bis 6 h [189]. Die nahezu halbierte CUR-Konzentration in unserer Studie könnte die Notwendigkeit einer längeren Behandlungszeit zur Modifikation der Proteinexpression dieses Signalweges erklären. Das minimale Ansprechen der Zelllinie RD unter Kombinationsbehandlung bereits nach 2 h gibt hierfür einen möglichen Hinweis. Leow et al. untersuchten die Wirkung von CUR ebenfalls nach 24 h, mit der hohen Konzentration von 20 μ M bei Osteosarkomzelllinien, und fanden neben einer konzentrationsabhängigen Verminderung der β -Catenin-Expression zusätzlich heraus, dass diese Verminderung lediglich das nukleäre β -Catenin betraf [188]. In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe fand sich unter CUR-Behandlung ebenfalls ein Shift von β -Catenin aus dem Nukleus in Zytoplasma und Zellmembran in der Konfokalmikroskopie bei höheren Konzentrationen CUR sowie eine Abnahme der β -Catenin-mRNA in der RT-PCR bereits unter niedrigerer Konzentration von CUR bei HepG1 Zellen [137]. Diese Spezifizierung wurde in unserem Fall nicht durchgeführt, könnte aber für zukünftige Untersuchungen interessant sein.

Die Ergebnisse dieser Studie sind insofern relevante Ergebnisse, da die Wirkung von CUR auf den WNT-Signalweg beim RMS nach unserem Wissenstand hier erstmals untersucht wurde. In nachfolgenden Untersuchungen sollen daher weitere Zielmoleküle dieses Signalweges wie Cadherine, Axin-1/2 oder LPR6 näher betrachtet werden [124]. Außerdem sollte der Effekt von CUR als hemmend oder aktivierend auf die WNT-Expression anhand weiterer RMS-Zelllinien untersucht werden.

Dank dieser Vorversuche konnten erste Effekte von CUR auf diese – besonders für die fehlende Differenzierung der RMS-Zellen – relevanten Signalwege WNT und NF- κ B nachgewiesen werden und sollen daher in zukünftigen Untersuchungen weiterverfolgt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie zeigen, dass bereits die Behandlung mit CUR zu einer effektiven Abnahme der Zellviabilität von RMS-Zelllinien führt. Dies zeigte sich sowohl für das alveoläre als auch das embryonale Rhabdomyosarkom bei den Zelllinien RH30, RD und SRH. Die zytotoxischen Effekte waren konzentrationsabhängig und, je nach Zellteilungsrate, unterschiedlich abhängig von der Behandlungsdauer sowie mit besonders niedrigen IC50-Werten bei der aRMS-Zelllinie assoziiert. Erstaunlicherweise zeigten sich bezüglich einer Senkung der Viabilität zwei von drei Zelllinien sensitiver auf die Behandlung mit CUR als auf die Behandlung mit den Standardchemotherapeutika. Durch die Kombination mit den Zytostatika VCR oder DAC – die beide bei alleiniger Gabe nur geringe zytotoxische Effekte aufwiesen – konnte die Zellviabilität zusätzlich deutlich gesenkt werden, wobei größtenteils synergistische Medikamenteninteraktionen impliziert werden. Damit ließ sich erstmalig nach unserem Wissensstand eine zytostatikaspärende Wirkung von CUR beim RMS *in vitro* nachweisen. Dies könnte zum einen den Vorteil chemopräventiver Effekte bieten, zum anderen eine Einsparung von hohen Dosen CUR, welche selbst in mizellarer Lösung nötig sind, um einen ausreichend hohen Blutplasmaspiegel zu erreichen.

Als Alternative zur Prävention von Lokalrezidiven hat sich die Kombinationsbehandlung aus CUR und PDT *in vitro* als höchst vielversprechend erwiesen. Hiermit konnte die CUR-Konzentration um das nahezu achtfache gesenkt werden, während die Behandlung an humanen Skelettmuskelzellen – bei gleicher CUR-Dosis – keine vergleichbaren, zytotoxischen Effekte zeigte.

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass CUR bereits in niedrigeren Konzentrationen als der IC50-Wert das Migrations- und Koloniebildungspotential vermindert. Da dies beides Mechanismen der Metastasenbildung und Tumorinvasivität sind, sind diese Ergebnisse besonders relevant für die Prävention von Tumorprogression und -rezidiven durch CUR als potentiell Therapeutikum. Die bis zu zehnfach niedrigeren CUR-Konzentrationen stellen einen alternativen Nachweis zytotoxischer Effekte dar, welcher sich pharmakologisch z. B. durch eine Interaktion mit Ziel-Membranproteinen erklären lassen könnte.

Um die Wirkung und Zielstrukturen von CUR besser nachvollziehbar zu machen, konnten wir in dieser Studie erfolgreich die Eigenfluoreszenz dieser Substanz in der Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz nutzen. Dabei ließ sich feststellen, dass die Aufnahme von CUR in die RMS-Zellen rasch erfolgt und bei den eRMS-Zellen ebenfalls rasch wieder ausgewaschen werden kann, während die Effluxmechanismen bei aRMS-Zellen langsamer ablaufen. Qualitativ präsentierte sich ein Verteilungsmuster von CUR im Zytosol und perinukleär bei aRMS-Zellen, nicht jedoch nukleär. Dies könnte bedeuten, dass die Wirkung von CUR über Membranproteine und zytosolische Proteine vermittelt wird und somit indirekt auf Translation und Transkription wirkt.

In dem *in vitro* Modell einer Langzeitbehandlung mit CUR ließ sich bei den Zelllinien RH30 und RD nur eine geringfügige Abnahme der Zytotoxizität – als Zeichen einer Resistenz gegenüber CUR – indizieren, die bei den eRMS-Zellen auch erst bei hohen Konzentrationen von CUR auftrat.

Weiterhin demonstrierten wir in dieser Studie die effektive Induktion von Apoptose durch CUR alleine und in Kombination mit den Zytostatika VCR und DAC bei den RMS-Zelllinien RD und RH30, welche einen möglichen Mechanismus für die Ergebnisse der Viabilitäts-Assays liefern und auch die Fähigkeit der Chemosensitivierung erklären könnten. Die alleinige Behandlung mit Zytostatika, sowie die Behandlung bei SKMC-Zellen, zeigten hingegen keine Induktion von Apoptose. In ersten Versuchen konnten wir als weitere molekulare Mechanismen den Einfluss von CUR auf einige der für die Tumorentstehung des RMS relevanten Signalwege bestätigen. Dies betraf die Signalwege NF- κ B und WNT, wobei es zu einer Abnahme der Proteinexpression von β -Catenin bei aRMS und eRMS-Zellen und geringfügig auch von NF- κ B bei eRMS-Zellen kam.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Miller, R. W., Young, J. L., Jr. & Novakovic, B. 1995. Childhood cancer. *Cancer*, 75, 395-405.
- 2 Kaatsch, P. 2010. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev*, 36, 277-85.
- 3 Wehkopf, T., Blettner, M., Dantonello, T., Jung, I., Klingebiel, T., Koscielniak, E., Luckel, M., Spix, C. & Kaatsch, P. 2008. Incidence and time trends of soft tissue sarcomas in German children 1985-2004 - a report from the population-based German Childhood Cancer Registry. *Eur J Cancer*, 44, 432-40.
- 4 <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/wichtigste-ergebnisse.html>. 2019. *Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse aus dem Jahresbericht 2019* [Online]. Available: <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/wichtigste-ergebnisse.html> [Accessed 15.09. 2022].
- 5 <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/auswertungen-im-detail/weichteilsarkome/rhabdomyosarkome/drms80d.html>. 2016. *RMS D Kinderkrebsregister 1980-2015* [Online]. Available: <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/auswertungen-im-detail/weichteilsarkome/rhabdomyosarkome/drms80d.html> [Accessed 17.09.2022].
- 6 Newton, W. A., Jr., Gehan, E. A., Webber, B. L., Marsden, H. B., van Unnik, A. J., Hamoudi, A. B., Tsokos, M. G., Shimada, H., Harms, D., Schmidt, D. & et al. 1995. Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification--an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer*, 76, 1073-85.
- 7 Dasgupta, R., Fuchs, J. & Rodeberg, D. 2016. Rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg*, 25, 276-283.
- 8 Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B. & Ross, J. A. 2009. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, 115, 4218-4226.
- 9 Pappo, A. S., Shapiro, D. N., Crist, W. M. & Maurer, H. M. 1995. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 13, 2123-39.
- 10 Raney, R. B., Walterhouse, D. O., Meza, J. L., Andrassy, R. J., Breneman, J. C., Crist, W. M., Maurer, H. M., Meyer, W. H., Parham, D. M. & Anderson, J. R. 2011. Results of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group D9602 Protocol, Using Vincristine and Dactinomycin With or Without Cyclophosphamide and Radiation Therapy, for Newly Diagnosed Patients With Low-Risk Embryonal Rhabdomyosarcoma: A Report From the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 1312-1318.
- 11 Sorensen, P. H., Lynch, J. C., Qualman, S. J., Tirabosco, R., Lim, J. F., Maurer, H. M., Bridge, J. A., Crist, W. M., Triche, T. J. & Barr, F. G. 2002. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 20, 2672-9.

- 12 Fredericks, W. J., Galili, N., Mukhopadhyay, S. N., Rovera, G., Bennicelli, J., Barr, F. & Rauscher, F. J. 1995. *Fredericks WJ, Galili N, Mukhopadhyay S, Rovera G, Bennicelli J, Barr FG, Rauscher III FJ*The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol Cell Biol* 15: 1522-1535.
- 13 Huh, W. W. & Skapek, S. X. 2010. Childhood Rhabdomyosarcoma: New Insight on Biology and Treatment. *Current Oncology Reports*, 12, 402-410.
- 14 Egas-Bejar, D. & Huh, W. W. 2014. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolesc Health Med Ther*, 5, 115-25.
- 15 Malempati, S. & Hawkins, D. S. 2012. Rhabdomyosarcoma: review of the Children's Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatr Blood Cancer*, 59, 5-10.
- 16 Crist, W. M., Anderson, J. R., Meza, J. L., Fryer, C., Raney, R. B., Ruymann, F. B., Breneman, J., Qualman, S. J., Wiener, E., Wharam, M., Lobe, T., Webber, B., Maurer, H. M. & Donaldson, S. S. 2001. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol*, 19, 3091-102.
- 17 Ma, X., Huang, D., Zhao, W., Sun, L., Xiong, H., Zhang, Y., Jin, M., Zhang, D., Huang, C., Wang, H., Zhang, W., Sun, N., He, L. & Tang, J. 2015. Clinical characteristics and prognosis of childhood rhabdomyosarcoma: a ten-year retrospective multicenter study. *Int J Clin Exp Med*, 8, 17196-205.
- 18 Chan, H., Thorner, P. S., Haddad, G. & Ling, V. 1990. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *Journal of Clinical Oncology*, 8, 689-704.
- 19 Dantonello, T. M., Int-Veen, C., Harms, D., Leuschner, I., Schmidt, B. F., Herbst, M., Juergens, H., Scheel-Walter, H. G., Bielack, S. S., Klingebiel, T., Dickerhoff, R., Kirsch, S., Brecht, I., Schmelzle, R., Greulich, M., Gadner, H., Greiner, J., Marky, I., Treuner, J. & Koscielniak, E. 2009. Cooperative trial CWS-91 for localized soft tissue sarcoma in children, adolescents, and young adults. *J Clin Oncol*, 27, 1446-55.
- 20 Hibbitts, E., Chi, Y. Y., Hawkins, D. S., Barr, F. G., Bradley, J. A., Dasgupta, R., Meyer, W. H., Rodeberg, D. A., Rudzinski, E. R. & Spunt, S. L. 2019. Refinement of risk stratification for childhood rhabdomyosarcoma using FOXO1 fusion status in addition to established clinical outcome predictors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer medicine*, 8, 6437-6448.
- 21 Seitz, G., Warmann, S. W., Vokuhl, C. O., Heitmann, H., Treuner, C., Leuschner, I. & Fuchs, J. 2007. Effects of standard chemotherapy on tumor growth and regulation of multidrug resistance genes and proteins in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatric surgery international*, 23, 431-439.
- 22 Dantonello, T. M., Stark, M., Timmermann, B., Fuchs, J., Selle, B., Linderkamp, C., Handgretinger, R., Hagen, R., Feuchtgruber, S., Kube, S., Kosztyla, D., Kazanowska, B., Ladenstein, R., Niggli, F., Ljungman, G., Bielack, S. S., Klingebiel, T. & Koscielniak, E. 2015. Tumour volume reduction after neoadjuvant chemotherapy impacts outcome in localised embryonal rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 62, 16-23.

- 23 Lager, J. J., Lyden, E. R., Anderson, J. R., Pappo, A. S., Meyer, W. H. & Breitfeld, P. P. 2006. Pooled analysis of phase II window studies in children with contemporary high-risk metastatic rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology*, 24, 3415-3422.
- 24 Mascarenhas, L., Lyden, E. R., Breitfeld, P. P., Walterhouse, D. O., Donaldson, S. S., Rodeberg, D. A., Parham, D. M., Anderson, J. R., Meyer, W. H. & Hawkins, D. S. 2019. Risk-based treatment for patients with first relapse or progression of rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer*, 125, 2602-2609.
- 25 Dantonello, T. M., Int-Veen, C., Schuck, A., Seitz, G., Leuschner, I., Nathrath, M., Schlegel, P. G., Kontny, U., Behnisch, W. & Veit-Friedrich, I. 2013. Survival following disease recurrence of primary localized alveolar rhabdomyosarcoma. *Pediatric blood & cancer*, 60, 1267-1273.
- 26 Chisholm, J. C., Marandet, J., Rey, A., Scopinaro, M., de Toledo, J. S., Merks, J. H., O'Meara, A., Stevens, M. C. & Oberlin, O. 2011. Prognostic factors after relapse in nonmetastatic rhabdomyosarcoma: a nomogram to better define patients who can be salvaged with further therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 1319-1325.
- 27 Hayes-Jordan, A., Doherty, D. K., West, S. D., Raney, R. B., Blakely, M. L., Cox Jr, C. S., Andrassy, R. J. & Lally, K. P. 2006. Outcome after surgical resection of recurrent rhabdomyosarcoma. *Journal of pediatric surgery*, 41, 633-638.
- 28 Cliff, J., Jorgensen, A. L., Lord, R., Azam, F., Cossar, L., Carr, D. F. & Pirmohamed, M. 2017. The molecular genetics of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 120, 127-140.
- 29 Clement, S., Schoot, R., Slater, O., Chisholm, J., Abela, C., Balm, A., Van Den Brekel, M., Breunis, W., Chang, Y. & Fajardo, R. D. 2016. Endocrine disorders among long-term survivors of childhood head and neck rhabdomyosarcoma. *European Journal of Cancer*, 54, 1-10.
- 30 Rao, A. D., Ladra, M., Dunn, E., Kumar, R., Rao, S. S., Sehgal, S., Dorafshar, A. H., Morris, C. D. & Terezakis, S. A. 2019. A road map for important centers of growth in the pediatric skeleton to consider during radiation therapy and associated clinical correlates of radiation-induced growth toxicity. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 103, 669-679.
- 31 Youn, P., Milano, M. T., Constine, L. S. & Travis, L. B. 2014. Long-term cause-specific mortality in survivors of adolescent and young adult bone and soft tissue sarcoma: a population-based study of 28,844 patients. *Cancer*, 120, 2334-2342.
- 32 Allegra, A., Innao, V., Russo, S., Gerace, D., Alonci, A. & Musolino, C. 2017. Anticancer Activity of Curcumin and Its Analogues: Preclinical and Clinical Studies. *Cancer Invest*, 35, 1-22.
- 33 <https://www.formulatehealth.com/>. 2020. *Turmeric Root and Turmeric Powder* [Online]. Wikimedia Commons: [formulatehealth](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Formulatehealth_turmeric.jpg). Available: <https://www.flickr.com/photos/189590028@N07/50396528903/> [Accessed 12.09. 2022].
- 34 Metzler, M., Pfeiffer, E., Schulz, S. I. & Dempe, J. S. 2013. Curcumin uptake and metabolism. *Biofactors*, 39, 14-20.

- 35 Aggarwal, B. B., Kumar, A. & Bharti, A. C. 2003. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer res*, 23, 363-398.
- 36 Gupta, S. C., Kismali, G. & Aggarwal, B. B. 2013. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors*, 39, 2-13.
- 37 Chignell, C. F., Bilskj, P., Reszka, K. J., Motten, A. G., Sik, R. H. & Dahl, T. A. 1994. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochemistry and photobiology*, 59, 295-302.
- 38 Dahll, T. A., Bilski, P., Reszka, K. J. & Chignell, C. F. 1994. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochemistry and photobiology*, 59, 290-294.
- 39 Ellerkamp, V., Bortel, N., Schmid, E., Kirchner, B., Armeanu-Ebinger, S. & Fuchs, J. 2016. Photodynamic Therapy Potentiates the Effects of Curcumin on Pediatric Epithelial Liver Tumor Cells. *Anticancer Res*, 36, 3363-72.
- 40 Koon, H., Leung, A. W., Yue, K. K. & Mak, N. K. 2006. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*, 25.
- 41 Das, K. C. & Das, C. K. 2002. Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (1O_2) quencher. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 62-66.
- 42 Toniolo, R., Di Narda, F., Susmel, S., Martelli, M., Martelli, L. & Bontempelli, G. 2002. Quenching of superoxide ions by curcumin. A mechanistic study in acetonitrile. *Annali di chimica*, 92, 281-288.
- 43 Shen, L. & Ji, H.-F. 2007. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67, 619-623.
- 44 Tønnesen, H. H., Karlsen, J., Adhikary, S. R. & Pandey, R. 1989. Studies on curcumin and curcuminoids XVII. Variation in the content of curcuminoids in *Curcuma longa* L. from Nenal during one season. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 189, 116-118.
- 45 Baum, L. & Ng, A. 2004. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *J Alzheimers Dis*, 6, 367-77; discussion 443-9.
- 46 Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K. & Aggarwal, B. B. 2011. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*, 28, 1937-1955.
- 47 Marcu, M. G., Jung, Y. J., Lee, S., Chung, E. J., Lee, M. J., Trepel, J. & Neckers, L. 2006. Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Med Chem*, 2, 169-74.
- 48 Fang, J., Lu, J. & Holmgren, A. 2005. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J Biol Chem*, 280, 25284-90.
- 49 Bera, R., Sahoo, B. K., Ghosh, K. S. & Dasgupta, S. 2008. Studies on the interaction of isoxazolcurcumin with calf thymus DNA. *International journal of biological macromolecules*, 42, 14-21.
- 50 Griesser, M., Pistis, V., Suzuki, T., Tejera, N., Pratt, D. A. & Schneider, C. 2011. Autoxidative and Cyclooxygenase-2 Catalyzed Transformation of the Dietary Chemopreventive Agent Curcumin*. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 1114-1124.

- 51 Wang, Y.-J., Pan, M.-H., Cheng, A.-L., Lin, L.-I., Ho, Y.-S., Hsieh, C.-Y. & Lin, J.-K. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15, 1867-1876.
- 52 Shen, L. & Ji, H.-F. 2012. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends in Molecular Medicine*, 18, 138-144.
- 53 Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A. & Aggarwal, B. B. 2007. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*, 4, 807-818.
- 54 Usta, M., Wortelboer, H. M., Vervoort, J., Boersma, M. G., Rietjens, I. M., van Bladeren, P. J. & Cnubben, N. H. 2007. Human glutathione S-transferase-mediated glutathione conjugation of curcumin and efflux of these conjugates in Caco-2 cells. *Chemical research in toxicology*, 20, 1895-1902.
- 55 Saha, S., Adhikary, A., Bhattacharyya, P., Das, T. & Sa, G. 2012. Death by design: where curcumin sensitizes drug-resistant tumours. *Anticancer Research*, 32, 2567-2584.
- 56 Gupta, S. C., Patchva, S. & Aggarwal, B. B. 2013. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal*, 15, 195-218.
- 57 Shah, B. H., Nawaz, Z., Pertani, S. A., Roomi, A., Mahmood, H., Saeed, S. A. & Gilani, A. H. 1999. Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor-and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca²⁺ signaling. *Biochemical pharmacology*, 58, 1167-1172.
- 58 Ammon, H. P. & Wahl, M. A. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*, 57, 1-7.
- 59 Hsieh, C. 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, 21, e2900.
- 60 Dhillon, N., Aggarwal, B. B., Newman, R. A., Wolff, R. A., Kunnumakkara, A. B., Abbruzzese, J. L., Ng, C. S., Badmaev, V. & Kurzrock, R. 2008. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical cancer research*, 14, 4491-4499.
- 61 Kanai, M., Yoshimura, K., Asada, M., Imaizumi, A., Suzuki, C., Matsumoto, S., Nishimura, T., Mori, Y., Masui, T. & Kawaguchi, Y. 2011. A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68, 157-164.
- 62 Suskind, D. L., Wahbeh, G., Burpee, T., Cohen, M., Christie, D. & Weber, W. 2013. Tolerability of curcumin in pediatric inflammatory bowel disease: a forced-dose titration study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 56, 277-9.
- 63 Spikes, I. 1985. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health science, RV Benssason. EJ Land, G. Jori and TG Truscott (eds.) pp. 124-144 In Primary photoprocesses in biology and medicine. Plenum Press New York.
- 64 Finsen, N. 1901. Phototherapy. Edward Arnold, London. A. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown and M. Reed (2001) *The History of Photodetection and Photodynamic Therapy*. *Photochem. Photobiol*, 74, 656-669.
- 65 Raab, O. 1900. Über die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. *Z. biol.*, 39, 524-546.
- 66 von Tappeiner, H. & Jodlbauer, A. 1907. *Die sensibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen: gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*, Vogel.

- 67 Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M. 1961. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *Journal of the National Cancer Institute*, 26, 1-11.
- 68 Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D. & Mittleman, A. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer research*, 38, 2628-2635.
- 69 Kelly, J. & Snell, M. 1976. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*, 115, 150-151.
- 70 Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. & Jain, R. K. 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3, 380-387.
- 71 Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J. & Peng, Q. 1998. Photodynamic Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90, 889-905.
- 72 Epstein, J. H. Phototoxicity and photoallergy. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 1999. 274-284.
- 73 Henderson, B. W. & Dougherty, T. J. 1992. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and photobiology*, 55, 145-157.
- 74 Moan, J. & BERG, K. 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*, 53, 549-553.
- 75 Henderson, B. W., Waldow, S. M., Mang, T. S., Potter, W. R., Malone, P. B. & Dougherty, T. J. 1985. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer research*, 45, 572-576.
- 76 Shumaker, B. & Hetzel, F. 1987. Clinical laser photodynamic therapy in the treatment of bladder carcinoma. *Photochemistry and photobiology*, 46, 899-901.
- 77 Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A. & Kessel, D. 2011. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61, 250-281.
- 78 Abrahamse, H. & Hamblin, Michael R. 2016. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473, 347-364.
- 79 Wen, X., Li, Y. & Hamblin, M. R. 2017. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 19, 140-152.
- 80 Yanovsky, R. L., Bartenstein, D. W., Rogers, G. S., Isakoff, S. J. & Chen, S. T. 2019. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 35, 295-303.
- 81 Haukvik, T., Bruzell, E., Kristensen, S. & Tønnesen, H. 2009. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, 666-673.
- 82 Sorg, C., Schmid, E., Bortel, N., Fuchs, J. & Ellerkamp, V. 2021. Antitumor effects of curcumin in pediatric rhabdomyosarcoma in combination with chemotherapy and phototherapy in vitro. *International Journal of Oncology*, 58, 266-274.

- 83 Wei, C. C., Ball, S., Lin, L., Liu, A., Fuchs, J. R., Li, P. K., Li, C. & Lin, J. 2011. Two small molecule compounds, LLL12 and FLLL32, exhibit potent inhibitory activity on STAT3 in human rhabdomyosarcoma cells. *Int J Oncol*, 38, 279-85.
- 84 Harati, K., Behr, B., Daigeler, A., Hirsch, T., Jacobsen, F., Renner, M., Harati, A., Wallner, C., Lehnhardt, M. & Becerikli, M. 2017. Curcumin and Viscum album Extract Decrease Proliferation and Cell Viability of Soft-Tissue Sarcoma Cells: An In Vitro Analysis of Eight Cell Lines Using Real-Time Monitoring and Colorimetric Assays. *Nutr Cancer*, 69, 340-351.
- 85 Molnar, J., Engi, H., Hohmann, J., Molnar, P., Deli, J., Wesolowska, O., Michalak, K. & Wang, Q. 2010. Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants. *Curr Top Med Chem*, 10, 1757-68.
- 86 Douglass, E., Valentine, M., Etcubanas, E., Parham, D., Webber, B., Houghton, P. & Green, A. 1987. A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenetic and Genome Research*, 45, 148-155.
- 87 Gibson, A. A., Harwood, F. G., Tillman, D. M. & Houghton, J. A. 1998. Selective sensitization to DNA-damaging agents in a human rhabdomyosarcoma cell line with inducible wild-type p53 overexpression. *Clinical cancer research*, 4, 145-152.
- 88 Taylor, A. C., Shu, L., Danks, M. K., Poquette, C. A., Shetty, S., Thayer, M. J., Houghton, P. J. & Harris, L. C. 2000. P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Pediatric Blood & Cancer*, 35, 96-103.
- 89 McAllister, R. M., Melnyk, J., Finkelstein, J., Adams Jr, E. & Gardner, M. B. 1969. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 24, 520-526.
- 90 Missiaglia, E., Selfe, J., Hamdi, M., Williamson, D., Schaaf, G., Fang, C., Koster, J., Summersgill, B., Messahel, B. & Versteeg, R. 2009. 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 and cancer*, 48, 455-467.
- 91 Schaaf, G., Hamdi, M., Zwijnenburg, D., Lakeman, A., Geerts, D., Versteeg, R. & Kool, M. 2010. Silencing of SPRY1 triggers complete regression of rhabdomyosarcoma tumors carrying a mutated RAS gene. *Cancer research*, 70, 762-771.
- 92 Felix, C. A., Kappel, C. C., Mitsudomi, T., Nau, M. M., Tsokos, M., Crouch, G. D., Nisen, P. D., Winick, N. J. & Helman, L. J. 1992. Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Research*, 52, 2243-2247.
- 93 Berchtold, S., Lampe, J., Weiland, T., Smirnow, I., Schleicher, S., Handgretinger, R., Kopp, H.-G., Reiser, J., Stubenrauch, F. & Mayer, N. 2013. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *Journal of virology*, 87, 3484-3501.
- 94 Boehme, K. A., Zaborski, J. J., Riester, R., Schweiss, S. K., Hopp, U., Traub, F., Kluba, T., Handgretinger, R. & Schleicher, S. B. 2016. Targeting hedgehog signalling by arsenic trioxide reduces cell growth and induces apoptosis in rhabdomyosarcoma. *International journal of oncology*, 48, 801-812.

- 95 Bouché, M., Canipari, R., Melchionna, R., Willems, D., Senni, M. I. & Molinaro, M. 2000. TGF- β autocrine loop regulates cell growth and myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *The FASEB Journal*, 14, 1147-1158.
- 96 Karon, M. R., Freireich, E. J. & Frei, E. 1962. A preliminary report on vincristine sulfate—a new active agent for the treatment of acute leukemia. *Pediatrics*, 30, 791-796.
- 97 Horn, Y. & Hochman, A. 1967. The alkaloids of *Vinca Rosea* Linn, in malignant tumors. *Oncology*, 21, 214-220.
- 98 James, D. H., Hustu, O., Wrenn, E. L. & Johnson, W. W. 1966. Childhood malignant tumors: Concurrent chemotherapy with dactinomycin and vincristine sulfate. *JAMA*, 197, 1043-1045.
- 99 Fvasconcellos. 2009. *Skeletal formula of vincristine*. [Online]. Wikimedia Commons: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vincristine.svg>. Available: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bf/Vincristine.svg> [Accessed 26.04.2022].
- 100 Mattern, R. 2009. *Actinomycin* [Online]. Wikimedia Commons: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Actinomycin.svg>: Roland1952. Roland Mattern, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>. Available: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d1/Actinomycin.svg> [Accessed 23.04.2022].
- 101 Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- 102 Gerlier, D. & Thomasset, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*, 94, 57-63.
- 103 Hansen, M. B., Nielsen, S. E. & Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*, 119, 203-210.
- 104 Sebaugh, J. L. 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10, 128-134.
- 105 Rodriguez, L. G., Wu, X. & Guan, J.-L. 2005. Wound-healing assay. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, 23-29.
- 106 Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & Van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1, 2315-2319.
- 107 Hawley, T. S. & Hawley, R. G. 2004. *Flow cytometry protocols*, Springer.
- 108 Oberle, V., Soßdorf, M. & Lösche, W. 2010. Durchflusszytometrie. *Hämostaseologie*. Springer.
- 109 Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I., Chin, D., Wagner, A. E. & Rimbach, G. 2012. Curcumin—vom Molekül zur biologischen Wirkung. *Angewandte Chemie*, 124, 5402-5427.
- 110 Koopman, G., Reutelingsperger, C., Kuijten, G., Keehnen, R., Pals, S. & Van Oers, M. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-1420.

- 111 Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutellingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods*, 184, 39-51.
- 112 Mirski, S. E., Gerlach, J. H. & Cole, S. P. 1987. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Research*, 47, 2594-2598.
- 113 Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- 114 Compton, S. J. & Jones, C. G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, 151, 369-374.
- 115 Zor, T. & Selinger, Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical biochemistry*, 236, 302-308.
- 116 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 4350-4354.
- 117 Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98, 503-530.
- 118 Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112, 195-203.
- 119 Marzocchi, E., Grilli, S., Della Ciana, L., Prodi, L., Mirasoli, M. & Roda, A. 2008. Chemiluminescent detection systems of horseradish peroxidase employing nucleophilic acylation catalysts. *Analytical biochemistry*, 377, 189-194.
- 120 LaRochelle, W. J. & Froehner, S. C. 1986. Immunochemical detection of proteins biotinylated on nitrocellulose replicas. *Journal of immunological methods*, 92, 65-71.
- 121 Morikawa, K. & Yanagida, M. 1981. Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. *Journal of biochemistry*, 89, 693-696.
- 122 Barcellona, M., Favilla, R., Von Berger, J., Avitabile, M., Ragusa, N. & Masotti, L. 1986. DNA-4'-6-diamidine-2-phenylindole interactions: A comparative study employing fluorescence and ultraviolet spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 250, 48-53.
- 123 Hašek, J. & Streiblová, E. 1996. Fluorescence microscopy methods. *Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology*, 391-405.
- 124 Annavarapu, S. R., Cialfi, S., Dominici, C., Kokai, G. K., Uccini, S., Ceccarelli, S., McDowell, H. P. & Helliwell, T. R. 2013. Characterization of Wnt/ β -catenin signaling in rhabdomyosarcoma. *Laboratory Investigation*, 93, 1090-1099.
- 125 Beg, A. A. & Baldwin, A. S. 1993. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & development*, 7, 2064-2070.
- 126 Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. 1998. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16, 225-260.

- 127 Raney, R. B., Anderson, J. R., Barr, F. G., Donaldson, S. S., Pappo, A. S., Qualman, S. J., Wiener, E. S., Maurer, H. M. & Crist, W. M. 2001. 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*, 23, 215-20.
- 128 Banik, U., Parasuraman, S., Adhikary, A. K. & Othman, N. H. 2017. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*, 36, 98.
- 129 Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Harsha, C., Banik, K., Gupta, S. C. & Aggarwal, B. B. 2017. Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. *Clin Sci (Lond)*, 131, 1781-1799.
- 130 Panda, A. K., Chakraborty, D., Sarkar, I., Khan, T. & Sa, G. 2017. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J Exp Pharmacol*, 9, 31-45.
- 131 Beevers, C. S., Li, F., Liu, L. & Huang, S. 2006. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *International journal of cancer*, 119, 757-764.
- 132 Kang, J. Y., Huang, H. & Zhu, F. Q. 2009. [Effect of curcumin on growth and function of fibroblast in human hyperplastic scar]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 29, 1100-3.
- 133 Houghton, J. A., Houghton, P. J. & Green, A. A. 1982. Chemotherapy of childhood rhabdomyosarcomas growing as xenografts in immune-deprived mice. *Cancer research*, 42, 535-539.
- 134 Melguizo, C., Prados, J., Marchal, J. A., Aránega, A. E., Alvarez, L. & Aránega, A. 1996. Low Concentrations of Actinomycin D Potentially Cause Therapeutic Differentiation in Human Rhabdomyosarcoma Cell Line RD. *Pathology - Research and Practice*, 192, 188-194.
- 135 Lu, Y., Kim, S. & Park, K. 2011. In vitro–in vivo correlation: Perspectives on model development. *International journal of pharmaceuticals*, 418, 142-148.
- 136 Kang, M. H., Smith, M. A., Morton, C. L., Keshelava, N., Houghton, P. J. & Reynolds, C. P. 2011. National Cancer Institute pediatric preclinical testing program: model description for in vitro cytotoxicity testing. *Pediatric blood & cancer*, 56, 239-249.
- 137 Bortel, N., Armeanu-Ebinger, S., Schmid, E., Kirchner, B., Frank, J., Kocher, A., Schiborr, C., Warmann, S., Fuchs, J. & Ellerkamp, V. 2015. Effects of curcumin in pediatric epithelial liver tumors: inhibition of tumor growth and alpha-fetoprotein in vitro and in vivo involving the NFkappaB- and the beta-catenin pathways. *Oncotarget*, 6, 40680-91.
- 138 Weidong, L., Zhongxue, F., Yong, Q., Lei, L. & Chuang, Y. 2011. Curcumin reverses multidrug resistance in HCT-8/VCR nude mice xenograft [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 4.
- 139 Babu, A., Prasanth, K. G. & Balaji, B. 2015. Effect of curcumin in mice model of vincristine-induced neuropathy. *Pharm Biol*, 53, 838-48.
- 140 Carvalho, L. F., Silva, A. M. F. & Carvalho, A. A. 2017. The use of antioxidant agents for chemotherapy-induced peripheral neuropathy treatment in animal models. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 44, 971-979.

- 141 Foucquier, J. & Guedj, M. 2015. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology research & perspectives*, 3, e00149.
- 142 Dujic, J., Kippenberger, S., Ramirez-Bosca, A., Diaz-Alperi, J., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A. & Hofmann, M. 2009. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *International journal of cancer*, 124, 1422-1428.
- 143 Bernd, A. 2014. Visible light and/or UVA offer a strong amplification of the anti-tumor effect of curcumin. *Phytochemistry Reviews*, 13, 183-189.
- 144 Mohammadi, S., Soratjahromi, E., Dehdari Vais, R. & Sattarahmady, N. 2020. Phototherapy and Sonotherapy of Melanoma Cancer Cells Using Nanoparticles of Selenium-Polyethylene Glycol-Curcumin as a Dual-Mode Sensitizer. *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 10, 597.
- 145 Roma, J., Masià, A., Reventós, J., de Toledo, J. S. & Gallego, S. 2011. Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro. *Clinical Cancer Research*, 17, 505-513.
- 146 Yang, J., Wang, C., Zhang, Z., Chen, X., Jia, Y., Wang, B. & Kong, T. 2017. Curcumin inhibits the survival and metastasis of prostate cancer cells via the Notch-1 signaling pathway. *Apmis*, 125, 134-140.
- 147 Li, Y., Zhang, J., Ma, D., Zhang, L., Si, M., Yin, H. & Li, J. 2012. Curcumin inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells through inactivation of Notch-1 signaling. *The FEBS journal*, 279, 2247-2259.
- 148 Bravo-Cordero, J. J., Hodgson, L. & Condeelis, J. 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 24, 277-283.
- 149 Gersey, Z. C., Rodriguez, G. A., Barbarite, E., Sanchez, A., Walters, W. M., Ohaeto, K. C., Komotar, R. J. & Graham, R. M. 2017. Curcumin decreases malignant characteristics of glioblastoma stem cells via induction of reactive oxygen species. *BMC cancer*, 17, 1-11.
- 150 Barry, J., Fritz, M., Brender, J. R., Smith, P. E., Lee, D.-K. & Ramamoorthy, A. 2009. Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy: the case of the antioxidant curcumin. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 4490-4498.
- 151 Tsukamoto, M., Kuroda, K., Ramamoorthy, A. & Yasuhara, K. 2014. Modulation of raft domains in a lipid bilayer by boundary-active curcumin. *Chemical Communications*, 50, 3427-3430.
- 152 Pressey, J. G., Haas, M. C., Pressey, C. S., Kelly, V. M., Parker, J. N., Gillespie, G. Y. & Friedman, G. K. 2013. CD133 marks a myogenically primitive subpopulation in rhabdomyosarcoma cell lines that are relatively chemoresistant but sensitive to mutant HSV. *Pediatric blood & cancer*, 60, 45-52.
- 153 Tsaplev, Y. B., Lapina, V. A. & Trofimov, A. V. 2020. Curcumin in dimethyl sulfoxide: Stability, spectral, luminescent and acid-base properties. *Dyes and Pigments*, 177, 108327.
- 154 Kunwar, A., Barik, A., Mishra, B., Rathinasamy, K., Pandey, R. & Priyadarsini, K. 2008. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780, 673-679.

- 155 Sun, J., Bi, C., Chan, H. M., Sun, S., Zhang, Q. & Zheng, Y. 2013. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability. *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, 111, 367-375.
- 156 Jiang, A.-J., Jiang, G., Li, L.-T. & Zheng, J.-N. 2015. Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma cells. *Molecular Biology Reports*, 42, 267-275.
- 157 Seitz, G., Warmann, S. W., Vokuhl, C. O., Heitmann, H., Treuner, C., Leuschner, I. & Fuchs, J. 2007. Effects of standard chemotherapy on tumor growth and regulation of multidrug resistance genes and proteins in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr Surg Int*, 23, 431-9.
- 158 Keyvani-Ghamsari, S., Khorsandi, K. & Gul, A. 2020. Curcumin effect on cancer cells' multidrug resistance: an update. *Phytotherapy Research*, 34, 2534-2556.
- 159 Cocker, H. A., Pinkerton, C. R. & Kelland, L. R. 2000. Characterization and modulation of drug resistance of human paediatric rhabdomyosarcoma cell lines. *British Journal of Cancer*, 83, 338-345.
- 160 Fruci, D., Cho, W. C., Nobili, V., Locatelli, F. & Alisi, A. 2016. Drug Transporters and Multiple Drug Resistance in Pediatric Solid Tumors. *Curr Drug Metab*, 17, 308-16.
- 161 Romiti, N., Tongiani, R., Cervelli, F. & Chieli, E. 1998. Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Life sciences*, 62, 2349-2358.
- 162 Lee, G., Joung, J.-Y., Cho, J.-H., Son, C.-G. & Lee, N. 2018. Overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in colorectal cancer: potential reversal agents among herbal medicines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- 163 Fulda, S. 2008. Targeting apoptosis resistance in rhabdomyosarcoma. *Curr Cancer Drug Targets*, 8, 536-44.
- 164 Dhivya, R., Ranjani, J., Bowen, P. K., Rajendhran, J., Mayandi, J. & Annaraj, J. 2017. Biocompatible curcumin loaded PMMA-PEG/ZnO nanocomposite induce apoptosis and cytotoxicity in human gastric cancer cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 80, 59-68.
- 165 Liu, L., Sun, L., Wu, Q., Guo, W., Li, L., Chen, Y., Li, Y., Gong, C., Qian, Z. & Wei, Y. 2013. Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. *Int J Pharm*, 443, 175-82.
- 166 Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Messina, E., Scafidi, V. & Di Carlo, M. 2014. Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of AKT and Foxo3a nuclear translocation. *Free Radic Res*, 48, 1397-408.
- 167 Yarpuzlu, A. A. 2003. A review of clinical and laboratory findings and treatment of tumor lysis syndrome. *Clinica chimica acta*, 333, 13-18.
- 168 Bakkar, N. & Guttridge, D. C. 2010. NF- κ B signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiological reviews*, 90, 495-511.
- 169 Sebire, N. & Malone, M. 2003. Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *Journal of clinical pathology*, 56, 412-416.
- 170 Tonin, P. N., Scrabble, H., Shimada, H. & Cavenee, W. K. 1991. Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development. *Cancer research*, 51, 5100-5106.

- 171 Keller, C. & Guttridge, D. C. 2013. Mechanisms of impaired differentiation in rhabdomyosarcoma. *The FEBS journal*, 280, 4323-4334.
- 172 del Peso, L., González, V. M., Hernández, R., Barr, F. G. & Núñez, G. 1999. Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. *Oncogene*, 18, 7328-7333.
- 173 Margue, C. M., Bernasconi, M., Barr, F. G. & Schaefer, B. W. 2000. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene*, 19, 2921-2929.
- 174 Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. & Donner, D. B. 1999. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401, 82-85.
- 175 Peterson, J. M., Bakkar, N. & Guttridge, D. C. 2011. Chapter four - NF- κ B Signaling in Skeletal Muscle Health and Disease. In: PAVLATH, G. K. (ed.) *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press.
- 176 Wang, H., Garzon, R., Sun, H., Ladner, K. J., Singh, R., Dahlman, J., Cheng, A., Hall, B. M., Qualman, S. J. & Chandler, D. S. 2008. NF- κ B-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*, 14, 369-381.
- 177 Shehzad, A. & Lee, Y. S. 2013. Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors*, 39, 27-36.
- 178 Garg, A. & Aggarwal, B. B. 2002. Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development. *Leukemia*, 16, 1053-1068.
- 179 Berger, F., Büchsler, I. & Munz, B. 2012. The effect of the NF-kappa B inhibitors curcumin and lactacystin on myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *Differentiation*, 83, 271-281.
- 180 Lollini, P., De Giovanni, C., Landuzzi, L., Nicoletti, G., Scotlandi, K. & Nanni, P. 1991. Reduced metastatic ability of in vitro differentiated human rhabdomyosarcoma cells. *Invasion & metastasis*, 11, 116-124.
- 181 Charytonowicz, E., Matushansky, I., Domingo-Doménech, J., Castillo-Martín, M., Ladanyi, M., Cordon-Cardo, C. & Ziman, M. 2012. PAX7-FKHR fusion gene inhibits myogenic differentiation via NF-kappaB upregulation. *Clinical and Translational Oncology*, 14, 197-206.
- 182 Deeb, D., Jiang, H., Gao, X., Al-Holou, S., Danyluk, A. L., Dulchavsky, S. A. & Gautam, S. C. 2007. Curcumin [1, 7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-6-heptadine-3, 5-dione; C₂₁H₂₀O₆] sensitizes human prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L-induced apoptosis by suppressing nuclear factor- κ B via inhibition of the prosurvival Akt signaling pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321, 616-625.
- 183 Klaus, A. & Birchmeier, W. 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8, 387-398.
- 184 Johnson, S. M., Gulhati, P., Arrieta, I., Wang, X., Uchida, T., Gao, T. & Evers, B. M. 2009. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/mTOR signaling. *Anticancer research*, 29, 3185-3190.

- 185 Wang, H., Zhang, K., Liu, J., Yang, J., Tian, Y., Yang, C., Li, Y., Shao, M., Su, W. & Song, N. 2021. Curcumin regulates cancer progression: Focus on ncRNAs and molecular signaling pathways. *Frontiers in Oncology*, 11, 1202.
- 186 Sundram, V., Chauhan, S. C., Ebeling, M. & Jaggi, M. 2012. Curcumin Attenuates β -catenin Signaling in Prostate Cancer Cells through Activation of Protein Kinase D1. *PLOS ONE*, 7, e35368.
- 187 Jaiswal, A. S., Marlow, B. P., Gupta, N. & Narayan, S. 2002. β -catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, 21, 8414-8427.
- 188 Leow, P.-C., Tian, Q., Ong, Z.-Y., Yang, Z. & Ee, P.-L. R. 2010. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ β -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Investigational new drugs*, 28, 766-782.
- 189 Prasad, C. P., Rath, G., Mathur, S., Bhatnagar, D. & Ralhan, R. 2009. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Chemico-Biological Interactions*, 181, 263-271.
- 190 Singh, S., Vinson, C., Gurley, C. M., Nolen, G. T., Beggs, M. L., Nagarajan, R., Wagner, E. F., Parham, D. M. & Peterson, C. A. 2010. Impaired Wnt signaling in embryonal rhabdomyosarcoma cells from p53/c-fos double mutant mice. *The American journal of pathology*, 177, 2055-2066.
- 191 Soglio, D. B.-D., Rougemont, A.-L., Absi, R., Giroux, L.-M., Sanchez, R., Barrette, S. & Fournet, J.-C. 2009. Beta-catenin mutation does not seem to have an effect on the tumorigenesis of pediatric rhabdomyosarcomas. *Pediatric and Developmental Pathology*, 12, 371-373.

7 ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Jörg Fuchs und PD Dr. med. Verena Ellerkamp angefertigt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Co-Betreuerin PD Dr. rer. nat. Evi Schmid und PD Dr. med. Verena Ellerkamp.

Sämtliche Versuche wurden, nach Einarbeitung und Anleitung durch die Laborleitung PD Dr. rer. nat. Evi Schmid und den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors, von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung durch PD Dr. rer. nat. Evi Schmid, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Mein Eigenanteil an der Publikation (Sorg, Christine; Schmid, Evi; Bortel, Nicolás; Fuchs, Jörg; Ellerkamp, Verena. 2021. *Antitumor effects of curcumin in pediatric rhabdomyosarcoma in combination with chemotherapy and phototherapy in vitro*. International Journal of Oncology; 58(2):266-74.) erstreckt sich auf die Erhebung und Auswertung der Daten (gemeinsam mit Dr. med. Nicolás Bortel, PD. Dr. med. Verena Ellerkamp und PD Dr. rer. nat. Evi Schmid). Das Konzept und die Planung der Versuche erfolgte durch PD Dr.med. Verena Ellerkamp, PD Dr. rer. nat. Evi Schmid und Prof. Dr. Jörg Fuchs. Alle Autoren haben die Arbeit verfasst und überarbeitet und ihre endgültige Zustimmung zur zu veröffentlichenden Version gegeben. Alle Autoren stimmen zu, für alle Aspekte der Arbeit verantwortlich zu sein. Die vorliegende Einschätzung über die erbrachte Eigenleistung wurde mit den am Artikel beteiligten Ko-Autoren/Ko-Autorinnen einvernehmlich abgestimmt.

Tübingen, den

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Sorg, Christine, Schmid, Evi, Bortel, Nicolás, Fuchs, Jörg, Ellerkamp, Verena. 2021. *Antitumor effects of curcumin in pediatric rhabdomyosarcoma in combination with chemotherapy and phototherapy in vitro*. International Journal of Oncology; 58(2):266-74.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Kinderchirurgie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank geht außerdem an Herrn Prof. Dr. Jörg Fuchs für die Möglichkeit der Erstellung meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung. Ohne die intensive Einarbeitung und rege Zusammenarbeit mit den Medizinisch-technischen Laborassistentinnen Bettina Kirchner, Melanie Hauth und Julia Wenz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und ich bedanke mich ganz herzlich bei ihnen. Meinem Labor Kollegen und Mitdoktoranden Matias Stagno danke ich für die gemeinsame Zeit im Labor, für seine Geduld, Kompetenz und Freundschaft, die mir eine große Unterstützung bei dieser Doktorarbeit waren.

Ich bedanke mich bei dem Promotionskolleg IZKF für die Aufnahme in das Promotionskolleg und ihre begleitende finanzielle und fachliche Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt meiner Laborbetreuerin PD Dr. Evi Schmid, für die Einarbeitung, Versuchsplanung und konstante Betreuung meiner Laborarbeit und meiner Betreuerin PD Dr. Verena Ellerkamp in besonderem Maße für die Unterstützung zur Kongressvorbereitung, der Veröffentlichung und der Betreuung während und am Ende meiner Doktorarbeit.

Besonders erwähnen möchte ich außerdem meine Freunde und Familie, die mir im Rahmen dieser Arbeit stets eine Insel voller Hoffnung und Liebe waren: Sara Biermann, Stefanie Anger, Eva Kraus, Miriam Dieterle und Khanh Nguyen, meine Brüder und meine Eltern und mein Rudel Santo und Eva. Danke von Herzen.

ANHANG

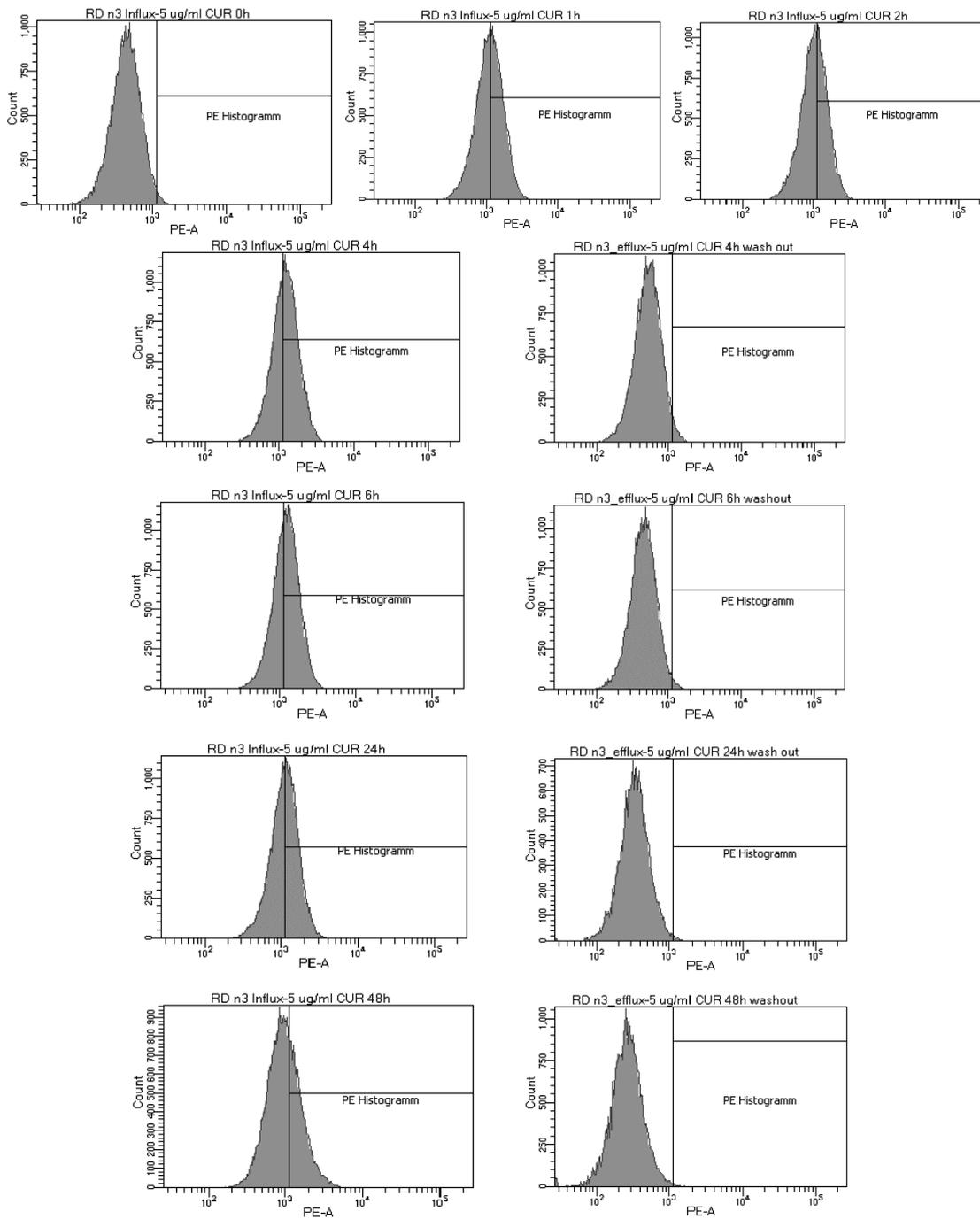
3.4.2 Vergleich von CUR-Influx und –Efflux bei RMS-Zelllinien:

Abbildung Anhang 1: CUR-Influx und –Efflux bei RD-Zellen: Darstellung als PE Histogramm

Dargestellt sind die Mediane von PE als Histogramm (grau) von der eRMS-Zelllinie RD unter Behandlung mit 5 µg/ml CUR im zeitlichen Verlauf (0-48 h). Ab 4 h Messzeit ist der Efflux dem Influx gegenübergestellt.

Tabelle Anhang 1: Statistische Auswertung des Vergleiches Efflux vs. Influx bei RD-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte von Efflux (E) und Influx (I), der SEM, die Anzahl der Versuchsreihen (n) und die p-Werte des Vergleiches von Influx vs. Efflux (nMFI) zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

RD	Mittelwert	SEM (+/-)	Anzahl (n)	p-Wert
4 h	E: 1,010	E: 0,031	3	< 0,0001
	I: 1,399	I: 0,150		
6 h	E: 0,995	E: 0,022	3	< 0,0001
	I: 1,356	I: 0,148		
24 h	E: 1,022	E: 0,011	3	< 0,0001
	I: 1,388	I: 0,180		
48 h	E: 1,070	E: 0,020	3	< 0,0001
	I: 1,431	I: 0,253		

Tabelle Anhang 2: Statistische Auswertung des Vergleiches Efflux vs. Influx bei RH30-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte von Efflux (E) und Influx (I), der SEM, die Anzahl der Versuchsreihen (n) und die p-Werte des Vergleiches von Influx vs. Efflux (nMFI) zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

RH30	Mittelwert	SEM (+/-)	Anzahl (n)	p-Wert
4 h	E: 1,012	E: 0,004	3	0,7054
	I: 1,064	I: 0,024		
6 h	E: 1,018	E: 0,007	3	0,7773
	I: 1,072	I: 0,025		
24 h	E: 1,039	E: 0,016	3	> 0,9999
	I: 1,059	I: 0,021		
48 h	E: 1,054	E: 0,007	3	0,0012
	I: 1,195	I: 0,054		

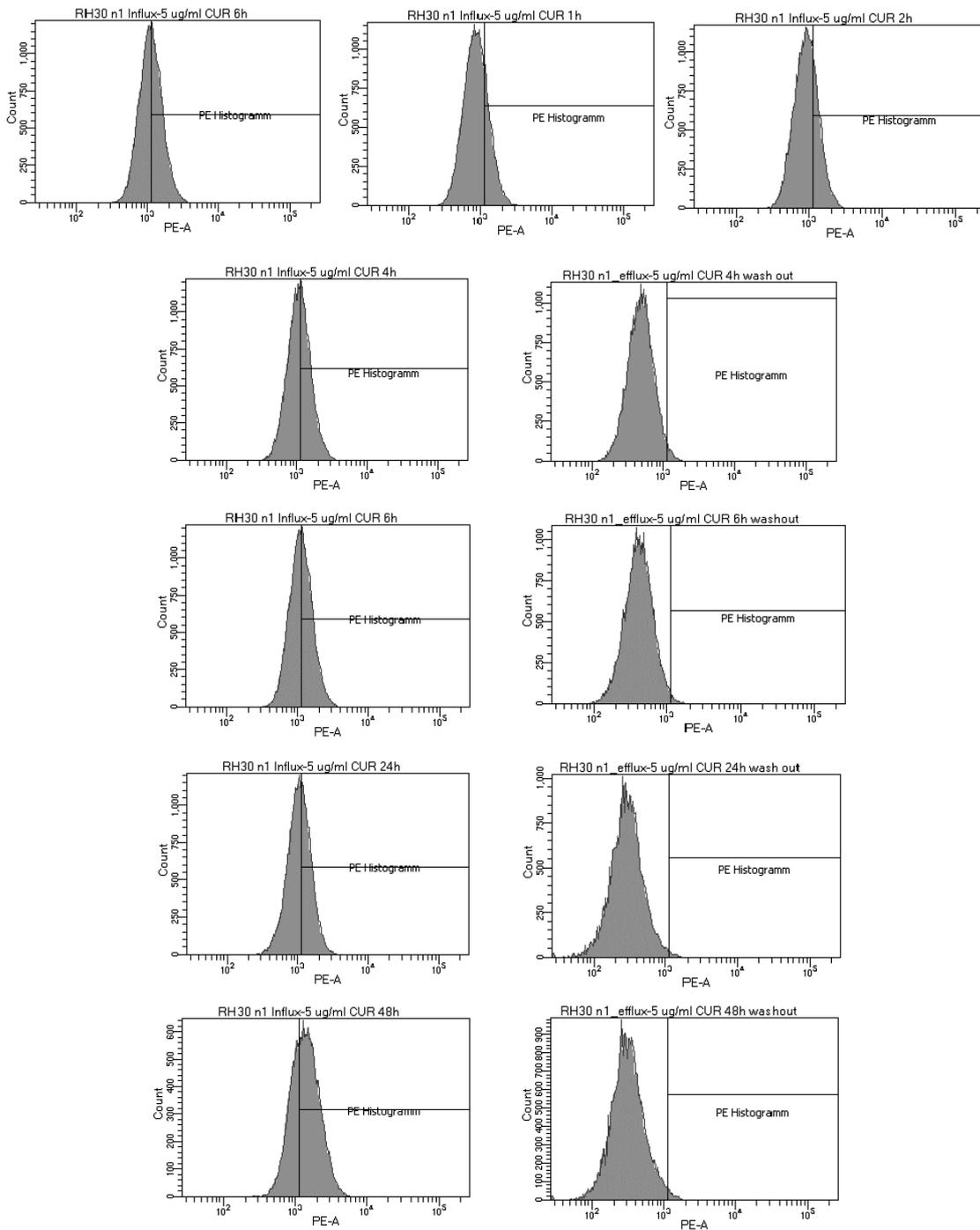


Abbildung Anhang 2: CUR-Influx und –Efflux bei RH30-Zellen: Darstellung als PE Histogramm

Dargestellt sind die Mediane von PE als Histogramm (grau) bei der aRMS-Zelllinie RH30 unter Behandlung mit 5 µg/ml CUR im zeitlichen Verlauf (0-48 h). Ab 4 h Messzeit ist der Efflux dem Influx gegenübergestellt.