

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Tübingen  
Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs**

**Möglichkeiten der Überwindung von Chemoresistenz beim  
kindlichen Rhabdomyosarkom**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

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

**vorgelegt von  
Natalie Veruschka Laizer, geb. Linsenmaier  
aus  
Stuttgart  
2013**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Seitz

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Glatzle

*In Gedenken an alle meine Lieben, die nicht mehr sind  
und in Gedanken an alle meine Lieben, die noch sind...*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Das Rhabdomyosarkom (RMS).....	7
1.2 Chemoresistenz und Möglichkeiten der Überwindung .....	11
1.3 Chemoresistenz beim kindlichen Rhabdomyosarkom .....	22
1.4 Fragestellungen/ Ziele der Arbeit.....	23
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Zellkultur .....	24
2.2 Untersuchte Wirkstoffe .....	27
2.3 Proliferationsassay „EZ4U“ .....	29
2.4 Zellzyklusanalyse.....	32
2.5 Färbemethoden <i>in vitro</i> .....	33
2.6 Tierversuche.....	36
2.7 RNA- Extraktion und Quantifizierung mittels qRT-PCR (quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion) .....	40
2.8 Materialien.....	45
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1 Wirkung des Pgp-Inhibitors Tariquidar auf RMS-Zellen <i>in vitro</i> .....	49
3.1.1 Proliferationsassay .....	49
3.1.2 HE-Färbung .....	50
3.1.3 JC1-Färbung .....	52

3.1.4 Zellzyklus-Analyse .....	54
3.2 Kombination von Tariquidar und Zytostatika <i>in vitro</i> .....	59
3.2.1 Proliferationsassay Tariquidar und Vincristin.....	59
3.2.2 Proliferationsassay: Vier Zytostatika und 100 nM Tariquidar in 2D .....	60
3.2.3 Proliferationsassay: Vier Zytostatika und 100 nM Tariquidar in 3D .....	62
3.3 Wirkung von Tariquidar und Zytostatika <i>in vivo</i> .....	65
3.4 Genexpression von RMS-Zellen nach Behandlung mit Vincristin .....	69
3.4.1 Genchipanalyse und Auswahl der Gene für die qRT-PCR .....	69
3.4.2 Genexpressionsprofil von RMS-Zellen nach Behandlung mit Tariquidar.....	74
3.4.3 Quantifizierung ausgewählter Mitglieder des Proteasom-Ubiquitinierung-Komplexes mittels qRT-PCR im Tumorgewebe von RMA und RME-Xenografts.....	75
3.4.4 Proliferationsassay: Proteasominhibitoren und Vincristin .....	79
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>81</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>98</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>7. Erklärungen zum Eigenanteil.....</b>	<b>109</b>
<b>8. Danksagungen.....</b>	<b>110</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
RMA	alveoläres Rhabdomyosarkom
BRCP	Breast cancer resistance protein
Ca	Carcinom
cDNA	copy DNA
CWS	Cooperative Weichteilsarkom Studie
engl.	Englisch
RME	embryonales Rhabdomyosarkom
FKHR	forkhead transcription factor
FOX	forkhead box
GST	Glutathion-S-Transferase
HE	Hämatoxylin Eosin
HWZ	Halbwertszeit
I κB	Inhibitory κB
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös
IRS	Intergroup rhabdomyosarcoma study
JÜR	Jahresüberlebensrate
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LRP	Lung Resistance Protein
MDR	Multiple Drug Resistance
MHC	major histone compatibility
MRF	Muscle regulatory factor
MRP	Multidrug resistance associated protein
NF– κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NPC	nuclear pore complex
NTC	negative template control
p.o.	per os
PAX	paired box protein
Pgp	P-Glycoprotein
PSMA	Proteasome subunit alpha type
PSMB	Proteasome subunit beta type
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RMS	Rhabdomyosarkom
Upm	Umdrehungen pro Minute

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das Rhabdomyosarkom (RMS)**

### **1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des RMS**

Mit einer jährlichen Inzidenzrate von 4,5 Fällen pro eine Million Menschen (im Alter von 0 bis 20 Jahren) ist das RMS der vierthäufigste solide Tumor im Kindes- und Jugendalter. 7,4 % aller malignen Tumorerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen unter 20 Jahren sind Weichteilsarkome, und im Alter von 0 bis 14 Jahren ist das RMS der häufigste Vertreter dieser Tumorentität (1).

Es ist wenig bekannt über die das RMS begünstigenden Risikofaktoren. Einige Erbkrankheiten und Syndrome sind mit einem erhöhten Risiko für das RMS assoziiert. Hierzu zählen das Li Fraumeni Syndrom (2, 3), das Costello-Syndrom (4), das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (5) und die Neurofibromatose Typ 1 (6). Eine vor kurzem veröffentlichte Studie deutete des Weiteren darauf hin, dass ein hohes Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für RMS einhergeht (7).

RMS-Zellen ähneln sowohl unter morphologischen Gesichtspunkten als auch im Hinblick auf die Expression muskelspezifischer Gene gesunden fetalen Muskelzellen vor der somatischen Innervation. Gemeinsamkeiten sind die Expression der Gene der MRF-Familie (muscle regulatory factor), die Expression der für Skelettmuskel spezifischen Strukturproteine (8) sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren PAX3 und PAX7.

PAX3 und PAX7 sind kennzeichnend für Muskelprogenitorzellen und entscheidend an deren Weiterentwicklung zur Skelettmuskelzelle beteiligt. Fehlen diese Transkriptionsfaktoren, kommt es zu einem Differenzierungs-Arrest während der Entwicklung von der Progenitorzelle zur reifen Muskelzelle (9). Bei den verschiedenen RMS-Subtypen finden sich spezifische Veränderungen im Bereich der genannten Transkriptionsfaktoren (siehe Abschnitt 1.1.2).

### **1.1.2 Klassifikation des RMS**

Die Klassifikation des RMS erfolgt anhand histopathologischer Merkmale.

Mittels morphologischer und immunhistochemischer Kriterien lassen sich insgesamt vier Subtypen klar voneinander differenzieren. Diese sind das RMA (alveoläre RMS), das RME (embryonale RMS) vom Spindelzelltyp, das RME vom botryoiden Typ und

das klassische RME. Die Unterscheidung dieser Subtypen ist aus prognostischer Sicht wichtig und gewinnt aus therapeutischer Sicht zunehmend an Bedeutung (10). (Näheres dazu in Abschnitt 1.1.3)

Bei allen RMA ist eine PAX-FOXO1 (paired box protein-forkhead box1) Translokation nachweisbar (11). Die häufigste Translokation ist dabei die PAX3-FKHR (paired box protein 3-forkhead transcription factor) Translokation entsprechend t(2;13)(q35;q14). Seltener kommt die Translokation PAX7-FKHR entsprechend t(1;13)(p36;q14) vor (12).

Alle Translokations-negativen RMS werden zu den verschiedenen Subtypen des RME gezählt (11). Beim RME kann hingegen meist ein vermehrt exprimiertes PAX7-Gen nachgewiesen werden (8, 11).

### **1.1.3 Prognose und Therapie des RMS**

Da es sich bei dem RMS um eine sehr seltene Erkrankung handelt, wird das RMS in der Regel im Rahmen von großen multizentrischen Studien oder nach Empfehlungen der entsprechenden Studiengruppen behandelt.

In den USA und Kanada ist das die Children's Oncology Group (COG), die im Jahr 2000 aus dem Zusammenschluss der Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS) mit drei anderen unabhängigen Studiengruppen entstand.

In Deutschland, Österreich, Polen, Schweden und der Schweiz werden die klinischen Studien von der CWS (Cooperativen Weichteilsarkom Studiengruppe) geleitet. Die CWS, eingerichtet von der GPOH (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie), leitet die Studien zur Optimierung von Diagnostik, Behandlung und Nachsorge des RMS.

Bis 2009 war die Therapieoptimierungsstudie CWS-Studie 2002 aktiv. Das Protokoll zu dieser Therapieoptimierungsstudie wurde in Zusammenarbeit mit der Italiano Gruppo Cooperativo und der International Society of Paediatric Oncology (SIOP) entworfen. Neben den Therapieschemata sind in diesem Protokoll Kriterien zur Risikostratifizierung der Erkrankung festgelegt. Eine Übersicht über die Einteilung in vier Risikogruppen gibt Tabelle 1 (13).

Bei der Risiko-Einteilung nach dem CWS-2002-Protokoll werden der histologische Subtyp, das IRS-Stadium (Intergroup Rhabdomyosarcoma Study), die Lokalisation des Primärtumors, der Lymphknotenstatus, die Größe des Primärtumors und das Patientenalter bei Diagnosestellung berücksichtigt.

Tabelle 1: Risikostratifizierung der CWS-2002 P (13)

Risiko	Histologie	Lokalisation	Lk-Status	TumorgroÙe/ Patientenalter	IRS- Stadium
<b>Niedrig</b>	RME	irrelevant	N0	≤ 5cm u. ≤ 10 Jahre	I
<b>Standard</b>	RME	irrelevant	N0	> 5cm u./o. > 10Jahre	I
	RME	günstig*	N0	irrelevant	II, III
	RME	ungünstig**	N0	≤ 5cm u. ≤ 10 Jahre	II, III
<b>Hoch</b>	RME	günstig*	N1	≤ 5cm u. ≤ 10 Jahre	II, III
	RME	ungünstig**	N0, N1	> 5cm u./o. > 10Jahre	II,III
	RMA	irrelevant	N0	irrelevant	I, II, III
<b>Sehr hoch</b>	RMA	irrelevant	N1	irrelevant	II, III,IV

\*günstige Lokalisation: Orbita (ohne knöcherner Infiltration), Kopf und Hals (nicht parameningeal), Urogenitaltrakt (nicht Blase oder Prostata)

\*\*ungünstige Lokalisation: Orbita mit knöcherner Infiltration, Urogenitaltrakt mit Beteiligung Blase oder Prostata, Kopf, Hals, Extremitäten und alle die nicht günstig sind.

Die Histologie des RMS wird berücksichtigt, da das RME, welches 75 % aller RMS-Fälle ausmacht, mit einer Gesamt-5-JÜR (Jahresüberlebensrate) von 68 % insgesamt eine deutlich bessere Prognose hat als das RMA mit einer Gesamt-5-JÜR von 50 % (1).

Bezüglich der Lokalisation des Primärtumors wird zwischen günstiger und ungünstiger Lokalisation unterschieden. Zu den als günstig betrachteten Lokalisationen zählen die Orbita (ohne knöcherner Infiltration), der Kopf und Hals (nicht parameningeal) und der Urogenitaltrakt (ohne Blase oder Prostata). Alle übrigen Lokalisationen werden als ungünstig bewertet.

Das RMS kann sich überall im Körper manifestieren. Am häufigsten ist das RMS im Kopf-Hals-Bereich und im Bereich des Urogenitaltraktes lokalisiert. Oft kommt es auch im Bereich der Extremitäten vor. 23 % der RMS liegen am Kopf parameningeal, 9 % nicht parameningeal und 7 % orbital. An der Blase/Prostata sind 11 % aller RMS-Tumoren lokalisiert und im übrigen Urogenitaltrakt sind weitere 5 % (bei Mädchen) bis 12 % (bei Jungen) lokalisiert. Etwa 16 % der RMS-Tumoren treten primär an den Extremitäten auf (14).

Das Alter des Kindes bei Diagnosestellung ist entscheidend, da die 5-JÜR für Kinder unter 5 Jahren bei 79 %, für Kinder älter als 10 Jahre bei etwa 49 % liegt (1).

Das IRS-Stadium ist abhängig von der postchirurgischen Tumorausdehnung (siehe Tabelle 2) (13).

**Tabelle 2: Stadieneinteilung des Rhabdomyosarkoms nach der Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (13)**

<b>IRS- Stadium</b>	<b>Definition</b>
<b>I</b> <i>I (T1)</i> <i>I (T2)</i>	R0-Resektion des Tumors (weder makroskopisch noch mikroskopisch sichtbare Tumorreste), Lymphknoten nicht befallen <i>Organ-begrenzter Tumor</i> <i>Nicht Organ-begrenzter Tumor</i>
<b>II</b> <i>II A</i> <i>II B</i>	R1-Resektion des Tumors (keine makroskopisch sichtbaren Tumorreste) <i>Kein Befall regionärer Lymphknoten</i> <i>Regionäre Lymphknoten befallen</i>
<b>III</b>	R2-Resektion (makroskopisch sichtbare Tumorreste), oder nur Biopsie mit Erguss in benachbarte Körperhöhle
<b>IV</b>	Fernmetastasen bereits bei Diagnosestellung oder Tumorbefall überregionaler Lymphknoten

Bei der Behandlung des RMS im Rahmen der CWS-Empfehlungen ist das Ziel der Behandlung stets die chirurgische Komplettresektion. Ist eine R0-Resektion initial nicht möglich, wird zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen. Im Anschluss daran erfolgt soweit möglich die chirurgische Resektion des Tumors. Eine Tumor-Bestrahlung ist im Protokoll regelhaft vorgesehen. Nur in Ausnahmefällen, zum Beispiel wenn eine chirurgische R0-Resektion möglich erscheint, wird auf eine Bestrahlung verzichtet. In jedem Fall wird eine adjuvante Polychemotherapie empfohlen (13, 15). Das Chemotherapie-Schema wird abhängig vom Risikoprofil des Patienten festgelegt.

Auch wenn sich die Gesamt-5-JÜR für Patienten mit RMS in den letzten 40 Jahren enorm verbessert hat (von 25 % 1970 auf bis zu 70 % heutzutage) (16), haben Patienten mit einem Rezidiv oder in fortgeschrittenen Stadien weiterhin eine sehr schlechte Prognose. Die Daten der IRS-Group zeigen, dass die Gesamt-5-JÜR für Patienten mit Rezidiv nur etwa 17 % (26 % für Patienten mit RME, 5 % für Patienten mit RMA) beträgt (17).

Ein wichtiger Grund für diese deutlich ungünstigere Prognose ist das schlechte Ansprechen der Tumoren auf Zytostatika. Ursächlich hierfür kann eine im Verlauf der Therapie entstandene, beziehungsweise durch Selektion resistenter Zellen hervorgerufene Chemoresistenz sein.

## 1.2 Chemoresistenz und Möglichkeiten der Überwindung

### 1.2.1 Übersicht verschiedener Chemoresistenz-Mechanismen

Chemoresistenz kann generell auf zwei Ebenen entstehen, die voneinander zu unterscheiden sind. Zum einen auf der Organismus-Ebene und zum anderen auf der Zell-Ebene. Chemoresistenz auf Organismus-Ebene entsteht aufgrund einer verminderten Bioverfügbarkeit oder einer Fehlverteilung von Zytostatika im Organismus. In diesem Fall werden zum Beispiel durch verminderte Absorption oral verabreichter Medikamente, durch vermehrten Abbau oder vermehrte Ausscheidung der Pharmaka oder durch besondere Eigenschaften der tumorversorgenden Gefäße (18) nur unzureichende Zytostatika-Konzentrationen im Tumorgewebe erreicht. Die Tumorstruktur und die extrazelluläre Matrix können ebenfalls zu einer ungenügenden Verfügbarkeit von Zytostatika in der einzelnen Tumorzelle führen (19, 20).

Die davon abzugrenzende Chemoresistenz auf Zellebene wird durch genetische sowie epigenetische Veränderungen ausgelöst. Einige der bekannten zellulären Resistenz-Mechanismen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt und im folgenden Abschnitt detailliert erläutert (21).

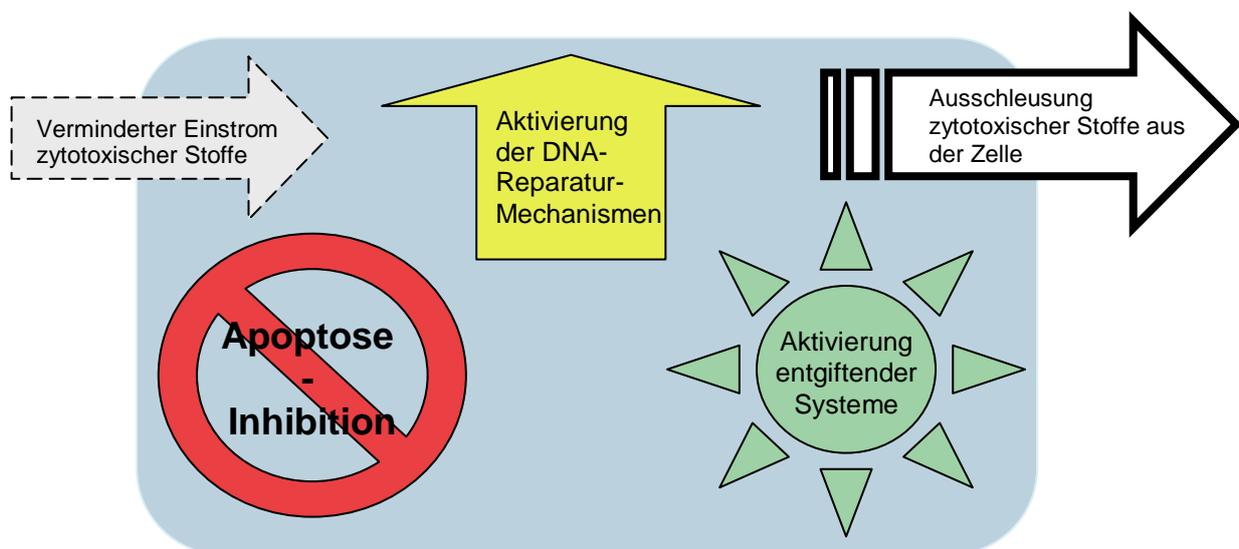


Abbildung 1: Zellvermittelte Chemoresistenz-Mechanismen.

Der wichtigste, am intensivsten beforschte und für die vorliegende Arbeit relevanteste zelluläre Chemoresistenz-Mechanismus ist die aktive Ausschleusung zytotoxischer Stoffe mittels ATP-abhängiger ABC-Transporter (ABC=ATP binding cassette) (siehe hierzu Abschnitt 1.2.2) (21).

Eine weitere Ursache für Chemoresistenz kann die verminderte Apoptose-Bereitschaft von Tumorzellen sein. Die Apoptose wird durch proapoptotisch und antiapoptotisch wirkende Proteine komplex reguliert. Werden proapoptotische Proteine zum Beispiel vermehrt über das Proteasom abgebaut, kann dies zu einer Chemoresistenz führen.

Ebenso begünstigt die Inaktivierung proapoptotisch wirkender Mediatoren, wie Ceramid, die Entstehung von Chemoresistenz. Ceramid ist ein Sphingolipid, welches durch Glykosylierung seine Funktion als proapoptotischer Mediator verliert (22).

Wie in Abbildung 1 weiterhin dargestellt, können auch eine verminderte Aufnahme und Endozytose zytotoxischer Stoffe (wie z.B. Cisplatin) oder die Aktivierung entgiftender Systeme Chemoresistenz zur Folge haben (23).

Als Beispiel für die Entstehung von Chemoresistenz durch Aktivierung entgiftender Systeme ist die Überexpression von Glutathion-S-Transferasen (GST) oder Cytochrom p450 zu nennen (24, 25). Die GST sind eine Enzym-Familie, welche durch Konjugation von Glutathion mit verschiedenen endogenen und exogenen Stoffen die Entgiftung der Zelle einleiten (26). Cytochrom p450 Proteine sind Schlüsselenzyme zur Aktivierung oder Deaktivierung zahlreicher Medikamente. Eine Überexpression dieser Schlüsselenzyme kann durch verstärkten Abbau zytotoxischer Stoffe zur Chemoresistenz führen (25).

### **1.2.2 Pgp (P-Glycoprotein) und andere ABC-Transporter**

Die ABC-Transporter sind eine Familie hochkonservierter Proteine, die in allen lebenden Organismen, vom Bakterium bis zum Menschen, vorkommen. Sie stellen die größte Gruppe der bekannten transmembranösen Proteine dar und erfüllen viele unterschiedliche Funktionen (27). Etliche Proteine dieser Gruppe sind am transmembranösen Transport von Pharmaka beteiligt. Sie kommen physiologisch im Körper vor und eine ihrer Hauptaufgaben ist der Schutz vor Xenobiotika (27, 28).

Bei drei der bekannten ABC-Transporter konnte zweifelsfrei festgestellt werden, dass sie in ihrer Funktion als Transporter in verschiedenen Tumorentitäten Chemoresistenz auslösen können (28). Es handelt sich hierbei um den MDR1- (Multi Drug Resistance) Transporter, das MRP1 (multidrug-resistance-associated protein1) und das BRCP1 (breast-cancer-resistance protein1). Der bekannteste Transporter ist der MDR1-Transporter, auch Pgp (P-Glycoprotein) genannt, welcher das Genprodukt von ABCB1 ist (29).

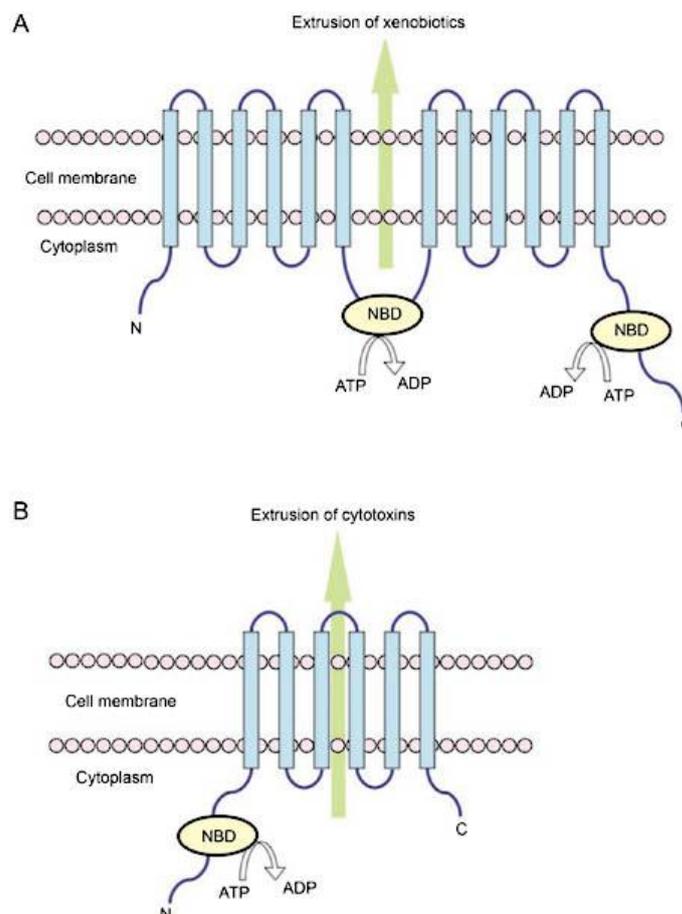
Eine erhöhte Expression dieses Transporters konnte in einer Reihe maligner Tumoren nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass nicht alle Tumoren in denen eine erhöhte Expression der Transporter nachweisbar ist, Chemoresistenz aufweisen. Umgekehrt ist auch nicht bei allen Tumoren mit erhöhter Expression der Transporter und vorliegender Chemoresistenz die Resistenz ausschließlich auf die MDR-Transporter zurückzuführen (21, 30-39).

Eine Übersicht über die regulierten Proteine, die entsprechenden Gen-Namen, die transportieren Substrate, die Tumoren, in denen die Transporter erhöht exprimiert nachgewiesen werden konnten und die Orte, an denen die ATP-Transporter physiologisch vorkommen bietet Tabelle 3 (29, 40-44).

**Tabelle 3: Übersicht über Funktion und Lokalisation der Chemoresistenz-vermittelnden ABC-Transporter (29, 40-44)**

	<b>P-Glycoprotein/ MDR1</b>	<b>MRP1</b>	<b>BCRP</b>
<b>Gen-Name</b>	ABCB1	ABCC1	ABCG2
<b>Gewebe</b>	Darm, Leber, Nieren, Plazenta, Blut-Hirn-Schranke	Ubiquitär	Darm, Leber, Plazenta, Brust
<b>Transportierte Zytostatika</b>	Actinomycin D, Bisanren, Doxorubicin, Daunorubicin, Docetaxel, Etoposid, Homoharringtonin, Paclitaxel, Teniposid, Vincristin, Vinblastin	Doxorubicin, Epirubicin, Etoposid, Methotrexat, Vincristin	Doxorubicin, Daunorubicin, Mitoxantron, Topotecan, SN-38
<b>Transportierte Substrate</b>	Neutrale und kationische organische Verbindungen, viele allgemein verwendete Medikamente	Glutathion und andere Konjugate organischer Anionen, Leukotriene C4	Prazosin
<b>Tumoren</b>	Colon Ca, Nierenzellkarzinom, Nebennierenrinden Ca, Hepatozelluläres Ca, AML (Akute Myeloische Leukämie), ALL (Akute Lymphatische Leukämie), Ösophagus Ca, Nicht-Kleinzelliges-Bronchial Ca, Mamma Ca, Osteosarkome, Non-RMS-Weichteilsarkome, RMA, Magen Ca, Blasen Ca	Ösophagus Ca, Magen Ca, Colon Ca, AML, ALL, Nicht-Kleinzelliges-Lungen Ca, Blasen Ca, Neuroblastom, RME	ALL, Ovarial Ca, Mamma Ca, Nicht-Kleinzelliges-Lungen Ca

Die meisten eukaryotischen ABC-Transporter sind ähnlich aufgebaut und erlauben nur einen unidirektionalen Transport von Substanzen über die Zellmembran. Sowohl MDR1 als auch MRP1 besitzen zwölf transmembranöse Regionen und zwei ATP-Bindungsstellen (siehe Abb. 2A) (45, 46) . Bei jedem transmembranösen Transport mittels Pgp werden nacheinander zwei ATPs hydrolysiert (47). Das BRCP hingegen ist ein Dimer bestehend aus zwei Halbtransportern (siehe Abb. 2B) mit jeweils einer Bindungsstelle für ATP (48). Damit bieten die ABC-Transporter zwei Angriffspunkte zur therapeutischen Inhibition des Transporters. Ein möglicher Angriffspunkt ist der Kanal selbst, der andere Angriffspunkt ist die ATP-Bindungsstelle. (Näheres dazu siehe Abschnitt 1.2.4)



**Abbildung 2 (übernommen aus (46)): Schematische Darstellung von MDR-Transportern**

**A:** Pgp mit 12 transmembranösen Regionen und zwei ATP-Bindungsstellen (NBDs-nucleotide binding domains) jeweils nach 6 transmembranösen Regionen.

**B:** BCRP-Transporter. Halbtransporter mit einer ATP-Bindungsstelle vor den 6 transmembranösen Regionen.

### 1.2.3 LRP-Major vault protein

Häufig wird zusammen mit MDR1, MRP1 und BRCP auch das LRP (lung resistance protein) aufgeführt. Dieses kommt oftmals erhöht exprimiert in resistenten Tumorzellen vor. Es ist jedoch nicht der Gruppe der ABC-Transporter zuzuordnen. Das LRP ist ein major vault protein. Vaults (engl. Tresor) sind fassförmige Proteine, die an der Nukleus-Membran in der Nähe von NPCs (nuclear pore complex) sitzen, aber auch im Zytoplasma vorkommen. Sie sind wahrscheinlich am intrazellulären und möglicherweise auch am Nukleo-Zytoplasmatischen Transport beteiligt. Man nimmt an, dass das LRP durch Weiterleitung von Zytostatika innerhalb der Zelle zur Chemoresistenz beitragen kann (49-51). Man vermutet daher, dass sie über eine Umverteilung zytotoxischer Stoffe in der Zelle Chemoresistenz vermitteln können.

### 1.2.4 Drei Generationen P-Glycoprotein-Inhibitoren

Seit etwa 30 Jahren wird nach Möglichkeiten gesucht Pgp zu inhibieren (52). Mittlerweile sind etliche Substanzen entdeckt und entwickelt worden, die das leisten können (53). Aktuell gibt es drei Generationen von Pgp-Inhibitoren, welche sich in ihrem Wirkmechanismus grundlegend voneinander unterscheiden. Tabelle 4 (54-66) gibt eine Übersicht über die drei Generationen und ihre Vertreter.

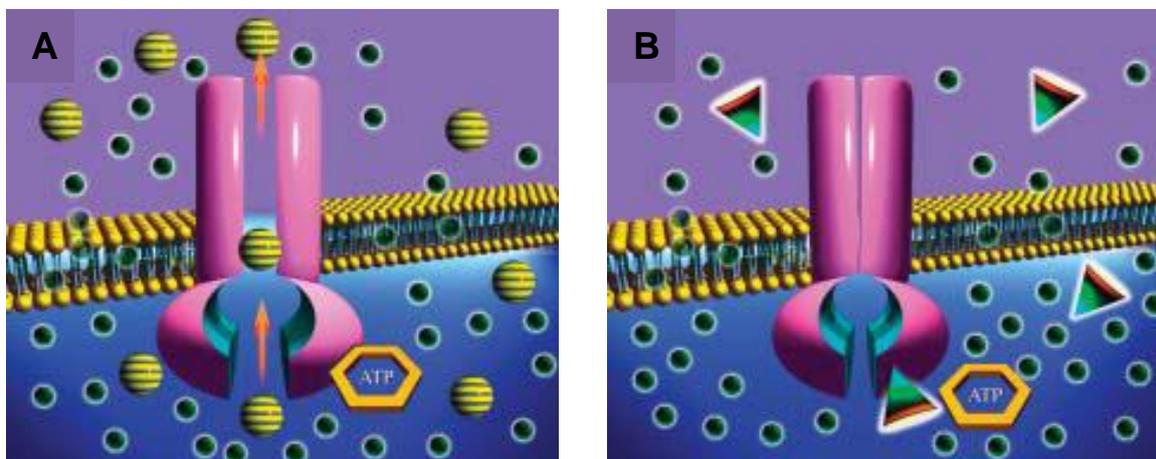
**Tabelle 4: Die unterschiedlichen Generationen der Pgp-Inhibitoren und Beispiele**

<b>Generation</b>	<b>Substanzen (Beispiele)</b>
<b>1. Generation</b>	Verapamil (54, 67), Devapamil, Emopamil, Isradipin, Nimodipin, Felodipin, Nitrendipin, Niguldipin (54), Chlorpromazin, Trifluperazin, Prochlorperazin (68), Flupenthixol, Fluphenazin (57), Cyclosporin A (58)
<b>2. Generation</b>	Dexverapamil, Emopamil, Gallopamil (59), Valspodar (PSC-833) (60, 61), Biricodar (VX-710) (62), XR9051 (63)
<b>3. Generation</b>	<b>Tariquidar (XR9576)</b> , Zosuquidar (LY335979) (64), Laniquidar (R101933) , ONT-093 (OC144-093) (65), Elacridar (GF120918/GG918) (66)

Die ersten Pgp-Inhibitoren waren selbst Substrate für Pgp, welche durch Konkurrenz mit den zytotoxischen Stoffen den Transporter zu inhibieren versuchten (Abbildung 3A) (69). Aus diesem Grund wurden hohe Serum-Konzentrationen dieser Substanzen benötigt (je nach Substanz zwischen 1-50  $\mu\text{M}$ ), was schwerwiegendes Nebenwirkungen auslöste (53, 69). Zu den Inhibitoren der ersten Generation gehörten etliche Calcium-Kanal-Antagonisten, wie zum Beispiel Verapamil (54, 57, 67, 68) und die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tamoxifen (69).

Die Suche nach weniger toxischen und in geringeren Serum-Konzentrationen wirksamen Pgp-Inhibitoren führte zur Entwicklung von Analoga der ersten Generation, den Pgp-Inhibitoren der zweiten Generation. Sie selbst waren weniger toxisch als die Inhibitoren der ersten Generation. Arzneimittelinteraktionen lösten jedoch schwere Nebenwirkungen aus. Der Metabolismus verschiedener Chemotherapeutika wurde durch sie gehemmt und führte somit zu einer nicht tolerablen Toxizität der Zytostatika (59, 60, 65). Auch die Pgp-Inhibitoren der zweiten Generation entfalteten ihre Wirkung über eine kompetitive Hemmung der MDR-Transporter (Abbildung 3A).

Die Inhibitoren der dritten Generation hingegen wirken über eine nicht-kompetitive Hemmung der Transporter (Abbildung 3B). Durch Inhibition der basalen ATPase-Aktivität der ATP-abhängigen Transporter hemmen sie die Pgps effizienter und noch selektiver als die Pgp-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation.



**Abbildung 3 (übernommen aus (69)): Schematische Darstellung der Mechanismen der Pgp-Inhibitoren**

**A:** Kompetitive Hemmung des MDR1-Transporters durch Pgp-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation. Der Wirkstoff ist schematisch als gestreifte Kugel dargestellt.

**B:** Pgp-Inhibitoren der 3ten Generation (Dreiecke) hemmen spezifisch die ATPase-Aktivität der MDR1-Transporter. Dadurch wird im Vergleich zu den Inhibitoren der ersten und zweiten Generation eine bessere Wirksamkeit und spezifischere Wirkung erzielt.

Die Pgp-Inhibitoren der dritten Generation, Zosuquidar und Tariquidar (XR9576), sind hochspezifisch für ABCB1 und hemmen, auch in höheren Konzentrationen, ausschließlich den ABCB1 Transporter (70, 71). Elacridar vermag neben ABCB1 noch ABCG1 (BRCP) zu inhibieren (72).

### **Tariquidar (XR9576)**

Tariquidar ist der selektivste, stärkste und am längsten wirkende Pgp-Inhibitor, der bisher beschrieben wurde (71, 73). Wie bereits erläutert, nimmt man an, dass er die basale ATPase-Aktivität von Pgp durch Hemmung der ATP-Hydrolyse inhibiert (73).

*In vitro* werden 25-80 nM Tariquidar benötigt, um die Pgp-vermittelte Chemoresistenz für verschiedene Zytostatika, darunter Doxorubicin, Vincristin, Paclitaxel und Etoposid, komplett aufzuheben. Die Inhibition von Pgp ist reversibel, aber es dauert etwa 22 Stunden bis die Wirkung von Tariquidar nachlässt (71). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Zugabe von Tariquidar (oder Inhibitoren der zweiten Generation wie PSC-833 oder VX-710) sowohl eine bereits bestehende Chemoresistenz überwinden kann als auch die Neu-Entstehung von Chemoresistenz *in vitro* zu verhindern vermag (74).

Die intrinsische Toxizität (10 % Wachstumsinhibition) von Tariquidar *in vitro* liegt für murine Zellen bei einer Konzentration von 0,369 µg/ml (0,570 µM), für humane Zellen bei 1,733 µg/ml (2,68 µM) (71). Auf Tumorzellen konnte bisher kein wachstumsinhibierender Effekt durch Tariquidar nachgewiesen werden (75).

In Mäusen mit resistenten Kolon-Karzinomen wird mittels 6-12 mg/kgKG Tariquidar eine vollständige Aufhebung der Chemoresistenz *in vivo* gegenüber Vincristin, Paclitaxel und Etoposid bewirkt. Die Behandlung mit Tariquidar oder der Kombination aus Tariquidar und Zytostatikum wird von den Mäusen gut vertragen und führt zu keinen nennenswerten Nebenwirkungen (71).

In gesunden menschlichen Probanden kann durch den Einsatz von Tariquidar eine fast 100prozentige Inhibition des Rhodamin123-Efflux aus CD56<sup>+</sup>-Zellen für 24 Stunden erreicht werden (76). Rhodamin123 ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher von Pgp unidirektional über die Zellmembran aus der Zelle ausgeschleust wird. Der Rhodamin123-Efflux ist abhängig von Pgp und der Aktivität dieses Transporters (77). Der Nachweis erfolgt durch Durchflusszytometrie. Die maximale Hemmung des Rhodamin123-Efflux aus CD56<sup>+</sup>-Zellen beim Menschen wird unter

Serumkonzentrationen von 0,15-0,2 µg/ml (0,23-0,31 µM) erreicht. Die Plasma-HWZ von Tariquidar liegt bei 24 Stunden (76).

Der Nachweis von Pgp *in vivo* und seine erfolgreiche Inhibition kann weiterhin mittels <sup>99m</sup>Tc-sestamibi-Efflux geführt werden. Sestamibi ist eine Substanz, welche ebenfalls mittels Pgp transmembranös transportiert wird. Technetium-markiertes Sestamibi kann wiederum radiologisch dargestellt werden. Bei 26 Patienten mit metastasierten Tumoren wurde gezeigt, dass der <sup>99m</sup>Tc-sestamibi-Efflux in der normalen Leber und in resistenten Tumorzellen durch Tariquidar inhibiert werden kann (78).

Tariquidar zeigt in therapeutischen Konzentrationen bis 2 mg/kgKG i.v. und 750 mg p.o. keine Nebenwirkungen bei Patienten und gesunden Probanden (76, 79). Die für Erwachsene empfohlene Dosierung von 2 mg/kgKG wird auch von Kindern gut toleriert (80). Zu pharmakinetischen Arzneimittelinteraktionen kam es unter der Verwendung von Tariquidar nicht (71, 79, 80). Es mussten jedoch zwei Phase III-Studien wegen toxischer Wirkungen abgebrochen werden. Möglicherweise traten diese zytotoxischen Wirkungen auf, weil durch die Inhibition von Pgp die schädigende Wirkung der Zytostatika auf die Stammzellen des Knochenmarks verstärkt wurde. Pgp ist ein protektives Enzym der Stammzellen, die Inhibition durch Tariquidar kann daher toxisch wirken (80).

Die Wirkung von Tariquidar auf Stammzellen im Einzelnen und das Nebenwirkungsprofil von Tariquidar sind dennoch weiterhin Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung

### **1.2.5 Das Proteasom und die Chemoresistenz**

Das Proteasom ist die wichtigste Protein-Abbaustelle der Zelle. Es kontrolliert unter anderem die Expression etlicher Proteine zur Regulation von Zellproliferation und -überleben (81). Wie bereits erwähnt, kann das Proteasom damit indirekt Einfluss auf das Überleben von Zellen nehmen und dadurch zu Chemoresistenz führen.

In verschiedenen Studien wird durch Proteasominhibition versucht, die Apoptose-Bereitschaft entarteter Zellen wieder herzustellen. Aus diesem Grund sind Proteasominhibitoren aktuell ebenfalls Objekt intensiver Forschung bei der Suche nach einer Möglichkeit, Chemoresistenz zu überwinden (82). Im folgenden Abschnitt werden einige Beispiele hierzu kurz erläutert.

Bei der Induktion von Chemoresistenz durch Stress (im Sinne von Glucose-Entzug, Hypoxie, Azidität) spielt das Proteasom eine wichtige Rolle, da es in „gestressten“

Zellen akkumuliert im Zellkern vorliegt (83, 84). Dadurch kommt es zu einem verstärkten Abbau proapoptotischer Proteine, wie zum Beispiel der Topoisomerase II $\alpha$ . Dies kann gegebenenfalls eine Chemoresistenz gegen Topoisomerase II-Gifte, wie zum Beispiel Doxorubicin nach sich ziehen. (85-87).

Neben dem bereits genannten Abbau von Topoisomerase II $\alpha$  ist das Proteasom auch für die Regulierung des Protoonkogens NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) und des Tumorsuppressorgens p53 zuständig.

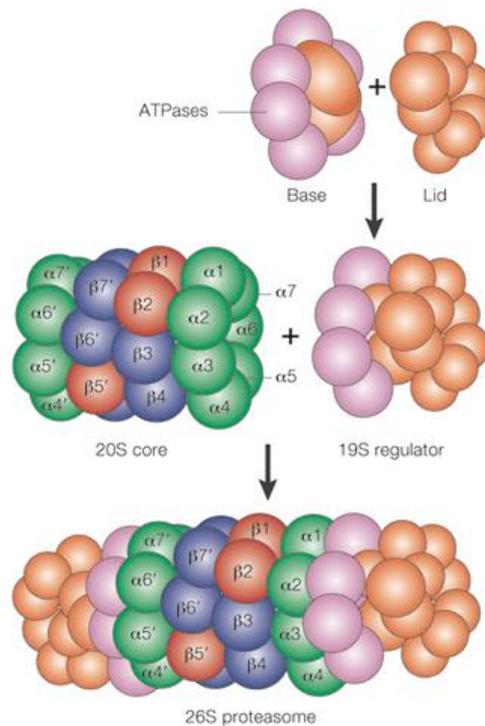
Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird durch den Abbau des I $\kappa$ B (inhibitory  $\kappa$ B) / NF- $\kappa$ B Komplexes über das Proteasom gesteuert. NF- $\kappa$ B spielt eine Schlüsselrolle in der schnell induzierbaren Gen-Regulation und ist außerdem ein antiapoptotisch wirkender Transkriptionsfaktor (88, 89). In der Regel liegt NF- $\kappa$ B im Komplex mit I $\kappa$ B im Zytoplasma vor. Durch den Abbau von I $\kappa$ B im Proteasom wird NF- $\kappa$ B frei und kann damit seine Arbeit als antiapoptotischer Transkriptionsfaktor aufnehmen (81, 84, 89). Eine erhöhte Expression von NF- $\kappa$ B kann zu Chemoresistenz führen, da es mitunter die Regulation von MDR1 beeinflusst (90).

Das Produkt des bekanntesten Tumorsuppressorgens p53 induziert in Stress-Situationen Apoptose, arretiert den Zellzyklus und leitet die DNA-Reparatur ein. Dadurch werden gefährliche Mutationen und Karzinogenese verhindert (91). Wird p53 verstärkt abgebaut, kann das sowohl die Tumorgenese an sich als auch die Chemoresistenz-Entstehung begünstigen (91, 92). Der Abbau von p53 im Proteasom erfolgt nach Ubiquitinierung durch MDM2. MDM2 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, welche unter anderem die Aufgabe hat, den Abbau von p53 zu regulieren (93).

### **1.2.6 Der Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplex**

Das Proteasom kommt ubiquitär in Zellkern und Zytoplasma aller eukaryotischen Zellen vor. Abbildung 4 (94) zeigt eine schematische Darstellung des Proteasoms.

Das funktionelle 26S-Proteasom besteht aus einer 20S-Kerneinheit und zwei 19S-Untereinheiten. Die 20S-Kerneinheit hat eine fassförmige Struktur und besteht aus insgesamt 28 Untereinheiten (14 verschiedenen). Diese formieren sich zu vier axial gegliederten heptameren Ringen (95). Jeder Ring besteht aus sieben  $\alpha$ - oder sieben  $\beta$ -Einheiten (PSMA (proteasome subunit alpha type) 1-7 und PSMB (proteasome subunit beta type) 1-7) (94). An beiden Enden der 20S-Kerneinheit hängt eine 19S-Untereinheit. Ubiquitinierte Proteine werden an der 19S-Untereinheit erkannt und daraufhin vom Proteasom verarbeitet.



**Abbildung 4 (übernommen aus (94)): Das 26S- Proteasom**

Dargestellt ist das 26S-Proteasom. Die 20S-Kern-Einheit ist mit den 7 verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten in grün und den 7 verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten in rot und blau dargestellt. Die zwei 19S-Untereinheiten sind in violett und braun gehalten.

## Die Ubiquitinierung

Die Konjugation von Lysin-Enden mit einer Polyubiquitin-Kette ist der wichtigste Mechanismus, um Proteine für den Abbau durch das Proteasom zu markieren (96). Die Ubiquitinierung erfolgt durch das Zusammenspiel von drei Enzymen. Entscheidend für die spezifische Markierung des Zielproteins ist die Ubiquitin-Ligase. Dementsprechend gibt es viele verschiedene Ubiquitin-Ligasen (96-98).

MDM2 ist wie bereits erwähnt die Ubiquitin-Ligase, welche das Enzym p53 für den Abbau markiert (siehe auch Abschnitt 1.2.4). UIMC1/RAP80 (Ubiquitin interaction motif containing 1/ receptor interacting protein 80) verstärkt die Wirkung von MDM2 und somit die Ubiquitinierung von p53. Durch UIMC1 kommt es zu einem vermehrten Abbau von p53 über das Proteasom (99). Die Expression von UIMC1 wird unter anderem im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Ubiquitinierte Proteine werden an der 19S-Untereinheit des Proteasoms erkannt, gebunden und gegebenenfalls desubiquitiniert.

### **Die 19S-Untereinheit: regulatorische Einheit des 26S-Proteasoms**

Die 19S-Untereinheit des Proteasoms besteht aus der Basis und dem Deckel.

Die Basis entfaltet die abzubauenen Proteine mit Hilfe von ATPasen, leitet sie in die 20S-Kerneinheit weiter und aktiviert den 20S-Kernkomplex (96, 100). Die Basis ermöglicht die Ubiquitin-unabhängige Protein-Verdauung im Proteasom.

Der Deckel ist verantwortlich für den Ubiquitin-abhängigen Abbau der Proteine (101-104). Er verschließt den Eingang in das Proteasom für nicht ubiquitinierte Proteine und ist für die Desubiquitinierung ubiquitinerter Proteine verantwortlich (100, 105, 106). Die desubiquitinierende Untereinheit ist PSMD14, besser bekannt als Rpn11 oder POH1. PSMD14 enthält ein hoch konserviertes Metalloprotease-Motiv JAMM. Ohne dieses ist eine Desubiquitinierung nicht möglich. PSMD14 ist somit für die Viabilität der Zellen essentiell wichtig (105).

PSMD14 kann eine Pgp-abhängige Chemoresistenz für Taxol und Doxorubicin bewirken, wenn es vorübergehend überexprimiert in Zellen vorliegt. Vermittelt wird diese Resistenz vermutlich ebenfalls über eine verstärkte Proteolyse zellzyklusrelevanter Proteine (107).

Nach der Denaturierung der Proteine durch die Basis, beziehungsweise den Deckel des Proteasoms, gelangen diese in 20S-Kerneinheit. Dort werden sie in kurze Polypeptid-Ketten zerlegt.

### **Funktionen der 20S-Kerneinheit**

Die proteolytische Aktivität des Proteasoms ist ausschließlich in den Ringen der  $\beta$ -Untereinheiten lokalisiert. Es gibt insgesamt sechs proteolytische Zentren, welche sich in ihrer Spezifität und Funktionsweise unterscheiden (81, 96, 108). Die durch Proteolyse entstehenden Polypeptidketten können vom MHC1-Komplex (major histone compatibility) auf der Zelloberfläche präsentiert werden (108, 109).

Der normale Umsatz von den Zell-Zyklus regulierenden Proteinen ist maßgeblich abhängig von dem Proteasom. Wie wichtig die Rolle des Proteasoms in diesem Prozess ist, zeigt sich unter anderem darin dass eine Proteasom-Inhibition zum Zellzyklus-Arrest führt. Maligne Zellen sind stärker abhängig von der Funktion des Proteasoms als normale Zellen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung des Proteasoms verschiedene maligne Zellen für Apoptose sensibilisiert (96, 110-112).

### 1.3 Chemoresistenz beim kindlichen Rhabdomyosarkom

An der Entstehung von Chemoresistenz beim kindlichen RMS scheinen unterschiedliche Mechanismen beteiligt zu sein. Es konnten bereits mehrere Resistenz-vermittelnde und Resistenz-assoziierte Proteine erhöht exprimiert in RMS-Tumorzellen nachgewiesen werden. Darunter waren LRP (39, 113), MRP1 (39, 114), GST (24), MDR1 (39, 114-117) und MDM2 (115). Zum Teil war die erhöhte Expression von MDM2 assoziiert mit der erhöhten MDR1-Expression (115).

MDR1 ist in der Literatur das am häufigsten als überexprimiert beschriebene Resistenzgen beim kindlichen RMS (39, 114-117). Die Expression von MDR1 beziehungsweise Pgp ist auf drei Ebenen nachweisbar. Durch PCR lässt sich das MDR1-Gen nachweisen und durch Southern Blot die Amplifikation des Gens darstellen. Die reverse Transkription und anschließende PCR erlaubt den Nachweis vorhandener MDR1-RNA, eine anschließende RT-PCR (Real Time-PCR) ermöglicht den quantitativen Nachweis. Der Nachweis von MDR1-RNA gelingt auch über die Northern Blot Methode. Mittels immunhistochemischer Färbung lässt sich der Pgp-Transporter direkt darstellen. Der Western Blot erlaubt ebenfalls den direkten Nachweis des Proteins. Der Vorteil der immunhistochemischen Färbung ist, dass auch sehr kleine Pgp-positive Zelleinheiten detektiert werden können (117).

Sowohl der immunhistochemische Nachweis von Pgp-Transportern in RMS-Zellen, als auch der Nachweis einer Überexpression von MDR1 auf mRNA-Ebene gelangen wiederholt in verschiedenen Studien. Dabei wurden MDR1-RNA und Pgp sowohl bei Zellen, welche *in vitro* kultiviert wurden, als auch bei Zellen, die aus Xenografts stammten, als auch in Zellen, welche direkt aus Tumorgewebe von Patienten gewonnen wurden, nachgewiesen (39, 115, 116). Es zeigte sich, dass die Überexpression von MDR1 auf RNA Ebene und von Pgp auf Proteinebene nicht zwangsläufig auf eine Genamplifikation auf DNA-Ebene zurückzuführen sind (116).

Die Chemoresistenz vermittelt durch MDR1 kann intrinsisch vorkommen (117, 118) oder durch Zytostatika-Behandlung induziert werden (116, 117, 119, 120). Beschrieben ist die Induktion von MDR1 bei RMS durch Chemotherapeutika mit Kreuzresistenzen für Actinomycin D, Vinca-Alkaloide und Doxorubicin (116, 119).

Patienten, in deren Tumorgewebe eine verstärkte Expression von Pgp durch immunhistochemische Färbung oder durch PCR nachgewiesen werden konnte, haben eine höhere Rezidiv-Rate und eine schlechtere 5-JÜR (117).

## 1.4 Fragestellungen/ Ziele der Arbeit

1. Welche Wirkung hat der Pgp-Inhibitor Tariquidar in Kombination mit verschiedenen Zytostatika auf RMS-Zellen *in vitro*?
2. Lassen sich die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche durch *in vivo*-Versuche mit RMS-Xenografts im Mausmodell untermauern?
3. Kann die Chemoresistenz in kindlichen RMS-Zellen durch den Einsatz von Pgp-Inhibitoren überwunden werden?
4. Welchen Effekt übt Tariquidar auf RMS-Zellen *in vitro* und *in vivo* aus?
5. Die Behandlung von RMS-Zellen mit Vincristin, Topotecan, Actinomycin D und Carboplatin *in vivo* führt zu einem veränderten Genexpressionsprofil. Welchen Einfluss hat die zusätzliche Gabe von Tariquidar auf das Genexpressionsprofil? Sind die durch die Zytostatika ausgelösten Veränderungen reversibel?
6. Ist eine erhöhte Expression der Gene MDR1, MRP1, LRP, UIMC1 oder PSMD14 in den RMS-Tumorzellen unseres Mausmodelles nachzuweisen?
7. Ist der Proteasom- und Ubiquitinierungs-Komplex an der Entstehung von Chemoresistenz beim kindlichen RMS beteiligt?

## **2. Material und Methoden**

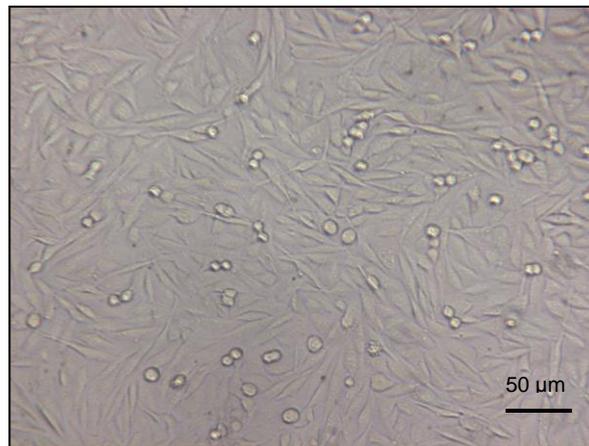
### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zelllinien**

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro*-Versuche mit drei verschiedenen RMS-Zelllinien durchgeführt. Alle Zellen waren nachweislich Mycoplasmen-negativ.

#### **Alveoläre RMS-Zelllinie Rh30**

Bei allen *in vitro*-Versuchen fand die alveoläre RMS-Zelllinie Rh30 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland, DSMZ-Nummer: ACC 489) Verwendung. Diese Zelllinie wurde aus einer Knochenmarkmetastase eines 17-jährigen Mannes mit undifferenziertem alveolärem RMS gewonnen. Die Tumorzellen tragen sowohl die p53 Mutation als auch die t(2;13)(q35;q14) Translokation. Die Zellen wachsen epithelähnlich, einschichtig und sind adhärent (siehe Abbildung 5).

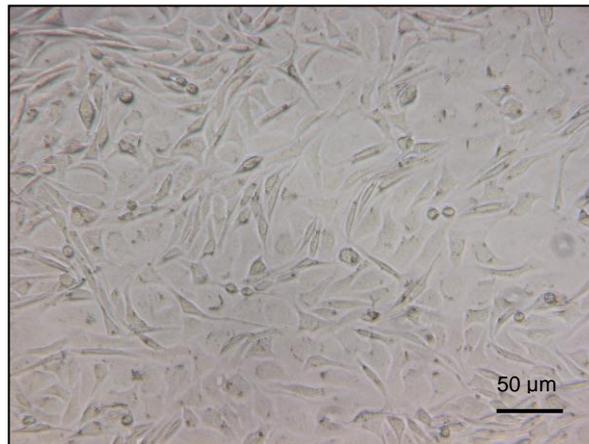


**Abbildung 5: RMS- Zelllinie Rh30**  
Aufnahme der Rh30-Tumorzellen *in vitro* nativ bei 20facher Vergrößerung.

#### **Embryonale RMS-Zelllinien A204 und RD**

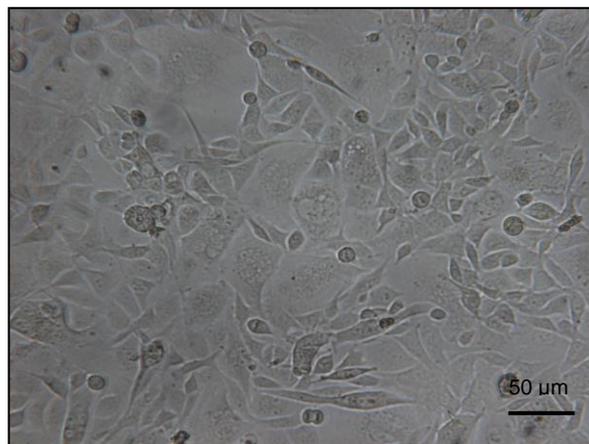
Die embryonale RMS-Zelllinie A204 (ATCC®, Manassas, VA, USA, ATCC®-Nummer: HTB- 82) wurde ebenfalls bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Versuchen eingesetzt. Zusätzlich wurde bei einigen Versuchen eine weitere embryonale RMS-Zelllinie namens RD (ATCC®, Manassas, VA, USA, ATCC®- Nummer: CCL- 136) verwendet.

Die embryonale Zelllinie A204 entstammt dem Tumor eines einjährigen Mädchens. Auch bei ihnen handelt es sich um epithelartig, adhärent wachsende Zellen (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: RMS-Zelllinie A204**  
Aufnahme der A204-Tumorzellen *in vitro* nativ bei 20facher Vergrößerung.

Die Zellen der embryonalen Zelllinie RD wurden aus dem Tumor eines sieben Jahre alten Mädchens mit RME (embryonales Rhabdomyosarkom) entnommen. Bei den Zellen handelt es sich um spindelförmige und große mehrkernige Zellen, die adhärent wachsen (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: RMS- Zelllinie RD**  
Aufnahme der RD-Tumorzellen *in vitro* nativ bei 20facher Vergrößerung.

### 2.1.2 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden im Nährmedium, bestehend aus DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt mit 10 % FCS (Biochrom

AG, Berlin, Deutschland), 1 % L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) auf Kulturplatten (Fa Sarstedt, Mümbrecht, Deutschland) mit Ø 10 cm im Brutschrank (37 °C, 5 %CO<sub>2</sub>, 90 %rH, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt, und bei etwa 80 % Konfluenz der Zellen wurden sie passagiert. Die verwendeten flüssigen Substanzen (DMEM, 1x PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und Trypsin (PAA GmbH, Cölbe, Deutschland)) wurden vor Zugabe zu den Zellen immer in einem Wasserbad auf Raumtemperatur (RT) angewärmt um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden.

Die Arbeit mit den Zellen erfolgte stets unter Laminar-Flow-Reinluftwerkbänken, um eine Kontamination mit Bakterien, Viren oder Pilzen zu vermeiden. Die Arbeitsfläche sowie die Gebrauchsgegenstände wurden vor Beginn und nach Beendigung der Arbeit stets mit 70 % Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt. Während der Arbeit wurden immer Einweg-Latex-Handschuhe (Ansell Derma Clean, Brüssel, Belgien) getragen.

### **Mediumwechsel**

Zunächst wurde der Überstand, bestehend aus Medium und avitalen Zellen, mit Hilfe der Vakuumpumpe (Schuett Biotec, Göttingen, Deutschland) und den Glaspasteur-Pipetten (WU Mainz, Mainz, Deutschland) abgesaugt. Anschließend wurden etwa 5 ml erwärmte 1xPBS-Lösung zugegeben und die Petrischale vorsichtig geschwenkt, um den Zelldebris zu entfernen. Die PBS-Lösung wurde wieder abgesaugt und ca. 8 ml des frischen Nährmediums zugegeben.

### **Passage der Zellen**

Vor der Passage wurden ebenfalls der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen wurden anschließend mittels 2 ml Trypsin von der Platte und voneinander gelöst. Die Zugabe von 8 ml FCS nach weiteren 1-2 Minuten inhibierte die Trypsinierungs-Reaktion. Die Zellen schwammen nun frei im Überstand und konnten für die Versuche geerntet werden. Dazu wurde die Zellsuspension in 15 ml Falcontubes (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) überführt. Wurden keine Zellen benötigt, wurden 4/5 der Zellen verworfen oder auf neue Petrischalen aufgeteilt. Dann wurde wieder 5 ml frisches Nährmedium pro Petrischale zu den übrigen Zellen hinzugefügt.

## Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Unter dem Lichtmikroskop (Fluovert FS, Leitz, Deutschland, Vergrößerung 40x) wurden bei 40facher Vergrößerung vier Großquadranten ausgezählt. Um die Zellzahl/ml zu bestimmen, wurde die ausgezählte Zellzahl durch vier dividiert und mit dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert. Anhand der Zellzahl/ml konnte die absolute Zellzahl in der Zellsuspension bestimmt werden. Die Zellen wurden drei Minuten bei 1300 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in der für die gewünschte Zellkonzentration entsprechenden Menge Nährmedium resuspendiert.

## 2.2 Untersuchte Wirkstoffe

Bei den Experimenten *in vitro* kamen drei Substanzgruppen zum Einsatz: der Pgp-Inhibitor Tariquidar, XR9576 (Fa. Xenova, Slough, United Kingdom), vier verschiedene Zytostatika und zwei Proteasominhibitoren. Die Zytostatika, gelistet in Tabelle 5, sowie Tariquidar wurden außerdem auch *in vivo* eingesetzt.

### 2.2.1 Tariquidar

Tariquidar (XR9576), hergestellt von der Firma Xenova®, 20 mg/ml gelöst in DMSO und aufgeteilt in 20 µl Aliquots, wurde bei 4 °C gelagert. Zur Anwendung *in vitro* wurde es weiter in DMEM verdünnt. Verwendete Konzentrationen lagen zwischen 0,065 µg/ml und 12,8 µg/ml. Für die *in vivo* Versuche wurde es in 0,9 % NaCl (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) verdünnt und in einer Konzentration von 2 mg/kgKG verabreicht. Da Tariquidar in DMSO gelöst wurde erhielten die Mäuse bei der Behandlung mit Tariquidar auch 100 µl DMSO/kgKG verabreicht. Bei einer etwa 25mg schweren Maus entsprach dies 2,5 µl DMSO.

### 2.2.2 Zytostatika

Es wurden vier Zytostatika sowohl alleine als auch in Kombination mit dem Pgp-Inhibitor Tariquidar *in vitro* und *in vivo* getestet. Eines der Zytostatika, Vincristin, wurde außerdem noch in Kombination mit den im Folgenden beschriebenen Proteasominhibitoren verwendet. Alle untersuchten Zytostatika (siehe Tabelle 5) finden klinisch in der Therapie des RMS Anwendung. Die Zytostatika wurden jeweils von der Universitätsapotheke Tübingen frisch hergestellt, dann im Kühlschrank bei 4°C gelagert und innerhalb von einer Woche verbraucht.

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Zytostatika

Zytostatikum (Ausgangs- konzentration und Herstellerangaben)	<i>In vivo</i> verwendete Konzentration	<i>In vitro</i> verwendete Konzentrationen	Wirkmechanismus
<b>Actinomycin D</b> 0,5 mg/ml, Fa. Roth, Braunschweig, Deutschland	0,5 mg/kgKG i.p.	$10^{-6}$ µg/ml- 1 µg/ml	Zytotoxisches Antibiotikum. Führt als Interkalator der DNA zur Hemmung der RNA- Synthese und DNA- Replikation.
<b>Carboplatin</b> 10 mg/ml, Fa. Roth, Braunschweig, Deutschland	15 mg/kgKG i.p.	$10^{-4}$ µg/ml- 100 µg/ml	Cisplatin- Derivat. Carboplatin wirkt, wie Actinomycin D, als Interkalator der DNA.
<b>Topotecan</b> 1 mg/ml, Fa. Roth, Braunschweig, Deutschland	6,6 mg/kgKG i.p.	$10^{-4}$ µg/ml- 100 µg/ml	Topoisomerase-Inhibitor. Verhindert den Wiederverschluss des durch die Topoisomerase 1 verursachten Einzelstrangbruches.
<b>Vincristin</b> 1 mg/ml, Fa. Roth, Braunschweig, Deutschland	0,75 mg/kgKG i.p.	$10^{-6}$ µg/ml- 1 µg/ml	Vinka-Alkaloid. Verhindert durch Bindung an Tubulin die Ausbildung der, zur erfolgreichen Zellteilung notwendigen, Mikrotubuli.

### 2.2.3 Proteasominhibitoren

Es wurden zwei Proteasominhibitoren verwendet, um die Situation eines inaktivierten Proteasom-Komplexes zu simulieren. Zum einen das bereits für das Multiple Myelom zugelassene Medikament Velcade®, ein mit Borsäure derivatisiertes Tripeptid (Synonyme sind PS 341 und Bortezomib, Fa. Janssen Cilag, Deutschland).

Zum anderen wurde das in Deutschland noch nicht zugelassene Polypeptid-Derivat MG132 (Fa. Sigma Aldrich, München, Deutschland) zur Proteasominhibition eingesetzt. Beide Pharmazeutika wurden direkt vor Gebrauch in Medium (DMEM) verdünnt. Verwendete Konzentrationen lagen für MG132 zwischen 0,25 und 0,5 µM, für PS341 zwischen 2,5 und 5 nM.

## **2.3 Proliferationsassay „EZ4U“**

Zur Beurteilung der Wirkung verschiedener Behandlungen mit Zytostatika, Tariquidar oder Proteasominhibitoren auf die Viabilität der Zellen wurden Proliferationstests mittels EZ4U (Biomedica, Eching, Deutschland) durchgeführt. Dieser Assay arbeitet mit einem Tetrazoliumsalz, (Natrium-3,3'-(1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat, C<sub>22</sub>H<sub>12</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>S<sub>2</sub>Na), welches von lebenden Zellen in ein chromogenes Formazan-Derivat umgewandelt wird. Für diese Reduktion werden intakte Mitochondrien benötigt. Da Mitochondrien bereits wenige Minuten nach dem Tod der Zelle inaktiv werden, lässt sich mit dieser Methode die Anzahl der lebenden Zellen sehr genau bestimmen. Im Gegensatz zu anderen Tetrazoliumsalzen ist das hierbei entstehende Formazan-Derivat gut löslich, stabil und erreicht gute Absorptionswerte.

### **Versuchsaufbau**

Die Zellen wurden nach Auszählen, Zentrifugation und Resuspension in Nährmedium (DMEM ohne Phenolrot mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) zunächst auf 96 well Platten ausgesät. Soweit nicht anders angegeben, wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro well in 100  $\mu$ l Medium verwendet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden von allen Werten Dreifachbestimmungen gemacht. Auf jeder Platte wurde außerdem eine Negativkontrolle (nur Medium) angelegt. Während einer 24stündigen Inkubation im Brutschrank hatten die Zellen Zeit, adhärent zu werden, bzw. Zellverbände zu bilden, bevor sie mit den entsprechenden Substanzen behandelt wurden. Die Substanzen wurden jeweils in 50  $\mu$ l Medium (bei Behandlung mit einer Substanz), bzw. 100  $\mu$ l Medium (bei Behandlung mit zwei Substanzen) gelöst in die wells gegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 48 oder 72 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor sie entsprechend des EZ4U Assay gemessen wurden.

### **Behandlungsschemata der verschiedenen Proliferationsversuche**

In Tabelle 6 sind alle Proliferationsversuche, die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt werden, zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht über die durchgeführten Proliferationsassays

Zelllinien	Behandlungsschema	Besonderheit	Behandlungsdauer
<b>A204 RD Rh30</b>	Tariquidar (0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 ; 12,8 µg/ml)	Tariquidar in aufsteigenden Konzentrationen	48 h 72 h
<b>A204 RD Rh30</b>	Tariquidar (0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 µg/ml)  + Vincristin 0,0001 µg/ml  oder + Vincristin 0,001 µg/ml  oder + Vincristin 0,01 µg/ml  oder ohne Zusatz von Vincristin	Vier Behandlungsgruppen pro Zelllinie. Tariquidar in steigenden Konzentrationen + Vincristin in einer bestimmten Konzentration.	48 h
<b>A204 RD Rh30</b>	Actinomycin D (0,0; 10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 0,1 und 1 µg/ml)  Carboplatin (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/ml)  Topotecan (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/ml)*  Vincristin (0,0; 10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 0,1 und 1 µg/ml)  +/- Tariquidar 100 nM	Einsatz von vier verschiedenen Zytostatika in steigenden Konzentrationen mit oder ohne Zusatz von Tariquidar 100 nM	48 h
<b>A204 RD Rh30</b>	Actinomycin D (0,0; 10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 0,1 und 1 µg/ml) **  Carboplatin (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/ml)  Topotecan (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/ml)*  Vincristin (0,0; 10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 0,1 und 1 µg/ml) **  +/- Tariquidar 100 nM	Sphäroid-Versuche Einsatz von vier verschiedenen Zytostatika in steigenden Konzentrationen mit oder ohne Zusatz von Tariquidar 100 nM	48 h

\*die Werte für die Behandlung mit 100 µg/ml Topotecan wurden aus der Wertung genommen, da Topotecan in dieser Konzentration eine eigenständige Fluoreszenz zeigte, welche die Messwerte zu stark verfälschte.

\*\* Für die Versuchsreihen mit Actinomycin D und Vincristin wurden nur 2fach-Bestimmungen von jedem Wert gemacht. Für Sphäroidversuche werden sehr viele Zellen benötigt. Da keine großen Schwankungen bei den Messungen auftraten wurde in diesem Versuchsaufbau von 3fach Bestimmungen der Werte für Actinomycin D und Carboplatin abgesehen.

<b>A204</b> <b>Rh30</b> ***	MG 132 ( 0; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 µmol/l)  PS 341 (0; 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 nmol/l)	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von MG132 und PS341	48 h
<b>A204</b> <b>Rh30</b> ***	Vincristin (0,0; 10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 0,1 und 1 µg/ml)  ohne Zusatz  oder + MG 132 (0,2 µM)  oder + PS 341 (2,5 nM)	Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Wirksamkeit von steigenden Konzentrationen Vincristin	48 h

\*\*\* Keine minimale Hemmkonzentration der Proteasominhibitoren für die Zellreihe RD erstellt, da bei den Versuchen mit den Proteasominhibitoren nur mit den Zellreihen Rh30 und A204 gearbeitet wurde.

## Messung

Zur Viabilitätsmessung wurde direkt vor Gebrauch die benötigte Menge an Substrat-Aktivator-Gemisch nach Anleitung des EZ4U Kits hergestellt. In jedes well wurden entsprechend dem Protokoll 10% Substrat-Aktivator-Gemisch hinzu pipettiert. Die OD (Optische Dichte) steigt in diesem Assay proportional zur Anzahl vitaler Zellen an. Die OD wurde nach 1 Stunde, 1,5 Stunden und 2 Stunden bei 450 nm mit dem ELISA-Gerät (Milenia, Kinetic Analyzer Diagnostic Product Corp., Biermann GmbH, Bad Nauheim) bestimmt. Die Messung wurde akzeptiert, sobald die OD der Kontrollwells zwischen 1 und 2 lag. Bei Messungen mit einer OD >1 oder >2 sind die Messfehler zu groß, daher wurden diese Messungen von unseren Ergebnissen ausgeschlossen. Um eine Verfälschung der Werte durch Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder anderen Zellen sicher ausschließen zu können musste die Negativkontrolle eine OD < 0,4 annehmen.

Die Zellverbände der Sphäroid-Kulturen wurden direkt vor der Messung noch durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 100 µl-Pipette voneinander getrennt.

## Statistische Auswertung der Proliferationsassays

Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe des Statistik-Programmes GraphPad Prism4 dargestellt und ausgewertet.

Zunächst wurde eine „baseline-correction“ durchgeführt, in der die Werte der Negativkontrolle von den übrigen Werten subtrahiert wurden. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Messwerte, wobei die unbehandelte Kontrollgruppe stets den

Referenzwert 100% Viabilität darstellte. Mit diesen Werten ließ sich die Viabilität in Prozent für jede Behandlungsgruppe darstellen.

In die Messpunkte wurde weiterhin mit Hilfe des Statistik-Programmes eine nonlineare Regressionskurve eingelegt, durch welche wiederum die  $IC_{50}$ -Werte der verschiedenen Behandlungen bestimmt werden konnten. Die  $IC_{50}$ -Werte entsprechen der Konzentration, die benötigt wird, um die Vitalität der Zellen um 50 % zu reduzieren.

## **2.4 Zellzyklusanalyse**

Mit Hilfe einer Zellzyklusanalyse wurde bei zwei Zelllinien (Rh30 und A204) untersucht, ob die Behandlung mit Vincristin oder Tariquidar eine Verschiebung ihres Zellzyklus zur Folge hat.

### **2.4.1 Versuchsaufbau**

Es wurden für jede Zelllinie vier 6well Platten angelegt mit 2 ml à  $1 \times 10^5$  Zellen/ml pro well. Die Zellen wurden 24 Stunden im Brutschrank kultiviert und dann behandelt. Je zwei Platten einer Zelllinie wurden mit Vincristin ( $10^{-5}$  µg/ml,  $10^{-4}$  µg/ml,  $10^{-3}$  µg/ml,  $10^{-2}$  µg/ml und  $10^{-1}$  µg/ml) und zwei mit Tariquidar (0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml, 3,2 µg/ml, 6,4 µg/ml und 12,8 µg/ml) behandelt. Somit konnte für jede Zelllinie und Behandlung eine Messung nach 24 Stunden und eine Messung nach 48 Stunden durchgeführt werden.

Zur Messung wurde der Überstand eines jeden wells in ein eigenes FACS-Röhrchen übertragen. Die wells wurden mit je 500 µl PBS ausgespült, die Zellen wurden mit 200 µl Trypsin gelöst, und jeder well wurde noch ein bis zweimal mit 500 µl PBS ausgespült. Die Flüssigkeiten wurden alle im entsprechenden FACS-Röhrchen gesammelt. Die FACS-Röhrchen wurden 5 Minuten bei 1200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und es wurde jeweils 1 ml Hoechst 33342 Farbstoff (Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen bei München, Deutschland) verdünnt zu 20 µg/ml in FACS-Puffer (bestehend aus 500 ml PBS, 10 ml FCS, 2 mM EDTA (292,5 mg) und 25 mg Natriumazid) zugegeben. Damit Hoechst 33342 gleichmäßig auf alle Zellen einwirken konnte, wurde jedes Röhrchen kurz auf dem Vortexer geschüttelt und dann 30 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurden die Proben am LSRII FACS- Gerät mit dem UV-Laser angeregt und mit dem 405/20 nm Filter gemessen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt.

## 2.4.2 Auswertung der FACS Analyse

Die Zellzyklusphasen können anhand der Größe des Chromosomensatzes voneinander unterschieden werden. In der G1-Phase liegt ein diploider Chromosomensatz (1n2c) vor, in der S-Phase ein Chromosomensatz zwischen 1n2c und 2n4c, in der G2-Phase ein tetraploider Chromosomensatz (2n4c) und in der Apoptose-Phase ein Chromosomensatz, welcher kleiner als 1n ist.

Hoechst 33342 ist ein zellmembrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch mit der AT-Region der DNA interkaliert. Die Bindung führt zu einem Wechsel des Emissionsmaximums von 500 nm nach 460 nm. Mit Hilfe des Durchflusszytometers ist es aufgrund der stöchiometrischen Bindung von Hoechst 33342 an die DNA möglich, die Zellen, den detektierten Fluoreszenzsignalen entsprechend, den vier Zellzyklusphasen zuzuordnen.

Anhand der Kontrolle der jeweiligen Zelllinie wurde zunächst das Fenster festgelegt, in dem alle lebenden und apoptotischen Zellen, ohne deren Dubletten oder dem Zelldebris, lagen. Anschließend wurden den Gipfeln die Zellzyklusphasen zugeteilt, entsprechende Grenzmarkierungen gesetzt und diese für die weiteren Messungen beibehalten. In den Abbildungen 11 und 12 in Abschnitt 3.1.4 ist anhand der Zelllinie A204 beispielhaft die Festlegung des Fensters und der Abgrenzungen der Zellzyklusphasen dargestellt.

## 2.5 Färbemethoden *in vitro*

Zur Beurteilung morphologischer Veränderungen in der Zelle unter der Behandlung mit Tariquidar wurden verschiedene Färbemethoden angewendet. In Vorbereitung der Färbungen wurden je zwei selbsthaftende Zellkultureinsätze (Fa. Ibbidi, Martinsrieth bei München, Deutschland) auf einen sterilen Objektträger (SuperFrost® Plus Objektträger, Fa. R. Langenbrink Labor und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) gebracht. Für jede Zelllinie wurde ein Objektträger angelegt, und in jede Kammer wurden 50 µl à  $1 \times 10^5$  Zellen/ml DMEM pipettiert, die vor der Behandlung mit Tariquidar 1 Stunde im Brutschrank inkubiert wurden. Die Zellen wurden dann mit Tariquidar, gelöst in weiteren 50 µl DMEM, behandelt. Die verwendeten Konzentrationen lagen bei 3,2 µg/ml, 6,4 µg/ml und 12,8 µg/ml Tariquidar. Vor der jeweiligen Färbung wurden die Zellen nochmals 24 Stunden lang im Brutschrank inkubiert.

### **2.5.1 HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung**

Als Erstes wurde eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin angefertigt. Bei dieser Methode färben sich der Zellkern blauviolett und das Zytoplasma rot an.

Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurden der Überstand abgesaugt, die Zellkultureinsätze vorsichtig mit einer Pinzette abgenommen und die Präparate dann luftgetrocknet. Für die Färbung wurden die Objektträger zunächst in einem Objektträger-Schlitten drei Minuten in Meyers Hämalaun (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, 1:5 mit Aqua dest. verdünnt) eingetaucht. Hämalaun konnte an die sauren Strukturen, insbesondere des Zellkerns, binden und färbte sie in der sauren Lösung zunächst braun. Anschließend wurden die Objektträger fünf Minuten unter fließendem Wasser gespült, und durch den steigenden pH-Wert schlug die Braunfärbung in Blauviolett um. Die Objektträger wurden danach 3 Minuten in den sauren Farbstoff Eosin (0,1 % Lösung, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht, wodurch sich das Zytoplasma blass rot anfärbte und der überschüssige Farbstoff schließlich 30 Sekunden lang unter fließendem Wasser abgespült werden konnte. Die Präparate wurden daraufhin in einer aufsteigenden Alkoholreihe 70 % Ethanol für fünf Minuten, 95 % Ethanol für fünf Minuten und 100 % Ethanol für zweimal fünf Minuten vom Wasser befreit. Zum Schluss wurden die Präparate noch fünf Minuten in Xylol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht, bevor sie, in DePeX (Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) gebettet, eingedeckelt werden konnten. Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung betrachtet, auf Änderungen der Zellmorphologie untersucht und fotografiert.

### **2.5.2 JC1 Färbung**

Mit Hilfe der JC1 Färbung wurden die Mitochondrien dargestellt. JC1 (5,5', 6,6'-tetrachloro- 1,1', 3,3'-tetraethylbezimidazolylcarbocyanine iodide, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes NJ, USA) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der von den Mitochondrien aufgenommen wird und bei einer Anregung von 485 nm leuchtet. Sind die Mitochondrien intakt und haben ein hohes Membranpotential, komplexiert JC1 und fluoresziert rot mit einem Emissionsmaximum bei 590 nm. Sind die Mitochondrien geschädigt und haben ein niedriges Membranpotential, komplexiert JC1 nicht und fluoresziert grün bei einem Emissionsmaximum von 535 nm.

Zur Färbung wurden nach der 24-stündigen Inkubation mit Tariquidar der Überstand abgesaugt und die Zellkultureinsätze zunächst auf den Objektträgern belassen. Es wurden nun 50 µl JC1 in einer Konzentration von 10 µg/ml (Ausgangskonzentration 1 mg/ml, 1:100 verdünnt in PBS) in jede Kammer pipettiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation im Brutschrank. Danach wurden der Farbstoff abgesaugt, die Zellkultureinsätze vorsichtig mit einer Pinzette vom Objektträger entfernt, auf jeden Objektträger ein Tropfen PBS gegeben und die Zellen mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurden die Zellen sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop (40x Vergrößerung, Axioskop40, Zeiss) mit dem Filtersatz 480/520nm (Breitband) beurteilt und fotografiert.

### **2.5.3 Acridinorange Färbung**

Acridinorange ( $C_{17}H_{20}Cl_3N_3Zn$ , Molekulargewicht 301 g/mol, Fluka Ag, Buchs, Schweiz) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der abhängig von seiner Bindung, bzw. Umgebung, unterschiedliche Absorptions-/ Emissionsmaxima aufweist. Acridinorange ist zellmembrangängig, bindet an die DNA im Zellkern und akkumuliert in Lysosomen. Bei Bindung an die DNA hat es ein Absorptions-/Emissionsmaximum von 502/525 nm und kann mit dem Filtersatz 480/520 nm als grüne Fluoreszenz betrachtet werden. Im sauren Milieu der Lysosomen hat Acridinorange ein Absorptions-/Emissionsmaximum bei 577/590 nm und kann als rote Fluoreszenz mit dem Filtersatz 540/590nm gesehen werden.

Da Acridinorange in Pulverform vom Hersteller geliefert wird, wurde zunächst eine 100 mM Stammlösung (in destilliertem  $H_2O$ ) hergestellt, welche bei 4 °C in Dunkelheit gelagert werden konnte. Zur Färbung der Zellen wurden nach der 24stündigen Inkubation im Brutschrank der Überstand von den Objektträgern abgesaugt, die Zellkultureinsätze abgenommen, 100 µl einer 10 µM Acridinorange-Lösung (1: 10 000 in PBS verdünnte Stammlösung) auf den Objektträger gegeben und die Zellen mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Präparate wurden sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop (40fache Vergrößerung, Axioskop 40, Zeiss) mikroskopiert und fotografiert.

## 2.6 Tierversuche

In Tierversuchen wurde die Wirkung von Tariquidar und den bereits vorgestellten Zytostatika (Abschnitt 2.2.2) weiter untersucht. Die Genehmigungsnummer des Tierversuches ist CK 01/03 (RP Tübingen). Die Tierversuche wurden durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen durchgeführt. Die Aufarbeitung des Materials und die Auswertung dieser Versuche erfolgten im Rahmen dieser Arbeit.

### 2.6.1 Aufbau der Tierversuche

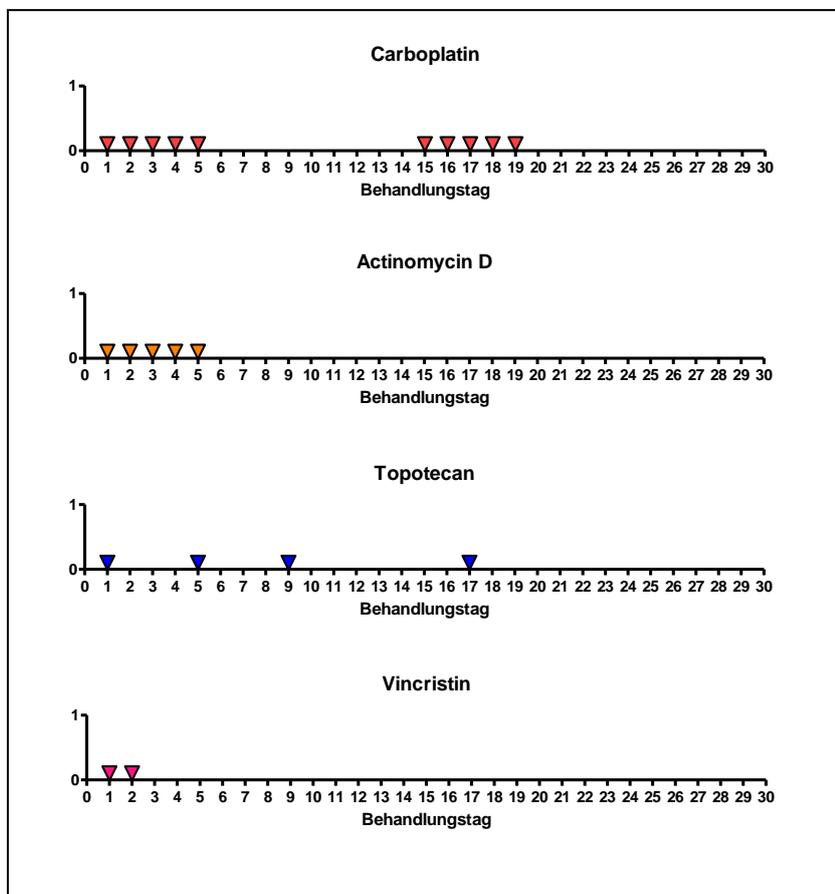
In den Tierversuchen wurden insgesamt 229 NMRI (nu/nu) Mäuse eingesetzt. In Tabelle 7 ist die Einteilung der Tiere in verschiedene Behandlungsgruppen aufgeführt.

Tabelle 7: Anzahl der Tiere in jeweiliger Behandlungsgruppe

Therapiegruppe	A204	Rh30
Kontrolle	10	11
Actinomycin D	10	13
Actinomycin D + Tariquidar	6	10
Carboplatin	10	13
Carboplatin + Tariquidar	0	16
Topotecan	10	14
Topotecan + Tariquidar	-	10
Vincristin	13	13
Vincristin + Tariquidar	5	13
Tariquidar (Actinomycin D-Schema)	6	6
Tariquidar (Carboplatin-Schema)	-	10
Tariquidar (Topotecan-Schema)	-	10
Tariquidar (Vincristin-Schema)	5	10

Den Mäusen wurden zu Beginn der Experimente einmalig 1 ml mit  $10^6$  Zellen (A204 oder Rh30) subkutan in den Rücken-/Flankenbereich injiziert. Die Tiere wurden beobachtet, bis ein Tumolvolumen von etwa  $0,5 \text{ cm}^3$  erreicht war und dann mit

einem Zytostatikum (Auflistung der Zytostatika und Dosierungen in Tabelle 5) entsprechend den aktuellen Therapieleitlinien der CWS 2002 behandelt. Abweichend vom Protokoll, wurden die Zytostatika jedoch immer einzeln eingesetzt, um die Einzelwirkung beurteilen zu können. Zusätzlich wurden Tiere mit dem Chemomodulator Tariquidar oder mit einer Kombination aus Tariquidar und Zytostatikum behandelt. Wurde Tariquidar nach einem Zytostatikum-Schema eingesetzt, bedeutete dies, dass die übliche Dosierung (2mg/kgKG i.p.) an den Tagen gegeben wurde, an denen sonst das jeweilige Zytostatikum gegeben worden wäre. Die Kontrollgruppen erhielten keinerlei Behandlung. Gelöst waren die Medikamente jeweils in 200 µl 0,9 % NaCl. Im Rahmen der Kombinationsbehandlung wurde Tariquidar (2 mg/kgKG i.p.) jeweils 10 Minuten vor Applikation des Zytostatikums verabreicht. In Abbildung 5 sind die Behandlungsschemata graphisch dargestellt.



**Abbildung 8: Behandlungsschemata der Tierversuche.**  
 Auf der Zeitachse sind die Tage markiert, an welchen das Zytostatikum verabreicht wurde.

Im Laufe der nachfolgenden Beobachtungszeit wurde zweimal wöchentlich die Länge, Breite und Höhe des Tumors ausgemessen. Am Ende der Beobachtungszeit (30 Tage) oder bei Anzeichen starker körperlicher Leiden wurden die Tiere mit Ketanest (100 mg/kgKG i.p.) und Rompun (10 mg/kgKG i.p.) betäubt und dann sakrifiziert. Die Tumoren wurden präpariert und bei - 80 °C gelagert. Ebenfalls konserviert wurden die Seren bei - 20 °C.

### **2.6.2 Statistische Auswertung der Tierversuchsdaten**

Berücksichtigt wurden alle untersuchten Mäuse, die mindestens 18 Tage lebten, gesund waren und die Behandlung gut tolerierten. Die Gruppen waren daraufhin jedoch versuchsbedingt unterschiedlich groß (vgl. Tabelle 7). Bei der Auswertung der Daten wurden daher stets statistische Methoden angewendet, die die Gruppengröße mit berücksichtigten.

Die Berechnungen und Darstellungen in Grafiken wurden alle mit Hilfe des Statistikprogrammes Graph Pad Prizm4 gemacht.

### **Bestimmung des Tumorumens**

Mit Hilfe der Volumenformel für einen ellipsoiden Körper

$$\text{Volumen}_{\text{ellipsoider Körper}} = \frac{4}{3} \times \pi \times a/2 \times b/2 \times c/2$$

und den ausgemessenen Größen Tumurlänge (a), Tumorbreite (b) und Tumorrhöhe (c) wurden die Tumorumina berechnet. Diese wurden in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe und der Tumorzelllinie über der Zeit dargestellt. Die Kurven zeigten, dass ein annähernd exponentielles Tumorumwachstum angenommen werden konnte.

### **Tumorumwachstum**

Durch die erste Ableitung der exponentiellen Kurve konnte die Steigung der Kurve und damit die Wachstumsrate des entsprechenden Tumors bestimmt werden.

Bei angenommenem exponentiellem Wachstum entsprach die erste Ableitung Logarithmus (log<sub>10</sub>) der Tumorumina.

Die Steigungen der hieraus entstehenden Geraden entsprachen den Tumorumwachstumsraten der einzelnen Tumoren.

Da kein log<sub>10</sub> von 0 existiert, musste der Datensatz vor Berechnung der Wachstumsraten bereinigt werden. Ein Wert=0, wenn beispielsweise bei einer Maus

kein Tumor ausgemessen werden konnte, da dieser nicht vorhanden oder nicht auffindbar war, wurde nach gängiger Methode durch einen sehr kleinen Wert ersetzt. In diesem Fall wurde der Wert 0 durch ein fiktives Tumolvolumen, welches halb so groß wie minimal messbar sein sollte, ersetzt. Die minimal messbare Seitenlänge wurde mit  $a=0,05\text{cm}$ ;  $b=0,05\text{cm}$ ;  $c=0,05\text{cm}$  festgelegt. Damit ergab sich folgendes fiktives Volumen für nicht nachweisbare Tumore:

$$\text{Wert } 0 = 1/2 \times (4/3 \times \pi \times 0,05\text{cm}/2 \times 0,05\text{cm}/2 \times 0,05\text{cm}/2) = 0,0002618 \text{ cm}^3.$$

Die Wachstumsraten (entsprechend den Steigungen der Geraden) der unterschiedlichen Behandlungen konnten nun mit Hilfe des Dunnett's-Tests statistisch miteinander verglichen werden. Damit war es möglich die Effektivität der Behandlung hinsichtlich des Tumorwachstums zu beurteilen und die verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander zu vergleichen.

Der Dunnett's-Test ist ein abgewandelter T-Test für den Vergleich mehrerer Gruppen mit einer Kontrollgruppe. Er hat eine Irrtums-Wahrscheinlichkeit von maximal 5 % (Fehler  $\alpha=0,05$ ). Mit Hilfe des Dunnett's Tests können unterschiedlich große Gruppen miteinander verglichen werden. Die Gruppengröße wird bei der Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse berücksichtigt.

### **Tumolvolumenverdopplungszeit**

Aus der Geraden-Steigung wurde mit Hilfe der Formel

$$\text{Verdopplungszeit } t^* = \frac{10 \log 2}{\text{Steigung } b}$$

die Verdopplungszeit des Volumens berechnet. Aus den Verdopplungszeiten der verschiedenen untersuchten Tumoren einer Behandlungsgruppe wurde, erneut um die unterschiedliche Gruppengröße statistisch zu berücksichtigen, die mediane Verdopplungszeit für eine Behandlungsgruppe berechnet.

Die mediane Tumolvolumenverdopplungszeit veranschaulicht den Einfluss der Behandlung auf das Tumorwachstum. Verdopplungszeiten, welche nach der Umrechnung aus der Steigung, einen negativen Wert hatten wurden gleich 1000 gesetzt. Ein negativer Wert hätte die mediane Verdopplungszeit in die falsche Richtung verzerrt, da eine negative Steigung einem sehr langsamen Wachstum entspricht, ein negativer Verdopplungswert hingegen einem sehr schnellen Wachstum.

## **2.7 RNA- Extraktion und Quantifizierung mittels qRT-PCR (quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion)**

### **2.7.1 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Mit diesem Kit werden nur RNA-Ketten, welche länger als 200 Nukleotide sind, isoliert. Diese Selektion führt zu einer Anreicherung von mRNA, da die meisten anderen RNAs, wie tRNA oder rRNA in der Regel kürzer als 200 Nukleotide sind.

Zunächst wurde der RLT-Lyse Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 40 mM DTT (1,4 Dithiothreitol, 154,23 g/mol, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) vorbereitet.

Anschließend wurde von dem Tumorgewebe (gelagert bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ein maximal 30 mg schweres Stück mit sterilen Einweg-Skalpellen (B. Braun, Melsungen) abgeschnitten und in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit der Präzisionswaage (Sartorius analytic A210S, geeicht bis 1 mg, Sartorius AG, Göttingen) gewogen.

Um einem RNA-Verdau durch RNAsen vorzubeugen, wurde zum einen stets steril gearbeitet, zum anderen wurde das Gewebe zwischen den Arbeitsschritten auf Trockeneis gehalten. (Die optimale Arbeitstemperatur für RNAsen liegt in der Regel zwischen  $15\text{-}70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Zur Homogenisierung und Lysierung wurde die benötigte Menge RLT-Puffer mit DTT ( $350\text{ }\mu\text{l}/20\text{ mg}$  Tumorgewebe) zum Gewebematerial gegeben und dann alles 20-40 Sekunden lang auf Stufe 4 mit dem Ultra Turrax® T8 (Ika Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Die folgenden Schritte zur RNA-Isolierung wurden entsprechend des Protokolls manuell oder maschinell mit Hilfe des Qiagen Roboters Qiacube (Qiagen, Darmstadt, Deutschland) gemacht

Die gewonnene RNA wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren (um einem Abbau der RNA durch RNAsen entgegen zu wirken) und zur Qualitätskontrolle an die Microarray Facility, Tübingen, Deutschland gesandt. Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurden mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland) und des RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) nach Herstellervorschriften die Qualität sowie die Konzentration der RNA in einer Probe bestimmt.

Da die RNA durch beständigen Abbau durch RNAsen sehr instabil ist, ist die Kontrolle der Qualität und Konzentration einer Probe essentiell für die Arbeit mit RNA. Die Qualität einer RNA-Probe kann mit Hilfe der RIN (RNA Integrity Number) und der rRNA ratio (Verhältnis 28s/18s) ermittelt werden.

Die RIN ist ein von Agilent Technologies und quantinom bioinformatics erstmalig festgelegtes Qualitätslabel, welches sich über RNA-Länge und Informationsgehalt errechnet. Es nimmt Werte zwischen 1 (komplett zerfallene RNA) und 10 (völlig intakt) an. Bei der rRNA-ratio wird das Verhältnis von 28s zu 18s RNA bei der Gelelektrophorese ermittelt. Bei völlig intakter RNA liegt das rRNA-ratio bei 2. RIN und rRNA-ratio wurden freundlicherweise von Microarray Facility Tübingen bestimmt.

Als Qualitätsmindestanforderung für die weitere Verwendung der RNA wurden eine RIN >8 und eine rRNA-ratio von mindestens 1,8 festgelegt.

### **2.7.2 Reverse Transkription**

Da für die qRT-PCR (quantitative Real Time-PCR) cDNA Proben benötigt werden, wurden mit Hilfe des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) cDNA-Proben aus den RNA-Proben gewonnen.

Zunächst wurde der 2fach Mastermix aus den im Kit enthaltenen dNTPs, dem reverse transcription buffer, den random primers, der MultiScribe<sup>TM</sup> reverse transcriptase und dem Nuklease-freien Wasser nach Protokoll hergestellt. Anschließend wurden in einem 200µl Eppendorf-Reaktionsgefäß 25 µl Mastermix und 25 µl RNA (0,2 µg/µl) vermischt und zur Durchführung der reversen Transkription im Thermocycler Gene Amp® PCR System9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) 10 Minuten lang bei 25 °C gehalten und anschließend 120 Minuten lang auf 37 °C erhitzt. Die hiermit gewonnene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei –20 °C aufbewahrt.

### **2.7.3 Die qRT-PCR**

Mittels qRT-PCR wurde die Genexpression ausgewählter Gene auf mRNA-Ebene untersucht.

#### **Gen- Auswahl für die qRT-PCR**

Die Auswahl der Gene für die qRT-PCR erfolgte in mehreren Schritten.

Zunächst wurde das Tumorgewebe von jeweils drei Tieren der verschiedenen Behandlungsgruppen (Kontrolle, Vincristin, Vincristin und Tariquidar) und der beiden Zelllinien (A204 und Rh30) zufällig ausgewählt.

Bei den ausgewählten Tumoren wurde eine Genchip-Analyse mittels Affymetrix high-density oligonucleotide microarrays (GeneChip HU Gene 1.0, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Die Hybridisierungs-Experimente und die Bewertung der Ergebnisse wurden freundlicherweise von der Microarray Facility Tübingen übernommen.

Der komplette Gen-Datensatz wurde anschließend stufenweise auf die für uns interessanten Gene beschränkt.

Zunächst wurden alle Gene ausgeschlossen, welche nicht mindestens ein Transkriptionssignal von 8 in der Kontrollgruppe oder der Vincristin-Gruppe erreichten. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine Varianz der Transkriptionssignale innerhalb einer Behandlungsgruppe größer als 0,099. Der endgültige Datensatz enthielt dann nur noch Gene, welche oben genannte Bedingungen erfüllten und die durch die Behandlung von Vincristin mindestens zweifach hoch- oder herunterreguliert waren. Die Gene des verbleibenden Gen-Datensatzes wurden schließlich mit Hilfe von IPA (Ingenuity Pathway Analysis) auf Ihre biologischen Funktionen und die Gen-Netzwerke, in denen sie eine Rolle spielen, untersucht. Zur Validierung der Genchip-Daten wurden schließlich sieben Gene für die quantitative Gen-Expressionsanalyse ausgewählt.

**Tabelle 8: Verwendete Gen Expressions-Assays. Die Haushaltsgene sind mit \* gekennzeichnet.**

Gen- Name	Gen ID Nr. (Entrez Gene)	RefSeq	Assay ID (Applied biosystems)	Amplicon-Länge
PSMB1	5689	NM_002793.3	Hs00427357_m1	71
PSMB6	5694	NM_002798.1	Hs00382586_m1	93
PSMD14	10213	-	Hs00271805_m1	144
USP17	391627	NM_001105662.1	Hs00970729_g1	81
UIMC1	51720	NM_016290.3	Hs00212459_m1	74
ABCB1	5243	NM_000927.3	Hs00184491_m1	110
LRP	4035	-	Hs00911183_m1	96
GAPDH*	2597	NM_002046.3	Hs99999905_m1	122
PDHB*	5162	NM_000925.2	Hs00168650_m1	82

Es wurden Gene ausgewählt, deren Expressionsprofil durch die Behandlung mit Vincristin/ Tariquidar besonders deutlich verändert war, deren Funktion bekannt und bereits näher beforscht ist und die außerdem nach heutigem Wissensstand Einfluss

auf die Chemoresistenz-Entstehung nehmen können. (Zur Auswahl der Gene siehe auch Abschnitt 3.4.1). Zwei Haushaltsgene als Referenzpunkte wurden festgelegt. In Tabelle 8 sind die ausgewählten Gene zusammen mit den verwendeten Assays und deren Amplicon-Längen aufgeführt. Bei der Auswahl des Assays wurde insbesondere auf die Amplicon-Länge geachtet, da die Assays umso spezifischer sind je größer die Amplicon-Länge ist.

### **Ablauf der qRT-PCR**

Zur Quantifizierung der durch die reverse Transkription gewonnenen DNA wurde eine qRT-PCR (quantitative Real Time-PCR) mit Taqman-Sonden durchgeführt.

Untersucht wurde die mRNA-Expression von jeweils drei Tumoren einer Behandlungsgruppe. Es wurden stets Dreifachbestimmungen für jede Probe und jeden Primer durchgeführt. Nach Anleitung wurden cDNA, TaqMan® Gene Expression Master Mix® (Applied biosystems, Darmstadt, Deutschland), H<sub>2</sub>O und TaqMan® Gene Expression Assay (Applied biosystems, Darmstadt, Deutschland) miteinander vermischt und die Platten damit bestückt.

Neben den zu untersuchenden Genen wurde auch die Menge zweier sogenannter Haushaltsgene (konstitutiv exprimierte, nicht regulierte Gene) bestimmt. Die Haushaltsgene wurden als interner Standard und bei den Berechnungen zur baseline-Korrektur verwendet

Die NTC (negative template control) enthielt anstelle von cDNA die entsprechende Menge H<sub>2</sub>O und den GAPDH-TaqMan® Gene Expression Assay. Nach dem Beladen wurde die Platte mit selbstklebenden optischen Folien (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) fest verschlossen und nach kurzer Zentrifugation in den C1000™ Thermal Cycler, CFX96™ Real Time System (Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gestellt. Das Gerät wurde dem Protokoll entsprechend folgendermaßen programmiert:

- |               |         |  |
|---------------|---------|--|
| – 2 Minuten   | 50 °C - | Aktivierung der Polymerase                                 |
| – 10 Minuten  | 95 °C - | Aktivierung der Polymerase                                 |
| – 15 Sekunden | 95 °C - | Denaturierung der DNA- Doppelstränge                       |
| – 1 Minute    | 60 °C - | Primerhybridisierung und Elongation der neuen DNA- Stränge |

Es wurden 40 Wiederholungs-Zyklen der Schritte 3 und 4 gemacht. Das Programm maß die Fluoreszenz nach jedem Zyklus und berechnete darüber den Ct- Wert einer jeden Probe (*Ct-Cycle threshold*, engl. Schwellenwertzyklus). Der Ct-Wert bezeichnet den Punkt, an dem die Fluoreszenz einer Probe zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Der Wert liegt stets zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR. Durch ihn ist eine relative Quantifizierung der RNA möglich. Zunächst wurde eine Qualitätskontrolle der Ct-Werte durchgeführt. Waren die Standardabweichungen der Dreifachbestimmungen zu groß, oder wich ein Wert um mehr als einen Ct-Wert von den anderen ab, wurde die Platte überprüft. Die Werte der betreffenden „wells“ wurden für ungültig erklärt, wenn diese nicht dicht verschlossen waren.

### Statistische Auswertung der qRT-PCR

Zur statistischen Auswertung der qRT-PCR wurden die Expressionsunterschiede mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode untersucht.

Zunächst wurde aus jedem Ct-Wert der entsprechende  $\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet.

Dazu wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmungen des Ct-Wertes des Referenzgens PDHB der entsprechenden Probe vom Ct-Wert der Probe x (z.B. Xenograft der Zelllinie Rh30, behandelt mit Vincristin, untersucht auf Gen MDR1) abgezogen.

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Probe x}} = \text{Ct}_{\text{Probe x}} - \text{Ct}_{\text{PDHB von Probe x}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}} = \text{Ct}_{\text{Kontrolle}} - \text{Ct}_{\text{PDHB von Kontrolle}}$$

Hieraus konnte der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet werden. Dazu wurden jeweils die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen des  $\Delta\text{Ct}$ -Wert einer Probe x gebildet und der Mittelwert des  $\Delta\text{Ct}$ -Wertes der entsprechenden Kontrolle (z.B. Xenograft der Zelllinie Rh30, unbehandelt untersucht auf Gen MDR1) abgezogen.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe x}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}}$$

Die n-fache RNA-Expression eines Gens einer Probe nach Behandlung wurde mit Hilfe der Formel

$$\text{n-fache Expression}_{\text{Probe x}} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct-Probe x}}$$

berechnet. Wieder erfolgte die statistische Auswertung und grafische Darstellung mit dem Statistik-Programm GraphPad Prism4.

## 2.8 Materialien

Sofern nicht anders angegeben befindet sich der Sitz des Herstellers in Deutschland.

### 2.8.1 Geräte

EcoVac Vakuumpumpe, Endvakuum 300 mbar, Pumpleistung 4 l/min	Schuett Biotec, Göttingen
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn
Brutschrank Heraeus® (37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , 90 % rH) BBD 6220	Thermo Scientific, Schwerte
C1000™ Thermal Cycler, CFX97™ Real Time System	BioRad Laboratories GmbH, München
FACS- Gerät LSRII	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Gene Amp.® PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikroskop Axioscop 40	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Fluovert FS,	Leitz, Wetzlar
Milenia, Kinetic Analyzer	DPC (Diagnostic Product Corp.) Biermann GmbH, Bad Nauheim
Multipipette pro	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (0,5- 10 µl; 10- 100 µl; 100- 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer, Multiscan Ascent	Thermo Electron Corp. seit 2006 Fusion mit Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Präzisionswaage, Sartorius analytic A210S, geeicht bis 1 mg	Sartorius AG, Göttingen
RNS-, DNA-Isolationsroboter QIAcube	Qiagen, Darmstadt,
Ultra Turrax® T8	Ika Labortechnik, Staufen
Zentrifuge Heraeus® Multifuge 1SR Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge Rotixal RP	Hettich, Tuttlingen

## 2.8.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, 24x50 mm, Dicke 0,13- 0,16 mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Einwegpinzetten, steril	Servoprax, Wesel
Einwegskalpelle, steril	B. Braun, Melsungen
FACS-Rundbodenröhren	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon™ Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Glaspasteurpipetten 230 mm	WU Mainz
Kulturplatten Ø 10cm	Fa. Sarstedt, Mümbrecht
Latex-Handschuhe	Ansell Derma Clean, Brüssel, Belgien
Objektträger, SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
PCR-Reaktionsgefäße, ThermoTube™ PCR Tubes	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Fa. Sarstedt, Mümbrecht
qRT-PCR-Abdeckfolien, Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
qRT-PCR-Platten, MicroAmp® Optical 96-well	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase-Spray, Invitrogen™ Rnase AWAY®	Molecular BioProducts, San Diego, USA
RNeasy mini spin column (Trennsäule)	Qiagen, Darmstadt
Costar® Ultra low attachment plate, 96 well flat bottom with lid	Corning Incorporated, Corning NY, USA
Zelleinsätze, Culture inserts	Fa. Ibidi, Martinsrieth bei München
Zellkultur- Platten (96 well; 24 well; 12 well; 6 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA
Zytostatika-Schutzhandschuhe	Zplus, Berner, Elmshorn

### 2.8.3 Reaktions- Kits

EZ4U, Cat. No. BI-5000	Biomedica, Eching
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
High capacity DNase Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 2.8.4 Chemikalien, Lösungen, Puffer

Acridinorange, 100 mM Acridinorange gelöst in Aqua dest., gelagert im Dunkeln bei 4 °C	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DePeX	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DNase- Stammlösung	Qiagen, Darmstadt
DTT, Wasser auf 2 M gelöst und bei -20 °C gelagert	Fa. Merck, Darmstadt
Eosin, 0,1 % Lösung	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol, 100 %	Fa. Merck, Darmstadt
FACS Puffer, bestehend aus 500 ml PBS, 10 ml FCS, 2 mM EDTA (292,5 mg) und 25 mg Natriumazid	Eigene Herstellung aus genannten Bestandteilen
Giemsalösung	Fa. Merck, Darmstadt
Hämalaun	Fa. Merck, Darmstadt
Hoechst 33342	Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen bei München
JC1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
RDD- Puffer	Qiagen, Darmstadt
RLT- Puffer	Qiagen, Darmstadt
RPE- Puffer	Qiagen, Darmstadt

RW1- Puffer	Qiagen, Darmstadt
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix®	Applied biosystems, Darmstadt
Xylol	Fa. Merck, Darmstadt

### 2.8.5 Zellkulturmedium , Zusätze und Waschlösungen

Dulbecco´s MEM mit oder ohne phenolrot, mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> und 4,5 g/l Glucose, ohne L-Glutamine, getestet auf Endotoxine	Biochrom AG, Berlin
FCS (fetal calve serum), getestet auf Mycoplasmen, gelagert in Dunkelheit bei 4 °C	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
PBS Dulbecco, ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> ,	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	PAA GmbH, Cölbe

### 2.8.6 Zellkulturmedium , Zusätze und Waschlösungen

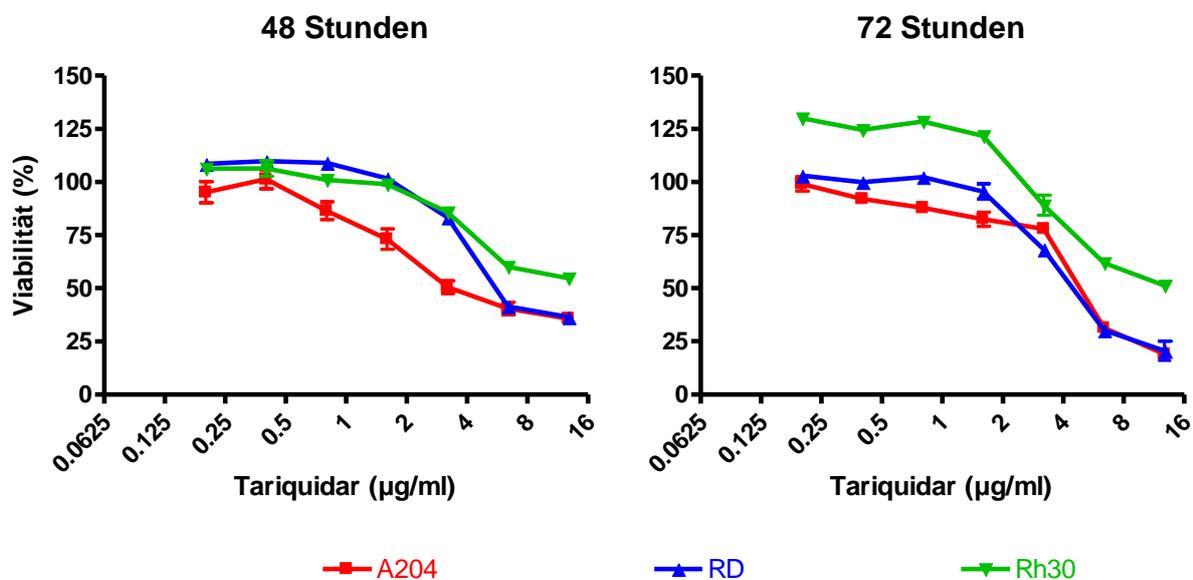
0,9 % NaCl	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Actinomycin D (Details s. Tabelle 5)	Universitätsapotheke Tübingen
Carboplatin (Details s. Tabelle 5)	Universitätsapotheke Tübingen
MG132, 475,62 g/mol, verdünnt zu 100 mM in DMSO und als 20 µl- Aliquots bei -20 °C gelagert	Fa. Sigma Aldrich, München
PS341, 384 g/mol, wird als 2,6 mM Lösung hergestellt und wurde unverdünnt gelagert bei -20 °C	Fa. Janssen Cilag, Neuss
Tariquidar (XR9576)	Xenova, Ltd., Slough, SL1 4EF, United Kingdom
Topotecan (Details s. Tabelle 5)	Universitätsapotheke Tübingen
Vincristin (Details s. Tabelle 5)	Universitätsapotheke Tübingen

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Wirkung des Pgp-Inhibitors Tariquidar auf RMS-Zellen *in vitro*

##### 3.1.1 Proliferationsassay

Der Pgp-Inhibitor Tariquidar beeinflusste die Viabilität der RMS-Zellen *in vitro*. Die Wirkung war abhängig von der verwendeten Konzentration und der Behandlungsdauer. In Abbildung 8 sind die Wachstumskurven der RMS-Zellen (der Zelllinie A204, RD und Rh30) in Abhängigkeit von der verwendeten Tariquidar-Konzentration nach einer Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden dargestellt.



**Abbildung 9: Viabilitätsverlust durch Behandlung mit Tariquidar**

Die RMS-Zellen A204, RD und Rh30 wurden mit verschiedenen Konzentrationen Tariquidar behandelt. Nach 48 und 72 Stunden wurde durch ein Proliferationsassay die Viabilität (%) in Bezug auf die Kontrolle bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte der dreifach bestimmten Messwerte mit Standardabweichung. Die x-Achse ist zur besseren Darstellung nach  $\mu\text{g}$  transformiert. Mit steigenden Konzentrationen Tariquidar und mit zunehmender Expositionszeit sinkt die Viabilität aller drei Zellreihen deutlich ab.

Bei allen drei Zelllinien war ein deutlicher Viabilitätsabfall unter steigenden Konzentrationen Tariquidar zu beobachten. Die Messungen zeigten, dass nach 48 Stunden die Viabilität der RMS-Zellen unter Behandlung mit 12,8 µg/ml Tariquidar auf 60 % (Rh30) bis 35 % (A204 und RD) fielen. Nach 72 Stunden sank die Viabilität der Zellen weiter, bei Rh30 auf 50 % und bei A204 und RD auf bis zu 20 %.

Die IC<sub>50</sub>-Werte für die Zelllinien A204 und Rh30 veränderten sich unter verlängerter Einwirkzeit nicht einheitlich in eine Richtung. Alle IC<sub>50</sub>-Werte dieses Versuches sind in Tabelle 9 aufgelistet.

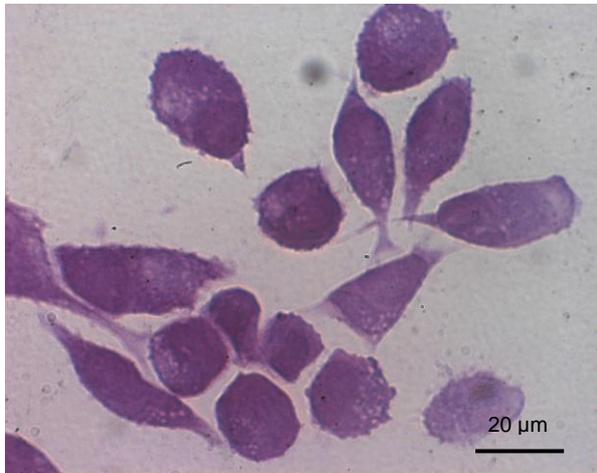
**Tabelle 9: IC<sub>50</sub>-Werte Tariquidar nach 48 und 72 Stunden Behandlungsdauer**

	<b>48 Stunden</b>	<b>72 Stunden</b>
<b>A204</b>	2,16 µg/ml	4,67 µg/ml
<b>RD</b>	5,59 µg/ml	4,01 µg/ml
<b>Rh30</b>	7,38 µg/ml	10,14 µg/ml

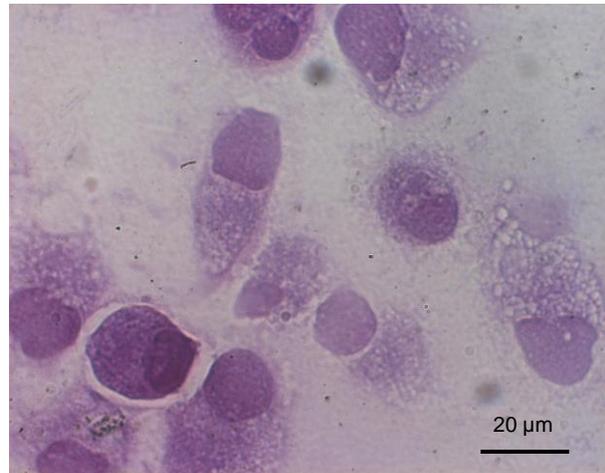
### **3.1.2 HE-Färbung**

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen nach Behandlung mit Tariquidar fielen deutliche morphologische Veränderungen bei allen drei untersuchten Zelllinien auf. Diese morphologischen Veränderungen waren sowohl nativ deutlich erkennbar als auch nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

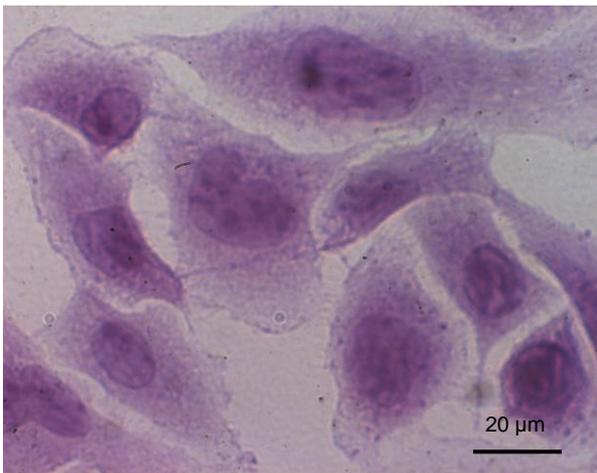
In den Abbildungen 9a-f sind unbehandelte und mit Tariquidar behandelte RMS-Zellen der drei Zellreihen A204, RD und Rh30 nach HE-Färbung nebeneinander dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Behandlung mit Tariquidar zu Zellkernfragmentierung, Formverlust der Zellen, Auflösung der Zell-Zellkontakte und Anhäufung von optisch dichtem Material im Zytoplasma führte. Desweiteren hatten sich in den behandelten RMS-Zellen Ansammlungen großer Vakuolen gebildet.



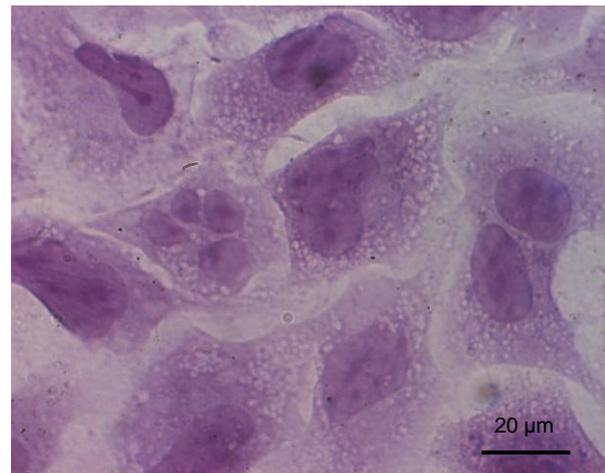
a) A204 Kontrolle



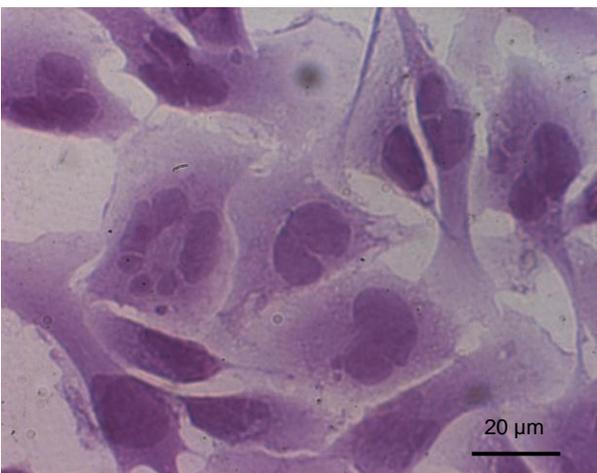
b) A204 behandelt mit Tariquidar 12,8 µg/ml



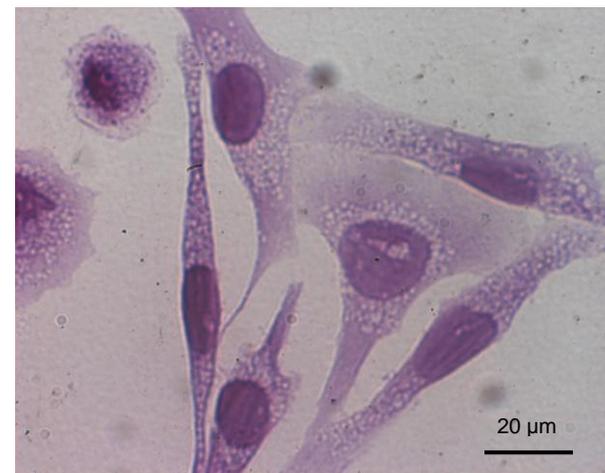
c) RD Kontrolle



d) RD behandelt mit Tariquidar 12,8 µg/ml



e) Rh30 Kontrolle



f) Rh30 behandelt mit Tariquidar 12,8 µg/ml

**Abbildung 10 a-f: Auswirkung von Tariquidar auf die Zellmorphologie**

a) A204, c) RD und e) Rh30 zeigen unbehandelte Zellen der bezeichneten Zelllinie.

b) A204, d) RD und f) Rh30 zeigen äquivalent zu a), c), und e) die mit Tariquidar behandelten Zellen.

Die Aufnahmen sind jeweils nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden und nach Anfärben mit Hämatoxylin-Eosin bei 40facher Vergrößerung gemacht. Nach Behandlung mit Tariquidar zeigen sich Zellkernfragmentierungen, Vakuolen-Formationen in den Zellen, Zellmembran-Auflösungen und Verluste der Zwischenzellkontakte.

### 3.1.3 JC1-Färbung

Zur Darstellung der Mitochondrien in RMS-Zelllinien vor und nach Behandlung mit Tariquidar wurden die drei RMS-Zelllinien mit dem Farbstoff JC1 angefärbt.

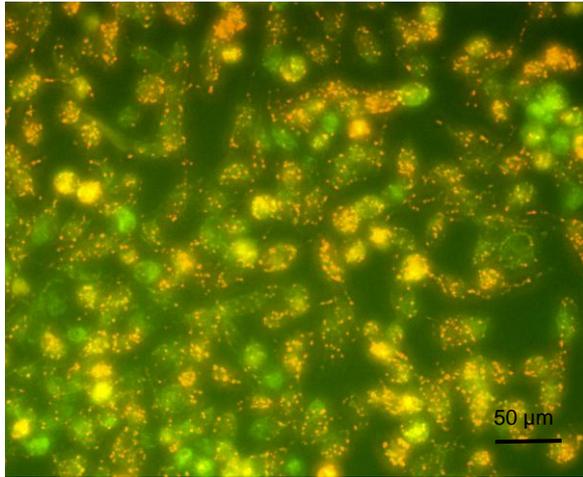
Wie in den Abbildungen 10a, c und e zu sehen ist, fluoreszierten die Mitochondrien der unbehandelten Zellen rot als Zeichen für intakte Mitochondrien.

Bei den behandelten Zellen (dargestellt in Abbildung 10b, d und f) fand sich eine überwiegend grün-gelbe Fluoreszenz. Die grün-gelbe Fluoreszenz ist ein Hinweis auf ein herabgesetztes Membranpotential der Mitochondrien.

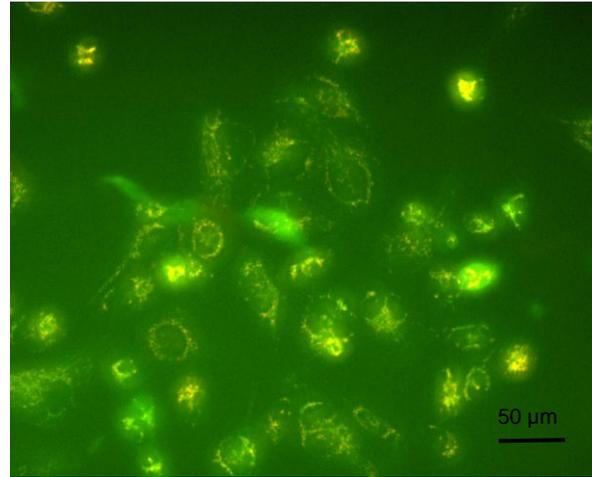
Am deutlichsten zu erkennen war der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen bei der Zelllinie A204, am schwächsten ausgeprägt war er bei der Zelllinie Rh30.

Die Tariquidar-behandelten und die unbehandelten Zellen wiesen keine Unterschiede bezüglich Anzahl und Größe der Mitochondrien auf. Damit ist ausgeschlossen, dass es sich bei den (in nativ und nach HE-Färbung beobachteten) Vakuolen-Formationen, die sich unter Tariquidar-Einfluss gebildet hatten, um das optische Korrelat der Mitochondrien handelte.

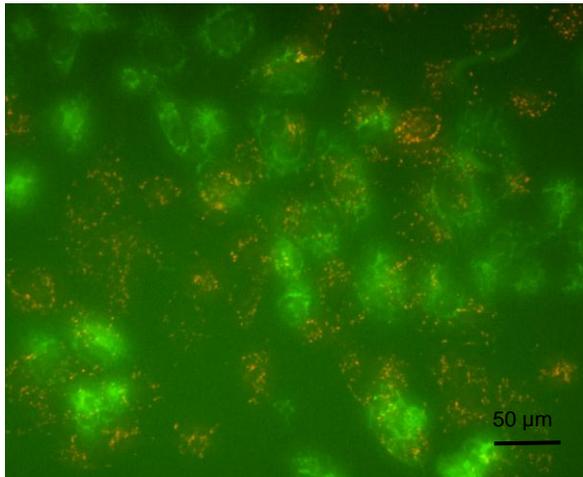
Gleichzeitig ist aber festzustellen, dass Tariquidar das Membranpotential der Mitochondrien herabsetzte.



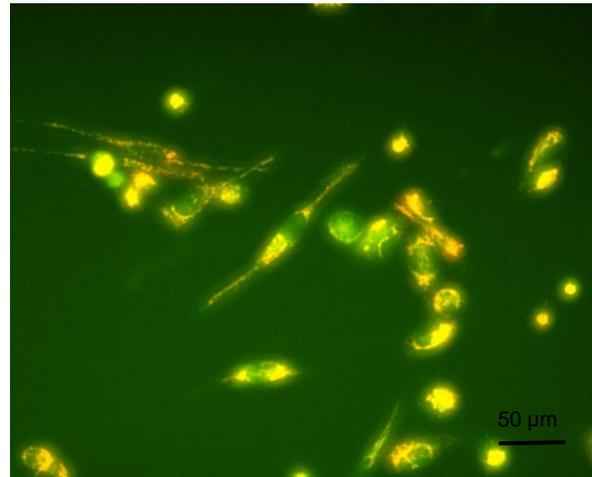
a) A204 Kontrolle



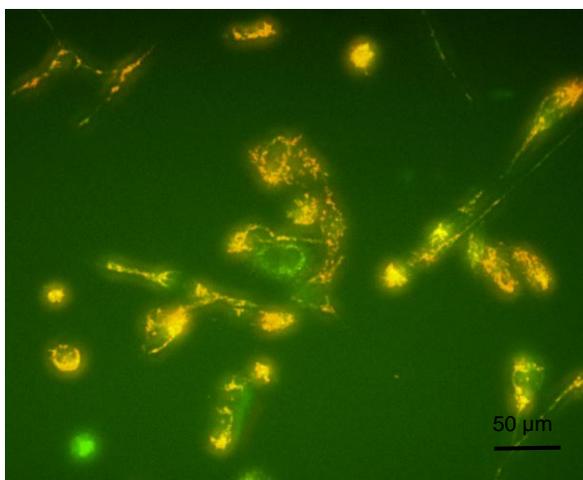
b) A204 behandelt mit Tariquidar 12,8 μg/ml



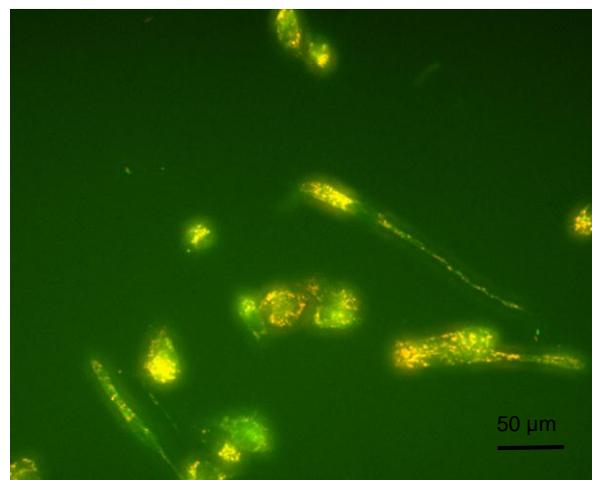
c) RD Kontrolle



d) RD behandelt mit Tariquidar 12,8 μg/ml



e) Rh30 Kontrolle



f) Rh30 behandelt mit Tariquidar 12,8 μg/ml

**Abbildung 11 a-f: Darstellung der Mitochondrien in RMS-Zellen**

Es sind die drei RMS-Zelllinien A204, RD und Rh30 nach 24stündiger Inkubationszeit ohne Behandlung in 10a, c, e und nach Tariquidar-Behandlung (12,8 μg/ml) in 10b, d, f zu sehen. Die Zellen wurden mit JC1 angefärbt und bei einer Anregung von 485 nm und einer 20fachen Vergrößerung fotografiert. Die überwiegend grün-gelbe Fluoreszenz der behandelten Zellen weist auf ein herabgesetztes Membranpotential der Mitochondrien hin.

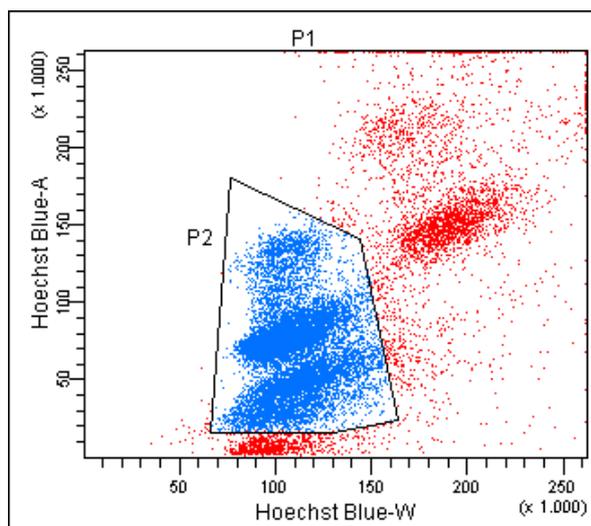
### 3.1.4 Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie erfolgte nach einer 48stündigen Inkubationszeit von RMS-Zellen mit Tariquidar oder Vincristin.

In den Abbildungen 12 und 13 ist anhand der Zelllinie A204 beispielhaft dargestellt, wie die Fluoreszenzbereiche („Fenster“) für die Auswertung des Versuches festgelegt wurden.

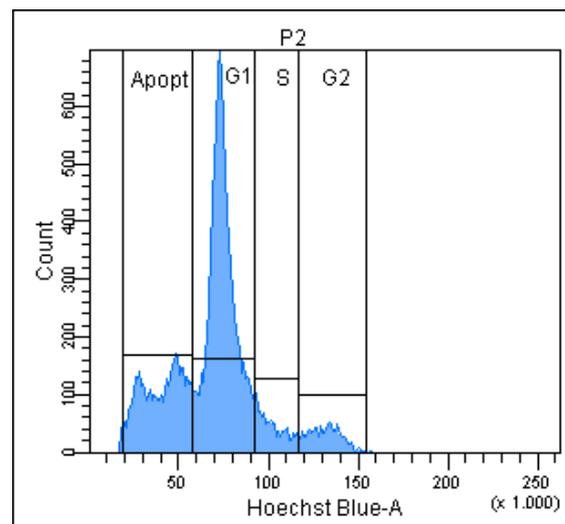
Abbildung 12 zeigt die Gesamtpopulation der unbehandelten Kontrollgruppe der Zelllinie A204. Im Fenster P2 (blau) befinden sich alle für die weiteren Auswertungen benötigten lebenden Zellen. Anhand der Amplitudenbereiche konnte eine Auftrennung der Zellen in ihre verschiedenen Zellzyklusphasen erfolgen.

Die Grenzen für die „Fenster“ der Zellzyklusphasen wurden einmalig bei der Messung der unbehandelten Zellen festgelegt und für alle weiteren Messungen der gleichen Zelllinie beibehalten. Mit Hilfe dieser Fenster konnte das Programm dann jeweils den prozentualen Anteil der lebenden Zellen berechnen, die sich in der Apoptose-Phase, der G1-Phase, der G2-Phase oder der Synthese-Phase befanden. Beispielhaft ist diese Festlegung in Abbildung 13 für die Zelllinie A204 dargestellt.



**Abbildung 12: Fensterauswahl für A204**

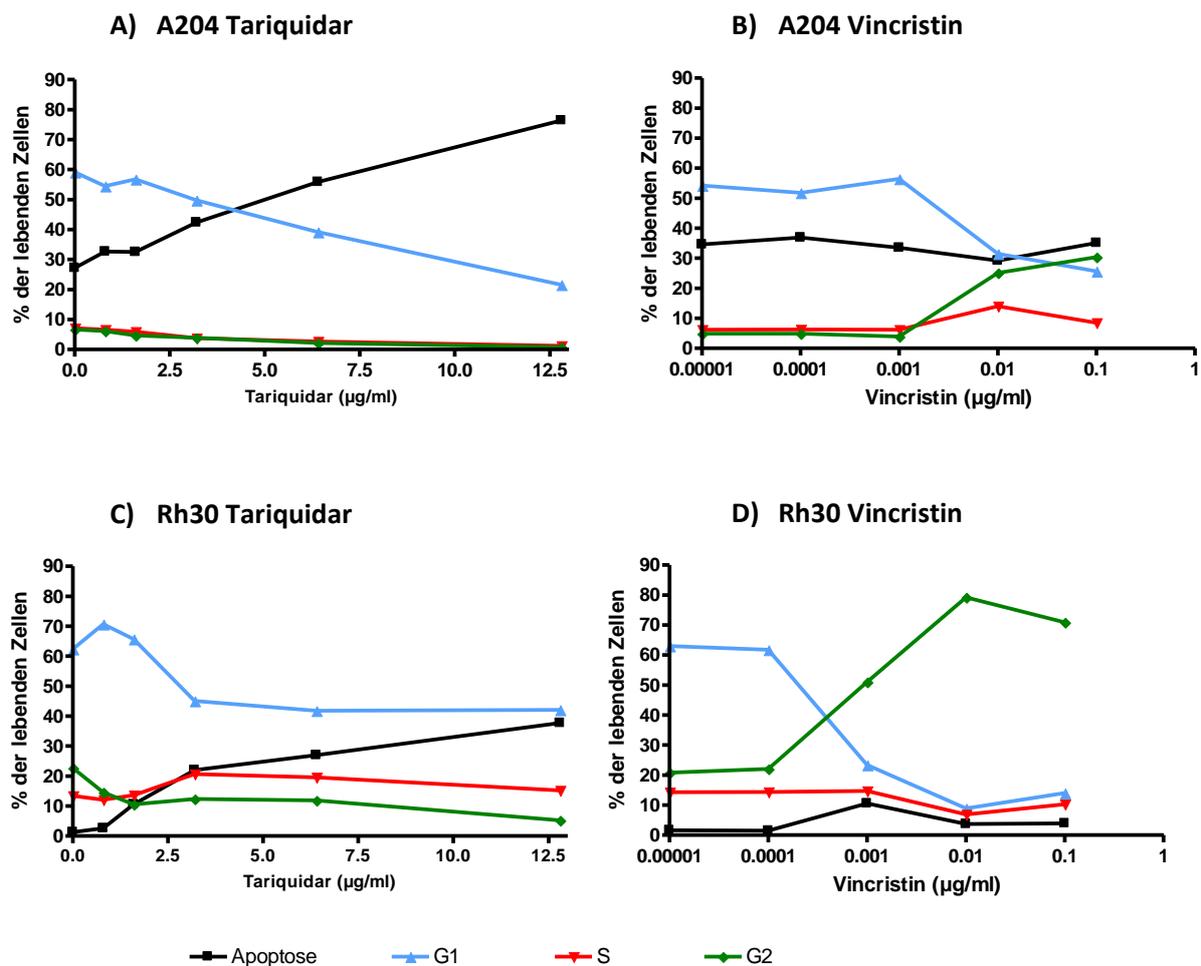
In rot ist die Gesamtpopulation der Kontrolle der A204 Zellen dargestellt. Das P2-Fenster schließt die lebenden und apoptotischen Zellen ein, die für die weitere Auswertung interessant sind. Das Fenster wurde für alle Messungen der A204-Zelllinie beibehalten.



**Abbildung 13: Einteilung in Zellzyklusphasen bei A204**

Die gemessene Zellzahl ist über der Hoechst Blue Amplitude dargestellt. Die Zellen wurden weiter unterteilt in die unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Auch diese Fensterung wurde für alle weiteren Messungen der A204-Zelllinie beibehalten.

Die durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analysen wurden für die Zelllinien A204 und Rh30 jeweils nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen Tariquidar oder Vincristin durchgeführt. Anhand der festgelegten Fenster wurde bei jeder Messung der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der G1, G2, Apoptose- oder Synthese-Phase befanden, bestimmt. Aus diesen Werten wurden wiederum Kurven erstellt, die die Veränderungen widerspiegeln, die sich durch die Behandlung in Bezug auf die Verteilung der Zellpopulation in die verschiedenen Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der Behandlung ergaben. In Abbildung 14 A-D sind die Kurven für die Zelllinien A204 und Rh30 nach Behandlung mit Tariquidar oder Vincristin dargestellt.



**Abbildung 14: Einfluss von Tariquidar und Vincristin auf den Zellzyklus von RMS Zellen (Rh30 und A204)**

Nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen Tariquidar, bzw. Vincristin wurde eine durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Die Kurven stellen konzentrationsabhängig den prozentualen Anteil der lebenden Zellen dar, welche sich in einer Zellzyklusphase befinden. (Kurvenbeschriftung s. Legende). Steigende Konzentrationen an Tariquidar führen zu einer Zunahme apoptotischer Zellen. Steigende Konzentrationen Vincristin führen zu einem steigenden Anteil von Zellen in der G2-Phase.

Aufgrund der sehr hohen benötigten Zellzahl wurden die Messreihen nur einmal durchgeführt, und es wurden Einfachbestimmungen der Werte gemacht. Bei den Grafiken ist daher zu berücksichtigen, dass es sich nicht um Mittelwerte, sondern um Einfach-Werte handelt. Da für jede Messreihe eine unbehandelte Kontrollgruppe angelegt und gemessen wurde, unterscheiden sich die Nullwerte auch bei den Grafiken der gleichen Zelllinie geringfügig.

Sowohl die Behandlung mit Tariquidar, als auch die Behandlung mit Vincristin beeinflussten die lebenden Zellen hinsichtlich ihres Zellzyklus.

Unter der Behandlung mit Tariquidar wurde deutlich, dass mit steigenden Konzentrationen Tariquidar der Anteil apoptotischer Zellen um ein Vielfaches gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert zunahm. Bei der Zelllinie A204 stieg der Anteil apoptotischer Zellen von 27,2% auf maximal 76,4% nach Behandlung mit Tariquidar in der höchsten Dosierung (12,6 µg/ml). Gleichzeitig nahm der Anteil, der Zellen die sich in der G1-Phase befanden, unter der Behandlung mit Tariquidar von 59,1% auf 21,6% ab. Bei der Zelllinie Rh30 waren unter Behandlung mit Tariquidar ähnliche Veränderungen zu beobachten. Der Anteil apoptotischer Zellen nahm unter Behandlung von 1,3% auf 37,7% zu, der Anteil der Zellen in der G1-Phase nahm von 62,4% auf 42,1% ab.

Die Behandlung mit Vincristin hatte andere Veränderungen im Bereich des Zellzyklus zur Folge. Bei der Zelllinie A204 bewirkte die Behandlung mit Vincristin in der Höchstkonzentration (0,1 µg/ml) eine Zunahme der Zellen, die sich in der G2-Phase befanden, von 3,9% auf 30,4%. Wie bei der Behandlung mit Tariquidar kam es jedoch auch hier zu einer Abnahme der Zellen in der G1-Phase von 41,8% auf 25,7%. Bei der Zelllinie Rh30 kam es ebenfalls zu einer Zunahme der Zellen, die sich in der G2-Phase befanden, und zu einer Abnahme der Zellen, die sich in der G1-Phase befanden. Der Anteil der Zellen, die sich in der G1-Phase befanden, nahm von 64,8% auf 14,0% ab. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase nahm von 19,3% auf 70,9% zu.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Tariquidar und Vincristin in unseren Versuchen zu charakteristischen Veränderungen im Zellzyklus von RMS führten. Tariquidar bewirkte eine Zunahme apoptotischer Zellen, Vincristin hatte eine Zunahme von Zellen, die sich in der G2-Phase befanden, zur Folge. Bei Tariquidar und bei Vincristin kam es zu einer Abnahme der Zellen, die sich in der G1-Phase befanden.

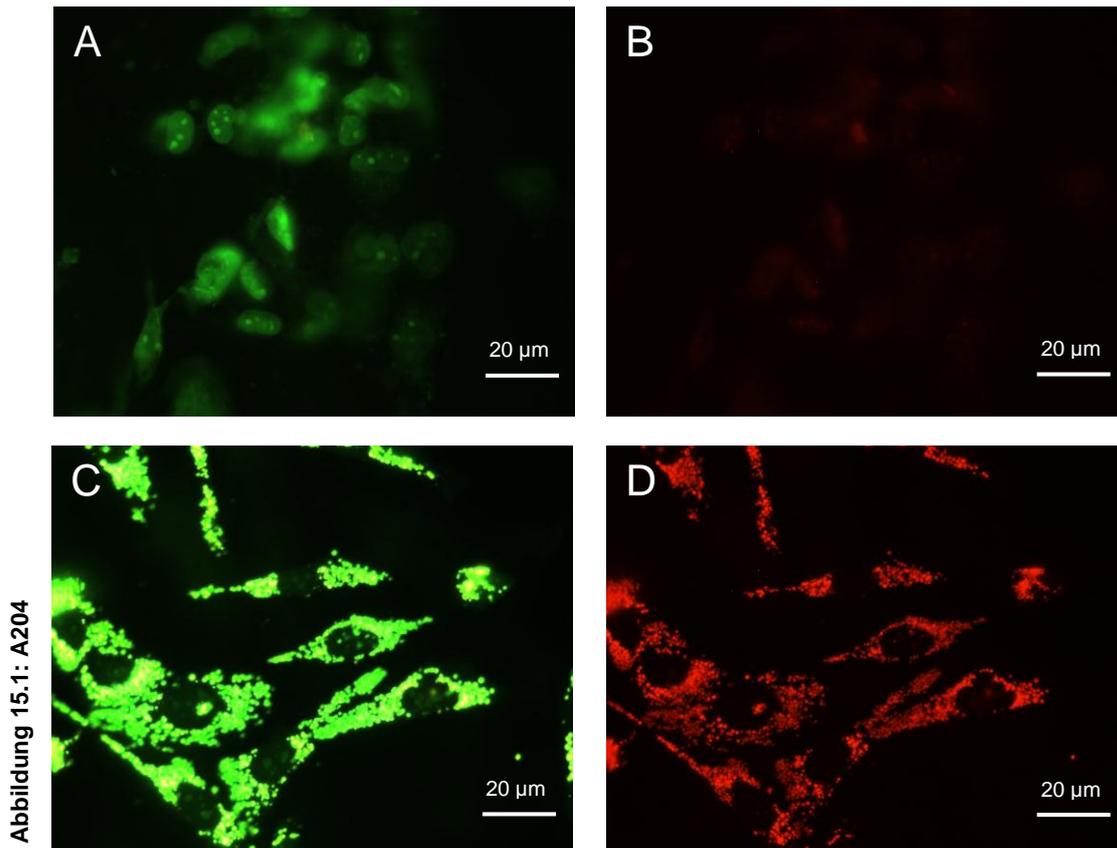
### 3.1.5 Acridinorange-Färbung

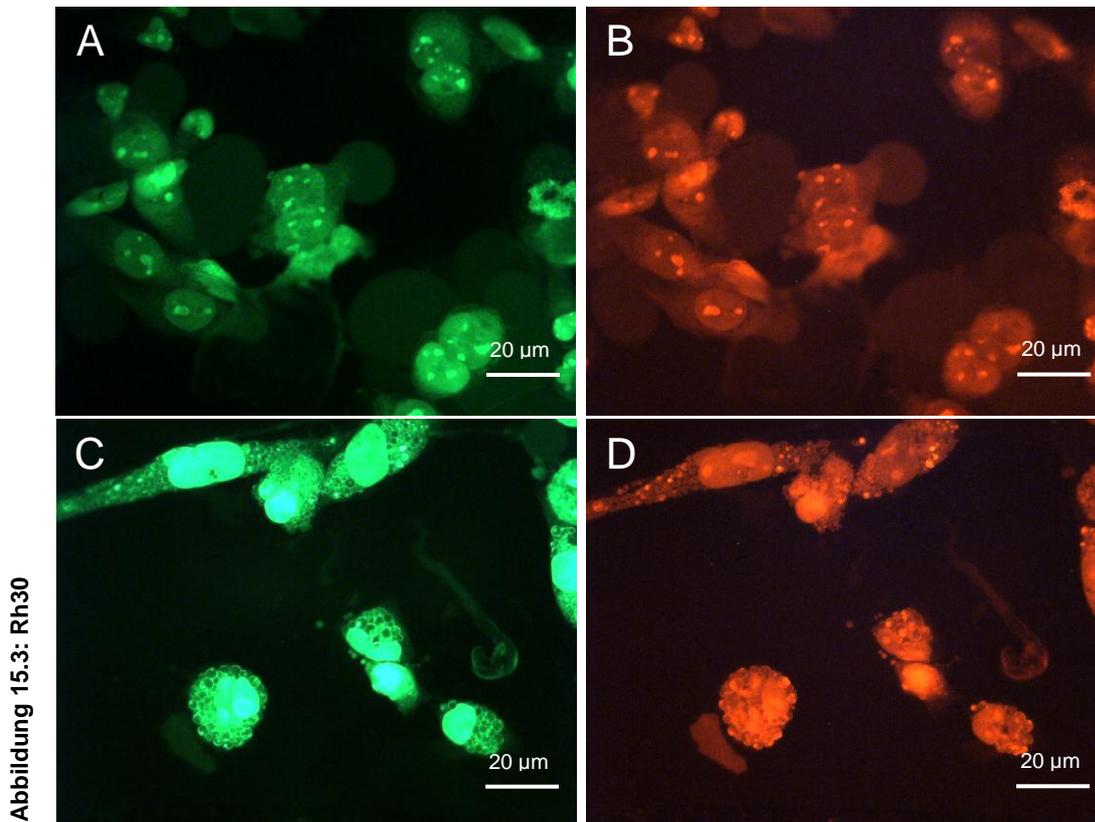
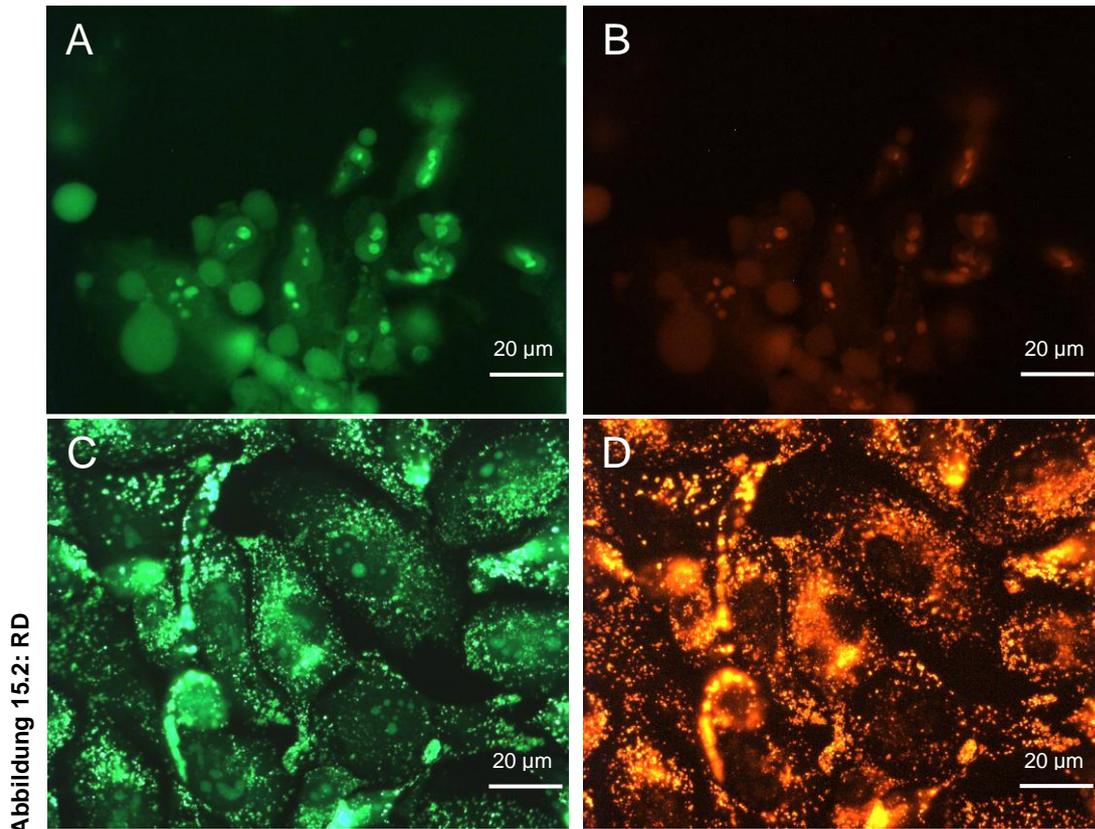
Mittels Acridinorange-Färbung wurden die RMS-Zellen vor und nach 24-stündiger Inkubation mit Tariquidar angefärbt, um die sauren Kompartimente der Zellen darzustellen.

In den Abbildungen 15.1 bis 15.3 ist deutlich zu sehen, dass die Behandlung mit Tariquidar (jeweils in Bild C und D) zu einem erheblichen Anstieg der roten und der grünen Fluoreszenz im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen (jeweils in Bild A und B) führte. Diese starke Fluoreszenz deutet auf ein diffus im Zytoplasma verteiltes Netzwerk sehr saurer Kompartimente hin, wie es beispielsweise für Lysosomen typisch ist.

Diese Veränderungen traten bei allen drei Zelllinien A204 (Abbildung 15.1), RD (Abbildung 15.2), und Rh30 (Abbildung 15.3) auf. Erste Veränderungen waren bei A204 und RD nach einer Behandlung mit 1,6 µg/ml Tariquidar festzustellen, bei Rh30 nach der Behandlung mit 6,4 µg/ml Tariquidar.

Die Bilder zeigten somit, dass es sich bei den in der Nativaufnahme gesehenen Vakuolen um saure Zellkompartimente (zum Beispiel Lysosomen) handelte.





**Abbildung 15.1-15.3 Nachweis saurer Zellkompartimente mittels Acridinorange**

a) und b) zeigen die Kontrolle der jeweiligen Zelllinie.

c) und d) jeweils die Tariquidar-behandelte Gruppe einer Zelllinie.

A204 und Rh30 wurden mit 12,8 µg/ml Tariquidar behandelt, RD mit nur 3,2 µg/ml Tariquidar.

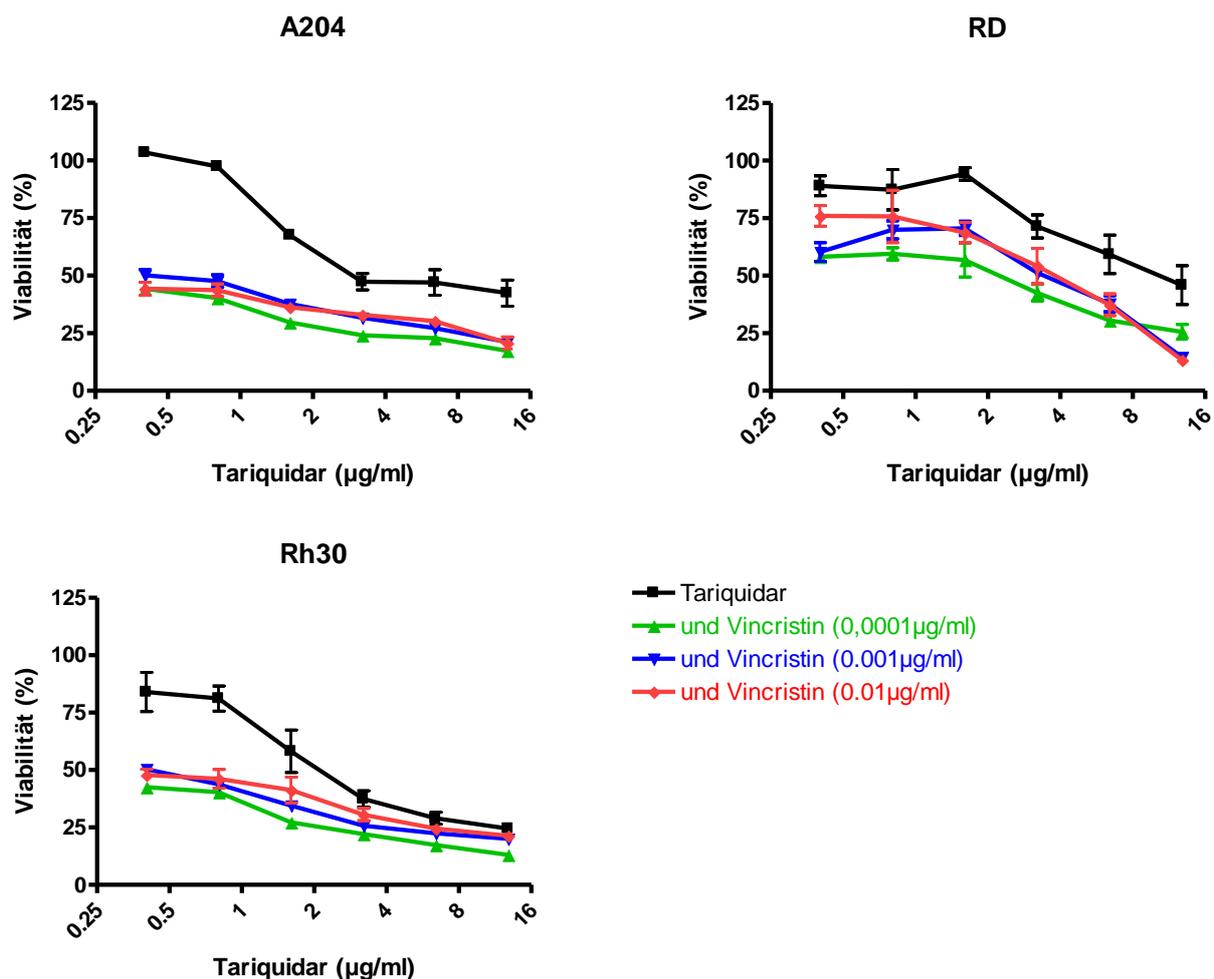
a) und c) sind jeweils mit dem Filtersatz 480/520 nm fotografiert worden, b) und d) mit 540/590 nm.

Alle Aufnahmen sind bei 40facher Vergrößerung gemacht. In den Bildern der behandelten Zellen ist die ausgeprägte Fluoreszenz der sauren Kompartimente zu sehen.

## 3.2 Kombination von Tariquidar und Zytostatika *in vitro*

### 3.2.1 Proliferationsassay Tariquidar und Vincristin

Tariquidar wirkt, wie die bisherigen Versuche zeigen konnten, wachstumshemmend. Vincristin wirkt ebenfalls zytostatisch. Die Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Tariquidar und Vincristin wurde in weiteren Proliferationsassays untersucht. Zunächst wurden die drei Zelllinien A204, RD und Rh30 mit drei Konzentrationen Vincristin und zusätzlich mit steigenden Konzentrationen Tariquidar behandelt. In Abbildung 16 ist das Ergebnis dieses Versuchs grafisch dargestellt.



**Abbildung 16: Verstärkte Wachstumsinhibition durch Behandlung mit Tariquidar und Vincristin**

Die drei RMS-Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen Tariquidar und Vincristin behandelt. Nach 48 Stunden wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays die Menge noch lebender Zellen bestimmt und die Viabilität (in %) in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Die schwarzen Kurven stellen jeweils die Viabilität der Zellen dar, welche nur mit Tariquidar behandelt wurden. Die grüne, blaue und rote Kurve präsentieren die Zellen, welche mit dem P-Glycoproteininhibitor Tariquidar und zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen Vincristin behandelt wurden. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte der Dreifach-Bestimmungen und ihre Standardabweichungen.

Die Kombination aus Tariquidar und Vincristin führt zu einem stärkeren Viabilitätsabfall als die Behandlung mit den zwei Substanzen alleine.

Steigende Konzentrationen Vincristin bewirken keinen zusätzlichen Viabilitätsabfall.

Die Behandlung der RMS-Zellen mit Vincristin alleine bewirkte einen Viabilitätsabfall um bis zu 60 %. Der Viabilitätsverlust war bei allen drei verwendeten Vincristin-Konzentrationen nahezu gleich groß. Den geringsten Effekt übte die Behandlung mit Vincristin auf die Zelllinie RD aus.

Die Behandlung mit steigenden Tariquidar-Konzentrationen führte zu zunehmenden Viabilitätsverlusten der RMS-Zellen. Bei der Zelllinie A204 führte die Behandlung mit Tariquidar zu einem Viabilitätsverlust um bis zu 50%, bei RD um bis zu 45% und bei Rh30 um bis zu 75%.

Die Kombination von Tariquidar mit Vincristin hatte einen stärker wachstumshemmenden Effekt als die Behandlung mit den zwei Einzelsubstanzen alleine. Bei allen drei Zelllinien kam es unter Behandlung mit der Kombination aus Tariquidar und Vincristin zu einem Viabilitätsabfall um mehr als 85%.

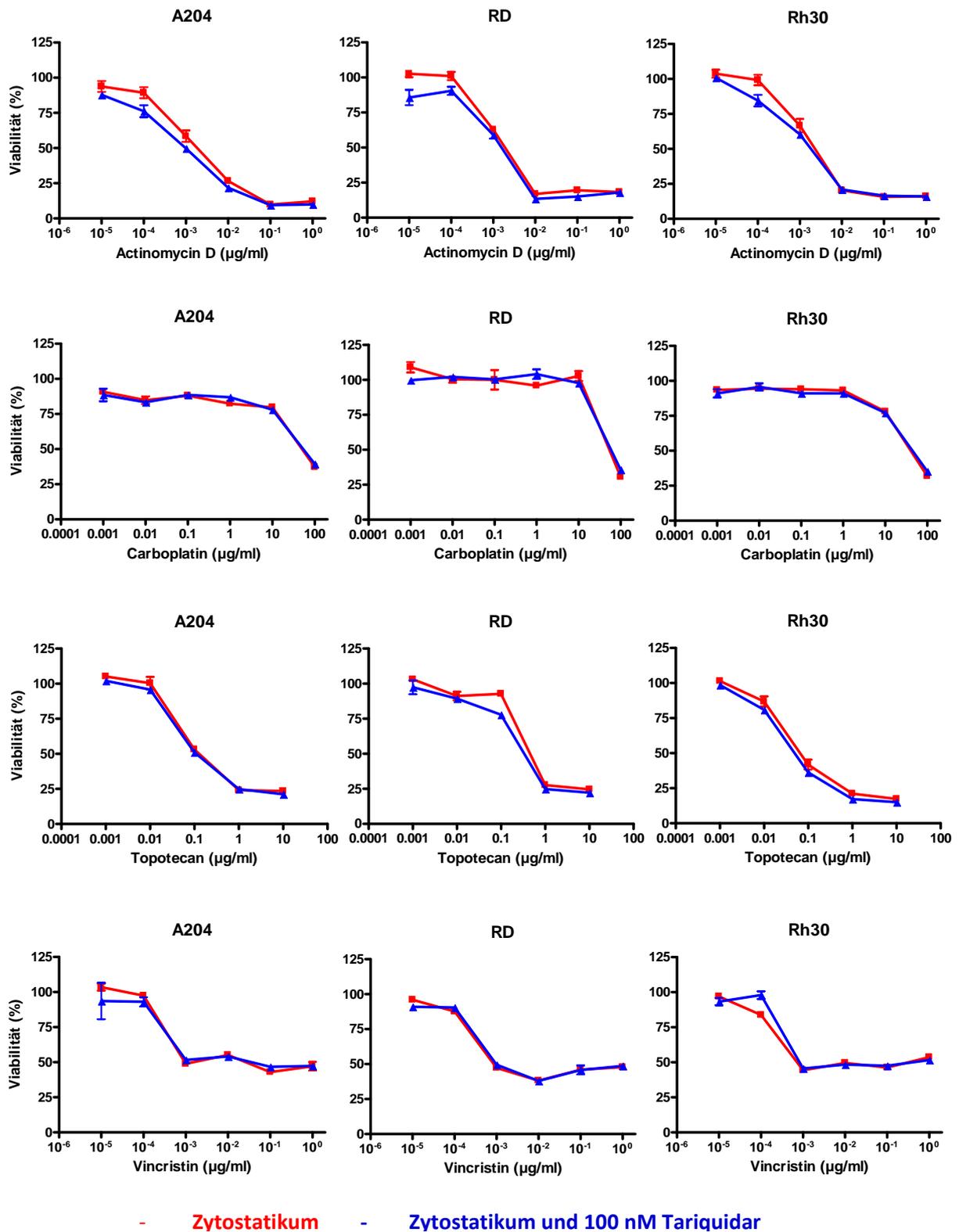
Bei allen drei Zelllinien zeigte sich erstaunlicherweise, dass die Kombination einer niedrigen Dosis Vincristin (0,0001 µg/ml) mit Tariquidar einen stärkeren wachstumshemmenden Effekt hatte als die Kombination höherer Konzentrationen Vincristin (0,01 und 0,001 µg/ml) mit Tariquidar.

Bei den embryonalen Zelllinien A204 und RD war der wachstumshemmende Effekt unter der Kombinationsbehandlung deutlich stärker ausgeprägt als unter der alleinigen Behandlung mit Tariquidar oder Vincristin. Bei der alveolären Zelllinie Rh30 war der Unterschied zwischen der ausschließlichen Behandlung mit Tariquidar (12,6 µg/ml) und der Kombination beider Substanzen nur gering.

### **3.2.2 Proliferationsassay: Vier Zytostatika und 100 nM Tariquidar in 2D**

Die drei Zelllinien wurden im folgenden Versuchsmodell zum einen jeweils mit vier verschiedenen Zytostatika (Actinomycin D, Carboplatin, Topotecan, Vincristin) in steigenden Konzentrationen behandelt und zum anderen parallel dazu mit genannten Zytostatika unter Zugabe von jeweils 100 nM Tariquidar.

Die Wachstumskurven der Viabilitätsassays sind in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Bei allen Behandlungen und allen Zelllinien war eine Abnahme der Viabilität bei steigenden Zytostatikakonzentrationen zu beobachten. Bei den Behandlungsgruppen mit und ohne Tariquidar-Zugabe unterschieden sich jedoch weder die maximale Wachstumshemmung, noch waren signifikante Veränderungen der IC<sub>50</sub>-Werte zu erkennen. Eine Übersicht über die IC<sub>50</sub>-Werte der unterschiedlichen Behandlungen bietet Tabelle 10.



**Abbildung 17: Wirkungsmodulation von verschiedenen Zytostatika durch Zugabe von 100 nM Tariquidar**  
 Die drei Zelllinien A204, RD und Rh30 wurden mit den vier verschiedenen Zytostatika (Actinomycin D, Carboplatin, Topotecan und Vincristin) und im gleichen Versuchsaufbau mit den vier verschiedenen Zytostatika plus Tariquidar in einer Konzentration von 100 nM. behandelt. Nach 48 Stunden Behandlungsdauer wurde ein Proliferationsassay durchgeführt und die Viabilität in Prozent in Bezug auf die Kontrollgruppe berechnet. Aus der Dreifachbestimmung eines Wertes wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und in den abgebildeten Grafiken dargestellt. Steigende Konzentrationen der Zytostatika führten bei allen Zelllinien zu einem Viabilitätsverlust. Die Zugabe von 100 nM Tariquidar verstärkte diese Wirkung nicht.

**Tabelle 10: Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>- Werte aus der Abbildung 17. Alle Angaben in µg/ml**

	A204		RD		Rh30	
	-Tariquidar	+Tariquidar	-Tariquidar	+Tariquidar	-Tariquidar	+Tariquidar
Actinomycin D	1,46×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>	1,02×10 <sup>-3</sup>	1,05×10 <sup>-3</sup>	1,28×10 <sup>-3</sup>	1,00×10 <sup>-3</sup>
Carboplatin	77,79	83,04	72,74	69,44	50,20	58,23
Topotecan	6,87×10 <sup>-2</sup>	6,44×10 <sup>-2</sup>	0,29	0,20	4,06×10 <sup>-2</sup>	3,30×10 <sup>-2</sup>
Vincristin	2,05×10 <sup>-4</sup>	3,90×10 <sup>-4</sup>	3,25×10 <sup>-4</sup>	5,19×10 <sup>-4</sup>	1,20×10 <sup>-4</sup>	3,64×10 <sup>-4</sup>

Die Kombination von steigenden Konzentrationen verschiedener Zytostatika mit 100 nM (0,0647 µg/ml) Tariquidar führte zu keiner Wirkungsverstärkung der Zytostatika. Die RMS-Zellen starben unter diesen Kulturbedingungen jedoch bereits unter Verwendung auffallend niedriger Zytostatika-Konzentrationen ab.

### **3.2.3 Proliferationsassay: Vier Zytostatika und 100 nM Tariquidar in 3D**

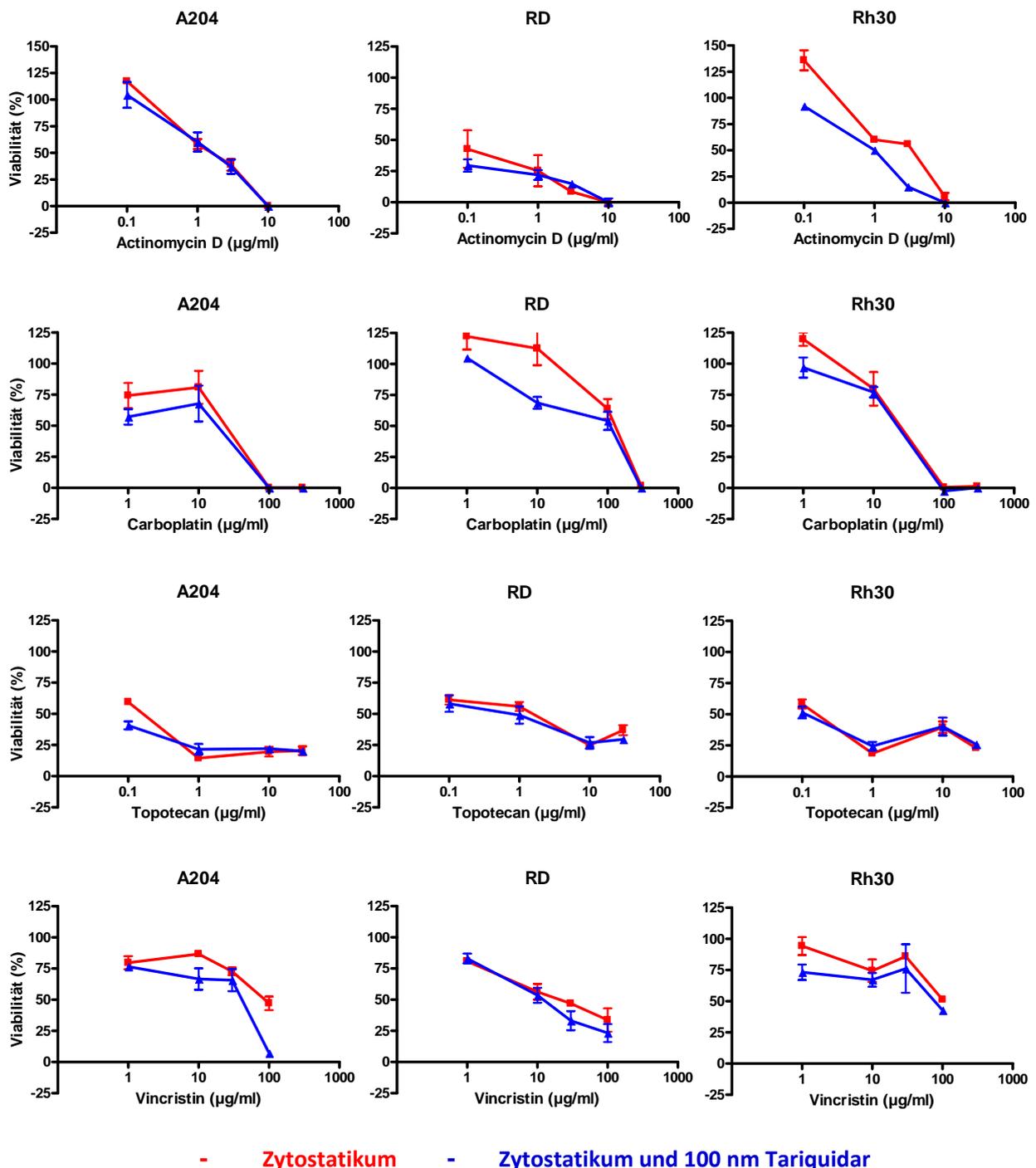
Die Behandlung von RMS-Zellen in 3D-Kultivierung erlaubt den Einsatz höherer Zytostatika-Konzentrationen. Das in Abschnitt 3.2.2 beschriebene Proliferationsassay wurde daher mit nicht adhärent wachsenden Zellen wiederholt. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dieses Versuches in Form von Wachstumskurven dargestellt.

Wieder fiel die Viabilität bei allen Behandlungen der drei RMS-Zelllinien mit steigenden Zytostatika-Konzentrationen ab.

Bei Gegenüberstellung der Kurven kombiniert behandelter Zellen und ausschließlich Zytostatika-behandelter Zellen ist erkennbar, dass die Zugabe von Tariquidar bei manchen Zytostatika-Konzentrationen zu einer geringfügigen Wirkungsverstärkung führte. Am meisten wurde die Wirkung von Vincristin durch Tariquidar verstärkt, am wenigsten wurde die Wirkung von Topotecan durch Tariquidar beeinflusst.

Die Wirkungsverstärkung durch die Kombination von Vincristin mit Tariquidar war bei allen drei Zelllinien zu beobachten, am deutlichsten jedoch bei der embryonalen RMS-Zelllinie.

Alle anderen Veränderungen, ausgelöst durch den Zusatz von 100 nM Tariquidar zu den Zytostatika, waren ohne statistische Signifikanz. Die Wachstumskurven lagen jeweils im einfachen Standardabweichungsbereich voneinander.



**Abbildung 18: Modulation der Zytostatika-Wirkung durch Tariquidar bei RMS-Zellen in Sphäroid Kulturen**

Die drei RMS-Zelllinien A204, RD und Rh30 wurden in 3D-Kulturen kultiviert und mit vier verschiedenen Zytostatika in steigenden Konzentrationen (einmal mit und einmal ohne die Zugabe von 100 nM Tariquidar) behandelt. Nach 48 Stunden wurde die Viabilität der Zellen mittels Proliferationsassay in Abhängigkeit von der jeweiligen Kontrollgruppe ermittelt. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, errechnet aus den Dreifach- (bei Carboplatin und Topotecan) oder Zweifach- (bei Actinomycin D und Vincristin) Bestimmungen der Werte. Zu beachten ist die veränderte Skalierung der Grafik für den Versuch mit Actinomycin D bei der Zelllinie Rh30. Steigende Zytostatika-Konzentrationen führten bei allen Zellen zu einer Viabilitäts-Abnahme. Bei der Zelllinie A204 führt die Kombination aus Vincristin und Tariquidar zu einem deutlich stärkeren Viabilitäts-Verlust als die Behandlung mit Vincristin alleine.

Der Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte aus den Versuchen der 2D-Kulturen mit den IC<sub>50</sub>-Werten der 3D-Versuche ergab deutliche Unterschiede. Die Werte aus den Versuchen mit den Sphäroid-Kulturen lagen um bis zu 6 Zehnerpotenzen über den IC<sub>50</sub>-Werten der Vergleichswerte aus dem Versuch mit den adhärent wachsenden Zellen. In der 3D-Kultur wurden deutlich höhere Zytostatika-Konzentrationen benötigt um den gleichen Viabilitätsabfall zu bewirken wie in der 2D-Kultur. Eine Ausnahme bildete die Behandlung mit Carboplatin, unter welcher die IC<sub>50</sub>-Werte in Sphäroid-Kultur um bis zu 60 µg/ml fielen. (Die IC<sub>50</sub>-Werte dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 11 aufgelistet.)

Eine eindeutige Wirkungsverstärkung durch Kombination von Zytostatika mit 100 nM Tariquidar konnte auch in diesem Versuchsmodell nicht erzielt werden.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>-Werte aus Abbildung 18. Alle Angaben in µg/ml**

	A204		RD		Rh30	
	-Tariquidar	+Tariquidar	-Tariquidar	+Tariquidar	-Tariquidar	+Tariquidar
Actinomycin D	1,59	1,56	$7,1 \times 10^{-2}$	$1,81 \times 10^{-2}$	2,24	0,99
Carboplatin	14,63	5,75	104,50	32,23	10,53	13,62
Topotecan	$118,7 \times 10^{-3}$	$5,73 \times 10^{-3}$	0,94	0,48	$8,69 \times 10^{-2}$	$2,64 \times 10^{-2}$
Vincristin	120,7	25,84	21,17	11,97	155,6	172,9

### **3.3 Wirkung von Tariquidar und Zytostatika *in vivo***

In Tierversuchen mit nu/nu Mäusen wurde die Wirkung verschiedener Zytostatika, die Wirkung von Tariquidar, sowie die Kombination aus Zytostatikum und Tariquidar auf das Tumorwachstum *in vivo* untersucht. Die Behandlungsschemata sind in Abbildung 8 (Absatz 2.6.1) graphisch dargestellt. Tariquidar wurde in gleicher Frequenz wie das entsprechende Zytostatikum und in üblicher Dosierung (2 mg/kgKG i.p.) verabreicht.

Für die Behandlung mit Tariquidar nach Topotecan- und Carboplatin-Schema, sowie die Kombinationsbehandlung aus Tariquidar und den zwei genannten Zytostatika wurden die Tierversuche nur mit den Xenografts der Zelllinie Rh30 durchgeführt.

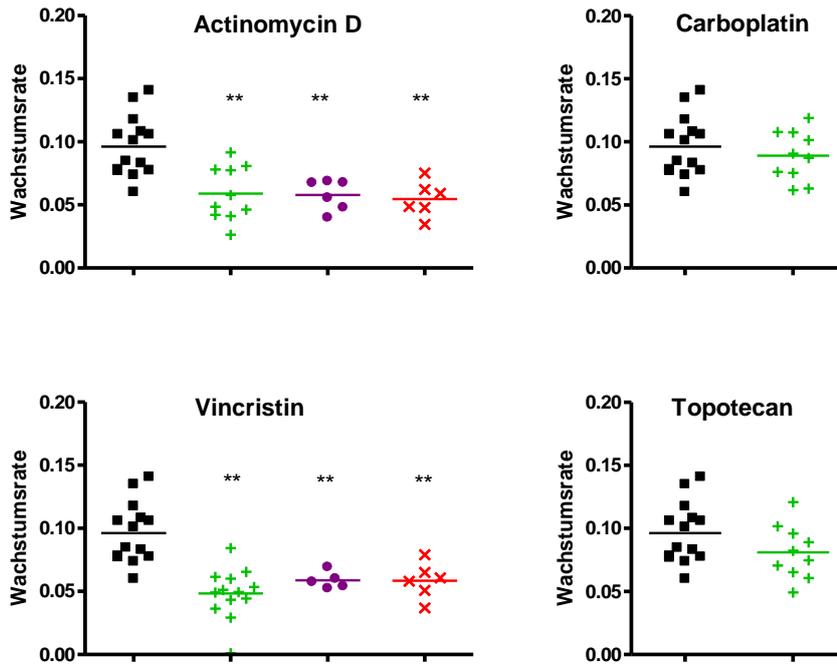
In Abbildung 19 sind die Wachstumsraten der Xenografts der Zelllinie A204 und der Zelllinie Rh30 dargestellt. Mittels Dunnett's Tests wurden die einzelnen Behandlungsgruppen hinsichtlich ihrer Tumorwachstumsraten statistisch mit der Kontrollgruppe verglichen (Fehler  $\alpha$  maximal 0,05).

Es zeigte sich, dass die Wachstumsraten der Xenografts der Zelllinie A204 bei fast allen Behandlungsgruppen hoch signifikant ( $p < 0,005$ ) kleiner waren als die der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine Ausnahme bildete die Gruppe der Xenografts, welche mit Carboplatin oder Topotecan behandelt wurden. Die Behandlung mit Carboplatin oder Topotecan führte zu keiner signifikanten Veränderung der Tumorwachstumsraten im Vergleich zu den unbehandelten Xenografts.

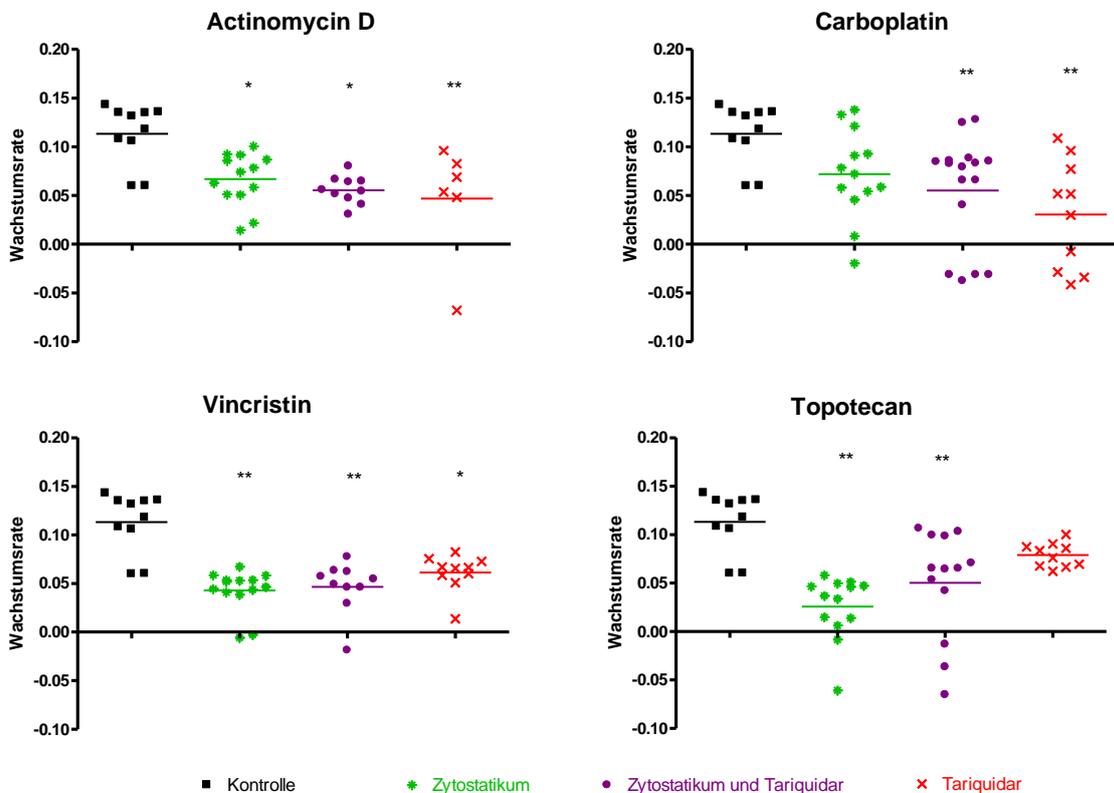
Bei den Xenografts der Zelllinie Rh30 waren ebenfalls nahezu alle Wachstumsraten der behandelten Xenografts signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe. Die Ausnahme bildeten hier die Xenografts die mit die mit Carboplatin oder mit Tariquidar nach Vincristin-Schema behandelt wurden. Bei diesen zwei Behandlungsgruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied im Wachstum gegenüber der Kontrollgruppe erkennen.

Die Wachstumsraten der Xenografts, die mit Actinomycin D, Actinomycin D und Tariquidar sowie Tariquidar nach Topotecan-Schema behandelt wurden, waren sehr signifikant kleiner (mit  $p < 0,05$ ) als die der Kontrollgruppe.

## A204



## Rh30



Kontrolle    
  Zytostatikum    
  Zytostatikum und Tariquidar    
  Tariquidar

**Abbildung 19: Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Behandlung.**

In den Grafiken sind die Wachstumsraten der Tumoren der Zelllinie A204 und Rh30 dargestellt. Jeder Punkt steht für die Steigung der logarithmierten Wachstumskurve (Wachstumsrate) des Tumors eines Tieres. Die Wachstumsraten sind sortiert nach Behandlungen dargestellt. Die Gruppen, welche sich im Dunnett's Test signifikant von der Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$  unterschieden, sind mit \* markiert, die die sich hochsignifikant von der Kontrollgruppe mit  $p < 0,005$  mit \*\*. Die Werte der Behandlung der A204 Xenografts mit Tariquidar nach Topotecan oder Carboplatin-Schema und der Kombinationsbehandlung von Tariquidar mit diesen beiden Zytostatika fehlen, da keine Tierversuche nach genannten Schemata durchgeführt wurden.

Für alle übrigen Behandlungsschemata (Vincristin, Topotecan, Tariquidar und Carboplatin, Tariquidar und Vincristin, Tariquidar und Topotecan, Tariquidar nach Actinomycin D-Schema und Tariquidar nach Carboplatin-Schema) waren die Wachstumsraten der Rh30-Xenografts hoch signifikant (mit  $p < 0,005$ ) kleiner als die Wachstumsraten der unbehandelten Tumoren.

Abgesehen von den genannten Ausnahmen waren also alle Therapieschemata erfolgreich. Die Monotherapie mit Tariquidar übte auch *in vivo* einen wachstumshemmenden Effekt auf die RMS-Xenografts aus.

Weiterhin wurden die Wachstumsraten der Behandlungsgruppen, die mit Zytostatikum alleine, mit den Gruppen, die mit dem gleichen Zytostatikum plus Tariquidar behandelt wurden durch den Dunnett's Tests statistisch miteinander verglichen. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen mit den Zytostatika alleine und den entsprechenden Zytostatika und Tariquidar feststellen. Demzufolge übten Tariquidar und Zytostatikum *in vivo* keine additiven Effekte aufeinander aus.

Zur besseren Veranschaulichung der Daten wurden die Wachstumsraten in Tumorzellen-Verdopplungszeiten umgerechnet. Die Mediane der Tumorzellen-Verdopplungszeiten der verschiedenen Behandlungen und Zelllinien sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Es zeigte sich, dass die Tumoren der unbehandelten Kontrollgruppen die kürzesten Tumorzellen-Verdopplungszeiten hatten. Die Kontrolle der alveolären Zelllinie Rh30 hatte eine Tumorzellenverdopplungszeit im Median von 2,42 Tagen und die embryonale Zelllinie A204 eine von 3,59 Tagen.

Die Behandlung mit Carboplatin hatte bei A204 keinen hemmenden Effekt auf das Tumorzellenwachstum. Die Tumorzellenverdopplungszeit lag nach Behandlung mit Carboplatin bei 3,38 Tagen und war damit 0,21 Tage kürzer als die der unbehandelten Kontrolle.

Die Behandlung mit Vincristin führte bei beiden Zelllinien im Median zur stärksten Verlängerung der Tumorzellenverdopplungszeit. Bei A204 verlängerte sich das Intervall unter Behandlung mit Vincristin auf 6,07 Tage bei Rh30 auf 8,19 Tage.

Diese Darstellung der Ergebnisse zeigt anschaulich, dass es sowohl durch den Einsatz von Zytostatika als auch durch die Verwendung von Tariquidar zu einer signifikanten Tumorzellenwachstumshemmung *in vivo* kam.

Die Kombinationsbehandlung aus Zytostatikum und Tariquidar war bei der Behandlung mit Actinomycin D bei der Zelllinie Rh30 von Vorteil gegenüber der Einzeltherapie mit Zytostatikum. Bei den übrigen Zytostatika brachte die Kombinationstherapie keinen Vorteil gegenüber der Therapie mit Zytostatikum alleine.

Tabelle 12: Übersicht über die medianen Tumolvolumen-Verdopplungszeiten der Tierversuche

Zelllinie	Behandlungsgruppe	Anzahl der Werte	Tumolvolumen-Verdopplungszeit (Median in Tagen)
<b>A204</b>	1- Kontrolle	10	<b>3,59</b>
	2- Carboplatin	10	<b>3,38</b>
	4- Actinomycin D	10	<b>5,70</b>
	5- Actinomycin D und Tariquidar	6	<b>4,94</b>
	6- Topotecan	10	<b>3,85</b>
	8- Vincristin	13	<b>6,07</b>
	9- Vincristin und Tariquidar	5	<b>5,22</b>
	11-Tariquidar (Actinomycin D- Schema)	6	<b>5,63</b>
13- Tariquidar (Vincristin- Schema)	6	<b>5,07</b>	
<b>Rh30</b>	1- Kontrolle	10	<b>2,42</b>
	2- Carboplatin	13	<b>4,17</b>
	3- Carboplatin und Tariquidar	16	<b>3,73</b>
	4- Actinomycin D	13	<b>4,05</b>
	5- Actinomycin D und Tariquidar	10	<b>5,47</b>
	6- Topotecan	14	<b>6,15</b>
	7- Topotecan und Tariquidar	10	<b>5,84</b>
	8- Vincristin	13	<b>8,19</b>
	9- Vincristin und Tariquidar	13	<b>4,64</b>
	10- Tariquidar (Carboplatin-Schema)	10	<b>7,96</b>
	11-Tariquidar (Actinomycin D- Schema)	6	<b>5,00</b>
	12-Tariquidar (Topotecan- Schema)	10	<b>4,56</b>
	13-Tariquidar (Vincristin- Schema)	10	<b>3,79</b>

## **3.4 Genexpression von RMS-Zellen nach Behandlung mit Vincristin**

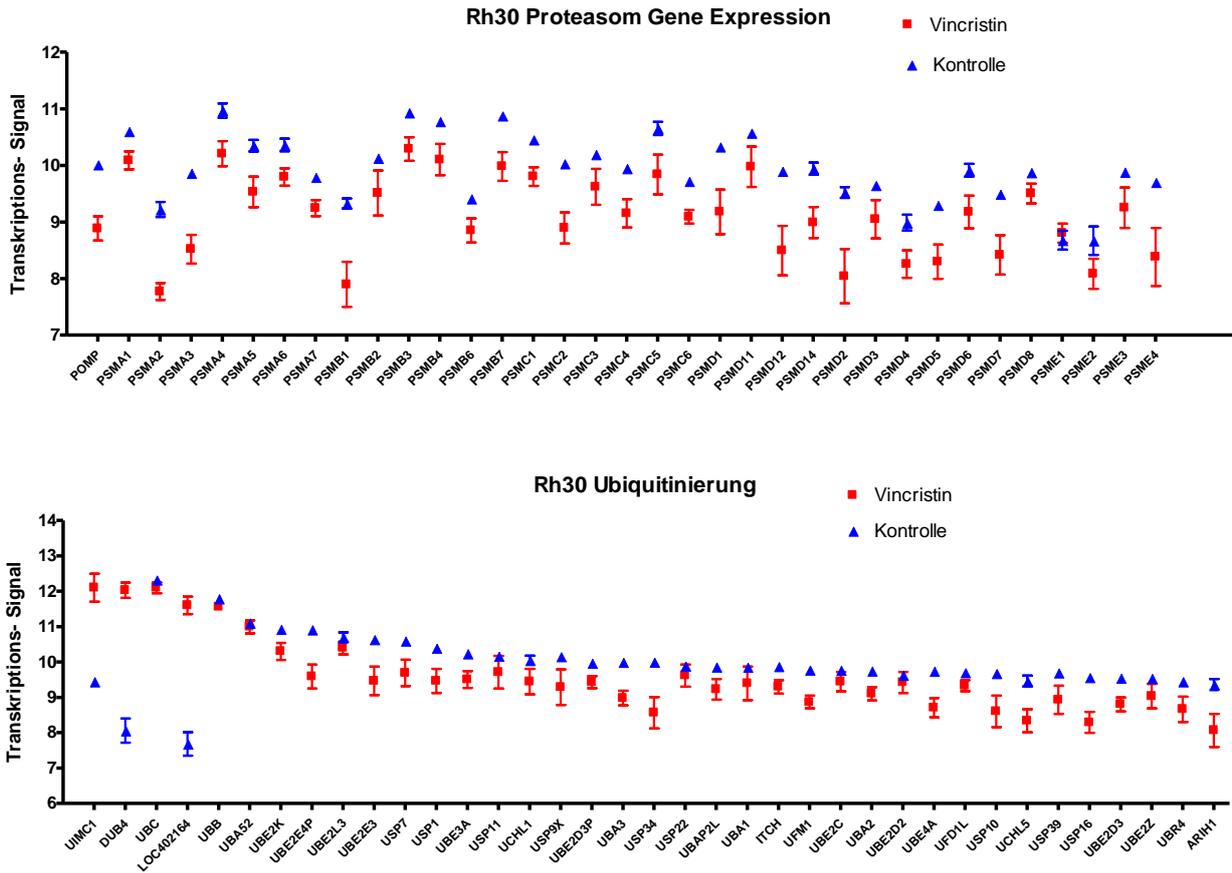
### **3.4.1 Genchipanalyse und Auswahl der Gene für die qRT-PCR**

Um Veränderungen auf RNA-Ebene feststellen und weitergehend untersuchen zu können, wurden zunächst Genchipanalysen für das Tumormaterial ausgewählter Xenografts erstellt. Für jede Zelllinie wurden jeweils drei Tumoren der Kontroll-Gruppe und drei Tumoren der mit Vincristin behandelten Gruppe ausgesucht, für die die Genchipanalysen erstellt wurden. Anschließend wurden die Expressionsprofile vor und nach Behandlung mit Vincristin miteinander verglichen und untersucht, welche Gene durch die Behandlung mit Vincristin verstärkt, beziehungsweise vermindert exprimiert wurden.

Nach Bereinigung der Daten der Genchipanalyse zeigte sich, dass durch die Vincristin-Behandlung 720 Gene bei den Tumoren der Zelllinie Rh30 zweifach oder noch stärker reguliert waren. In Abbildung 20 sind die bei der Zelllinie Rh30 verändert exprimierten Gene ausschnittsweise dargestellt. In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass viele Gene des Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplexes unter der Behandlung mit Vincristin verändert exprimiert sind.

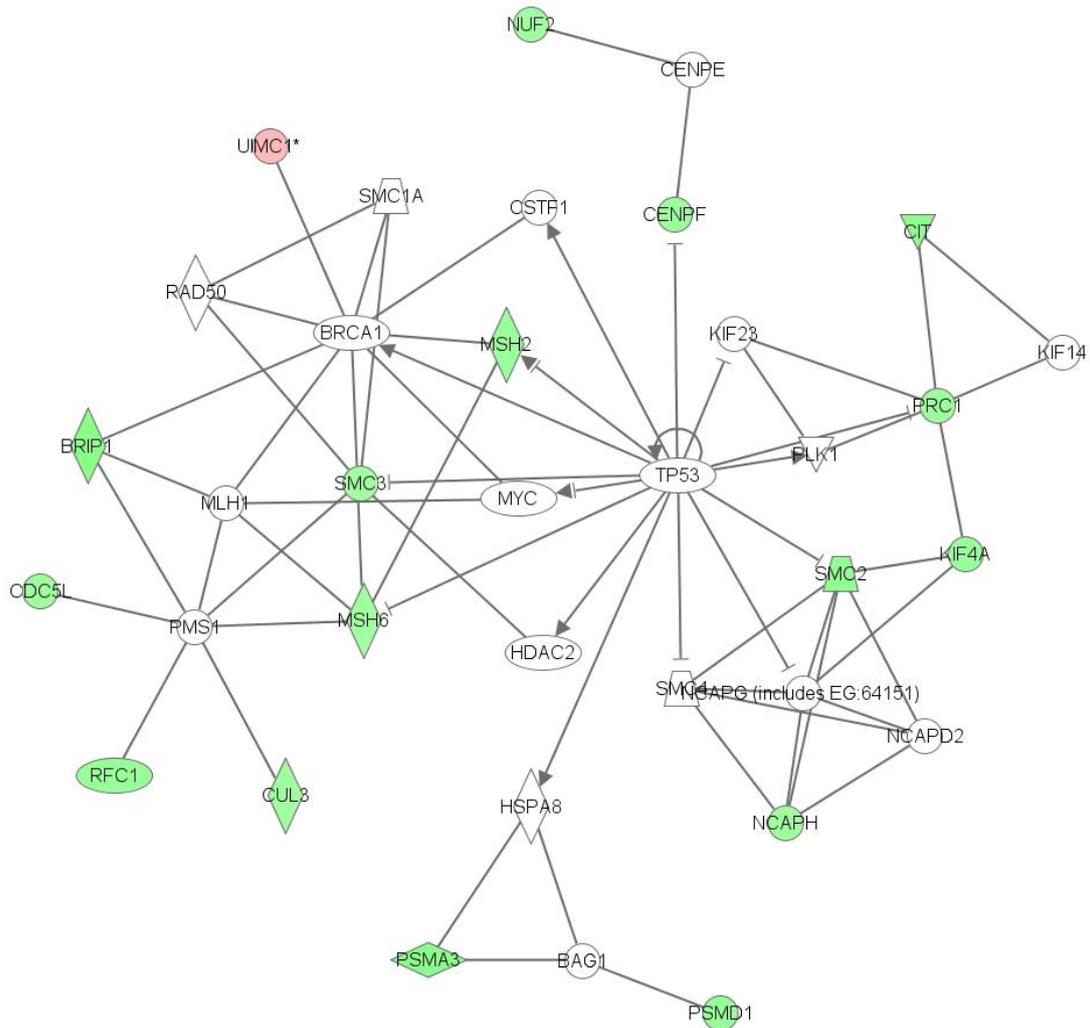
Bei den Tumoren der Zelllinie A204 fanden sich 226 mindestens zweifach regulierte Gene. Die bereinigten Daten der Genchipanalyse wurden anschließend mit Hilfe von IPA (Ingenuity Pathway analysis) untersucht. Bei dieser Untersuchung fanden sich insgesamt 32 Gen-Netzwerke bei Rh30 und 15 Gen-Netzwerke bei der Zelllinie A204, die von dem veränderten Genexpressionsprofil in unterschiedlichem Ausmaß betroffen waren.

Bei beiden Zelllinien gab es je ein komplexes Netzwerk in dem jeweils TP53, das Gen welches das Tumor-Suppressor-Protein p53 kodiert, die Schlüsselrolle spielte und einige Gene des Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplexes beteiligt waren. TP53 selbst lag nicht verändert exprimiert vor. In beiden Netzwerken war jedoch das Gen UIMC1 nach der Behandlung mit Vincristin verändert exprimiert. UIMC1 sorgt für einen vermehrten Abbau von p53 über das Proteasom. Das Netzwerk der Zelllinie Rh30, welches UIMC1 umfasst, ist in Abbildung 21 beispielhaft dargestellt. Das entsprechende Netzwerk der Zelllinie A204 ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Veränderungen in der Genexpression sind bei den verschiedenen Zelllinien augenscheinlich nicht konkordant.



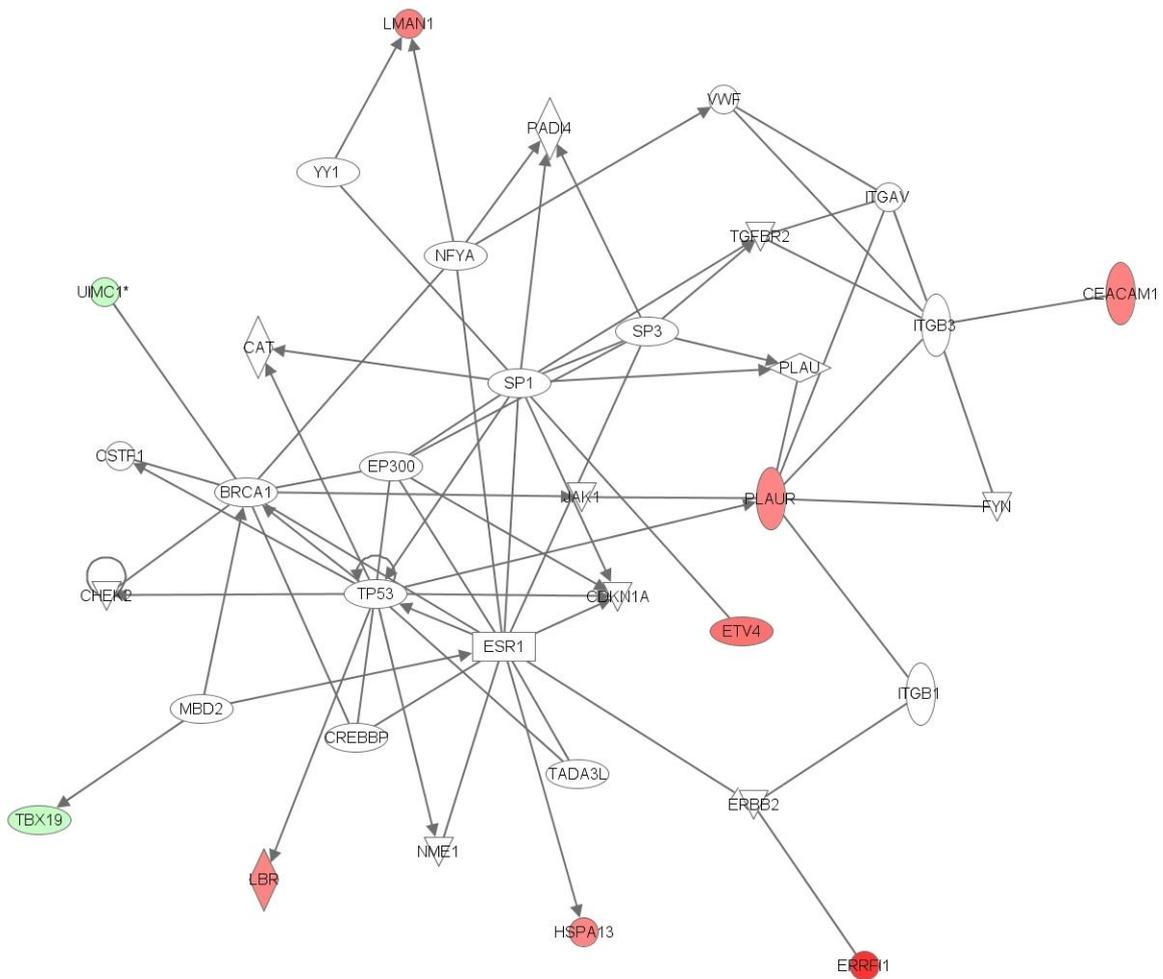
**Abbildung 20: Genchip-Analyse der Tumorzelllinie Rh30 für die Gene des Proteasom- und Ubiquitinierungs-Komplexes**

Die Abbildung zeigt eine Auswahl der in der Genchipanalyse gemessenen Transkriptions-Signalstärken verschiedener Gene bei der Tumorzelllinie Rh30. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung der Mehrfachbestimmungen aus den drei verschiedenen Tumorproben. Die obere Grafik zeigt eine Auswahl verändert exprimierter Gene aus dem Proteasom-Komplex, die untere Grafik eine Auswahl verändert exprimierter Gene des Ubiquitinierungs-Systems. Die Daten der Vincristin-Gruppe sind rot und die der Kontrollgruppe blau dargestellt.



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Abbildung 21: Veränderungen im Expressionsprofil bei Rh30 betreffen ein Netzwerk Zellzyklus- und Tumorregulierender Gene. Dabei gehören etliche zum Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplex**  
 In der Abbildung ist ein Gen-Netzwerk der Zelllinie Rh30 dargestellt, welches von der Behandlung mit Vincristin beeinflusst wurde. Die Schlüsselrolle des Netzwerkes spielt TP53. Höher exprimierte Gene, wie UIMC1, sind rot, vermindert exprimierte Gene sind grün dargestellt.

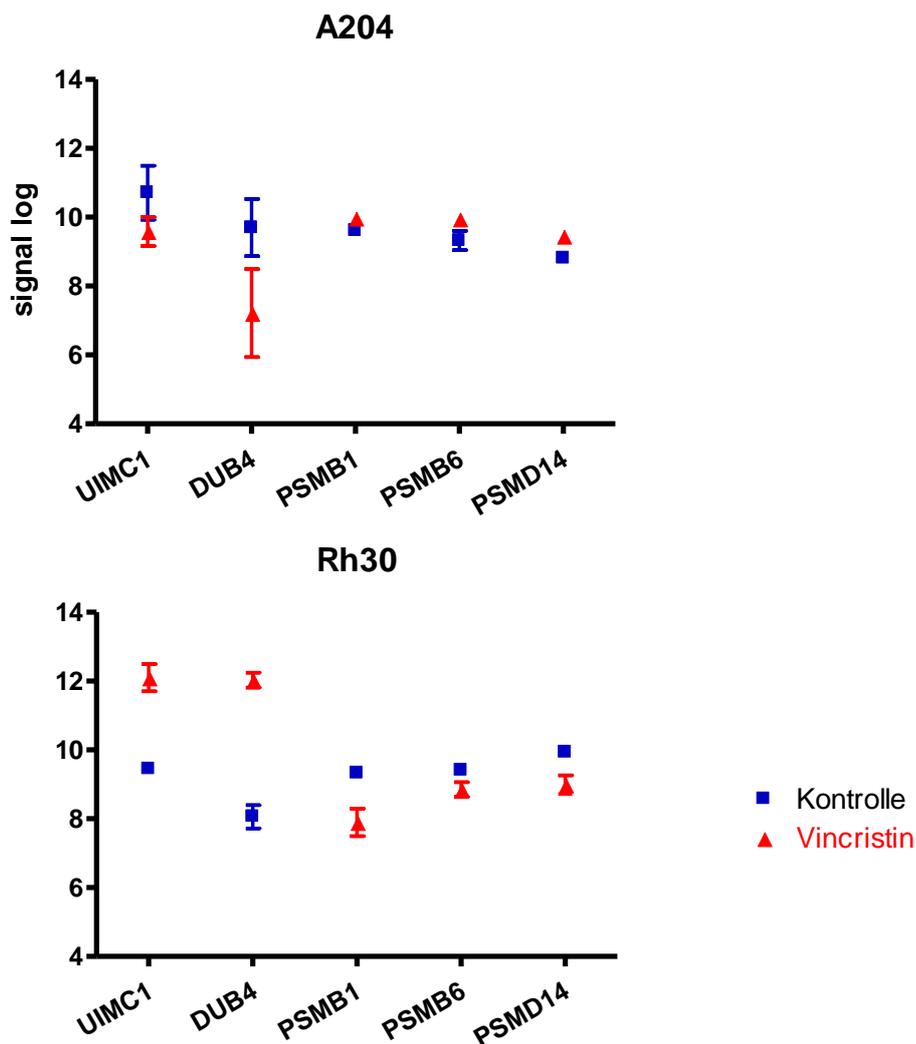


© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

### Abbildung 22: Veränderungen im Expressionsprofil bei A204

Die Abbildung zeigt ein Gen-Netzwerk der Ziellinie A204, welches von der Behandlung mit Vincristin beeinflusst wurde. Die Schlüsselrolle des Netzwerkes spielt TP53. Vermindert exprimierte Gene, wie UIMC1, sind grün, vermehrt exprimierte Gene sind rot dargestellt. Veränderungen im Expressionsprofil bei A204 betreffen wie zu sehen ist ebenfalls ein Netzwerk Zellzyklus- und Tumorregulierender Gene.

Für die qRT-PCR wurden schließlich fünf Gene aus dem Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplex ausgesucht, welche die größten Veränderungen in ihrem Expressionsprofil nach Vincristin-Behandlung aufwiesen und deren Funktion zumindest teilweise geklärt ist und über welche Literatur zu finden war. Die ausgewählten Gene sind UIMC1 und DUB4 aus der Ubiquitinierungs-Gruppe und PSMB1, PSMB6 sowie PSMD14 aus dem Proteasom-Komplex. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für diese fünf Gene nochmals dargestellt.



**Abbildung 23: Für die qRT-PCR ausgewählte Gene und deren Transkriptionssignale in der Genchipanalyse**

Bei der Zelllinie Rh30 führte die Behandlung mit Vincristin zu einer Hochregulierung von UIMC1 und DUB4. PSMB1, PSMB6 und PSMD14 wurden nach der Behandlung mit Vincristin vermindert exprimiert.

In der Genchipanalyse zeigte sich, dass bei Rh30 die Gene UIMC1 und DUB4 unter der Behandlung mit Vincristin nach oben reguliert waren. Die Gene PSMB1, PSMB6 und PSMD14, welche dem Proteasom zuzuordnen sind, waren in der Genchipanalyse nach unten reguliert. Bei der Zelllinie A204 waren die Unterschiede gering und lagen bis auf die Variation bei dem Gen DUB4 im Standardabweichungsbereich.

### **3.4.2 Genexpressionsprofil von RMS-Zellen nach Behandlung mit Tariquidar**

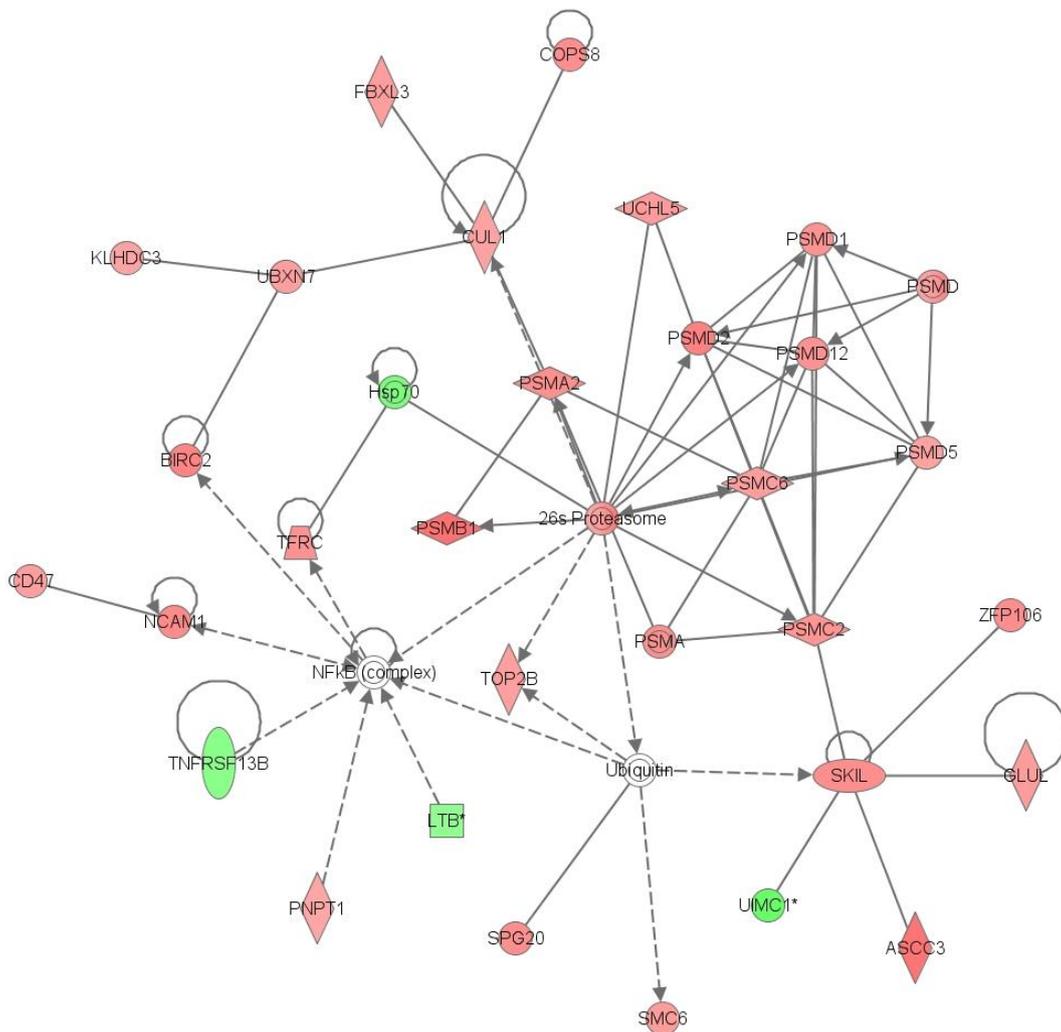
Der Vergleich der Genchip-Daten der mit Vincristin behandelten RMS-Zellen und der mit Tariquidar und Vincristin behandelten Zellen zeigte, dass es der Zusatz von Tariquidar zu weiteren komplexen Veränderungen des Genexpressionsprofils führte. Bei der Untersuchung der Daten mit Hilfe von Ingenuity Pathway ergaben sich 10 Gen-Netzwerke, die bei der Zelllinie Rh30 und drei Netzwerke, welche bei Tumoren der Zelllinie A204 von der Behandlung signifikant beeinflusst waren. Unter den 10 Netzwerken der Tumoren der Zelllinie Rh30 waren wiederum drei, welche Gene aus dem Proteasom- und Ubiquitinierungs-Komplex einschlossen.

Das größte der Netzwerke spannte sich um die 26S-Untereinheit des Proteasoms auf. Dabei zeigt sich, dass viele Gene, die Teile des Proteasoms kodieren, und einige Gene, die Ubiquitinierungs-Proteine kodieren, verändert exprimiert waren (Abbildung 24).

Der Vergleich mit den Tumoren der ausschließlich mit Vincristin behandelten Tiere ergab, dass etliche Gene, welche durch Vincristin in ihrer Expression verändert waren, durch die Zugabe von Tariquidar wieder „zurück“ reguliert wurden. UIMC1 beispielsweise, welches unter der Behandlung mit Vincristin bei der Zelllinie Rh30 erhöht exprimiert war, wurde durch die Zugabe von Tariquidar wieder weniger stark exprimiert.

Die übrigen Proteasom-Gene, wie zum Beispiel PSMD, PSMD1, PSMD2, PSMD12, PSMB1, PSMA, PSMA2, PSMC, PSMC2, PSMC6 wurden unter Zugabe von Tariquidar stärker exprimiert.

Die Behandlung mit Tariquidar führt zu vielen Veränderungen der Genexpression des Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplexes. Im Vergleich zu der Behandlung mit Vincristin sind etliche Gene des Proteasom-Komplexes erhöht exprimiert.



© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Abbildung 24: Durch Vincristin reguliertes Gen-Netzwerk bei den RMS-Tumoren der Zelllinie Rh30**

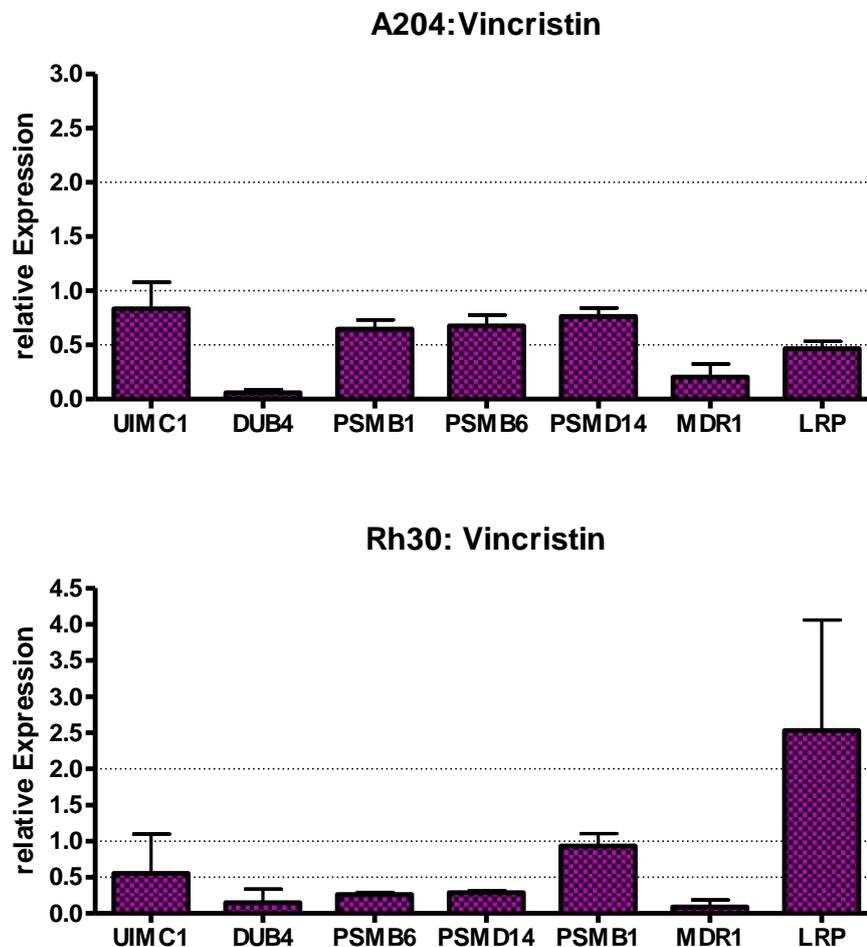
Die Gene, welche gegenüber der Vincristin-behandelten Gruppe stärker exprimiert sind, sind rot dargestellt. Die Gene die unter der Behandlung mit Vincristin höher exprimiert sind, sind in grün dargestellt. UIMC1 wird vermindert exprimiert. Das 26S-Proteasom, dabei insbesondere PSMD, PSMD1, PSMD2, PSMD12, PSMB1, PSMA, PSMA2, PSMC, PSMC2, PSMC6 wurden unter Zugabe von Tariquidar stärker exprimiert.

**3.4.3 Quantifizierung ausgewählter Mitglieder des Proteasom-Ubiquitinierung-Komplexes mittels qRT-PCR im Tumorgewebe von RMA und RME-Xenografts**

Wie sich die Behandlung mit Vincristin auf die mRNA-Expression der ausgewählten Gene ausgewirkt hatte, wurde mittels qRT-PCR überprüft. Bei der Genchip-Analyse entsprachen, abgesehen vom LRP-Gen, keine klassischen Chemoresistenz-Gene, den angelegten Auswahlkriterien. Da die Chemoresistenz im kindlichen RMS und

das MDR1-Gen im besonderen Interesse dieser Arbeit lagen, wurde die Expression dieses Gens ebenfalls auf mRNA-Ebene überprüft.

Abbildung 25 zeigt die zu dem konstant exprimierten Referenzgen PDHB relative mRNA-Expression der fünf ausgewählten Gene UIMC1, DUB4, PSMB1, PSMB6 und PSMD14 sowie der Gene MDR1 und LRP nach der Behandlung mit Vincristin.



**Abbildung 25: Relative mRNA-Expression unter Behandlung mit Vincristin gegenüber der Kontrolle**

Zu sehen ist die n-fache Expression der mRNA mit den Standardabweichungen der Mittelwerte der dreifach-Bestimmungen dreier Tumoren einer Zelllinie nach Behandlung mit Vincristin. Vor Berechnung der relativen Expression wurde bei allen Werten eine Nulllinien-Korrektur durchgeführt. Dazu wurde jeweils die Expression von PDHB der gleichen Probe abgezogen und dann der  $\Delta\Delta C_t$ -Werte berechnet.

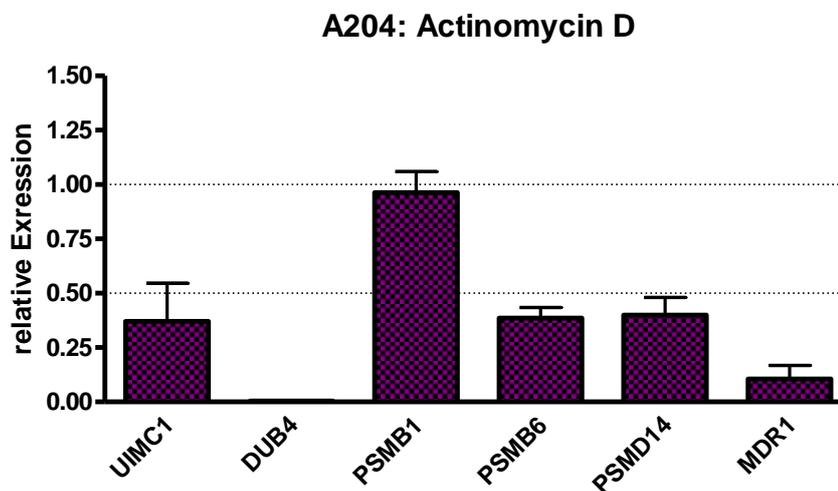
Die Daten der Genchip-Analyse ließen sich nur zum Teil durch die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigen. Analog zur Genchip-Analyse ist die Expression von PSMB1, PSMB6 und PSMD14 nach der Behandlung mit Vincristin vermindert. Die Expression von PSMB1 und PSMD14 war nur bei der Zelllinie Rh30 mehr als zweifach reduziert. PSMB6 war bei Rh30 kaum verändert exprimiert und alle drei

untersuchten Gene des Proteasom-Komplexes sind bei der Zelllinie A204 (weniger als zweifach) vermindert exprimiert.

Entgegen den Ergebnissen aus der Genchipanalyse wurde DUB4 von keiner der beiden Zelllinien vermehrt transkribiert. UIMC1 wurde von den embryonalen Tumorzellen unverändert transkribiert, von der alveolären Zelllinie vermindert.

MDR1 wurde bei beiden Zelllinien kaum exprimiert. Die Expression von LRP war, wie anhand der Genchipanalyse erwartet, bei der Zelllinie Rh30 um mehr als das Zweifache hoch reguliert. Bei der embryonalen Zelllinie A204 zeigte sich nach der Behandlung mit Vincristin keine erhöhte Expression von LRP.

Bei der Zelllinie A204 wurde außerdem noch eine qRT-PCR zur Untersuchung der Veränderungen des Genexpressionsprofils nach Behandlung mit Actinomycin D durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Bis auf PSMB1, welches unverändert exprimiert vorlag, waren alle untersuchten Gene nach der Behandlung mit Actinomycin D vermindert transkribiert worden.

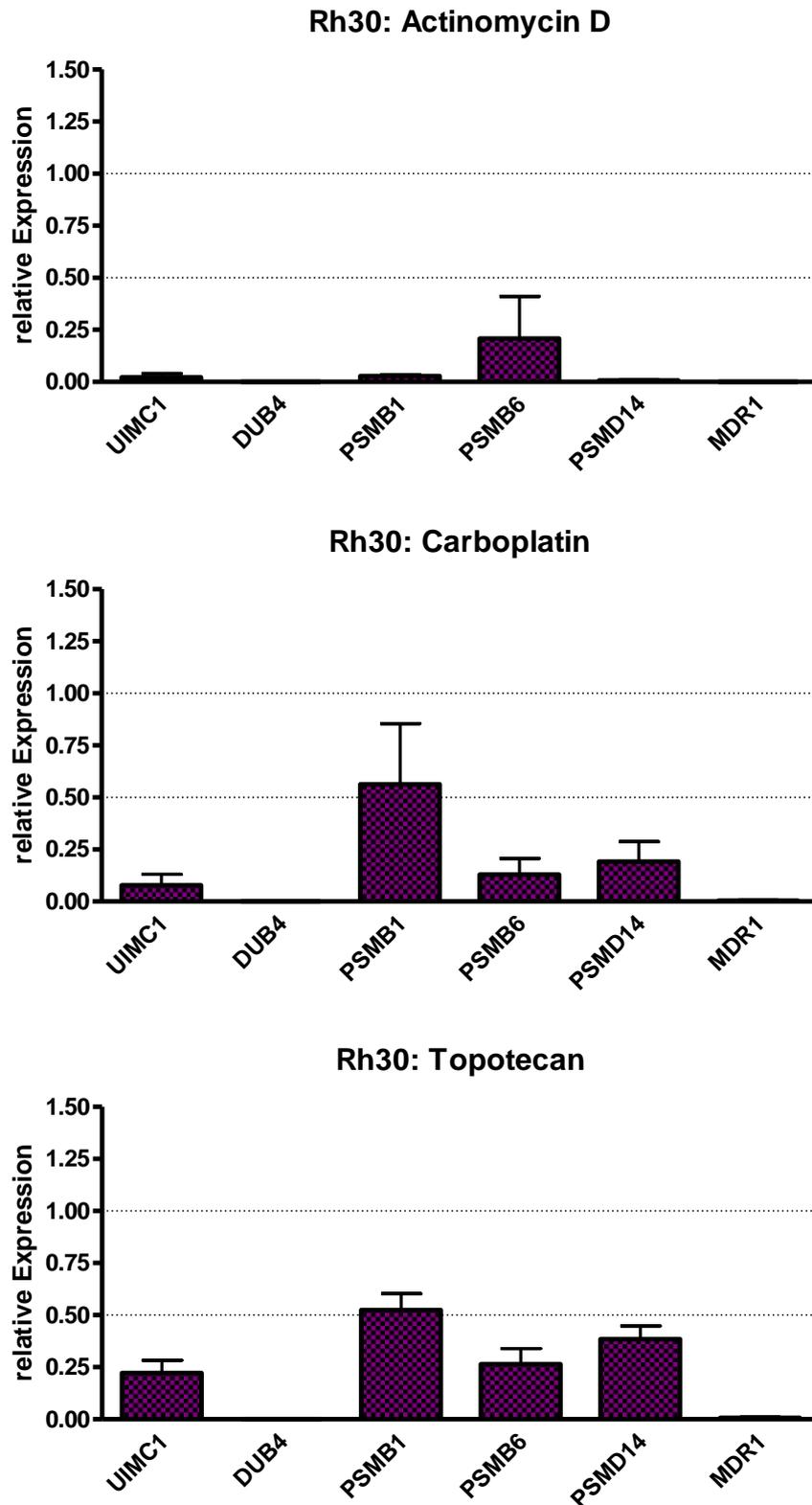


**Abbildung 26: Einfluss der Behandlung mit Actinomycin D auf die mRNA Expression von embryonalen RMS-Tumoren der Zelllinie A204.**

Dargestellt ist die n-fache Expression der mRNA mit den Standardabweichungen der Mittelwerte der dreifach-Bestimmungen dreier Tumoren einer Zelllinie nach Behandlung mit Actinomycin D. Die Berechnung der relativen Genexpression (der  $\Delta\Delta C_t$ -Werte) erfolgte nach dem in Abbildung 22 beschriebenen Schema.

Die Gen-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR wurden außerdem bei den Gewebeproben der alveolären Xenografts (Rh30) nach Behandlung mit Actinomycin D, Carboplatin und Topotecan durchgeführt. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Alle sechs untersuchten Gene (UIMC1, DUB4, PSMB1,

PSMB6, PSMD14 und MDR1) waren nach Zytostatika-Behandlung deutlich vermindert exprimiert.



**Abbildung 27: Wirkung verschiedener Zytostatika auf die mRNA-Expression von RMS-Tumoren der Zelllinie Rh30**

Dargestellt ist die n-fache Expression der mRNA mit den Standardabweichungen der Mittelwerte der dreifach-Bestimmungen dreier Tumoren einer Zelllinie nach Behandlung mit Actinomycin D, Carboplatin oder Topotecan. Berechnung der relativen Expression wie in Abbildung 22 und 23 beschrieben.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es bei keiner Behandlung und keiner Zelllinie zu einer Resistenzprägung im Sinne einer Überexpression der mRNA von MDR1 kam.

Das Chemoresistenz-Gen LRP war unter der Behandlung mit Vincristin bei der alveolären Zelllinie Rh30 auf das Doppelte hochreguliert. Bei der embryonalen Zelllinie A204 war es jedoch zweifach runter reguliert.

Alle Behandlungsschemata führten bei den Tumoren beider Zelllinien zu einer verminderten Expression aller untersuchten Gene des Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplexes. Eine Ausnahme bildete die Expression von PSMB1, die bei der Zelllinie A204 nach Behandlung mit Actinomycin D sowie nach Vincristin-Behandlung bei der alveolären Zelllinie Rh30 weder hoch noch runter-reguliert waren.

Insgesamt waren die Gene bei den Tumoren der alveolären Zelllinie Rh30 stärker reguliert.

Die Minderexpression der Gene des Proteasom-Komplexes wurde mittels Proteasominhibitoren simuliert und mittels Proliferationsassays weiter untersucht.

#### **3.4.4 Proliferationsassay: Proteasominhibitoren und Vincristin**

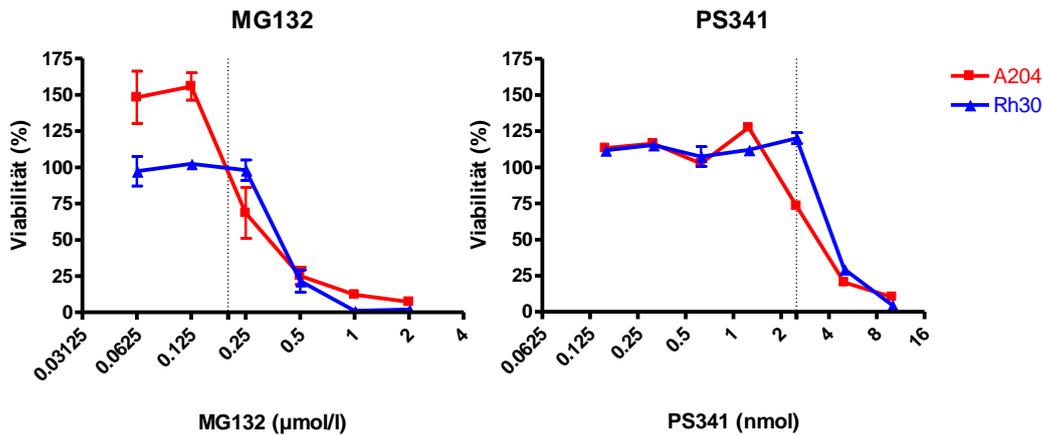
Zunächst wurde mit Hilfe von Proliferationsassays die minimalen Hemmkonzentrationen der Proteasominhibitoren PS341 und MG132 bestimmt. In Abbildung 28 sind die Kurven dieser Proliferationsassays dargestellt.

Die minimale Hemmkonzentration betrug bei der Zelllinie Rh30 für PS341 etwa 2,5 nM, für MG132 etwa 0,2 µM. Bei der Zelllinie A204 lagen die Werte etwas niedriger.

Anschließend wurden Kombinationsversuche mit Vincristin und Proteasominhibitor an den RMS-Zelllinien A204 und Rh30 durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils mit zwei verschiedenen Proteasominhibitoren, MG132 und PS341, und steigenden Konzentrationen Vincristin behandelt.

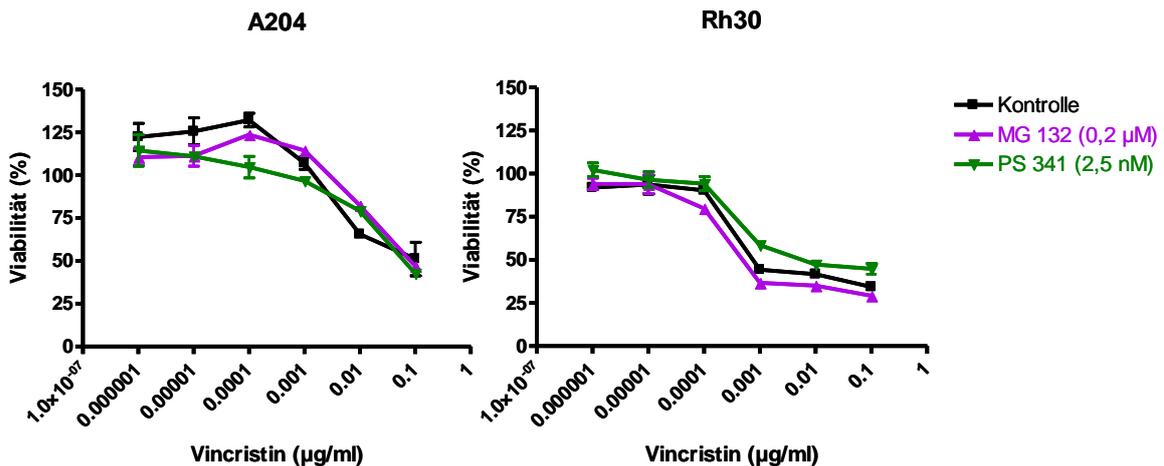
In Abbildung 29 ist die Viabilität der Zellen in Abhängigkeit von der verwendeten Vincristin-Konzentration grafisch dargestellt.

Mit steigenden Konzentrationen Vincristin sank die Viabilität auf bis zu 30%. Durch die Zugabe von MG132 (0,2 µM) oder PS341 (2,5 nM) kam es zu keiner signifikanten Verschiebung der Kurve im Sinne einer Resistenzentstehung nach oben oder im Sinne einer Chemo-Sensibilisierung nach unten.



**Abbildung 28: Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen der Proteasominhibitoren**

Die zwei RMS-Zelllinien A204 und Rh30 wurden jeweils mit verschiedenen Konzentrationen PS341 und MG132 behandelt. Nach 48 Stunden wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt und die Viabilität (in %) in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte der Dreifach-Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Die gestrichelte Markierungslinie kennzeichnet jeweils die Konzentration, welche zur Verwendung in den weiteren Versuchen ausgewählt wurde.



**Abbildung 29: Modulation der Wirkung von Vincristin durch Proteasominhibition**

Die zwei RMS-Zelllinien A204 und Rh30 wurden mit zwei verschiedenen Proteasominhibitoren und verschiedenen Konzentrationen Vincristin behandelt. Nach 48 Stunden wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt und die Viabilität (in %) in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Die schwarze Kurve stellt den Viabilitätsabfall der Zellen dar, welche nur mit Vincristin behandelt wurden. Die blaue Kurve steht für die Zellen, welche zusätzlich mit 0,2 µM MG132 behandelt wurden. Die rote Kurve veranschaulicht den Viabilitätsabfall der Zellen, welche zusätzlich zu Vincristin mit 2,5 nM PS341 behandelt wurden. Bei den dargestellten Werten handelt es sich stets um Mittelwerte der Dreifach-Bestimmungen und ihre Standardabweichungen.

## **4. Diskussion**

Das häufigste Weichteilsarkom im Kindesalter ist das Rhabdomyosarkom. Innerhalb von 21 Jahren (1970-1991) konnte durch Verbesserung der Behandlungsschemata das Gesamt-Überleben beim kindlichen RMS von 25% auf etwa 70% verbessert werden (16). Die Überlebenschancen variieren allerdings abhängig vom IRS-Stadium, der Histologie des Tumors, der Lokalisation des Primärtumors und anderen bereits einleitend genannten Faktoren stark. Patienten mit RMS im Stadium III; IV oder mit einem Rezidiv-Tumor haben abhängig von der Histologie eine 5-JÜR von nur 5-26% (17). Die Resistenz gegenüber Zytostatika stellt ein großes Problem in der Behandlung des RMS dar. Welcher Pathomechanismus beim kindlichen Rhabdomyosarkom hinter der Ausprägung von Chemoresistenz steht und welche Möglichkeiten zur Überwindung der Chemoresistenz bestehen, sind daher Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung und stellen die leitenden Fragestellungen der vorliegenden Arbeit dar.

Ein Mechanismus, der bei etlichen Tumorentitäten zur Resistenzentstehung führt, ist die Überexpression von MDR1. Der MDR1-Transporter ist ein Pgp-Transporter, der ATP-abhängig zytotoxische Stoffe aus der Zelle ausschleusen kann (21, 28, 29, 45, 47). Dadurch wird die Zytostatika-Konzentration in der Tumorzelle gesenkt, was in einer verminderten Wirksamkeit des Zytostatikums resultiert.

Auch in chemoresistenten RMS-Zellen liegt MDR1 überexprimiert vor. Dies wurde in mehreren Studien mittels unterschiedlicher Verfahren, darunter Western Blot, Northern Blot, immunhistochemische Färbungen und qRT-PCR wiederholt nachgewiesen (39, 114-117).

Es sind mehrere unterschiedliche Substanzen bekannt, die MDR1 inhibieren können. Der spezifischste und wirksamste derzeit bekannte Pgp-Inhibitor mit dem geringsten Nebenwirkungsprofil ist Tariquidar (71, 73). Tariquidar wurde bei anderen Tumorentitäten, z.B. dem Colon-Karzinom, bereits erfolgreich eingesetzt, um eine bestehende Chemoresistenz bei den Tumor-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu überwinden (71).

Bei den Versuchen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, zeigte sich mitunter, dass der Pgp-Inhibitor Tariquidar eine eigenständige Wirkung auf RMS-Zellen *in vitro* und *in vivo* ausübte, dass die Kombinationsbehandlung von Tariquidar

mit Zytostatika keinen entscheidenden Vorteil in der Behandlung des RMS brachte (weder *in vitro* noch *in vivo*) und dass der Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplex möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Chemoresistenz beim RMS spielt. Die wissenschaftliche Bedeutung der genannten Ergebnisse wird im Folgenden diskutiert und im Kontext aktueller Forschung betrachtet werden.

### **Die Wirkung von Tariquidar auf RMS-Zellen *in vitro***

Im Rahmen der Versuchsplanung der vorliegenden Arbeit fiel zufällig auf, dass Tariquidar eine eigenständige Wirkung auf RMS-Tumorzellen ausübte. Dieser Effekt von Tariquidar auf die RMS-Zellen war eine überraschende und nicht in diesem Ausmaß antizipierte Entdeckung. In weiteren *in vitro* und *in vivo*-Versuchen bestätigte sich der eigenständige wachstumsinhibitorische Effekt von Tariquidar auf RMS-Zellen. Die Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass Tariquidar Apoptose in kindlichen RMS-Zellen induzieren kann.

In Proliferationsassays zeigte sich, dass Tariquidar das Wachstum der alveolären Zelllinie Rh30 und der embryonalen Zelllinien A204 und RD massiv einschränkte. Die Viabilität wurde sowohl von der Dauer der Exposition als auch von der eingesetzten Tariquidar-Konzentration beeinflusst. Ab einer Konzentration Tariquidar von 1 µg/ml war bereits nach 24 Stunden ein wachstumsinhibitorischer Effekt erkennbar. Unter Zugabe von 12,8 µg/ml Tariquidar sank die Viabilität der Zellen nach 48 Stunden auf etwa 35%, nach 72 Stunden auf unter 25%.

Lichtmikroskopisch ließen sich bereits bei geringen Konzentrationen Tariquidar, z.B. 1,6 µg/ml, deutliche und für Apoptose charakteristische Zellveränderungen feststellen. Sowohl im nativen Bild als auch nach Färbung mit HE kam es in den mit Tariquidar behandelten Zellen zur Auflösung von Zellverbänden, zur Membranalyse und zu Zellkern-Fragmentierungen. Diese Zellveränderungen sind Zeichen für apoptotische Vorgänge in der Zelle. Besonders auffällig war außerdem die Entstehung multipler großer Vakuolen im Zytoplasma der Zelle. Eine längere Einwirkzeit von Tariquidar verstärkte diese Effekte.

Die Vakuolen wurden durch verschiedene Färbemethoden weiter untersucht. Mit Hilfe der Acridinorange-Färbung ließ sich schließlich zeigen, dass es sich bei den

Vakuolen um sehr saure Kompartimente, vermutlich Lysosomen, handelte. Lysosomen zeichnen sich durch ihren sauren pH aus. In Lysosomen können unter anderem Zellorganellen und langlebige Proteine verdaut werden. Werden Zellorganellen oder langlebige Proteine in Lysosomen verdaut, nennt sich dieser Prozess Autophagie. Die Autophagie ist die einzige Möglichkeit der Zelle, Zellorganellen abzubauen. Die Lysosomen werden in diesem Fall als Autolysosomen bezeichnet (121). Die Autophagie ist einerseits für das Zellgleichgewicht und die Energiebereitstellung in "Hungerzeiten" wichtig, andererseits kann durch Autophagie ein programmierter Zelltod vermittelt werden, der von der Apoptose abzugrenzen ist (122). Während bei der klassischen Apoptose zunächst das Zytoskelett kollabiert und die Zellorganellen bis spät in den Prozess hinein präserviert werden, werden beim programmierten Zelltod durch Autophagie die Zellorganellen als Erstes abgebaut und das Zytoskelett bleibt bis zum Ende intakt. Bei dem programmierten Zelltod durch Autophagie kommen typischerweise Ansammlungen von Autolysosomen im Zytoplasma vor (123).

Diese Autolysosomen lassen sich optisch nicht von Lysosomen, die im Rahmen von apoptotischen Veränderungen auftreten, unterscheiden. Daher stellte sich die Frage, ob es sich bei den Zellveränderungen um den programmierten Zelltod durch Autophagie und nicht um Apoptose handeln könnte. Aufgrund der Zellzyklusanalyse lässt sich diese Frage jedoch verneinen. Unter apoptotischen Bedingungen wird die DNA fragmentiert. In autophagischen Zellen wird die DNA in der Regel nicht gespalten (122, 123). Unter Tariquidar war ein massiver Anstieg DNA-fragmentierter Zellen in der Durchflusszytometrie beobachtet worden. Der Einsatz von circa 3 µg/ml Tariquidar führte bereits zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen (Zellen mit stark fragmentierter DNA) um mehr als 20%. Der Anteil der in der G1-Phase befindlichen Zellen nahm zu Gunsten der apoptotischen Zellen ab. Damit ist der programmierte Zelltod durch Autophagie mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Die weiteren Untersuchungen bestätigten ebenfalls die Annahme, dass Tariquidar Apoptose in RMS-Zellen auslösen kann. So zeigte die Färbung mit JC1 eine deutliche Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Das mitochondriale Membranpotential wird über einen Protonengradienten hergestellt. Ohne das Membranpotential arbeitet die ATP-Synthase, welche an der Innenseite der Membran liegt, nicht und es kann keine Energie für die Zelle bereit gestellt

werden (124). Ein fehlendes, bzw. verringertes Membranpotential ist ein Anzeichen dafür, dass die Zelle sich in Apoptose befindet.

Alle genannten Ergebnisse untermauern die Annahme, dass Tariquidar Apoptose in kindlichen RMS-Zellen auslösen kann. In anderen Arbeiten zeigte Tariquidar bei der Verwendung von Konzentrationen bis zu 1,733 µg/ml *in vitro* keine relevante eigenständige Wirkung auf unterschiedliche humane Tumorzellen (71, 75). Die Schwelle für eine toxische Wirkung von Tariquidar liegt für humane Zellen bei etwa 1,733 µg/ml (71). Es ist daher zu berücksichtigen, dass der ausgeprägte wachstumsinhibitorische Effekt, den wir beim Einsatz von Tariquidar *in vitro* beobachten konnten, zum Teil auf die verhältnismäßig hohen Konzentrationen des Pgp-Inhibitors zurückzuführen ist. Der proapoptotische Effekt von Tariquidar auf RMS-Zellen ist dennoch eine neue Entdeckung und wurde bisher in keiner mir bekannten Veröffentlichung, welche sich mit Tariquidar auseinandersetzt, beschrieben.

Bei den Pgp-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation wurde ebenfalls beobachtet, dass sie unter bestimmten Umständen und auf unterschiedlichem Weg Apoptose induzieren. Verapamil, ein Pgp-Inhibitor der ersten Generation, induziert, wenn er in geringen Konzentrationen eingesetzt wird, Apoptose in MDR1-positiven Zellen. Interessant ist dabei jedoch, dass Verapamil die Aktivität des Pgp-Transporters in geringen Konzentrationen aktiviert und nicht hemmt. Durch Zugabe eines Pgp-Inhibitors der dritten Generation ist der Effekt reversibel. *Karwatsky et al 2003* stellten die Vermutung auf, dass durch den vermehrten Bedarf an ATP durch die Aktivierung der Pgp vermehrt freie Sauerstoffradikale im Mitochondrium anfallen, die wiederum Apoptose induzieren können (125). Für die Pgp-Inhibitoren der zweiten und dritten Generation konnte kein Pgp-aktivierender Effekt nachgewiesen werden, so dass nicht davon auszugehen ist, dass Tariquidar Apoptose auf dem gleichen Weg induziert.

Die Pgp-Inhibitoren der zweiten Generation lösten auch in einigen MDR1-positiven sowie in nicht chemoresistenten Leukämie-Zellen eigenständig Apoptose aus (126). Über den dahinter stehenden Pathomechanismus liegen keine Publikationen vor.

Der Pathomechanismus, der für die Apoptose-Induktion bei RMS-Zellen unter dem Einsatz von Tariquidar verantwortlich ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit

nicht untersucht. Möglicherweise hemmt Tariquidar die ATP-Hydrolyse noch an einer anderen Stelle in der Zelle und kann dadurch Apoptose auslösen. In vielen Proteinen ist die Spaltung von ATP durch ATPasen essentiell für die Funktion des Enzyms. Wenn Tariquidar nicht so hochspezifisch für den MDR1-Transporter ist wie bisher angenommen ist es denkbar, dass durch Tariquidar noch andere ATPasen gehemmt werden. Dies kann wiederum Stress in der Zelle auslösen, der Apoptose induzieren kann.

### **Wirkung von Tariquidar auf RMS-Xenografts *in vivo***

Nach dem einschlägigen Effekt den Tariquidar *in vitro* gezeigt hatte, stellte sich die Frage, ob Tariquidar auch *in vivo* eine eigenständige Wirkung zeigen würde. Daher wurden weitere Versuche mit Tariquidar an RMS-Xenografts *in vivo* an nu/nu Mäusen durchgeführt.

Die zytotoxische Wirkung *in vitro* war zum Teil über die Verwendung von vergleichsweise hohen Konzentrationen Tariquidar erklärbar. In den Tierversuchen wurden hingegen eher niedrige Konzentrationen Tariquidar eingesetzt. Trotzdem konnte auch *in vivo* eine signifikante wachstumsinhibitorische Wirkung von Tariquidar auf RMS-Tumorzellen beobachtet werden. Eingesetzt wurde die vom Hersteller empfohlene und auch in anderen Tierversuchen in dieser Konzentration verwendete Dosierung mit 2mg/kgKG/ Tag. In anderen Arbeiten wurden sogar bis zu doppelt so hohe Konzentrationen Tariquidar eingesetzt um die erwünschte potenzierende Wirkung der Zytostatika zu erreichen. Auch in diesen Konzentrationen traten keine unerwünschten Nebenwirkungen von Tariquidar auf (71).

Die Wirkung, die Tariquidar auf die Xenografts ausübte, war trotz der *in vitro*-Versuche überraschend. Es lassen sich keine Studien finden, die beim RMS oder anderen malignen Tumoren einen vergleichbaren Effekt von Tariquidar beschrieben. Wie Abbildung 19 eindrücklich zeigt, wurde das Wachstum der RMS-Xenografts durch die Therapie mit Tariquidar signifikant gehemmt. Im Vergleich mit den verwendeten Zytostatika zeigte sich, dass Tariquidar eine ähnlich gute, zum Teil sogar stärker wachstumsinhibierende Wirkung hatte als die Zytostatika, die üblicherweise in der Therapie des Rhabdomyosarkoms eingesetzt werden. Tariquidar erreichte eine stärkere Wachstumshemmung als Carboplatin, Topotecan

oder Actinomycin D alleine. Die Wirkung von Tariquidar auf das Tumorwachstum war jedoch abhängig von dem Therapieschema (siehe Abbildung 8), bzw. korrelierte mit der eingesetzten Gesamtdosis Tariquidar.

Bei den Rh30-Tumoren der unbehandelten Kontrollgruppe betrug die Tumolvolumen-Verdopplungszeit 2,42 Tage. Der Einsatz von Tariquidar nach Vincristin-Schema (je eine Gabe Tariquidar an zwei Tagen in Folge) zeigte den geringsten Effekt und verlangsamte die Tumolvolumenverdopplungszeit nur auf 3,79 Tage. Den besten Erfolg erzielte die Behandlung mit Tariquidar nach Carboplatin-Schema und verlängerte die Tumolvolumen-Verdopplungszeit auf 7,96 Tage. Damit konnte Tariquidar durchaus mit der Wirkung der beim RMS üblicherweise eingesetzten Zytostatika konkurrieren. Vincristin, welches von den vier im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Zytostatika die stärkste Wirksamkeit auf die RMS-Xenografts zeigte, setzte die Tumolvolumen-Verdopplungszeit auf 8,19 Tage herauf. Damit hatte es nur einen geringfügig stärkeren Effekt als Tariquidar verwendet nach dem Carboplatin-Schema.

Die beste Wirkung von Tariquidar beim Einsatz von Tariquidar nach dem Carboplatin-Schema ist auf die größte Gesamtdosis zurückzuführen. Bei dem Einsatz von Tariquidar nach Carboplatin-Schema wurden insgesamt 10 Gaben Tariquidar verabreicht (zweimal fünf Tage hintereinander täglich).

Die Plasma-HWZ für Tariquidar beträgt 24 Stunden (76). Es ist daher davon auszugehen, dass Tariquidar, wenn es über mehrere Tage in Folge gegeben wird, im Körper akkumuliert und zu höheren Serum-Konzentrationen führt. Die Applikation über mehrere Tage in unseren Versuchen und die konsekutiv vermutlich höheren Serum-Konzentrationen führten sowohl bei den embryonalen RMS-Tumoren als auch bei den alveolären RMS-Xenografts zu einer unerwartet starken Wachstumsinhibition *in vivo*. Dieser Effekt ist dennoch bemerkenswert, da die vom Hersteller empfohlene Konzentration verwendet wurde, die in anderen Studien mit Tariquidar von Tier und Mensch stets gut toleriert wurde (71). Auch in unseren Versuchen wurde Tariquidar von den Tieren stets gut vertragen.

Es bleibt jedoch noch intensiver zu untersuchen, welche Nebeneffekte in einem Organismus durch eine solche Dauerexposition mit Tariquidar ausgelöst werden und ob Tariquidar als eigenständige Substanz für die Therapie von RMS interessant sein könnte. Eine Phase 1 Studie für den Einsatz von Tariquidar zusammen mit

verschiedenen Zytostatika bei Kindern (2-18 Jahren) mit soliden Weichteiltumoren wurde im Dezember 2011 abgeschlossen. Die Ergebnisse dieser Studie stehen aus. Untersucht wurden dabei unter anderem die Verträglichkeit und die toxische Schwelle des Medikamentes. Die Studie wurde durchgeführt vom "National Cancer Institute" in den USA (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00011414).

### **Kombination aus Tariquidar und Zytostatika *in vitro***

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Möglichkeit zur Überwindung der Chemoresistenz gesucht werden. Da bekannt ist, dass resistente RMS-Zellen MDR1 überexprimieren (39, 114-117), wurden RMS-Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen Vincristin zusammen mit steigenden Konzentrationen Tariquidar *in vitro* behandelt. Dabei zeigte sich, dass die Kombinationsbehandlung einen stärker wachstumshemmenden Effekt auf die Tumorzellen ausübte als die Behandlung mit Vincristin alleine. Bei der Bewertung dieses Ergebnisses ist jedoch dem bereits diskutierten Effekt, dass Tariquidar eine eigenständige Wachstumshemmung in RMS-Zellen bewirkt, Rechnung zu tragen.

Anders als bei der Wirkung der Kombinationsbehandlung beim Colon-Karzinom, bei der eine potenzierende Wirkungsverstärkung zu beobachten war (71), konnte bei der Behandlung von RMS-Zellen *in vitro* lediglich eine synergistische Wirkungsverstärkung erzielt werden. Die gemeinsame Wirkung war also höher als die Wirkung der beiden Substanzen für sich genommen, jedoch nicht so groß und nicht größer als die Summe der Wirkungen beider Substanzen zusammen.

Die Wachstumskurven der beiden Behandlungsgruppen (Tariquidar und Tariquidar mit Vincristin) verliefen parallel zu einander. Steigende Konzentrationen Tariquidar führten zu einer steigenden Wachstumshemmung. Der Viabilitäts-Verlust der Zellen war damit abhängig von der verwendeten Konzentration Vincristin und von der verwendeten Konzentration Tariquidar.

Die Konzentrationen Tariquidar, die in den soeben beschriebenen Kombinationsversuchen verwendet wurden, lagen deutlich oberhalb der Konzentration, die benötigt wird um eine vollständige Pgp-Inhibition zu erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher weitere Kombinationsversuche von Zytostatika mit Tariquidar in geringer Dosierung *in vitro* durchgeführt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die potenzierende Wirkung, die Tariquidar bei anderen Tumorentitäten

auf verschiedene Zytostatika ausübt, nicht durch die synergistische Wirkung von Tariquidar (in höherer Dosierung) und Zytostatikum kaschiert wurde.

In anderen Studien ist beschrieben, dass sehr niedrige Konzentrationen Tariquidar ausreichen um die Pgp-Transporter zu inhibieren. *In vitro* sind 25-80 nM Tariquidar suffizient eine vollständige Inhibition von Pgp in Tumorzellen zu bewirken und damit das maximale Potenzierungspotential der Zytostatika zu erreichen (71). *In vivo* im Menschen und in Mäusen wurden Serumspiegel von mindestens 100 nM Tariquidar gemessen, welche eine vollständige Pgp-Inhibition in Tumorzellen und in der Leber bewirkten. Der Nachweis einer ausreichenden Pgp-Inhibition konnte durch Anreicherung von  $^{99m}\text{Tc}$ -sesetamibi in den Zellen *in vivo* und durch Anreicherung von Rhodamin *in vitro* nach Behandlung mit Tariquidar erbracht werden.  $^{99m}\text{Tc}$ -sesetamibi und Rhodamin werden physiologischer Weise durch Pgp-Transporter aus den Zellen ausgeschleust (76, 78). Ist der Transporter inhibiert kommt es folglich zu einer Anreicherung von  $^{99m}\text{Tc}$ -sesetamibi, bzw. Rhodamin in den Zellen.

In den erneut durchgeführten Proliferationsassays, die die Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Tariquidar in geringer Konzentration (100 nM) und Zytostatikum untersuchen sollte, zeigte sich für keine Zelllinie und kein Zytostatikum eine verbesserte Wirksamkeit des Zytostatikums durch den Zusatz von Tariquidar.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Potenzierung ist, dass die RMS-Zellen das MDR1-Gen zum Zeitpunkt der Kombinationsbehandlung (noch) nicht überexprimierten. Die Voraussetzung für den Erfolg der Kombinationsbehandlung ist die Expression von MDR1. *Seitz et al 2007* wiesen mittels qRT-PCR die Überexpression von MDR1 in den Zelllinien, die in den vorliegenden Versuchen verwendet wurden, nach. In der Arbeit von *Seitz et al 2007* wurde die Überexpression von Pgp jedoch erst nach einer viertägigen Exposition mit Vincristin, Topotecan oder Carboplatin in den Zellen nachgewiesen (39).

Eine zweizeitige Behandlung wäre daher gegebenenfalls ein neuer Versuchsansatz, der diese Fehlerquelle ausschließen könnte. Bei einer zweizeitigen Behandlung würden die Zellen zunächst mehrere Tage mit einem Zytostatikum alleine vorbehandelt, bevor die Kombinationsversuche an ihnen gemacht werden würden. Das Problem, das sich dabei jedoch stellt ist, dass unter der Behandlung mit einem Zytostatikum alleine bereits so viele Zellen absterben, dass für die weiteren Versuche

nicht ausreichend Zellen zur Verfügung stehen. Dieses Problem müsste vor der Durchführung eines weiteren Experimentes zuerst gelöst werden.

Unter der Annahme, dass die Kultivierung in 3D-Kultur eine Versuchssituation imitiert, die mit *in vivo*-Versuchen besser vergleichbar ist und die zu einer Resistenz-Ausbildung gegenüber Zytostatika führen kann (127-129), wiederholten wir die *in vitro*-Versuche mit Tariquidar und Zytostatika in Sphäroid-Kulturen. Wie erwartet, wiesen die Zellen unter diesen Versuchsbedingungen eine gesteigerte Resistenz gegenüber den Zytostatika auf. Dies zeigte sich darin, dass Viabilitäts-Verluste der Zellen erst bei Verwendung höherer Konzentrationen an Zytostatika einsetzten. Doch auch unter diesen Versuchsbedingungen führte die Zugabe von Tariquidar (100 nM) zum Zytostatikum zu keiner potenzierenden Wirkungsverstärkung. Es deutete sich lediglich ein synergistischer Effekt von Zytostatikum und Tariquidar an.

Ein Problem dieses Versuchsmodells ist, dass die beobachtete Chemoresistenz wahrscheinlich nicht durch MDR1 vermittelt wird. Zell-Zell-Kontakte regulieren bei soliden Tumoren den programmierten Zelltod. Durch den Erhalt von Zell-Zell-Kontakten können sie den programmierten Zelltod umgehen und damit resistent gegenüber Apoptose-induzierenden Zytostatika werden (130). Auch die schlechtere Verfügbarkeit von Zytostatika im Zentrum eines soliden Tumors oder in diesem Fall einer Sphäroid-Kultur kann eine Chemoresistenz begründen, die durch den Einsatz von Tariquidar nicht beeinflusst werden kann.

### **Wechselwirkungen zwischen Vincristin und Tariquidar**

Die erwartete potenzierende Wirkung von Tariquidar auf die Zytostatika konnte *in vitro* nicht erzielt werden. Die beim RMS eingesetzten Zytostatika (Vincristin, Doxorubicin, Topotecan, Carboplatin) sind alle auf den Zellzyklus angewiesen, um ihre Wirkung optimal entfalten zu können. In den Proliferationsassays und den anderen Versuchen hatte sich gezeigt, dass Tariquidar eine proapoptotische Wirkung auf die RMS-Zellen ausübte. In wie weit Tariquidar den Zellzyklus tatsächlich beeinflusste wurde durchflusszytometrisch untersucht und anhand der Ergebnisse wurde evaluiert, ob die Wirkung von Tariquidar auf den Zellzyklus ursächlich für die fehlende potenzierende Wirkung sein könnte.

Tariquidar führte bei RMS-Zellen zu Apoptose und Zellzyklusarrest. Dadurch wird der Zellzyklus in den betroffenen Zellen unterbrochen und die Grundlage für die

Wirksamkeit der Zytostatika ist nicht mehr gegeben. Somit ist es denkbar, dass Tariquidar den Zytostatika die Grundlage für ihre Wirksamkeit entzog. Diese Theorie liefert eine mögliche Erklärung, warum Tariquidar beim RMS keinen potenzierenden, sondern maximal einen synergistischen Effekt im Zusammenspiel mit den Zytostatika ausüben konnte.

### **Zellzyklusveränderungen durch Vincristin führen zur Chemoresistenz**

Vincristin ist ein Mitose-Hemmstoff, welcher an das  $\beta$ -Tubulin des Spindelapparates bindet. In niedrigeren Konzentrationen verhindert Vincristin zunächst nur das dynamische Verhalten der Mikrotubuli. Mikrotubuli geben der Zelle Stabilität in ihrer äußeren Form, bilden eine Schiene für den Transport intrazellulärer Vesikel und sind entscheidend an der Zellteilung beteiligt. In höheren Konzentrationen führt Vincristin zu einer Dissoziation der Mikrotubuli (131). Im Idealfall führt Vincristin daher über eine Hemmung des Spindelapparates zu einem Mitosearrest in einer tetraploiden „pseudo-G1-Phase“ (132). Der Mitosearrest hat zur Folge, dass in der Zelle Apoptose eingeleitet wird (133). 48 bis 72 Stunden nach Beginn der Mitose-Hemmung sterben die Zellen dann schließlich ab (134).

Die Zellzyklusanalyse der mit Vincristin behandelten Zellen zeigte überraschender Weise eine Akkumulation der Zellen in der G2-Phase, nicht wie erwartet in der G1-Phase (135). Möglicherweise prägten die RMS-Zellen in diesem Fall so eine Resistenz gegenüber Vincristin aus. *Skladanowsky et al 2005* beschrieben, dass Tumorzellen eine Vincristin-Resistenz durch Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus ausprägen können. Da Zellen im G2-Arrest nicht in die Mitosephase gelangen, sind sie nicht sensibel gegenüber dem Mitose-Hemmstoff Vincristin (135). Möglicherweise lag bei unseren Zellen eine solche Resistenz vor. Dafür spricht, dass der Anteil apoptotischer Zellen unter der Behandlung mit Vincristin nicht deutlich anstieg und dass es tatsächlich zu einer Akkumulation von Zellen in der G2-Phase kam.

Unsere Zellzyklus-Messungen wurden jedoch bereits nach 48 Stunden gemacht. So ist es auch denkbar, dass die Apoptose noch nicht eingeleitet und die Akkumulation der G2-Phase Zellen eigentlich auf den Zyklusarrest in der Mitosephase zurückzuführen war. G2-Phase-Zellen und Zellen, die sich zu Beginn der Mitosephase befinden, sind mit der durchflusszytometrischen Untersuchung nach Anfärben mit Hoechst 33342 nicht zu unterscheiden. Die Akkumulation der Zellen in der G2-Phase nach Behandlung mit Vincristin ist also entweder ein Hinweis auf

Chemoresistenz-Entstehung oder ein Zellzyklusarrest in der Mitosephase kurz vor der Apoptose. Für zukünftige Betrachtungen der Chemoresistenz gegenüber Vincristin beim kindlichen RMS sollte dieser Pathomechanismus gegebenenfalls berücksichtigt werden.

### **Überwindung von Chemoresistenz durch die Kombinationstherapie *in vivo***

Basierend auf der Arbeit von *Seitz et al 2007* war davon auszugehen, dass die RMS-Zellen der Xenografts chemoresistent sein würden und MDR1 exprimieren würden. In der Arbeit von *Seitz et al 2007* waren Mäuse mit nicht resistenten RMS-Zellen transfiziert worden. Nach der Behandlung mit Vincristin, Actinomycin D und Ifosfamid konnte eine Überexpression von MDR1 in den Zellen nachgewiesen werden. Der Aufbau der Tierversuche, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, war abgesehen von der zusätzlichen Therapie mit Tariquidar identisch zum Aufbau der Tierversuche von *Seitz et al.* Daher wurde auch bei unseren Xenografts eine Resistenzentstehung und MDR1-Ausprägung erwartet. Es war daher davon auszugehen, dass die Kombinationsbehandlung *in vivo* einen anderen Effekt auf die RMS-Zell-Proliferation ausüben würde als den, den wir *in vitro* bei nicht resistenten RMS-Zellen beobachtet hatten.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche (Kombinationsbehandlung von RMS-Xenografts in nu/nu-Mäusen mit Tariquidar und verschiedenen Zytostatika) bestätigten jedoch die Ergebnisse der *in vitro* Versuche. Bei den alveolären RMS-Xenografts deutete sich ein wirkungssteigernder Effekt bei der Behandlung mit Actinomycin D und Carboplatin zusammen mit Tariquidar gegenüber der Behandlung mit dem entsprechenden Zytostatikum alleine an. Der Unterschied war laut Dunnett's T-Test mit  $p < 0,005$  allerdings nicht signifikant. Da der eigenständige wachstumshemmende Effekt von Tariquidar auch *in vivo* deutlich ausgeprägt war, ist davon auszugehen, dass es sich bei der Wirkungsverstärkung *in vivo* genauso wie bei den *in vitro*-Versuchen, um einen synergistischen und keinen additiven Effekt handelte.

Die Behandlungen mit der Kombination aus Tariquidar und Topotecan oder Carboplatin sowie die Behandlungen mit Tariquidar nach Topotecan- und Carboplatin-Schema wurden nur beispielhaft für die Zelllinie Rh30 durchgeführt. Die Kombinationsbehandlung von Tariquidar und Zytostatikum wurde *in vivo* von den Tieren gut vertragen und löste in den Mäusen keine stärkeren Nebenwirkungen aus als die Behandlung mit Zytostatika alleine. Dies deckte sich mit den Erfahrungen

anderer Arbeitsgruppen, welche die Präparate in Kombination bei Mäusen eingesetzt hatten (71, 136, 137).

### **Ursachen für die fehlende potenzierende Wirkung**

Es sind zwei Ursachen für die fehlende potenzierende Wirkung der Zytostatika durch den Einsatz von Tariquidar *in vivo* zu diskutieren.

Zum einen ist zu diskutieren ob bei fehlender Überexpression von MDR1 überhaupt eine Chemoresistenz vorlag, die mit Hilfe von Tariquidar überwunden werden kann. Bei verschiedenen MDR1-positiven chemoresistenten Xenograft-Tumoren (Colon-Ca, Ovarial-Ca, kleinzelliges Bronchial-Ca) im Mausmodell konnte mit Hilfe von Tariquidar die Chemoresistenz nachweislich überwunden werden (71). Zuvor resistente Tumoren wurden wieder komplett sensibel auf die eingesetzten Zytostatika. Die Sensibilisierung erfolgte nur für Zytostatika (zum Beispiel Actinomycin D und Vincristin), welche tatsächlich über Pgp-Transporter ausgeschleust werden können. Bei anderen Zytostatika hingegen, wie beispielsweise Cisplatin und Methotrexat, erfolgte keine Sensibilisierung der Tumorzellen nach Gabe des Pgp-Inhibitors. *In vitro* wurde bei diesen Tumorzellen beobachtet, dass die Zugabe von Tariquidar zu Zellen, welche keine Überexpression von MDR1 und konsekutive Chemoresistenz zeigten, keinen sensibilisierenden Effekt ausübte (71). Zusammenfassend bedeutet das, dass nur bei MDR1-Überexpression und Verwendung entsprechender Zytostatika eine Wirkungssteigerung durch Tariquidar zu erwarten ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Genchipanalysen und qRT-PCRs der RMS-Xenograft-Zellen durchgeführt. Dabei konnte, entgegen der Annahme basierend auf den Ergebnissen von *Seitz et al 2007*, keine erhöhte Expression von MDR1 in den behandelten Zellen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Transporter nicht vermehrt auf der Zelloberfläche vorlagen und somit der Einsatz von Tariquidar zu keiner Wirkungssteigerung der Zytostatika führen konnte.

Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende potenzierende Wirkung Tariquidars auf die Zytostatika ist der Einsatz zu niedriger Tariquidar-Konzentrationen.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde gemäß Herstellerangaben Tariquidar in einer Dosierung von 2,0 mg/kgKG Tariquidar i.v. eingesetzt. Die maximal potenzierende Wirkung der Zytostatika in Mäusen wurde unter dem Einsatz von 2,5-4,0 mg/kgKG Tariquidar i.v., bzw. 6,0-12,0 mg/kgKG Tariquidar p.o. erreicht (71). Die fehlende

Ausbildung des additiven Effektes bei der Kombinationsbehandlung von Tariquidar und Zytostatikum *in vivo* könnte also auch im Einsatz zu geringer Konzentrationen Tariquidar begründet sein.

Können die beiden soeben diskutierten Ursachen für die fehlende Wirkungsverstärkung der Zytostatika durch Tariquidar ausgeschlossen werden, ist letztendlich anzunehmen, dass die Chemoresistenz beim kindlichen RMS durch Tariquidar nicht überwunden werden kann.

### **Resistenz auf RNA-Ebene**

In der Genchipanalyse, die bei dem Tumorgewebe der RMS-Xenografts durchgeführt wurde, zeigte sich keine veränderte Expression der klassischen Chemoresistenz-Gene MDR1, MDM2, MRP und LRP. Die Ergebnisse der Genchipanalyse bestätigten sich in der qRT-PCR nur zum Teil. MDR1 wurde bei beiden Zelllinien und unter dem Einfluss der verschiedenen Zytostatika (Actinomycin D, Carboplatin oder Vincristin) kaum bis überhaupt nicht exprimiert. Dieses Ergebnis widersprach der ursprünglichen Erwartung, die Expression von MDR1 würde durch die Zytostatika-Exposition erhöht sein (39, 114-117).

LRP hingegen wurde bei der Zelllinie Rh30 nach der Behandlung mit Vincristin mehrfach erhöht exprimiert nachgewiesen. Das LRP ist ein major vault protein, dessen Funktion noch nicht endgültig geklärt werden konnte. Wahrscheinlich leistet es durch Umverteilung von Zytostatika innerhalb der Zelle einen Beitrag bei der Entstehung von Chemoresistenz (49-51).

*Cocker et al 2000* wiesen ebenfalls eine Erhöhung des LRP-Gens bei verschiedenen Zelllinien des kindlichen RMS *in vitro* nach und konnten dies bei einer der embryonalen Zelllinien, HX170, auch auf Proteinebene mittels Immunoblotting verifizieren (138). Es ließ sich auch bei intensiver Recherche kein Wirkstoff und keine Möglichkeit finden, LRP gezielt zu modulieren. Daher ist die Entdeckung, dass LRP eventuell an der Chemoresistenz-Entstehung beim kindlichen RMS beteiligt ist, zunächst nur von akademischer Bedeutung.

## **Veränderungen in der Genexpression und die Bedeutung des Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplexes im kindlichen RMS**

Die Chemoresistenz wurde, wie die Genchip-Analyse und die qRT-PCR zeigten, in unserem Mausmodell vermutlich nicht durch das klassische Resistenz-Gen MDR1 vermittelt. Es galt daher, andere mögliche Ursachen für die Chemoresistenz der RMS-Zellen zu finden und zu evaluieren. Aufgrund einer ersten Genchipanalyse rückte der Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplex in das Blickfeld dieser Arbeit.

In dieser ersten Genchipanalyse fanden sich nach der Behandlung mit Vincristin (*in vivo*) für 720 Gene bei den Tumorzellen der Zelllinie Rh30 und für 226 Gene der Zelllinie A204 signifikant veränderte Expressionen. Mittels Ingenuity pathways ließen sich daraus für die Zelllinie A204 insgesamt 15 Netzwerke und für die Zelllinie Rh30 32 Netzwerke darstellen, die von dem veränderten Gen-Expressionsmuster beeinflusst wurden. Darunter gab es jeweils einen Regulationsweg, in dessen Zentrum TP53 stand, das Gen welches p53 kodiert. In diesen beiden Netzwerken kamen jeweils Gene des Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplexes vor, welche in ihrer Expression verändert waren.

Es ist bereits bekannt, dass das Proteasom eine bedeutende Rolle im Bereich der Chemoresistenz-Entstehung verschiedener Tumoren (81, 84-93, 102) spielt. Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass die Genchipanalyse ebenfalls Veränderungen im Bereich der Genexpression Proteasom-spezifischer Gene nach Zytostatika-Behandlung zeigte, wurden im Rahmen dieser Arbeit einige dieser Gene zur weiteren Analyse ausgesucht. Mittels qRT-PCR wurde die Genexpression der Gene PSMB1, PSMB6, PSMD14, UIMC1 und DUB4 vor und nach Zytostatika-Exposition untersucht um die Ergebnisse der Genchipanalyse zu verifizieren und zu quantifizieren.

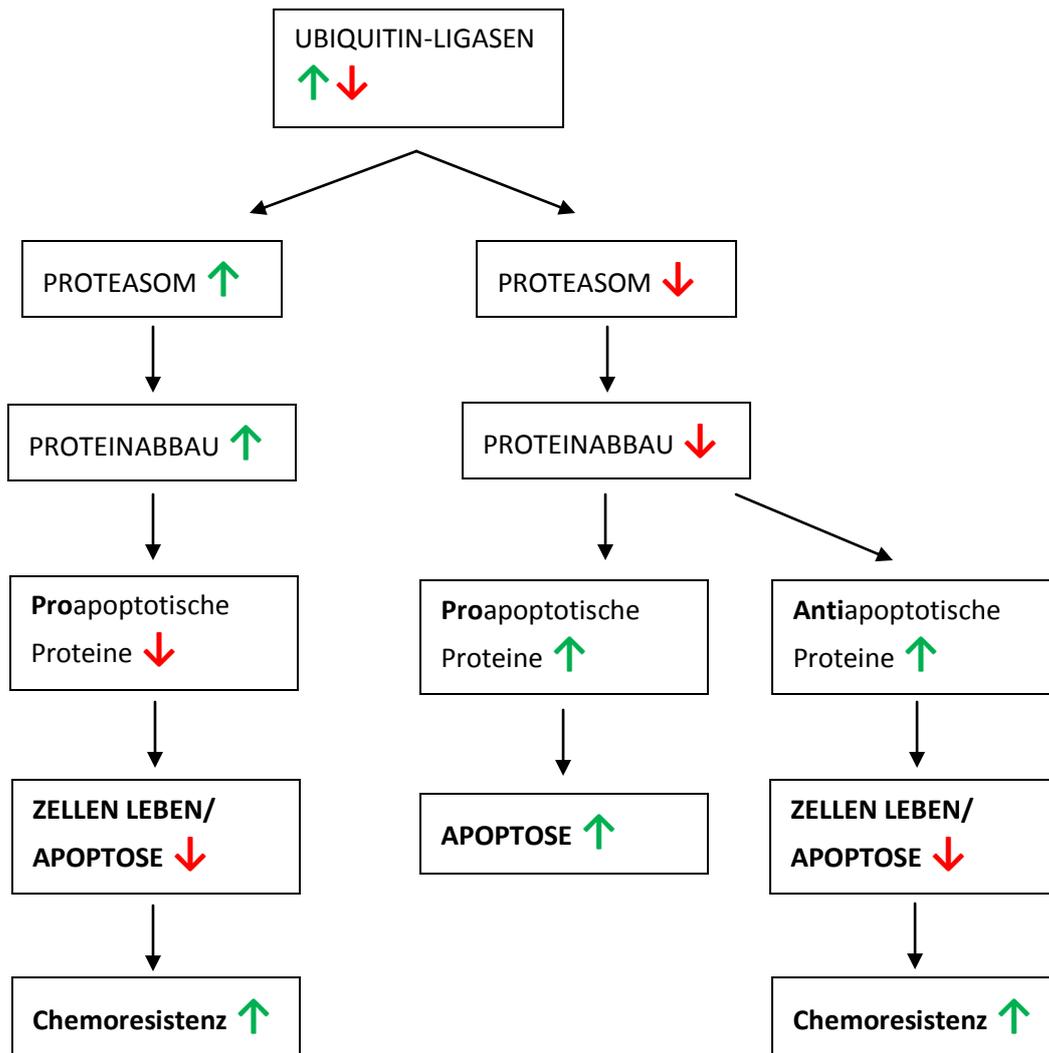
PSMB1, PSMB6 und PSMD14 lagen nach der Behandlung mit Vincristin weniger stark exprimiert in den RMS-Zellen vor. PSMB1 und PSMB6 sind Untereinheiten der 20S-Kerneinheit des Proteasoms (94). PSMD14 ist Teil der 19S-Untereinheit des Proteasoms. Die 19S-Untereinheit bildet die regulatorische Einheit des Proteasoms. In der 19S-Untereinheit werden die ubiquitinierten Proteine desubiquitiniert und gelangen anschließend zum weiteren Abbau in die 20S-Kerneinheit des Proteasoms. Dieser Schritt ist ohne PSMD14, welches ein hoch konserviertes Metalloprotease-Motiv (JAMM) enthält, nicht möglich (100, 105, 106). (Zur Veranschaulichung siehe

auch Abbildung 4). Essentielle Einheiten des Proteasoms waren nach der Behandlung mit Vincristin in den RMS-Tumorzellen also vermindert exprimiert. Dies hätte jedoch, berücksichtigt man die aktuelle Datenlage, zu einer Chemo-Sensibilisierung und nicht zu einer Chemoresistenz führen müssen. Das Proteasom kann durch den vermehrten Abbau von Proteinen, die den Zellzyklus kontrollieren und die für den programmierten Zelltod unabdingbar sind, Apoptose verhindern. Bei verschiedenen chemoresistenten Tumoren gelang es daher, die Chemoresistenz mittels Proteasominhibitoren aufzuheben, bzw. die Zellen gegenüber den eingesetzten Zytostatika zu sensibilisieren (96, 110-112). Eine Resistenzentstehung durch Funktionsminderung des Proteasoms ist mit bisherigen Forschungsergebnissen nicht erklärbar.

Die Funktion des Proteasoms ist jedoch sehr komplex und lange noch nicht vollständig verstanden. Dass auch eine verminderte Expression essentieller Gene des Proteasom-Komplexes zu einer Chemoresistenz beitragen kann, ist daher durchaus vorstellbar. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass bei unseren Versuchen andere Proteine vermindert abgebaut wurden als bei der Proteasom-Inhibition durch Proteasominhibitoren in anderen Studien. Wenn zum Beispiel zellprotektive Proteine, welche Apoptose verhindern können, vermindert abgebaut werden, könnte dies theoretisch zu Chemoresistenz führen.

Es ist auch möglich, dass beim RMS eine Proteasom-Inhibition andere Auswirkungen hat als bei anderen Tumorzellen. Daher wurden Proliferationsassays mit RMS-Zellen *in vitro* durchgeführt und untersucht, ob eine eingeschränkte Proteasom-Funktion bei den untersuchten Zellen zu einer Resistenzentstehung gegenüber Vincristin führt. Die RMS-Zellen wurden mit Vincristin und zwei verschiedenen Proteasominhibitoren behandelt. Anschließend wurden Viabilitäts-Assays durchgeführt. Die Zugabe von Proteasominhibitoren hatte jedoch keine eingeschränkte Wirksamkeit von Vincristin zur Folge. Die Wirksamkeit von Vincristin wurde jedoch umgekehrt auch nicht gesteigert. Ob das Proteasom an der Entstehung von Chemoresistenz beim kindlichen RMS beteiligt ist, war mit den vorliegenden Versuchsergebnissen nicht endgültig zu klären.

In Abbildung 30 sind die beschriebenen Regulationsmechanismen, die zu Apoptose oder alternativ zu Chemoresistenz führen könnten, grafisch dargestellt



**Abbildung 30: Regulation der Apoptose und Resistenzentstehung durch das Proteasom**

Über Zelltod oder Überleben entscheidet unter anderem der Aktivitätszustand des Proteasoms. Bei Aktivität des Proteasoms ist eine Chemoresistenz zu erwarten, da in der Regel proapoptische Proteine über das Proteasom abgebaut werden. Letzten Endes entscheidet jedoch das Vorliegen von proapoptischen oder antiapoptischen Proteinen in der Zelle über Apoptose oder Chemoresistenz. Daher können auch bei vermindert exprimiertem, bzw. inhibiertem Proteasom-Komplex die antiapoptischen Proteine vorherrschend und die Zelle chemoresistent sein.

UIMC1 und DUB4, als Teil des Ubiquitinierungs-Komplexes, welcher die Proteine für den Abbau im Proteasom vorbereitet, waren in der Genchipanalyse bei Tumoren der Zelllinie Rh30 nach Behandlung mit Vincristin erhöht exprimiert, bei der Zelllinie A204 tendenziell herab reguliert. UIMC1 ist eine Ubiquitin-Ligase. Sie markiert Proteine für den Abbau im Proteasom. UIMC1 unterstützt MDM2 in seiner Funktion. MDM2 ubiquitiniert vor allem p53, ein proapoptisch wirkendes Protein, und verhindert damit die Einleitung des programmierten Zelltodes. Wird p53 vermehrt abgebaut, kann Apoptose nur noch vermindert stattfinden (91-93). Es wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben, dass MDM2 an der Entstehung von Chemoresistenz beim

kindlichen RMS beteiligt sein könnte (115). Eine erhöhte Expression von UIMC1, wie es bei der Ziellinie Rh30 nach Behandlung mit Vincristin in der Genchipanalyse zu beobachten war, könnte zu einer weiteren Verstärkung des Abbaus von p53 und damit zu einer verstärkten Chemoresistenz führen.

Da sich die Ergebnisse der Genchipanalyse bei der qRT-PCR nicht bestätigen ließen, ist diese These jedoch nicht haltbar. In der qRT-PCR wurde bei den Tumoren beider Zelllinien eine verringerte Expression von UIMC1 und DUB4 festgestellt. Mit diesem Expressionsprofil ist es sehr unwahrscheinlich, dass UIMC1 an der Entstehung von Chemoresistenz beim kindlichen RMS beteiligt ist. Ein eindeutiger Hinweis für die Ursache der Chemoresistenz beim kindlichen RMS konnte durch die gemachten Genexpressions-Analysen nicht gefunden werden.

### **Fazit**

Die Kombinationstherapie aus Zytostatikum und dem Pgp-Inhibitor Tariquidar zeigte bei Verwendung hoher Konzentrationen Tariquidar einen synergistischen Effekt. Unter dem Einsatz niedriger Konzentrationen Tariquidar, die üblicherweise ausreichen um Pgp zu inhibieren, zeigte sich weder in den RMS-Zellen *in vitro* noch bei den Xenografts *in vivo* der erwartete Behandlungserfolg.

Neu entdeckt wurde die eigenständige wachstumshemmende Wirkung von Tariquidar auf RMS-Tumorzellen. Es bleibt im Weiteren herauszufinden, über welchen Mechanismus Tariquidar seine Wirkung entfaltet und welche Targets in den RMS-Zellen für die Wirksamkeit von Tariquidar verantwortlich sind.

Das Proteasom scheint an der Entstehung von Chemoresistenz beim kindlichen RMS keine ausschlaggebende Rolle zu spielen.

## **5. Zusammenfassung**

Das RMS ist der häufigste solide Weichteiltumor im Kindesalter. Ein großes Problem bei der Behandlung des RMS, vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien und bei Rezidiv-Tumoren, ist die Chemoresistenz. Ziel dieser Arbeit war es Möglichkeiten der Überwindung der Chemoresistenz zu untersuchen. Es wird vermutet, dass beim RMS die P-Glycoprotein vermittelte Chemoresistenz eine entscheidende Rolle spielt. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher der P-Glycoprotein-Inhibitor Tariquidar *in vitro* und *in vivo* eingesetzt und der Effekt dieser Substanz alleine und in Kombination mit verschiedenen Zytostatika auf die RMS-Zellen untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Genexpressionsprofil von RMS-Xenograft-Tumorzellen untersucht, die zuvor mit Zytostatika behandelt wurden, um weitere mögliche Ursachen für die Chemoresistenz beim kindlichen RMS aufzudecken.

Die Proliferationsassays von RMS-Zellen nach Behandlung mit Tariquidar zeigten, dass Tariquidar einen wachstumshemmenden Effekt auf RMS-Zellen *in vitro* ausübt. Weitere Versuche und verschiedene Zellfärbemethoden, z.B. HE-Färbung, Färbung mit Acridinorange oder JC1 bewiesen, dass Tariquidar Apoptose in RMS-Zellen induzieren kann. Bereits durch die Behandlung mit Tariquidar ab 0,6 µg/ml veränderte sich die Morphologie der RMS-Zellen erheblich und es wurden Zeichen apoptotischer Veränderungen in den Zellen sichtbar. Eine Zellzyklus-Analyse bestätigte die Annahme, dass Tariquidar Apoptose in RMS-Zellen induziert.

Die Kombinationsbehandlung aus Tariquidar (>1,6 µg/ml) und Zytostatika führte zu einer synergistischen Wirkung beider Substanzen. Unter dem Einsatz von geringen Konzentrationen Tariquidar (0,0647 µg/ml) konnte durch die Kombinations-Behandlung keine verbesserte Wirksamkeit erzielt werden.

Die *in vitro* gesammelten Ergebnisse ließen sich durch die Versuche *in vivo* bestätigen. Auch *in vivo* übte Tariquidar einen wachstumshemmenden Effekt auf die RMS-Xenografts aus. Die Kombinations-Behandlung aus Tariquidar und Zytostatikum brachte *in vivo* keinen Vorteil gegenüber der Behandlung mit den beiden Einzelsubstanzen. Dabei ist jedoch zum einen zu berücksichtigen, dass keine Resistenz im Sinne einer Überexpression von MDR1 in den Xenografts nachgewiesen werden konnte. Zum anderen ist zu berücksichtigen, dass in anderen

Arbeiten erst beim Einsatz höherer Konzentrationen Tariquidar, als wir sie verwendeten, eine potenzierende Wirkung beobachtet wurde.

Aufgrund einer durchgeführten Genchipanalyse rückte der Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplex als potentielle Quelle für Chemoresistenz beim RMS in das Blickfeld dieser Arbeit. Es wurden daraufhin fünf Gene aus dem Proteasom-Ubiquitinierungs-Komplex ausgesucht, deren Expressionsprofile mittels qRT-PCR weiter untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit Zytostatika von RMS-Xenografts in Mäusen zu einer herabgesetzten Expression verschiedener Gene führte, die Teile des Proteasoms kodieren. Eine Erklärung für die Chemoresistenz beim RMS lässt sich aus dem veränderten Expressionsprofil jedoch nicht ableiten.

Im Rahmen der qRT-PCR wurde außerdem das Expressionsmuster der klassischen Chemoresistenz-Gene MDR1 und LRP untersucht. Es ließ sich keine erhöhte Expression von MDR1 nach Behandlung mit Vincristin nachweisen. LRP wurde nach Behandlung mit Vincristin bei der ERMS Zelllinie zweifach herab-reguliert, bei der ARMS-Zelllinie zweifach hoch-reguliert nachgewiesen. Eine Beteiligung von LRP an der Entstehung von Chemoresistenz beim RMS ist möglich, hat aufgrund fehlender Therapiemöglichkeiten momentan jedoch nur akademische Bedeutung.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Kombination von Zytostatika mit Tariquidar weder *in vitro* noch *in vivo* zu einer signifikanten Wirkungssteigerung führte. Da bei den untersuchten Tumorzellen jedoch keine erhöhte Expression von MDR1 nachweisbar war, ist die Theorie, dass die Chemoresistenz beim RMS durch Pgp-Inhibitoren überwindbar ist, möglicherweise noch nicht endgültig zu verwerfen. Tariquidar übte überraschenderweise eine eigenständige, proapoptotische Wirkung auf die RMS-Zellen aus. Dieser Effekt ist eine neue Entdeckung, die weiter untersucht werden sollte.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. James G. Gurney JLY, Jr., Steven D. Roffers, Malcolm A. Smith, Greta R. Bunin, Ries LAG, Linet M, Tamra T. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, Chapter: SOFT TISSUE SARCOMAS. National Cancer Institute, SEER Program NIH Pub No 99-4649 Bethesda, MD, 1999
2. Trahair T, Andrews L, Cohn RJ. Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*2007 Mar;48(3):345-8.
3. Diller L, Sexsmith E, Gottlieb A, Li FP, Malkin D. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest*1995 Apr;95(4):1606-11.
4. Gripp KW. Tumor predisposition in Costello syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*2005 Aug 15;137C(1):72-7.
5. DeBaun MR, Tucker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr*1998 Mar;132(3 Pt 1):398-400.
6. Ferrari A, Bisogno G, Macaluso A, Casanova M, D'Angelo P, Pierani P, Zanetti I, Alaggio R, Cecchetto G, Carli M. Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Cancer*2007 Apr 1;109(7):1406-12.
7. Ognjanovic S, Carozza SE, Chow EJ, Fox EE, Horel S, McLaughlin CC, Mueller BA, Puumala S, Reynolds P, Von Behren J, Spector L. Birth characteristics and the risk of childhood rhabdomyosarcoma based on histological subtype. *Br J Cancer*2010 Jan 5;102(1):227-31.
8. Tiffin N, Williams RD, Shipley J, Pritchard-Jones K. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. *Br J Cancer*2003 Jul 21;89(2):327-32.
9. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*2005 Jun 16;435(7044):948-53.
10. Leuschner I, Harms D. [Pathology of childhood and adolescent rhabdomyosarcoma]. *Pathologe*1999 Mar;20(2):87-97.
11. Wexler LH, Ladanyi M. Diagnosing alveolar rhabdomyosarcoma: morphology must be coupled with fusion confirmation. *J Clin Oncol*2010 May 1;28(13):2126-8.
12. Beltinger C, Debatin KM. Murine models for experimental therapy of pediatric solid tumors with poor prognosis. *Int J Cancer*2001 May 1;92(3):313-8.
13. Prof. Dr. med. J. Treuner PDmEKuMdS. Protokoll der Multizentrischen Therapiestudie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit Weichteilsarkomen, Therapieoptimierungsstudie mit Einsatz von Chemo- und Strahlentherapie, CWS-2002P. 2003.
14. McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child*2003 Apr;88(4):354-7.
15. AWMF-Leitlinie Nr 025/007, Weichteilsarkome. AWMF-LeitlinienRegisterLetzte Aktualisierung: 2005.
16. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruyman FB, Breneman J, Qualman SJ, Wiener E, Wharam M, Lobe T, Webber B, Maurer HM, Donaldson SS. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol*2001 Jun 15;19(12):3091-102.

17. Pappo AS, Anderson JR, Crist WM, Wharam MD, Breitfeld PP, Hawkins D, Raney RB, Womer RB, Parham DM, Qualman SJ, Grier HE. Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *J Clin Oncol*1999 Nov;17(11):3487-93.
18. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev*1997 Jul 7;26(2-3):71-90.
19. Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, McKee TD, Gohongi T, di Tomaso E, Brown EB, Izumi Y, Campbell RB, Berk DA, Jain RK. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*2001 Apr 10;98(8):4628-33.
20. Green SK, Frankel A, Kerbel RS. Adhesion-dependent multicellular drug resistance. *Anticancer Drug Des*1999 Apr;14(2):153-68.
21. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*2002 Jan;2(1):48-58.
22. Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Cabot MC. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J*2001 Mar;15(3):719-30.
23. Shen DW, Liang XJ, Gawinowicz MA, Gottesman MM. Identification of cytoskeletal [14C]carboplatin-binding proteins reveals reduced expression and disorganization of actin and filamin in cisplatin-resistant cell lines. *Mol Pharmacol*2004 Oct;66(4):789-93.
24. Seitz G, Bonin M, Fuchs J, Poths S, Ruck P, Warmann SW, Armeanu-Ebinger S. Inhibition of glutathione-S-transferase as a treatment strategy for multidrug resistance in childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol*2010 Feb;36(2):491-500.
25. Doehmer J, Goepfert AR, Vermeulen NP. Cytochromes P450 and drug resistance. *Cytotechnology*1993;12(1-3):357-66.
26. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*2003 Oct 20;22(47):7369-75.
27. Dean MC. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. [Bethesda, MD: NCBI]; 2002. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono\\_001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono_001).
28. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev*2006 Oct;86(4):1179-236.
29. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*1987 May;84(9):3004-8.
30. Kourti M, Vavatsi N, Gombakis N, Sidi V, Tzimagiorgis G, Papageorgiou T, Kolioukas D, Athanassiadou F. Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*2007 Aug;86(2):166-73.
31. Fillpits M, Suchomel RW, Dekan G, Stiglbauer W, Haider K, Depisch D, Pirker R. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in colorectal carcinomas. *Br J Cancer*1997;75(2):208-12.
32. Xu HW, Xu L, Hao JH, Qin CY, Liu H. Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein is associated with multidrug resistance in gastric cancer. *J Int Med Res*2010 Jan-Feb;38(1):34-42.
33. Haber M, Smith J, Bordow SB, Flemming C, Cohn SL, London WB, Marshall GM, Norris MD. Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J Clin Oncol*2006 Apr 1;24(10):1546-53.

34. Legrand O, Zittoun R, Marie JP. Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia*1999 Apr;13(4):578-84.
35. Ramus SJ, Gayther SA. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol*2009 Apr;3(2):138-50.
36. Quinn JE, Carser JE, James CR, Kennedy RD, Harkin DP. BRCA1 and implications for response to chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*2009 Apr;113(1):134-42.
37. Reguart N, Cardona AF, Carrasco E, Gomez P, Taron M, Rosell R. BRCA1: a new genomic marker for non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*2008 Nov;9(6):331-9.
38. Teng LS, Zheng Y, Wang HH. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*2008 Feb;9(2):85-9.
39. Seitz G, Warmann SW, Vokuhl CO, Heitmann H, Treuner C, Leuschner I, Fuchs J. Effects of standard chemotherapy on tumor growth and regulation of multidrug resistance genes and proteins in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr Surg Int*2007 May;23(5):431-9.
40. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*1999;39:361-98.
41. Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res*1998 Nov 15;58(22):5130-6.
42. Homolya L, Varadi A, Sarkadi B. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*2003;17(1-4):103-14.
43. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*1998 Dec 22;95(26):15665-70.
44. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*2001 Apr 15;61(8):3458-64.
45. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*1986 Nov 7;47(3):381-9.
46. Lin T, Islam O, Heese K. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis--a different perspective. *Cell Res*2006 Nov;16(11):857-71.
47. Senior AE, al-Shawi MK, Urbatsch IL. ATPase activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *Methods Enzymol*1998;292:514-23.
48. McDevitt CA, Collins RF, Conway M, Modok S, Storm J, Kerr ID, Ford RC, Callaghan R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure*2006 Nov;14(11):1623-32.
49. Chugani DC, Rome LH, Kedersha NL. Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J Cell Sci*1993 Sep;106 ( Pt 1):23-9.
50. Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene*2003 Oct 20;22(47):7458-67.
51. Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets*2006 Aug;7(8):923-34.

52. Fojo T, Bates S. Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene*2003 Oct 20;22(47):7512-23.
53. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*2000 Oct;11(4):265-83.
54. Hollt V, Kouba M, Dietel M, Vogt G. Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*1992 Jun 23;43(12):2601-8.
55. Tsuruo T. [Membrane transport of anticancer drugs--potentiation of antitumor effect by calcium modifiers and overcoming of drug-resistance]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*1983 May;28(6):865-71.
56. Ganapathi MK, Lee EY. Dephosphorylation and inactivation of phosphorylase kinase: subunit specificity of rabbit skeletal muscle protein phosphatases. *Arch Biochem Biophys*1984 Aug 15;233(1):19-31.
57. Ford JM, Prozialeck WC, Hait WN. Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance. *Mol Pharmacol*1989 Jan;35(1):105-15.
58. Kuhl JS, Sikic BI, Blume KG, Chao NJ. Use of etoposide in combination with cyclosporin for purging multidrug-resistant leukemic cells from bone marrow in a mouse model. *Exp Hematol*1992 Oct;20(9):1048-54.
59. Pirker R, Keilhauer G, Raschack M, Lechner C, Ludwig H. Reversal of multidrug resistance in human KB cell lines by structural analogs of verapamil. *Int J Cancer*1990 May 15;45(5):916-9.
60. Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loor F. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Res*1991 Aug 15;51(16):4226-33.
61. Atadja P, Watanabe T, Xu H, Cohen D. PSC-833, a frontier in modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Cancer Metastasis Rev*1998 Jun;17(2):163-8.
62. Germann UA, Ford PJ, Shlyakhter D, Mason VS, Harding MW. Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. *Anticancer Drugs*1997 Feb;8(2):141-55.
63. Dale IL, Tuffley W, Callaghan R, Holmes JA, Martin K, Luscombe M, Mistry P, Ryder H, Stewart AJ, Charlton P, Twentyman PR, Bevan P. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by XR9051, a novel diketopiperazine derivative. *Br J Cancer*1998 Oct;78(7):885-92.
64. Dantzig AH, Shepard RL, Law KL, Tabas L, Pratt S, Gillespie JS, Binkley SN, Kuhfeld MT, Starling JJ, Wrighton SA. Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J Pharmacol Exp Ther*1999 Aug;290(2):854-62.
65. Newman MJ, Rodarte JC, Benbatoul KD, Romano SJ, Zhang C, Krane S, Moran EJ, Uyeda RT, Dixon R, Guns ES, Mayer LD. Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*2000 Jun 1;60(11):2964-72.
66. Maliepaard M, van Gastelen MA, Tohgo A, Hausheer FH, van Waardenburg RC, de Jong LA, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH. Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-

- substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clin Cancer Res*2001 Apr;7(4):935-41.
67. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Potentiation of vincristine and Adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res*1983 May;43(5):2267-72.
68. Ganapathi R, Grabowski D, Rouse W, Riegler F. Differential effect of the calmodulin inhibitor trifluoperazine on cellular accumulation, retention, and cytotoxicity of anthracyclines in doxorubicin (adriamycin)-resistant P388 mouse leukemia cells. *Cancer Res*1984 Nov;44(11):5056-61.
69. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*2003 Mar-Apr;10(2):159-65.
70. Shepard RL, Cao J, Starling JJ, Dantzig AH. Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *Int J Cancer*2003 Jan 1;103(1):121-5.
71. Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, Okiji S, Liddle C, Bootle D, Plumb JA, Templeton D, Charlton P. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res*2001 Jan 15;61(2):749-58.
72. Kruijtzter CM, Beijnen JH, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, Schot M, Jewell RC, Paul EM, Schellens JH. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol*2002 Jul 1;20(13):2943-50.
73. Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br J Pharmacol*1999 Sep;128(2):403-11.
74. Cocker HA, Tiffin N, Pritchard-Jones K, Pinkerton CR, Kelland LR. In vitro prevention of the emergence of multidrug resistance in a pediatric rhabdomyosarcoma cell line. *Clin Cancer Res*2001 Oct;7(10):3193-8.
75. Di Nicolantonio F, Knight LA, Glaysher S, Whitehouse PA, Mercer SJ, Sharma S, Mills L, Prin A, Johnson P, Charlton PA, Norris D, Cree IA. Ex vivo reversal of chemoresistance by tariquidar (XR9576). *Anticancer Drugs*2004 Oct;15(9):861-9.
76. Stewart A, Steiner J, Mellows G, Laguda B, Norris D, Bevan P. Phase I trial of XR9576 in healthy volunteers demonstrates modulation of P-glycoprotein in CD56+ lymphocytes after oral and intravenous administration. *Clin Cancer Res*2000 Nov;6(11):4186-91.
77. Guillermo T. Are Asian/Pacific Islander Americans Underrepresented in Health Research? *Asian Am Pac Isl J Health*1994 Autumn;2(4):299-302.
78. Agrawal M, Abraham J, Balis FM, Edgerly M, Stein WD, Bates S, Fojo T, Chen CC. Increased <sup>99m</sup>Tc-sestamibi accumulation in normal liver and drug-resistant tumors after the administration of the glycoprotein inhibitor, XR9576. *Clin Cancer Res*2003 Feb;9(2):650-6.
79. Abraham J, Edgerly M, Wilson R, Chen C, Rutt A, Bakke S, Robey R, Dwyer A, Goldspiel B, Balis F, Van Tellingen O, Bates SE, Fojo T. A phase I study of the P-glycoprotein antagonist tariquidar in combination with vinorelbine. *Clin Cancer Res*2009 May 15;15(10):3574-82.
80. Fox E, Bates SE. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Rev Anticancer Ther*2007 Apr;7(4):447-59.
81. Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med*2002;8(4 Suppl):S49-54.

82. Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci*2003 Jan;94(1):15-21.
83. Shen J, Hughes C, Chao C, Cai J, Bartels C, Gessner T, Subjeck J. Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*1987 May;84(10):3278-82.
84. Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Science*2003;94(1):15-21.
85. Yun J, Tomida A, Nagata K, Tsuruo T. Glucose-regulated stresses confer resistance to VP-16 in human cancer cells through a decreased expression of DNA topoisomerase II. *Oncol Res*1995;7(12):583-90.
86. Kim HD, Tomida A, Ogiso Y, Tsuruo T. Glucose-regulated stresses cause degradation of DNA topoisomerase IIalpha by inducing nuclear proteasome during G1 cell cycle arrest in cancer cells. *J Cell Physiol*1999 Jul;180(1):97-104.
87. Ogiso Y, Tomida A, Kim HD, Tsuruo T. Glucose starvation and hypoxia induce nuclear accumulation of proteasome in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*1999 May 10;258(2):448-52.
88. Messer G, Rupec RA. [Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). II. Pathophysiologic meaning]. *Hautarzt*2001 Aug;52(8):746-52; quiz 53-5.
89. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*1996;14:649-83.
90. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*2003 Jan 9;22(1):90-7.
91. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*2008 May;9(5):402-12.
92. Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Guner D, Dorken B, Daniel PT. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ*2003 Apr;10(4):477-84.
93. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*1993 Jul;7(7A):1126-32.
94. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*2001 Mar;2(3):179-87.
95. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*1998 Feb 6;92(3):367-80.
96. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Cell Cycle*2005 Feb;4(2):290-6.
97. Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci*2009 Aug;100(8):1374-81.
98. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*1998;67:425-79.
99. Yan J, Menendez D, Yang XP, Resnick MA, Jetten AM. A regulatory loop composed of RAP80-HDM2-p53 provides RAP80-enhanced p53 degradation by HDM2 in response to DNA damage. *J Biol Chem*2009 Jul 17;284(29):19280-9.
100. Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*1999 Aug;1(4):221-6.
101. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature*1997 Apr 3;386(6624):463-71.

102. Kawada S, Yamashita Y, Fujii N, Nakano H. Induction of a heat-stable topoisomerase II-DNA cleavable complex by nonintercalative terpenoides, terpenecin and clerocidin. *Cancer Res*1991 Jun 1;51(11):2922-5.
103. Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol*1998 Jun;18(6):3149-62.
104. Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*1998 Sep 4;94(5):615-23.
105. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*2002 Oct 18;298(5593):611-5.
106. Wei N, Deng XW. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol*2003;19:261-86.
107. Spataro V, Toda T, Craig R, Seeger M, Dubiel W, Harris AL, Norbury C. Resistance to diverse drugs and ultraviolet light conferred by overexpression of a novel human 26 S proteasome subunit. *J Biol Chem*1997 Nov 28;272(48):30470-5.
108. Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stevanovic S, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild H. Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem*1998 Oct 2;273(40):25637-46.
109. Emmerich NP, Nussbaum AK, Stevanovic S, Priemer M, Toes RE, Rammensee HG, Schild H. The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J Biol Chem*2000 Jul 14;275(28):21140-8.
110. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*2001 Apr 1;61(7):3071-6.
111. Masdehors P, Omura S, Merle-Beral H, Mentz F, Cosset JM, Dumont J, Magdelenat H, Delic J. Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol*1999 Jun;105(3):752-7.
112. Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R. Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*2003 Mar;9(3):1145-54.
113. J.W. Klunder RK, W.T.A. van der Graaf, E.J.S.M. de Bont,, H.J. Hoekstra EvdB, W.M. Molenaar. Expression of multidrug resistance-associated proteins in rhabdomyosarcomas before and after chemotherapy: the relationship between lung resistance-related protein (LRP) and differentiation. *Human Pathology*2003;34:150-155.
114. Komdeur R, Plaat BE, van der Graaf WT, Hoekstra HJ, Hollema H, van den Berg E, Zwart N, Scheper RJ, Molenaar WM. Expression of multidrug resistance proteins, P-gp, MRP1 and LRP, in soft tissue sarcomas analysed according to their histological type and grade. *Eur J Cancer*2003 May;39(7):909-16.
115. Cocker HA, Hobbs SM, Tiffin N, Pritchard-Jones K, Pinkerton CR, Kelland LR. High levels of the MDM2 oncogene in paediatric rhabdomyosarcoma cell lines may confer multidrug resistance. *Br J Cancer*2001 Nov 30;85(11):1746-52.

116. Prados J, Melguizo C, Marchal JA, Velez C, Alvarez L, Aranega A. Multidrug resistance phenotype in the RMS-GR human rhabdomyosarcoma cell line obtained after polychemotherapy. *Jpn J Cancer Res*1999 Jul;90(7):788-93.
117. Chan HS, Thorner PS, Haddad G, Ling V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol*1990 Apr;8(4):689-704.
118. Jimenez RE, Zalupski MM, Frank JJ, Du W, Ryan JR, Lucas DR. Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma: correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy. *Cancer*1999 Sep 15;86(6):976-81.
119. Prados J, Melguizo C, Fernandez A, Aranega AE, Alvarez L, Aranega A. Inverse expression of mdr 1 and c-myc genes in a rhabdomyosarcoma cell line resistant to actinomycin d. *J Pathol*1996 Sep;180(1):85-9.
120. Prados J, Melguizo C, Fernandez JE, Carrillo E, Marchal JA, Boulaiz H, Martinez A, Rodriguez-Serrano F, Aranega A. Induction of drug resistance in embryonal rhabdomyosarcoma treated with conventional chemotherapy is associated with HLA class I increase. *Neoplasma*2006;53(3):226-31.
121. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*2004 Apr;6(4):463-77.
122. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*2005 Oct;115(10):2679-88.
123. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*2004 Dec;36(12):2405-19.
124. Andrej Hasilik GL, Petro E. Petrides, Peter C. Heinrich. 6 Zelluläre Organellen, Strukturen und Transportvorgänge Biochemie und Pathobiochemie. Berlin1998.
125. Karwatsky J, Lincoln MC, Georges E. A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry*2003 Oct 28;42(42):12163-73.
126. Duraj J, Takacsova X, Sedlak J, Sulikova M, Hunakova L, Bies J, Chorvath B. PSC 833 induces apoptosis in drug-sensitive human leukemia cell line and modulates resistance to paclitaxel in its multidrug-resistant variant. *Anticancer Res*2000 Nov-Dec;20(6B):4627-32.
127. Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*2006 Sep-Oct;42(8-9):242-7.
128. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*2007 Oct;8(10):839-45.
129. Kim KU, Wilson SM, Abayasiriwardana KS, Collins R, Fjellbirkeland L, Xu Z, Jablons DM, Nishimura SL, Broaddus VC. A novel in vitro model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance. *Am J Respir Cell Mol Biol*2005 Dec;33(6):541-8.
130. St Croix B, Kerbel RS. Cell adhesion and drug resistance in cancer. *Curr Opin Oncol*1997 Nov;9(6):549-56.
131. Downing KH. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*2000;16:89-111.
132. Blajeski AL, Phan VA, Kottke TJ, Kaufmann SH. G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J Clin Invest*2002 Jul;110(1):91-9.
133. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*2004 Apr;4(4):253-65.

134. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res*1996 Feb 15;56(4):816-25.
135. Skladanowski A, Come MG, Sabisz M, Escargueil AE, Larsen AK. Down-regulation of DNA topoisomerase IIalpha leads to prolonged cell cycle transit in G2 and early M phases and increased survival to microtubule-interacting agents. *Mol Pharmacol*2005 Sep;68(3):625-34.
136. Höcherl P. New tariquidar-like ABCB1 modulators in cancer chemotherapy: Preclinical pharmacokinetic / pharmacodynamic investigations and computational studies. Dissertation2010.
137. Hubensack M, Muller C, Hocherl P, Fellner S, Spruss T, Bernhardt G, Buschauer A. Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol*2008 May;134(5):597-607.
138. Cocker HA, Pinkerton CR, Kelland LR. Characterization and modulation of drug resistance of human paediatric rhabdomyosarcoma cell lines. *Br J Cancer*2000 Aug;83(3):338-45.

## **7. Erklärungen zum Eigenanteil**

Herr Professor Dr. G. Seitz, Herr PD Dr. S. Armeanu-Ebinger und Frau N. Laizer waren an der Gesamt-Konzeption dieser Arbeit beteiligt.

Sämtliche *in vitro* Versuche wurden von Frau N. Laizer, teilweise unterstützt durch Herrn PD Dr. S. Armeanu-Ebinger, geplant, durchgeführt und ausgewertet.

Das Konzept der Tierversuche wurde von Herrn Professor Dr. G. Seitz entworfen und durchgeführt. Das Tumormaterial dieser Tierversuche wurde konserviert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Daten der Tierversuche wurden von Frau N. Laizer in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. Geiger, vom Institut für Biomathematik, statistisch ausgewertet.

Das Tumormaterial wurde von Frau N. Laizer für die Genchipanalyse und die qRT-PCR vorbereitet. Die Genchipanalyse wurde von Herrn Dr. rer. nat. Michael Bonin und seinem Team der Microarray Facilities erstellt und zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt. Die weitere Auswertung der Genchipanalyse mittels Ingenuity pathways wurde von Frau N. Laizer durchgeführt.

Die Planung der qRT-PCR erfolgte durch Frau N. Laizer und Herrn PD Dr. S. Armeanu-Ebinger. Die qRT-PCR wurde von Frau N. Laizer gemacht und ausgewertet.

Frau N. Laizer hat das Manuskript dieser Dissertation selbstständig erstellt und Herr Professor Dr. G. Seitz hat das Manuskript Korrektur gelesen.

## **8. Danksagungen**

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Fuchs in dessen Räumlichkeiten und unter dessen Schirmherrschaft ich die Daten für die vorliegende Arbeit sammeln und ausarbeiten durfte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Guido Seitz, der mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht hat, mich bei meinen Vorhaben stets unterstützt hat und mir bei der Entwicklung dieser Arbeit viel Freiraum gegeben hat.

Außerordentlicher Dank gilt meinem Betreuer und Laborleiter Herrn PD Dr. rer. nat. Sorin Armeanu-Ebinger, der mich bei meiner Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt hat, der sich immer Zeit genommen hat wissenschaftliche und nicht wissenschaftliche Themen zu diskutieren.

Ich danke Frau Delia Herrmann für ihre hilfreichen Tipps im praktischen Bereich der Labortätigkeiten und die produktiven gemeinsamen Tage im Labor.

Dank geht auch an Herrn Professor Dr. Geiger vom Institut für Biomathematik für die professionelle und freundliche Beratung bezüglich der statistischen Auswertung der Tierversuchs-Daten.

Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Michael Bonin und sein Team der Microarray Facilities in Tübingen für die Genchipanalysen und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke meinem geliebten Mann, der mich immer wieder Gelassenheit lehrt und dessen volle Unterstützung mir stets in jeglicher Hinsicht sicher ist.

Zum Schluss denke ich voll Dankbarkeit an meine wunderbare Familie und was sie mir geschenkt hat. Ohne sie wäre die Arbeit weder entstanden noch fertig geworden. Mein Opa gab mir Willensstärke und Unermüdlichkeit mit auf den Lebensweg, meine Oma bedingungslose Liebe, meine Mutter Frohsinn und Lebensmut und mein Vater unendlich viel Kraft und Vertrauen in mich selbst und andere. Mein Bruder Oliver ist mir stets der treueste Begleiter gewesen. Meiner Tante Christa und Onkel Gottfried danke ich für ihre Zuneigung und treue Unterstützung, besonders in den letzten Jahren.