

Universität Ulm

Institut für Rechtsmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Erich Miltner

**Untersuchung der Wirkung von Morphin auf
Krebszelllinien und Möglichkeiten der
Therapieoptimierung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Andrea Mähler

Tübingen

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Erich Miltner

2. Berichterstatter: PD Dr. Cornelia Brunner

Tag der Promotion: 14.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Apoptose.....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Apoptosemechanismen.....	3
1.2 Apoptosesignalwege.....	5
1.2.1 Rezeptor vermittelte Apoptose.....	5
1.2.2 Mitochondrialer Apoptoseweg.....	7
1.2.3 Caspase 2.....	11
1.3 Zellzyklus	11
1.4 Doxorubicin.....	12
1.5 Opioide in der Behandlung von Krebspatienten	12
1.5.1 Schmerztherapie	12
1.5.2 Apoptoseinduktion durch Opioide in Krebszellen	16
1.6 Opioidrezeptoren.....	16
1.7 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits	21
2.1.2 Geräte und Materialien.....	23
2.1.3 Zellkulturmedium, Puffer, Substanzen.....	26
2.1.4 Antikörper	29
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Zellkultur.....	30
2.2.2 Versuchsansätze	31
2.2.3 Durchflusszytometrie	34
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	38
3 Ergebnisse	42
3.1 Nachweis des Opioidrezeptors auf der Oberfläche von Krebszelllinien.....	42
3.2 Wirkung von Morphin auf Krebszellen verschiedener Herkunft.....	44
3.2.1 Wirkung der Morphin-Behandlung auf Glioblastomzellen	44
3.2.2 Wirkung der Morphin-Behandlung auf Leukämiezellen	45

3.3	Charakterisierung des Morphin induzierten Zelltodes bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60	49
3.3.1	Analysen zur Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des durch Morphin induzierten Zelltodes der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60	49
3.3.2	Einfluss von Morphin auf das Proliferationsverhalten und den Zellzyklus der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60	51
3.3.3	Molekulare Mechanismen des Morphin induzierten Zelltodes.....	54
3.4	Synergistische Wirkung von Morphin und Fentanyl bei der Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60	59
3.4.1	Synergistische Wirkung von Fentanyl und Morphin auf die Zelltodinduktion bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60	59
3.4.2	Vergleich der Empfindlichkeit der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 auf verschieden zusammengesetzte Gesamtmengen an Opioiden	67
3.4.3	Molekulare Mechanismen des synergistischen Zelltodes der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 durch Fentanyl und Morphin	68
3.5	Kombinationsbehandlung von Krebszellen mit Doxorubicin und Morphin.....	75
3.5.1	Behandlung von Glioblastomzellen mit einer Morphin-Doxorubicin-Kombination.....	75
3.5.2	Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit einer Morphin-Doxorubicin-Kombination	76
4	Diskussion	78
5	Zusammenfassung.....	92
6	Literaturverzeichnis.....	94
	Danksagung.....	119
	Lebenslauf	120

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ADP	Adenosindiphosphat
Apaf	engl. „apoptotic protease activating factor-1“
ATP	Adenosinriphosphat
Bax	engl. „ Bcl-2 associated x-protein“
Bcl-2	engl. „ B-cell-lymphoma protein-2“
BCA	engl. „bicinchoninic acid“
Bcl-x _{S/L}	engl. „ B-cell-lymphoma extra long/short “
BH-Domäne	engl. „Bcl-2-homology“-Domäne
BIR	engl. „Baculoviral IAP repeat“
Bid	engl. „ BH3 interacting DD agonist “
BP	Blockingpuffer
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAD	engl. „caspase-activated DNase“
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	engl. „caspase recruitment domain“
CCRF-CEM (=CEM)	humane T-Zell-Leukämie (ALL) Zelllinie
CD	engl. „cluster of differentiation“
CDK	engl. „cyclin-dependent kinase“
CDKI	CDK-Inhibitor
Ced	engl. „cell death abnormal“
Cl ⁻	Chlorid

cIAP	engl. „cellular IAP”
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ⁺ bzw. Cu ²⁺	Kupfer (einwertig bzw. zweiwertig)
DD	engl. „death domain”
DED	engl. „death effector domain”
DISC	engl. „death-inducing signalling complex“
DMEM	engl. „Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. „deoxyribonucleic acid“
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. „enhanced chemiluminescence“
ERK	engl. „extracellular signal regulated kinase”
et al.	von lat.: „und andere”
EtOH	Ethanol
FACS	engl. „fluorescence-activated cell sorter“
FADD	engl. „Fas-associated death domain protein”
FBS	fötales bovines Serum, Synonym: FCS
FCS	fötales Kälberserum, Synonym: FBS
Fl	Fluoreszenz
FSC	engl. „forward light scatter“
g	Gramm
g	Gravitationskraft
G-Protein	engl. „guanine nucleotide binding protein”
G-Phase	engl. „gap”-Phase
GDP	Guanosindiphosphat

GRK	engl. „G-protein-coupled receptor kinase“
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HL-60	humane AML-Zelllinie
HRP	engl. „horseradish peroxidase“
IAP	engl. „inhibitor of apoptosis protein“
IgG	Immunglobulin G
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	engl. „mouse“
M	molar
M.	Morbus (lat. Krankheit)
M-Phase	Mitose-Phase
mA	Milliampere
MAPK	engl. „mitogen activated protein kinases“
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
MOR	µ-Opioidrezeptor

mRNA	engl. „messenger ribonucleic acid“
Na ⁺	Natrium
nm	Nanometer
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	engl. „Non-steroidal anti-inflammatory drug“
ORL-1	engl. „opioid-receptor-like 1“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK2	engl. „p21-activated kinase 2“
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	engl. „phosphate buffered saline“
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
r	engl. „rabbit“
RING	engl. „really interesting new gene“
Rpm	engl. „revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
SSC	engl. „side light scatter“
SDS	engl. „sodium dodecyl sulfate“
Smac	engl. „second mitochondrial activator of caspases“, Syn: DIABLO
S-Phase	Synthese-Phase
SPI	engl. „small peptid inhibitors“, Proteasen-Inhibitor- Mischung
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	engl. „TNF-related apoptosis-inducing ligand“
V	Volt

WHO	World Health Organization
WP	Waschpuffer
XIAP	engl. „X-chromosome-linked IAP“
ZNS	Zentrales Nervensystem
zVAD.fmk	Z-Val-Ala-D, L-Asp-fluoromethylketon

1 Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Allgemeines

Schon in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts beschäftigte sich Virchow mit der Frage, unter welchen Umständen und durch welche Mechanismen Zelltod eintreten kann. Erst im Laufe des Folgejahrhunderts konnten zwei von einander abgegrenzte Konzepte, nämlich das der Nekrose und das der Apoptose, postuliert werden (Majno et al. 1995).

Der Begriff Nekrose wurde auch mit dem Begriff „*accidental cell death*“ beschrieben und bezieht sich auf ein Zellsterben, bei dem es durch Einwirkung eines für die Zelle nicht mehr tolerablen Stresses wie z. B. übermäßige mechanische Belastung, Ischämie oder Hitze zu einem eher unkontrollierten Prozess des Zellzerfalls kommt (Majno et al. 1995, Kumar et al. 2007a). Der nekrotische Zelltod (Abb. 1(d) und (e)) ist charakterisiert durch das Anschwellen der Zelle, die Kondensation und zunehmende Eosinophilie des Zytoplasmas, sowie durch verschiedene nacheinander ablaufende Veränderungen des Zellkerns: Pyknose (Schrumpfung), Karyorrhesis (Fragmentierung) und Karyolyse (Zersetzung des Kerns). Die Plasmamembran nekrotischer Zellen zerfällt und es werden zelluläre Bestandteile ins umgebende Gewebe freigesetzt, was zu einer entzündlichen Umgebungsreaktion führt (Abb. 1(e)) (Kumar et al. 2007a).

Im Gegensatz zur Nekrose, deren Auftreten stets pathologisch ist, stellt die Apoptose, der „programmierte Zelltod“, einen Prozess dar, welcher in physiologischer Weise in vielen Geweben auftritt und für die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts im Gewebe unbedingt erforderlich ist. Auch in der Embryonalentwicklung spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle (Kumar et al. 2007a). Der apoptotische Zelltod zeichnet sich durch verschiedene morphologische und biochemische Charakteristika aus (Abb. 1(a) bis (c)). Morphologisch kommt es zur Zellschrumpfung und zur erhöhten Granularität des Zytoplasmas. Der Zellkern wird pyknotisch, und es zeigen sich membranäre Ausstülpungen, die sich im Folgenden zu so genannten „apoptotischen Körperchen“ abschnüren und von umgebenden Zellen oder Zellen des Immunsystems phagozytiert werden (Abb. 1(b)) (Darzynkiewicz et al. 1997). So „verschwindet“ die funktionsuntüchtige Zelle auf kontrollierte Art und Weise aus dem Gewebe, ohne im umliegenden Gewebe eine inflammatorische Reaktion hervorzurufen (Abb. 1(c)) (Kumar

et al. 2007a). Diese empfindlichen Vorgänge werden durch eine hoch komplexe und streng regulierte Maschinerie an Enzymkaskaden und regulatorischen Proteinen vermittelt.

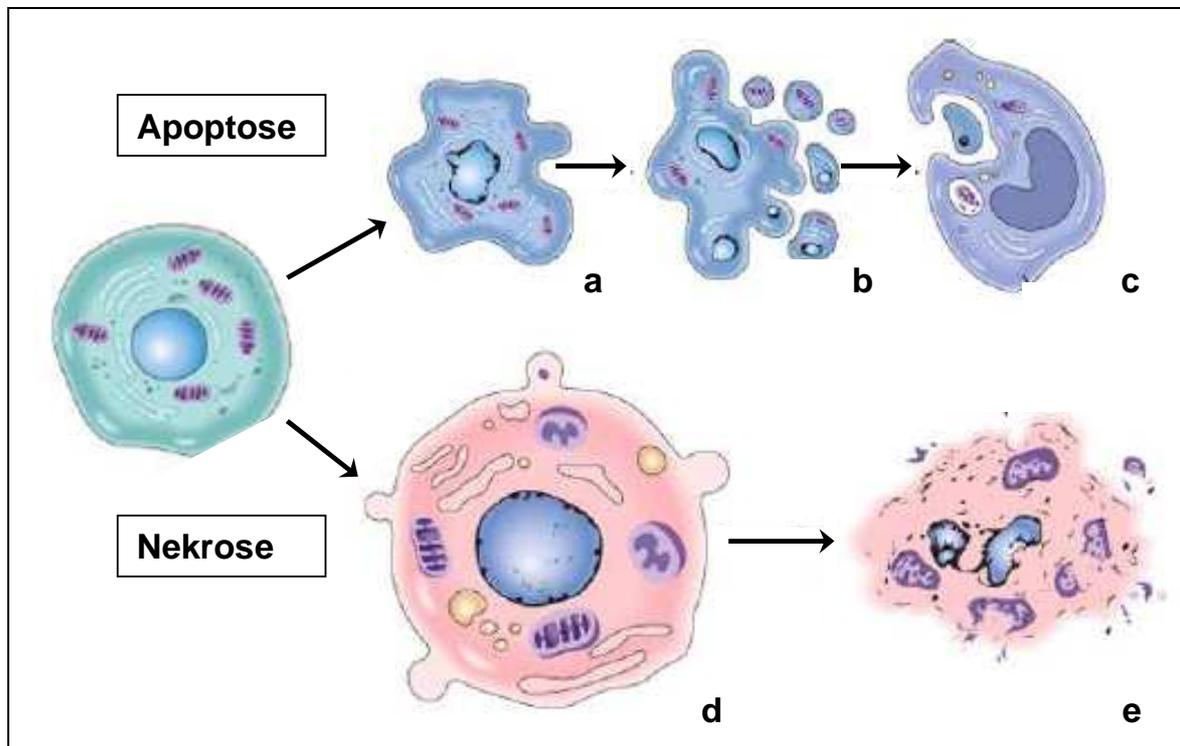


Abbildung 1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen beim (a-c) apoptotischen Zelltod und bei (d-e) der Nekrose. In der apoptotischen Zelle wird (a) zuerst eine Verdichtung der zytoplasmatischen Struktur und des Kerns sowie ein „*Membrane blebbing*“ sichtbar, dann kommt es (b) zum Abschnüren von apoptotischen Körperchen, welche (c) phagozytiert werden. Bei der Nekrose ist (d) eine vermehrte Eosinophilie und ein Aufblähen der Zelle und des Kerns erkennbar, bevor es (e) zur Zellyse kommt und die zellulären Bestandteile in das umliegende Gewebe freigesetzt werden. Modifiziert nach (Kumar et al. 2007a, S.6)

Die Erkenntnis, dass Apoptose für die Kontrolle des „Pools“ an Zellen in verschiedenen Geweben von entscheidender Bedeutung ist, bedeutet gleichzeitig, dass eine Deregulation apoptotischer Vorgänge fatale Folgen haben kann. So kann eine erhöhte Apoptoserate beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Alzheimer (Rohn et al. 2009, Rohn 2010) oder M. Parkinson (Tatton et al. 2003), aber auch bei der Infektion mit HIV eine Rolle spielen (Kumar et al. 2007c). Eine zu geringe Apoptoserate hingegen tritt typischerweise bei Krebserkrankungen auf (Stricker et al. 2007).

Durch Veränderungen in zentralen, die Apoptose regulierenden Proteinen wie beispielsweise der Überexpression von antiapoptotischen Proteinen (Tsujimoto et al. 1985) kommt es zu einer defekten Induzierbarkeit von Apoptose (Reed 2008), was zur malignen Entartung beiträgt.

Veränderungen der apoptotischen Signalwege, die mit einer verminderten Apoptoseinduktion einhergehen, spielen jedoch nicht nur in der Entstehung, sondern auch in der Therapie von Malignomen eine wichtige Rolle. Da Zytostatika sowohl in Leukämien als auch in soliden Tumoren die Apoptosekaskaden aktivieren (Friesen et al. 1996, Fulda et al. 1998a, Fulda et al. 1998b, Fulda et al. 1998c, Friesen et al. 1999, Zhen et al. 2009, Saunders et al. 2010), kommt es bei Deregulation dieser Signalwege zu einer Resistenz gegenüber Zytostatika und Strahlung (Friesen et al. 1997) und infolgedessen zum Therapieversagen.

Die entscheidende Rolle der Apoptose für die Erhaltung der Gewebshomöostase spiegelt sich in der Komplexität der daran beteiligten Signalkaskaden wider. Im Kern dieser Signalwege spielen proteolytische Enzyme, die Caspasen, eine zentrale Rolle.

1.1.2 Apoptosemechanismen

Caspasen

Seit dem Jahr 1993 wurde gezeigt, dass zu den zuvor in *Caenorhabditis elegans* entdeckten Genen ced-3, ced-4 und ced-9, die in diesen Nematoden an Apoptosevorgängen beteiligt sind (Hengartner et al. 1992, Yuan et al. 1992), auch im menschlichen Genom hoch konservierte Homologe vorhanden sind (Yuan et al. 1993, Spector et al. 1997). Aus diesen Anfängen konnte bis heute ein hoch komplexes Signalwerk aus Enzymen und regulatorischen Proteinen, welche an Apoptosevorgängen beteiligt sind, erforscht werden.

Im Zentrum der Apoptosemaschinerie stehen die Caspasen, Cysteinproteasen, die ihre Substrate spezifisch nach einem Aspartatrest schneiden und in ihrem katalytischen Zentrum einen Cysteinrest tragen (Montenarh 2007). Ihre Substratspezifität wird festgelegt durch die vier N-terminal darauf folgenden Aminosäurereste. Hierbei konnte eine Gruppe (Caspase 6, 8, 9) ausgemacht werden, die aufgrund ihrer Substratspezifität andere Caspasen proteolytisch schneiden und somit Signalkaskaden fortleiten kann. Andere Caspasen wie Caspase 2, 3 und 7 weisen hingegen Spezifitäten für andere zelluläre Proteine auf, welche während der Apoptose gespalten werden (Thornberry et al. 1997). Anhand dieses Modells wird die Hierarchie der Caspasen innerhalb der Apoptosekaskade deutlich, wobei sich diese Enzyme in die übergeordneten Initiatorcaspasen und die durch diese aktivierten Effektorcaspasen klassifizieren lassen.

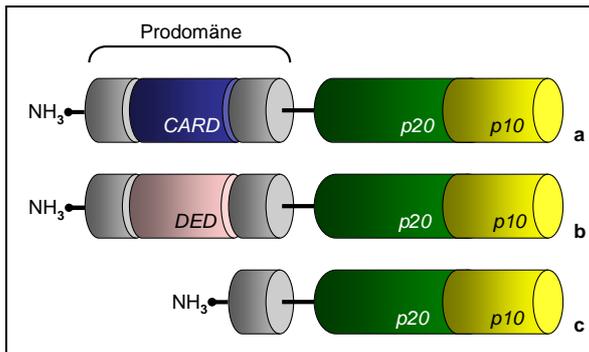


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus (a) der inaktiven Caspase 9 und (b) Caspase 8 bzw. 10 mit großen Prodomänen, die Protein-Protein-Interaktionsdomänen enthalten, sowie (c) der Effektorcaspasen mit kurzer Prodomäne, Darstellung basierend auf (Degterev et al. 2003).

Caspasen liegen im Zytosol als Zymogene vor und werden durch verschiedene Stimuli wie z. B. DNA-Schaden oder Verlust des mitochondrialen Membranpotentials aktiviert. Alle Caspasen verfügen über eine N-terminale Prodomäne, die bei einigen Caspasen eine zusätzliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne beinhaltet und an die sich zwei Untereinheiten, p20 und p10, anschließen (Abb. 2) (Degterev et al. 2003). Das aktive Enzym liegt als Heterotetramer vor, bestehend aus je zwei p10- und p20-Untereinheiten mit insgesamt zwei aktiven Zentren (Hengartner 2000).

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen wie Caspase 8, 9 und 10 erfolgt bei Aktivierung der Apoptosesignalwege über eine Protein-Protein-Interaktion, welche über spezielle Interaktionsdomänen in der N-terminalen Prodomäne vermittelt wird (Degterev et al. 2003).

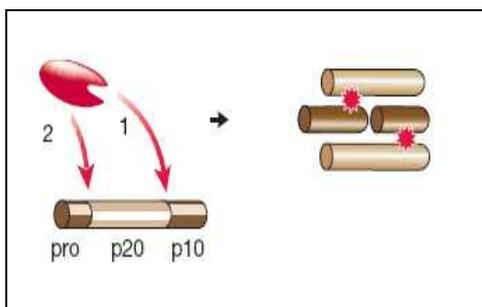


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus der Effektorcaspasen. Erkennbar sind die Schnittstellen zwischen der Prodomäne (pro) und p20 bzw. zwischen p20 und p10, an denen die übergeordnete Caspase (rot) die Effektorcaspase schneidet. Im zweiten Schritt erfolgt die Zusammenlagerung je zweier p10- und p20-Fragmente und die Aktivierung. Aus (Hengartner 2000, S.772)

Die Effektorcaspasen wie Caspase 3, 6 und 7 sind die „Vollstrecker“ der Apoptose. Ihre Aktivierung (Abb. 3) erfolgt durch die übergeordneten Initiatorcaspasen, die mittels proteolytischer Spaltung die p10- und p20-Domänen und die Prodomäne voneinander

abspalten (Hengartner 2000). Es folgt eine Konformationsänderung, durch die eine Ligandenbindung erst ermöglicht wird (Chai et al. 2001). Die Substratspezifität dieser Caspasen liegt bei Proteinen, die in zelluläre Regulation und Homöostase involviert sind (Thornberry et al. 1997).

Über 100 Substrate der Effektorcaspasen konnten bereits identifiziert werden (Hengartner 2000). CAD (*Caspase-activated DNase*) beispielsweise wird durch Spaltung der inhibitorischen Untereinheit durch Caspase 3 aktiviert, was zur internucleosomalen Degradierung der DNA führt (Enari et al. 1998, Sakahira et al. 1998) und die typische DNA-Fragmentierung im Rahmen der Apoptose nach sich zieht. Auch das „*membrane-blebbing*“ steht in Zusammenhang mit der proteolytischen Abspaltung der regulatorischen Untereinheit von PAK2 (*p21-activated kinase 2*), was zu einer konstitutiven Aktivierung dieses Enzyms führt (Rudel et al. 1997). Ein weiteres wichtiges Substrat, das durch Caspase 3 gespalten wird, ist Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP), welches eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur spielt (Nicholson et al. 1995).

1.2 Apoptosesignalwege

Es sind zwei Apoptosewege bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Aktivierungsmechanismen, der beteiligten Initiatorcaspasen und ihrer Regulation unterscheiden, jedoch auf Ebene der Effektorcaspasen konvergieren: der Rezeptor vermittelte und der mitochondriale Apoptoseweg.

1.2.1 Rezeptor vermittelte Apoptose

Schon im Jahr 1989 wurde von zwei Arbeitsgruppen ein Oberflächenrezeptor beschrieben, dessen Stimulation Apoptose induziert (Trauth et al. 1989, Yonehara et al. 1989). Dieser Rezeptor, der im Weiteren als Fas-Rezeptor, APO-1 bzw. CD95 benannt wurde, gehört zur Gruppe der TNF-Rezeptoren, die alle über ähnliche, cysteinreiche extrazelluläre Domänen verfügen (Walczak et al. 2000). Der Fas-Rezeptor gehört in dieser Familie zur Subgruppe der Todesrezeptoren, welche zusätzlich eine spezielle, ca. 80 Aminosäuren umfassende intrazelluläre Domäne aufweisen, die für die Signaltransduktion des Apoptosestimulus vom Rezeptor in die Zelle relevant ist (Tartaglia et al. 1993), die „*death domain*“ (DD) (Walczak et al. 2000). Einige intrazellulärer Proteine, die ebenfalls mit einer DD ausgestattet sind, dienen als Adapterproteine für die Bildung des „*death inducing signalling complex*“ (DISC) (Abb. 5) (Kischkel et al. 1995). Für diese Funktion steht im Falle des Fas-Rezeptors das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*)

im Mittelpunkt. FADD enthält neben der DD, über die es mit dem aktivierten Todesrezeptor interagiert (Kischkel et al. 1995), eine weitere Domäne, die „*death effektor domain*“ (DED), die für die Rekrutierung der Procaspase 8 benötigt wird (Muzio et al. 1996). Die Rekrutierung von Procaspase 8 über ihre DED an FADD und somit an den Fas-Rezeptor setzt eine Oligomerisierung des Rezeptors voraus (Kischkel et al. 1995). Im so gebildeten DISC (*death inducing signalling complex*) erfolgt die Aktivierung von Caspase 8 nach dem „*induced proximity*“-Mechanismus (Abb. 4), wobei im DISC hohe Konzentration an Procaspase 8-Molekülen auftreten. Es kommt zur örtlichen Erhöhung der intrinsischen Aktivität der Zymogene und zu gegenseitigen Aktivierung (Muzio et al. 1998) und im Folgenden zur Aktivierung von Effektorcaspasen (Medema et al. 1997).

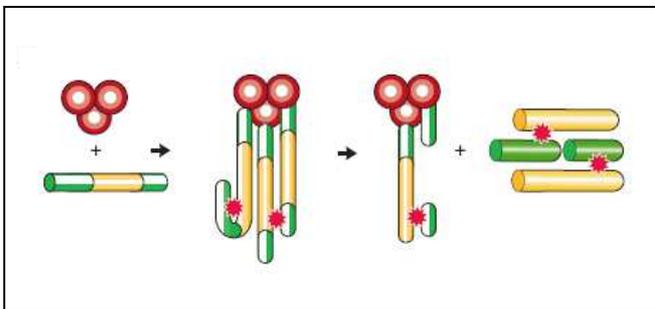


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus von Caspase 8 nach dem „*induced proximity*“-Modell. Gezeigt ist von links nach rechts die Rekrutierung mehrerer Procaspase 8-Moleküle in den „*death-inducing signalling complex*“, DISC („*induced proximity*“), wobei die intrinsische proteolytische Aktivität der Procaspasen zu einer gegenseitigen proteolytischen Aktivierung führt. Die freigesetzten Domänen lagern sich zum aktiven Enzym zusammen. Aus: (Hengartner 2000, S. 772)

Die Aktivierung des Fas-Rezeptors erfolgt durch Bindung des Fas-Liganden (CD95 Ligand) sowohl unter physiologischen Bedingungen (Krammer 2000), als auch bei der Apoptoseinduktion z. B. durch Chemotherapeutika (Friesen et al. 1996).

Der Fas-Ligand gehört zur TNF-Zytokin-Familie. Sein C-terminales Ende ist für die Bindung an den Fas-Rezeptor sowie für seine Oligomerisation notwendig (Orlinick et al. 1997). Neben einer transmembranständigen Form kommt der Fas-Ligand auch als lösliche Form vor, bei der die membrandurchspannenden Domänen fehlen. Beide Formen können über eine extrazelluläre Rezeptorbindung Apoptose induzieren (Krammer 2000).

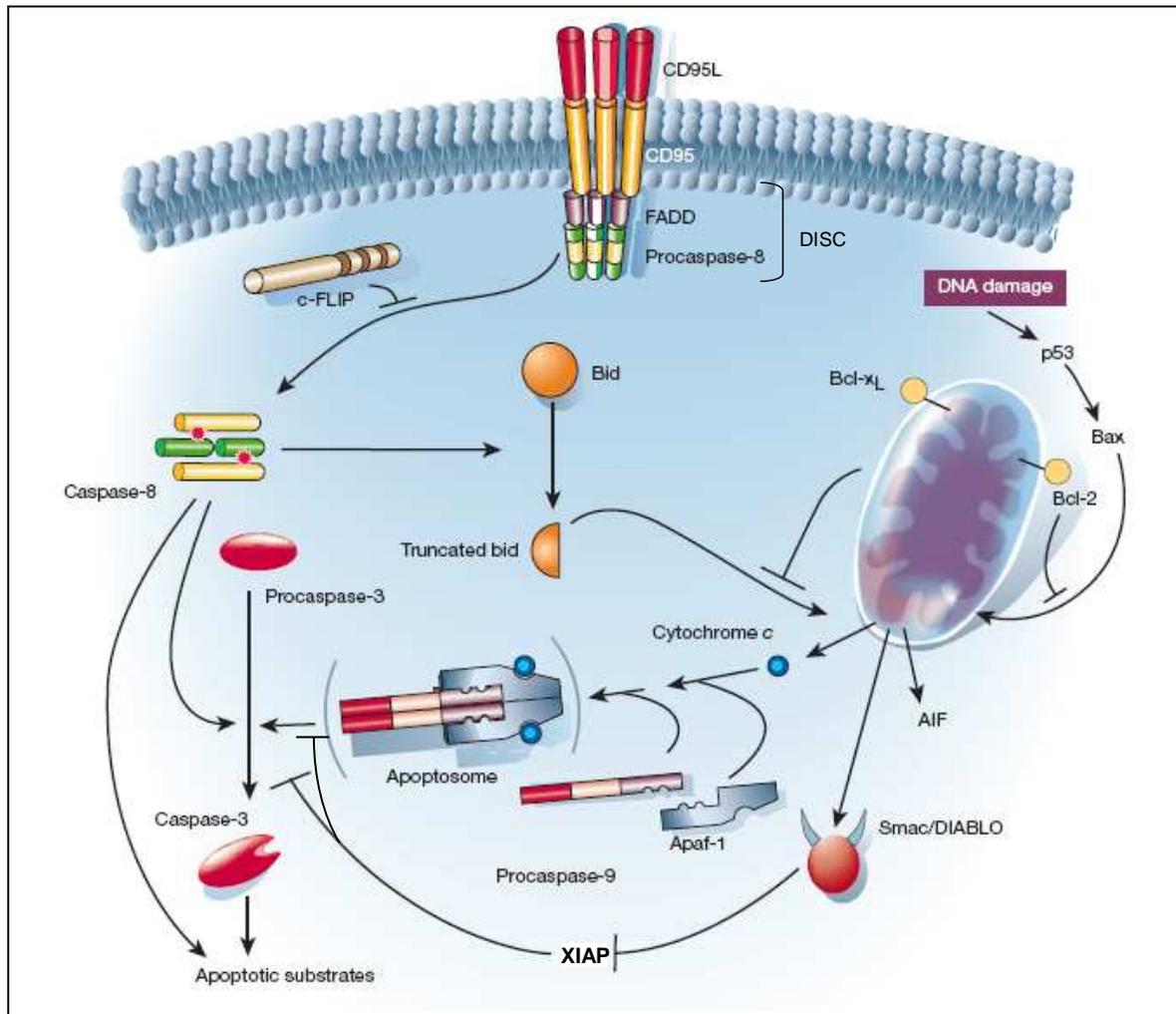


Abbildung 5: Schematische Darstellung beider Apoptosewege. Erkennbar ist der Rezeptor vermittelte Apoptoseweg (links) sowie der Ablauf des mitochondrialen Apoptoseweges (rechts) mit den jeweiligen regulatorischen Proteinen. Die Wege sind verknüpft über die Caspase 8 vermittelte Spaltung von Bid („*BH3 interacting death domain agonist*“) welches den mitochondrialen Signalweg aktivieren kann und konvergieren auf Ebene der Effektorcaspase 3. Modifiziert nach (Hengartner 2000, S. 773)

1.2.2 Mitochondrialer Apoptoseweg

Im Jahr 1996 konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Caspase 3 nicht nur über die Aktivierung von Todesrezeptoren und Caspase 8 stattfindet, sondern auch unter dem Einfluss so genannter „*apoptotic protease activating factors*“, den Apafs, möglich ist (Liu et al. 1996). Bei genauerer Charakterisierung von Apaf-1 fand sich eine Sequenzhomologie einer N-terminalen Domäne mit der Caspase 3 Prodomäne, der „*Caspase recruitment domain*“, CARD (Hofmann et al. 1997, Zou et al. 1997). Es wurde gezeigt, dass Cytochrom c direkt mit Apaf-1 interagieren muss, um eine Caspase 3-Aktivierung zu ermöglichen (Zou et al. 1997). Auch Caspase 9 bindet über eine direkte Interaktion der beiden homologen CARD-Domänen an Apaf-1 (Li et al. 1997). Alle drei Komponenten,

Apaf-1, Cytochrom c und Caspase 9 bilden einen Komplex, das Apoptosom, das eine radförmige dreidimensionale Struktur aufweist und in dem die Procaspase 9 aktiviert wird (Abb. 6) (Acehan et al. 2002). Hierbei kann es ebenfalls zur Proteolyse kommen, welche jedoch für die Aktivierung nicht zwingend notwendig ist, da diese auch durch allosterische Regulation eingeleitet werden kann. Dies geschieht durch Homodimerisierung im Apoptosom und führt zu einer aktivierenden Konformationsänderung von Caspase 9 (Renatus et al. 2001).

Das Apoptosom bildet das Kernstück des intrinsischen Apoptosewegs (Abb. 5); alle seiner Komponenten werden für die Aktivierung von Caspase 3 benötigt (Li et al. 1997).

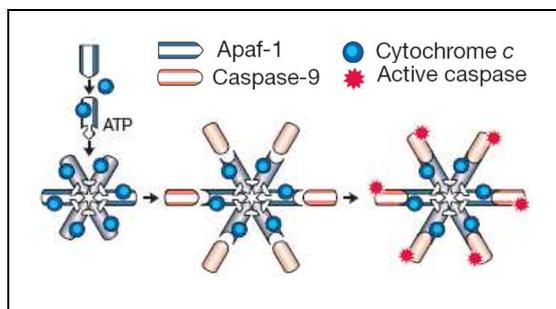


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus von Caspase 9 im Apoptosom. Gezeigt ist von links nach rechts die Zusammenlagerung des Apoptosoms aus Apaf-1 („*apoptotic protease activating factor-1*“), Cytochrom c und Procaspase 9 und die Aktivierung der Procaspase 9 durch allosterische Regulation. Aus: (Hengartner 2000, S. 772)

Cytochrom c ist in der gesunden Zelle im Intermembranspalt zwischen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und hat eine wichtige Funktion in der Atmungskette (Brandt 2007). Die Freisetzung von Cytochrom c sowie weiteren proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum erfolgt im Rahmen von Apoptose induzierenden, die Mitochondrien schädigenden Ereignissen. Dazu gehören DNA-Schädigung, Strahlung, Hitzeeinwirkung, aber auch Chemotherapeutika, die zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen und zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren beitragen. Damit kommt es zur Apoptoseinduktion über den intrinsischen Signalweg (van Loo et al. 2002).

Zum wichtigsten Regulationssystem des intrinsischen Apoptosewegs gehören die Proteine der Bcl-2-Familie. Sie regulieren mit Hilfe von pro- und antiapoptotischen Mitgliedern die Permeabilität der Mitochondrienmembran über die Bildung so genannter „Poren“.

Alle Proteine dieser Familie besitzen mindestens eine „*Bcl-2-homology domain*“ (BH-Domäne), mittels der sie untereinander interagieren (Brunelle et al. 2009).

Bax und Bak sind proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, die über die Domänen BH1, 2 und 3 verfügen und sich damit von der anderen proapoptotischen Bcl-2-Untergruppe, den BH3-only Proteinen abgrenzen, welche nur über diese eine BH-Domäne verfügen (Brunelle et al. 2009).

Im inaktiven Zustand liegt Bax als Monomer im Zytosol vor und transloziert zu bzw. inseriert in die äußere Mitochondrienmembran (Hsu et al. 1997), während Bak sich bereits im inaktiven Zustand dort befindet (Wei et al. 2000). Die aktivierten Proteine durchlaufen eine Konformationsänderung und bilden Homo-Oligomere in der Mitochondrienmembran (Saito et al. 2000, Wei et al. 2000), welche dann entweder eine Pore bilden, durch die proapoptotische Faktoren freigesetzt werden (Brunelle et al. 2009) oder mit schon vorhandenen mitochondrialen Transportproteinen zu diesem Zweck interagieren (Shimizu et al. 1999).

Die BH3-only-Proteine können hingegen antiapoptotisch wirksame Bcl-2-Mitglieder binden und so deren Interaktion mit Bax oder Bak verhindern, was zu deren Freisetzung führt (Willis et al. 2007). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass einige BH3-only-Proteine wie Bid durch direkte Interaktion mit beispielsweise Bax diesen aktivieren (Lovell et al. 2008). Das BH3-only-Protein Bid spielt auch insofern eine herausragende Rolle, als dass es in sogenannten Typ II-Zellen eine zentrale Verknüpfungsstelle zwischen den beiden Apoptosewegen darstellt (Scaffidi et al. 1998). Diese Zellen unterscheiden sich von den Typ I-Zellen dadurch, dass in Folge der Fas-Rezeptor-Aktivierung nur wenig DISC gebildet wird (Scaffidi et al. 1998); die wenigen aktivierten Caspase 8-Moleküle schneiden und aktivieren wiederum Bid (Li et al. 1998), welches dann die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs vermittelt (Lovell et al. 2008) und so zum apoptotischen Zelltod führt. Im Gegensatz dazu wird in Typ I-Zellen, unabhängig von mitochondrialer Apoptoseinduktion, durch den DISC Caspase 8 in ausreichenden Mengen aktiviert, um konsekutiv massiv Caspase 3 zu spalten und Zelltod zu induzieren (Scaffidi et al. 1998).

Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, v.a. Bcl-2 und Bcl-x_L, besitzen vier BH-Domänen. Einerseits sind sie in der Lage, BH3-only Proteine zu binden und damit die Aktivierung von Bax und Bak zu unterbinden (Cheng et al. 2001), andererseits können sie durch direkte Interaktion Bax auch direkt inaktivieren und so eine Porenbildung verhindern (Billen et al. 2008).

Eine weitere wichtige inhibitorische Regulation der Apoptosesignalkaskade erfolgt über die „*inhibitor of apoptosis proteins*“, kurz IAPs. Sie agieren auf Ebene der Caspaseninhibition und sind charakterisiert durch mehr als eine BIR-Domäne (*baculoviral*

IAP repeat). Viele der IAPs enthalten auch eine C-terminal gelegene Zink-Finger-RING-Domäne. Bis heute konnten sieben Mitglieder dieser Familie identifiziert werden, darunter „*cellular IAP*“ (cIAP) 1 und 2 sowie das am besten charakterisierte Protein „*X-chromosome-linked IAP*“ (XIAP) (Liston et al. 2003). XIAP verfügt über eine Domäne (BIR 3), mit der die katalytische Aktivität von Caspase 3 und 7 durch Protein-Protein-Interaktion inhibiert werden kann (Deveraux et al. 1997, Takahashi et al. 1998). Manche IAPs, darunter auch XIAP, inhibieren auch Caspase 9 über eine weitere spezifische Domäne (BIR2) (Takahashi et al. 1998). Die Ubiquitinylierung von XIAP oder cIAP wird über die RING-Domäne sowie von Caspase 3 und 7 vermittelt und induziert die proteosomale Degradation der IAPs (Yang et al. 2000).

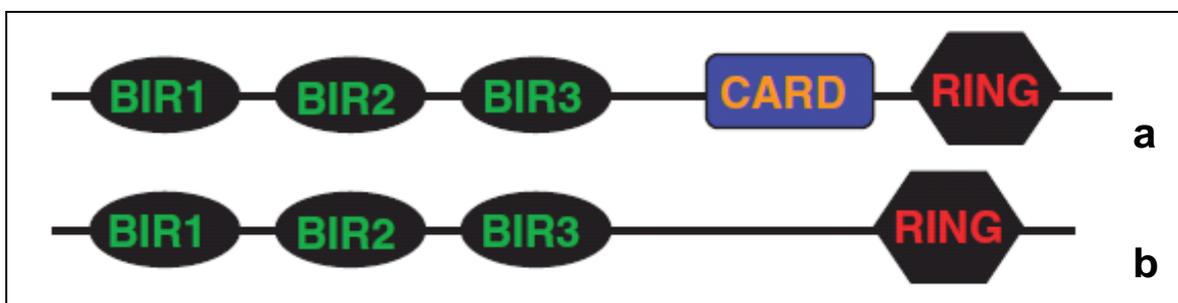


Abbildung 7: Schematische Darstellung von „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs): cIAP1/2 (a) und XIAP (b). Gezeigt sind die drei BIR Domänen sowie die RING Domänen, über die sowohl die „*cellular IAPs*“ (cIAPs) als auch „*X-chromosome-linked IAP*“ (XIAP) verfügen. Die cIAPs besitzen zudem eine CARD-Domäne. BIR= *baculoviral IAP repeat*; CARD= *caspase recruitment domain* RING= *really interesting new gene*. Aus: (LaCasse et al. 2008, S. 6253)

Durch Inhibition von Caspase 3 und 7 sind die IAPs negative Regulatoren des intrinsischen und des extrinsischen Apoptosewegs, die Hemmung der aktiven Caspase 9 hingegen inhibiert spezifisch den mitochondrialen Apoptoseweg. Proapoptotische Faktoren wie Smac/DIABLO und OMI/HtrA2, die wie Cytochrom c bei der Zelltodinduktion aus dem mitochondrialen Zwischenmembranspalt freigesetzt werden (van Loo et al. 2002), agieren wiederum im Rahmen der Apoptose als XIAP-Inhibitoren (Liston et al. 2003).

Insgesamt unterstreichen die dargestellten komplexen Zusammenhänge, die sich durch die Interaktion einer Vielzahl von am mitochondrialen Apoptoseweg beteiligten Proteinen ergeben, wie wichtig die präzise Regulation dieser Signalkaskade für das Überleben der Zelle ist.

1.2.3 Caspase 2

Die Rolle von Caspase 2 im Apoptosegeschehen wird in der Literatur bis heute kontrovers diskutiert. Anhand ihrer Substratspezifität ließe sie sich zu den Effektorcaspasen zählen (Thornberry et al. 1997). Sie verfügt jedoch wie Caspase 9 über eine CARD-Domäne und wird durch Dimerisierung und Autoproteolyse (Baliga et al. 2004), durch Zusammenlagerung in Proteinkomplexen (Tinel et al. 2004, Olsson et al. 2009), aber auch proteolytisch durch Caspase 3 (Harvey et al. 1996) aktiviert.

Caspase 2 scheint besonders bei der p53-vermittelten Apoptoseinduktion nach Auftreten von genotoxischem Stress eine zentrale Rolle zu spielen (Tinel et al. 2004). Ihre Aktivierung wurde darüber hinaus jedoch auch sowohl im Rahmen des mitochondrialen als auch des Rezeptor vermittelten Apoptosewegs beschrieben (Guo et al. 2002, Lavrik et al. 2006).

Die aktive Form von Caspase 2 vermittelt apoptotische Stimuli über ihre Wirkung auf die Mitochondrien. Ein wichtiges Substrat ist das BH3-only-Protein Bid (Upton et al. 2008), dessen Spaltprodukt, tBid, über die Interaktion mit weiteren proapoptotischen BH3-only-Proteinen eine Cytochrom c-Freisetzung induziert (Wei et al. 2000).

1.3 Zellzyklus

Der Zellzyklus wird definiert von einer Abfolge von Ereignissen, deren Ziel die Teilung der Zelle darstellt. Dysregulationen des Zellzyklus können zu einer unbeschränkten Zellproliferation führen und zur Entstehung von Krebserkrankungen beitragen (Vermeulen et al. 2003). Um die Integrität des Genoms zu erhalten, unterliegt der Zellzyklus deshalb einer strikten Regulation durch sogenannte „*checkpoints*“. Diese liegen in einzelnen Zellzyklusphasen. In der M-Phase (Mitose-Phase) findet die Zellteilung statt. Die übrigen Phasen, G₁-, S- und G₂-Phase, werden auch als Interphase zusammengefasst. In der S-Phase (Synthese-Phase) erfolgt die Replikation der DNA. In den G-Phasen („*Gap*“-Phasen) vor und nach der S-Phase kommt es zum Zellwachstum und das Genom wird auf Schäden oder Fehler überprüft. Nach der G₂-Phase folgt erneut eine S-Phase (Schwartz et al. 2005).

Eine positive Regulation des Zellzyklus erfolgt durch die Interaktion zwischen „*cyclin-dependent kinases*“, kurz CDKs, und spezifischen regulatorischen Proteinen, den Cyclinen. Eine Inhibition des Zellzyklus findet durch die Aktivität der CDK-Inhibitoren (CDKIs) statt (Schwartz et al. 2005). Eine Schädigung der DNA ist ein wichtiger Auslöser für einen Zellzyklusarrest. Dieser kann an drei Stellen im Zellzyklus auftreten: Ein Arrest

am *G₁/S-checkpoint* verhindert den Eintritt in die S-Phase und damit die Replikation beschädigter DNA. Ein Zellzyklusarrest während der S-Phase tritt bei Störungen bei der Replikation, aber auch bei DNA-Schäden auf. Zellen, die nach der Interphase Schäden an der DNA aufweisen, werden am *G₂/M-checkpoint* gestoppt, bevor die Mitose beginnt. So haben DNA-Reparaturmechanismen die zusätzliche Möglichkeit, die Schäden zu beheben (Li et al. 2005).

1.4 Doxorubicin

Doxorubicin gehört, wie z.B. auch Daunorubicin und Epirubicin, zur Gruppe der Anthrazykline und wurde zuerst aus Streptomyceten isoliert. Es zählt zu den zytostatisch wirksamen Antibiotika und wird bei einer Vielzahl solider Tumoren, wie Mamma- und Bronchialcarcinomen oder malignen Lymphomen eingesetzt (Aktories et al. 2009). Anthracycline schädigen die Zelle, indem sie zum einen in die DNA interkalieren und zu anderen die Bildung eines stabilen Komplexes aus DNA und Topoisomerase II induzieren (McClendon et al. 2007). Diese Komplexbildung führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen (Bigioni et al. 1994). Die Behandlung mit Doxorubicin führt außerdem zur Bildung freier Radikale, die ihrerseits DNA-Schäden induzieren können (Aktories et al. 2009). Wenn die durch Doxorubicin geschädigte DNA nicht mehr von der Zelle repariert werden kann, kommt es zur Induktion von Apoptose (Friesen et al. 2008b).

1.5 Opioide in der Behandlung von Krebspatienten

1.5.1 Schmerztherapie

25-30 % der Patienten mit einem neu diagnostizierten Malignom leiden aufgrund ihrer Erkrankung bereits an Schmerzen, in fortgeschrittenen Krebsstadien betrifft dies sogar 70-80 % der Patienten (Pharo et al. 2005). Erkennung und Behandlung von Krebs assoziierten Schmerzen ist somit eine wichtige Basis für eine erfolgreiche Therapie (Nersesyan et al. 2007). Die moderne Schmerztherapie basiert auf von der WHO vorgestellten Richtlinien, dem WHO Stufenschema (Abb. 8) (World Health Organization 1996).

Opioide nehmen im WHO-Schmerzschema eine zentrale Stellung ein, mittelstarke bis schwere Schmerzen erfordern entsprechend der Stufen 2 und 3 des Stufenschemas den Einsatz von schwach oder stark wirksamen Opioiden.

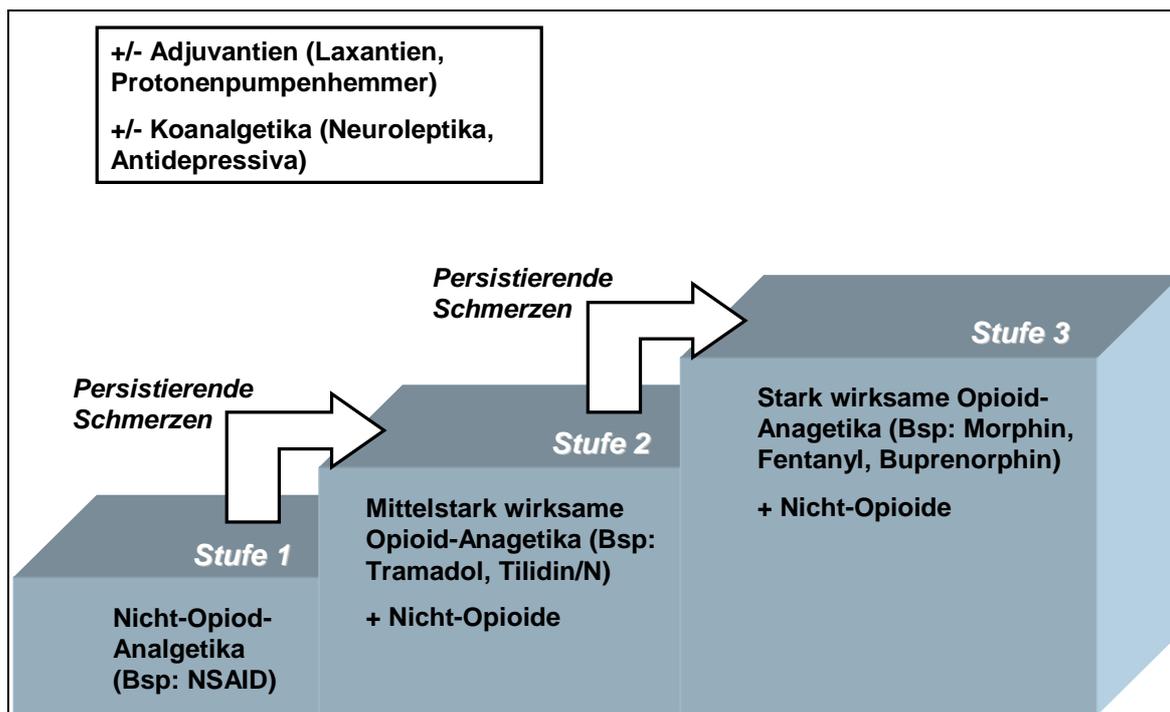


Abbildung 8: WHO-Stufenschema zur Behandlung von Schmerzen, dargestellt ist das therapeutische Vorgehen bei verschiedenen starken Schmerzzuständen. Schwächere Schmerzen sind nach Stufe 1 mit nicht-Opioidanalgetika wie den nicht steroidalen Antirheumatika (NSAIDs, z. B. Ibuprofen) oder Metamizol zu therapieren. Ist diese Therapie ungenügend, sind in der Stufe 2 des Schemas niedrigpotente Opioidanalgetika wie Tamadol oder Tilidin indiziert, zusätzlich werden die Nicht-Opioidanalgetika beibehalten. In der Stufe 3 des Stufenplans werden die niedrigpotenten Opioide mit hochpotenten Opioidanalgetika wie Morphin, Fentanyl, Buprenorphin oder Methadon ersetzt. Bei allen Stufen werden den Nebenwirkungen der analgetischen Therapie wie z. B. Obstipation oder Übelkeit durch die Opioidanalgetika mit Hilfe von Adjuvantien (Antiemetika, Laxantien) vorgebeugt. Insbesondere bei schweren Schmerzzuständen können Koanalgetika wie Neuroleptika indiziert sein, die z. B. neuropathische Schmerzen effektiv bekämpfen. Darstellung nach: (World Health Organization (WHO) 1996)

Schon in der Antike kannte man die analgetische, aber auch berauschende Wirkung des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), aus dem Opium gewonnen wird (Sauer et al. 2001). Opium enthält mehr als 40 verschiedene Alkaloide. Ein Hauptbestandteil ist Morphin, welches um 1804 aus Opium isoliert werden konnte und als Ausgangssubstanz für die Synthese vieler weiterer Substanzen wie z. B. Heroin gilt (Sauer et al. 2001). Als Opiate bezeichnet man die Verbindungen, die im Opium enthalten sind. Der Begriff Opioide hingegen umfasst morphinartig wirkende, natürliche Substanzen wie die Opiate und endogenen Opioidpeptide, aber auch die Gruppe der halbsynthetischen, durch chemische Modifikation von Morphin hergestellten Stoffe wie Hydromorphon und Heroin. Als dritte Gruppe fallen auch die vollsynthetischen Substanzen wie Buprenorphin, Levomethadon und Fentanyl unter die Bezeichnung Opioide (Sauer et al. 2001, Karow et al. 2008).

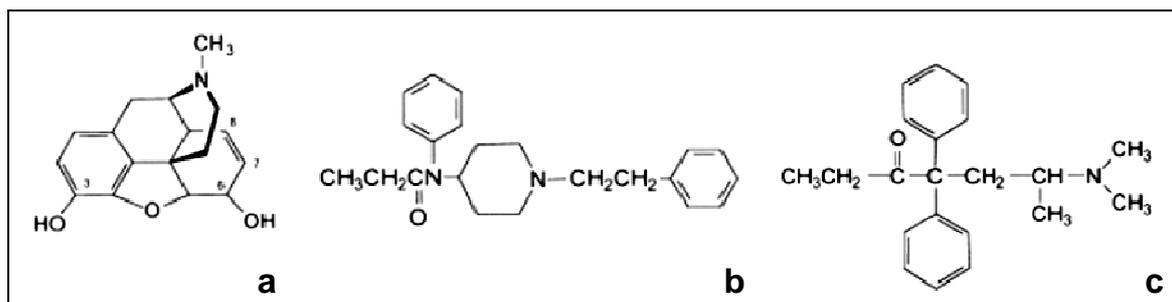


Abbildung 9: Strukturformel der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Opiode Morphin (a), Fentanyl (b) und Methadon (c) Aus: (Pasternak 2001, S. 221).

Morphin gilt heute als Standard-Opioid und ist Medikament der ersten Wahl bei der Behandlung von krebserkrankten Schmerzen nach Stufe 3 des WHO-Schmerzschemas (World Health Organization 1996). Die Wirkungen von Morphin werden hauptsächlich durch eine Aktivierung des μ -Opioidrezeptors vermittelt (Karow et al. 2008). Seine analgetische Wirkung entfaltet Morphin auf verschiedenen Ebenen der Schmerzverarbeitung im ZNS, wo es zum einen auf Ebene des Rückenmarks die synaptische Weiterleitung von aufsteigenden (afferenten) Schmerzreizen unterbricht, zum anderen deszendierende antinozizeptive Bahnen supraspinal aktiviert (Höllt et al. 2009). Weitere erwünschte oder auch unerwünschte Effekte von Morphin sind ebenfalls durch die μ -agonistische Wirkung zu erklären: ein Akutresultat der μ -Aktivierung ist Euphorie, die ein gewisses Abhängigkeitspotential besitzt; über Wirkung auf die Formatio Retikularis kommt es zur Sedierung. Miosis, Bradykardie, Blutdruckabfall, Übelkeit und Erbrechen sowie Obstipation und Harnverhalt sind typische unerwünschte Nebenwirkungen. Dosislimitierend wirkt die durch Morphin induzierte zentrale Atemdepression (Höllt et al. 2009). Morphin steht in verschiedenen Darreichungsformen zu Verfügung. Es unterliegt bei oraler Gabe einem hohen *First-Pass-Effekt* in der Leber und wird dort zum analgetisch potenteren, besser ZNS-gängigen Morphin-6-Glukuronid bzw. zu Morphin-3-Glukuronid umgebaut, dem eher unerwünschte Nebenwirkungen zugeschrieben werden (Nersesyan et al. 2007). Therapeutische Plasmakonzentrationen von Morphin bei Schmerzpatienten unterliegen vielen Variablen, die gemessenen Werte schwanken stark. Als Mittelwerte der therapeutischen Konzentrationen werden durchschnittliche Plasmaspiegel von umgerechnet ca. $0,078\mu\text{g/ml}$ (McQuay et al. 1990) bzw. $0,069\mu\text{g/ml}$ (Faura et al. 1996) angegeben.

Erst wenn unter Morphingabe durch Dosiserhöhungen etc. keine ausreichende Analgesie mehr möglich ist, wird empfohlen, auf andere Opiode auszuweichen, wobei die

Behandlung mit Fentanyl eine moderne und effektive Alternative darstellt (Nersesyan et al. 2007).

Fentanyl besitzt an den Opioidrezeptoren ein ähnliches Wirkprofil wie Morphin, hat im Vergleich zu Morphin jedoch eine über 100-fach stärkere analgetische Potenz (Karow et al. 2008) und wirkt bei entsprechender Dosierung stark atemdepressiv (Karow et al. 2008). Aufgrund seiner hohen Lipophilie flutet es im ZNS schnell an und wird sekundär auch schnell wieder in die Peripherie umverteilt (Karow et al. 2008). Deswegen kann bei einer Darreichungsform, bei der Fentanyl rasch resorbiert wird, z. B. über die Mundschleimhaut, innerhalb von Minuten eine Schmerzlinderung erreicht werden, die innerhalb einer Stunde abklingt (Bredenberg et al. 2003, Karow et al. 2008). Typischerweise wird Fentanyl jedoch auch transdermal über Pflaster verabreicht, mittels derer die Substanz langsam über mehrere Tage freigesetzt wird. So kann eine „Basisanalgesie“ erreicht werden (Nersesyan et al. 2007).

Die therapeutischen und toxischen Plasma- bzw. Serumkonzentrationen von Fentanyl werden in der Literatur mit unterschiedlichen Werten angegeben und betragen 0,001-0,01 µg/ml (therapeutisch) (Repetto et al. 1997, Winek et al. 2001, TIAFT 2004) bzw. 0,002-0,017 µg/ml (toxisch) (Poklis 1995, Repetto et al. 1997, TIAFT 2004).

Das synthetische Opioid Methadon wurde bisher als Ersatzsubstanz bei der Behandlung Opioidabhängiger mit Erfolg eingesetzt (Krantz et al. 2004) und gilt außerdem als Alternativopioide bei der Behandlung starker Schmerzen (Karow et al. 2008). Es wirkt wie Morphin hauptsächlich über den μ -Opioidrezeptor, allerdings bei doppelter analgetischer Potenz (Karow et al. 2008). Eine Besonderheit des Methadons ist seine antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor und die damit einhergehende verbesserte Wirksamkeit gegen neuropathische Schmerzen (Soares 2005). Weitere Vorteile sind die hohe orale Bioverfügbarkeit, fehlendes Auftreten aktiver Metabolite sowie relativ niedrige Kosten. Die individuelle Pharmakokinetik gilt beim einzelnen Patienten jedoch als schwer vorhersehbar und die Ausscheidung dauert lange, so dass die Handhabung von Methadon relativ schwierig ist (Soares 2005).

Ein häufiges Problem bei der Tumorschmerztherapie mit langwirksamen Präparaten sind Durchbruchschmerzen, die als akut einsetzend und intensiv beschrieben werden, jedoch nach relativ kurzer Zeit wieder abklingen (Payne 2007). In einer internationalen, multizentrisch konzipierten, prospektiven Studie an Krebspatienten gaben ca. 65 % der Befragten an, unter Durchbruchschmerzen zu leiden (Caraceni et al. 1999). Zur Behandlung von Durchbruchschmerzen werden schnell verfügbare, eher kurz wirksame,

potente Opioide als Bedarfsmedikation eingesetzt. Hierzu gehört z. B. unretardiertes Morphin, aber auch buccal appliziertes Fentanyl. Es konnte gezeigt werden, dass Fentanyl Durchbruchschmerzen wirksamer bekämpft als unretardiertes Morphin (Coluzzi et al. 2001).

1.5.2 Apoptoseinduktion durch Opioide in Krebszellen

Ein weiterer Aspekt bei der Behandlung von Krebspatienten mit Opioiden stellt die erst seit kurzem bekannte Zytotoxizität mancher Substanzen gegenüber Krebszellen dar. Friesen et al konnten zeigen, dass insbesondere Methadon Apoptose in Leukämiezellen induziert (Friesen et al. 2008a). Dies konnte nicht nur für sensible, sondern auch für Doxorubicin- und apoptoseresistente Leukämiezellen nachgewiesen werden, wobei gesunde periphere Blutlymphozyten bei gleicher Behandlung keinem Zelltod unterlagen (Friesen et al. 2008a).

Des Weiteren sensitiviert Methadon auch Glioblastomzelllinien für eine Apoptoseinduktion durch Doxorubicin (Hormann et al. 2010).

Weitere Studien zeigten, dass Fentanyl und Buprenorphin Apoptose in Leukämiezellen induzieren bzw. diese ebenfalls für Doxorubicin sensitivieren (Drost 2009, Hagemeyer 2009).

1.6 Opioidrezeptoren

Seit dem ersten Nachweis von Opioid-Bindungsstellen im ZNS konnten verschiedene Typen von Opioidrezeptoren beschrieben werden. Heute sind vier zur Familie der Opioidrezeptoren gehörende Membranproteine bekannt: der μ -, der κ - und der δ -Opioidrezeptor sowie der „*opioid-receptor-like 1*“ (ORL-1)-Rezeptor. Die Ersteren sind die klassischen Opioid-Bindungsstellen, die pharmakologisch hauptsächlich genutzt werden und die ca. 60 % Sequenzhomologien untereinander aufweisen (Höllt et al. 2009).

Der Großteil der pharmakologisch beobachtbaren erwünschten Opioidwirkungen wie Analgesie, aber auch viele der unerwünschten Nebenwirkungen werden durch den μ -Opioidrezeptor vermittelt (Höllt et al. 2009).

Zusätzlich zur Unterteilung der Opioidrezeptoren in μ -, κ - und δ -Rezeptoren konnten für den μ -Opioidrezeptor verschiedene Subtypen identifiziert werden. Der $\mu 1$ -Rezeptor bindet mit hoher Affinität μ -Agonisten wie Morphin (Pasternak 2001) und vermittelt supraspinale und systemische Analgesie, während die spinal vermittelte Analgesie nicht beeinflusst wird (Pasternak 1993). Der $\mu 2$ -Rezeptor hat eine schwächere Bindungsaffinität für

Morphin unterscheidet sich vom μ_1 -Rezeptor auch durch unterschiedliche Ligandenselektivität. Er spielt eine zentrale Rolle bei der Analgesie auf spinaler Ebene und vermittelt typische Nebenwirkungen wie Atemdepression und Obstipation (Pasternak 1993). Der dritte Subtyp, μ_3 , konnte zuerst auf Immunzellen nachgewiesen werden (Stefano et al. 1993a). Er bindet spezifisch Opioid-Alkaloide wie Morphin, jedoch keine Opioidpeptide (Stefano et al. 1993a) und wird nicht nur auf Monozyten (Stefano et al. 1993b), sondern auch auf Granulozyten (Makman et al. 1995) und Gefäßendothelzellen (Stefano et al. 1995) exprimiert. Seine Aktivierung führt unter anderem zur Bildung von NO (Cadet et al. 2003) und wirkt damit z. B. in Gefäßendothelzellen vasodilatatorisch (Stefano et al. 1995), außerdem hat er immunmodulatorische Effekte (Stefano et al. 1993a).

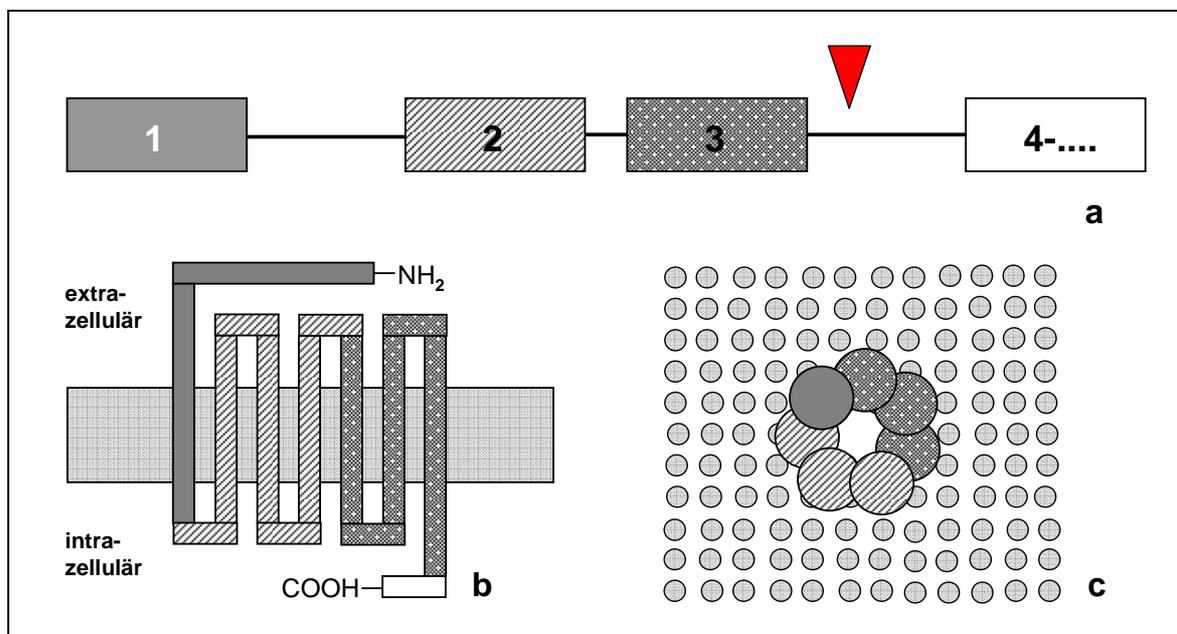


Abbildung 10: Schematische Darstellung des MOR-Gens und dessen Genprodukt. Zu erkennen ist (a) das μ -Opioidrezeptor 1 (MOR-1)-Gen mit seinen Exons und der μ -Opioidrezeptor (b) von der Seite und (c) von extrazellulär betrachtet. Die Muster der Exons entsprechen den von ihnen codierten Rezeptordomänen; der rote Pfeil in (a) bezeichnet den häufigen Ansatzpunkt des alternativen Spleißens. Darstellung nach (Pasternak 2001, S.224)

Neben diesen eher funktionellen Unterschieden wurden bereits zahlreiche, durch alternatives Spleißen entstandene Varianten des μ -Opioidrezeptors beschrieben (Abb. 10). Das MOR-1-Gen, welches für den μ -Opioidrezeptor codiert, besteht aus mindestens dreizehn Exons (Xu et al. 2009), wobei die Exons eins bis drei für den extrazellulären und den transmembranären Anteil des Rezeptor codieren (Abb. 10). Der intrazelluläre Anteil wird von den zahlreichen anderen Exons codiert (Pasternak 2001). Dies wird durch

alternatives Spleißen am 3'-Ende der mRNA reguliert und führt zu einer Vielzahl von μ -Opiod-Rezeptoren, die zwar aufgrund ihrer identischen Bindungsdomänen ähnliche Ligandenaffinitäten aufweisen, bei denen aber die G-Protein-Aktivierung durch verschiedene μ -Agonisten sehr unterschiedlich ist (Bolan et al. 2004, Pan et al. 2005). Diese Rezeptorvarianten zeigen unterschiedliche Expressionsmuster innerhalb des ZNS (Abbadie et al. 2000a, Abbadie et al. 2000b).

Die Opioidrezeptoren gehören zu dem G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie sind charakterisiert durch sieben Transmembrandomänen, wobei das carboxyterminale Ende intrazellulär liegt und der N-Terminus sich auf der extrazellulären Seite befindet (Abb. 10) (Connor et al. 1999). Nach Aktivierung der Opioidrezeptoren kommt es durch Interaktion mit G-Proteinen der G_i - und G_o -Familie zur Signaltransduktion (Connor et al. 1999). Die G-Proteine (*Guanine-nucleotide binding proteins*) liegen am inaktiven Rezeptor als Heterotrimer vor, bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Bei Aktivierung des Rezeptors durch Bindung eines Agonisten kommt es an der α -Untereinheit zum Austausch des zuvor gebundenen GDPs mit GTP, was die Dissoziation der G_α - und der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit bewirkt (Abb. 11 (a) und (b)) und die Interaktion mit verschiedener Effektoren ermöglicht. Die Hydrolyse des GTP durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit beendet diese Aktivität und die Untereinheiten bilden erneut ein Heterotrimer (Siderovski et al. 2005).

Im Falle der Bindung eines μ -Rezeptoragonisten hemmen die dissoziierten G-Protein-Untereinheiten unter anderem die Adenylatzyklase, wodurch der zelluläre Anteil des *second messengers* cAMP sinkt (Johnson et al. 1994). Dies hat beispielsweise einen inhibitorischen Effekt auf die Na^+/K^+ -ATPase zur Folge (Woolcock et al. 2006). Außerdem kommt es zur Aktivierung einwärts gerichteter Kaliumkanäle (Ikeda et al. 2000). Die Modulation von Ionenkanälen stellt einen wesentlichen Mechanismus dar, über den Opioid-Agonisten die Weiterleitung von Schmerzreizen unterbinden (Ikeda et al. 2000).

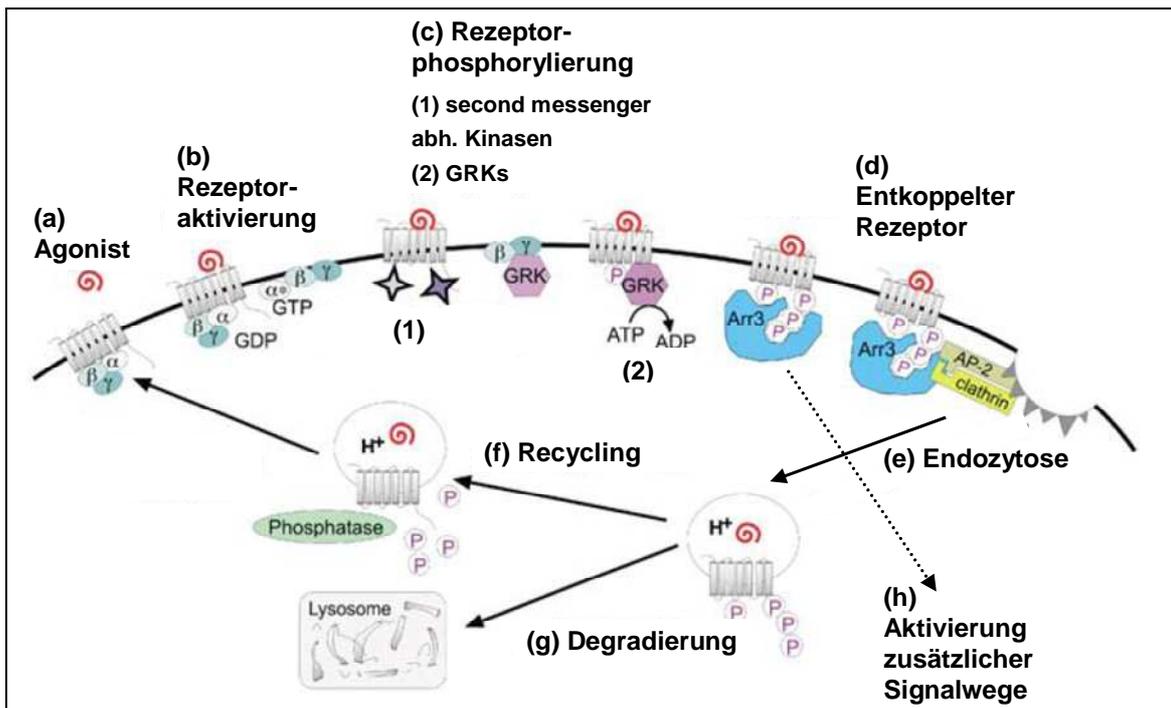


Abbildung 11: Schematische Darstellung von Regulationsvorgängen am μ -Opioidrezeptor. Gezeigt ist (a), (b) die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten, (c) Phosphorylierung durch (1) *second messenger* abhängige Kinasen wie z. B. Proteinkinase C oder (2) „*G-Protein-coupled receptor kinases*“ (GRKs) und (d) konsekutive Anlagerung von β Arrestin. Diese vermittelt (h) sowohl weitere Signaltransduktion, als auch (e) Endozytose des Rezeptors, wonach dieser entweder (f) dephosphoryliert und wieder funktionsfähig, oder (g) degradiert wird. Modifiziert nach: (Connor et al. 2004, S. 686)

Durch Aktivierung verschiedener Signalkaskaden über den aktivierten μ -Rezeptor kann es zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der zu den „*mitogen activated protein kinases*“ (MAPKs) gehörenden „*extracellular signal regulated kinases*“ (ERKs) kommen. Enzyme, die vom μ -Opioidrezeptor aktiviert werden und ERK phosphorylieren können, sind z. B. die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (Lopez-Ilasaca et al. 1997), die Phospholipase C (Smart et al. 1995), aber auch die Proteinkinase C (Belcheva et al. 2005). Ähnliche Effekte wurden auch nach der Assoziation von β -Arrestin an dem Rezeptor beobachtet (Zheng et al. 2008). Typische Ziele sind hierbei Transkriptionsfaktoren, aber auch Apoptoseregulatoren der Bcl-2 Familie (Pimienta et al. 2007).

Für die Regulation der Rezeptor vermittelten Signaltransduktion ist die durch Agonistenbindung induzierte Desensitivierung von zentraler Bedeutung (Abb. 11(c) bis (g)). Nach dem klassischen Modell werden hierbei nach verlängerter Agonistenbindung intrazelluläre Rezeptordomänen phosphoryliert (Clever et al. 2001). Dies kann sowohl durch GRKs (*G-protein-coupled receptor kinases*), als auch durch *second messenger*

aktivierte Kinasen wie die Proteinkinase C erfolgen (Kramer et al. 1999, Celver et al. 2001).

Es kommt zur für die Endozytose notwendige Anlagerung von β -Arrestin an die Phosphatreste (Whistler et al. 1998) und zur damit verbundenen Entkopplung des Rezeptors von den assoziierten G-Proteinen (Whistler et al. 1998, Celver et al. 2001). Es zeigte sich, dass verschiedene Agonisten am μ -Opioidrezeptor bezüglich dieser Desensitivierungs- und Internalisierungsvorgänge unterschiedlich effektiv sind (Yu et al. 1997, Borgland et al. 2003).

Diese Vorgänge sind nicht nur für die Regulation der primär stattfindenden Signaltransduktion von großer Bedeutung, sondern spielen auch bei sekundären, G-Protein unabhängigen und β -Arrestin abhängigen Signalwege eine Rolle (Ignatova et al. 1999, Macey et al. 2006). Über diesen alternativen Weg kann es beispielsweise ebenfalls zur Aktivierung von MAPKs kommen (Zheng et al. 2008).

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, anknüpfend an die bereits vorhandenen Erkenntnisse über die Apoptoseinduktion in Krebszellen durch Methadon, das Potential des Standardopioids Morphin hinsichtlich einer Apoptoseinduktion in Leukämie- und Glioblastomzellen zu untersuchen und herauszufinden, ob Krebszellen durch Behandlung mit Morphin für Zytostatika sensitiviert werden können. Außerdem sollte in der Kombination zweier Opioide das bisher noch nicht untersuchte Zusammenwirken dieser Substanzen auf den Zelltod in Leukämiezellen analysiert werden. Weitere Studien sollten die molekularen Mechanismen beleuchten, die bei der Apoptoseinduktion durch Opioide eine Rolle spielen, um so neue Ansätze für die Therapie von Malignomen zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits

Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits	Bezugsquelle
Aqua ad iniectabilia (1000 ml) (2703452)	B. Braun AG, Melsungen
Ampuwa Spüllösung (7151-4)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Antipain (A-6191)	Sigma, St. Louis, Steinheim
Alkoholische Schnelldesinfektion, DESOMED RAPID AF (N-22330)	DESOMED Dr.Trippen GmbH, Freiburg
BCA Protein Assay Kit (23225)	Pierce, Rockford
BD FACSFlo TM (342003)	BD Biosciences, Ontario
BSA, Albuminstandard (23209)	Pierce, Rockford
Chymostatin (C-7268)	Sigma, St. Louis, Steinheim
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) (99,5 %) (D-4540)	Sigma, St. Louis, Steinheim
D, L-Dithiothreitol, (D, L-DTT) (D-0632)	Sigma, St. Louis, Steinheim
Doxorubicin-HCl \geq 98 % (D-1515)	Sigma, St. Louis, Steinheim
DMEM 21969	Gibco, Auckland
ECL TM Western Blotting Detection Reagents (RPN 2106)	GE Healthcare, Buckinghamshire
FACS Clean (340345)	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse (340346)	BD Biosciences, Heidelberg
Fentanyl-Citrat (700955-0001)	Fa. Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel

Fetales bovines Serum (FBS)	Lonza, Verviers
Charge 5SB0010 (DE14-801F)	
Glycerol \geq 98 %, wasserfrei (7530.1)	Roth, Karlsruhe
Glycin min. 99,5 % p.a. (A1377, 1000)	AppliChem, Darmstadt
HEPES-Buffer 1 M (L1613)	Biochrom AG, Berlin
Leupeptin (L-2884)	Sigma, St. Louis, Steinheim
L-Glutamine 200 mM (25030)	Gibco (Invitrogen Corporation), Auckland
Magermilchpulver (T145.2)	Roth, Karlsruhe
D, L-Methadon Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Methanol, puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO reag. Ph. Eur., \geq 99.8 % (GC) (32213)	Sigma-Aldrich, Seelze
Morphin-Hydrochlorid-Trihydrat (176751-0004)	Fa. Fagron Gmbh & Co KG, Barsbüttel
Naloxon-Fluoreszin N1384	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) p.A. (1.06404.0500)	Merck, Darmstadt
Novex [®] Sharp Protein Standard (LC5800)	Invitrogen Carlsbad
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4x) (NP0007)	Invitrogen, Carlsbad
NuPAGE [®] MES SDS Running Buffer (20x) (NP0002)	Invitrogen, Carlsbad
NuPAGE [®] Novex [®] 4-12 % Bis-Tris Midi Gel (WG1403BOX)	Invitrogen, Carlsbad
PBS-Dulbecco (Phosphate buffered saline) (1x) (L1825)	Biochrom AG, Berlin
PBS-Dulbecco (Phosphate buffered saline) Instamed 9,55 g/l (L182-50)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (15140-122)	Gibco BRL Life, Auckland
Pepstatin A (P-4265)	Sigma, St. Louis, Steinheim

Phenylmethanesulfonyl (PMSF) (P-7626-250MG)	Sigma, St. Louis, Steinheim
Propidiumjodid 95-98 % (P-4170)	Sigma, St. Louis, Steinheim
ProSieve [®] , Color protein markers (50550)	Cambrex, Rockland, Maine
Restore [™] Western Blot Stripping Buffer (21059)	Pierce, Rockford
RPMI-1640 Medium (31870-025)	Gibco, Auckland
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (20760)	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat p.a. (1.06448.0500)	Merck, Darmstadt
Tris Base Ultrapure (75825)	USB Corporation, Cleveland
Tris Hydrochloride (Tris-HCl) Ultrapure (15506-017)	Gibco BRL (Life Technologies), Grand Island, Paisley
Triton X-100 (X-100-100ML)	Sigma, St. Louis, Steinheim
Trypsin/EDTA-Solution 0,05 %/ 0,02 % (L2143)	Biochrom AG, Berlin
Tween 20 (8.22184.0500)	Merck, Hohenbrunn
Wasser für Infusionszwecke (100 ml)	GlaxoSmithKline, München
Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (N-1510)	Bachem AG, Bubendorf

2.1.2 Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller
6-Wellplatten (353502)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
12-Wellplatten (353043)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
24-Wellplatten (353047)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
96-Wellplatten (353072)	Becton Dickinson, Franklin Lakes

Amersham Hyperfilm™ ECL™ (28906837)	GE Healthcare, Buckinghamshire
BD CellQuest™ Pro, Version 5.2.1	BD Biosciences, Ontario
Blotting-Apparatur, Trans-Blot® SD Cell	BIO-RAD, Kalifornien
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus, Hanau
Brutschrank Function line	Heraeus, Hanau
Combitips plus 1ml (0030069.439), 2,5ml (0030069.447), 5ml (0030069.455)	Eppendorf AG, Hamburg
Decontamination Solution (S 232444)	DakoCytomation, Glostrup
Einmal-Injektions-Kanüle, 100 Sterican®, Gr.1 (4657519)	B. Braun AG, Melsungen
Elektrophoresekammer Criterion Cell	BioRad, München
Entwicklermaschine, Optimax 2010 X-Ray Film Processor	Protec Medizintechnik GmbH, Oberstenfeld
Eppendorf Cups, Safe-Lock Tubes 1,5 ml (0030120.086)	Eppendorf AG, Hamburg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Falcon®-Tube 50ml (352070)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Falcon®-Tube 15ml (352095)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Fireboy plus	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Gaskartuschen CV 360 Butane	Campingaz, Givisiez
Gel Blotting Papier GB 002	Whatman, Dassel
Hybond™ ECL™ Nitrocellulose membrane (RPN 303D)	Amersham Biosciences, Buckinghamshire
Hypercassette™ ECL™	Amersham Biosciences, Buckinghamshire

Laborflaschen SCHOTT DURAN [®] 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Inverses Lichtmikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Magnetrührer IKA [®] RCT basic	IKA-Werke, Staufen
Membran-Vakuumpumpe AZ04	HLC BioTech, Bovenden
Messbecher, Duran [®] 50 ml, 100 ml, 250 ml, 600 ml, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Messzylinder, PP 100 ml, 500 ml, 1000 ml	Vitlab, Grossostheim
Midi Gel Adapter	Invitrogen, Carlsbad
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Hera Safe HS 12	Heraeus, Hanau
Mikrotiterplattenleser, Expert Plus Microplate reader	ASYS Hitech GmbH, Eugendorf
Mikrozentrifuge (DW-41-230)	Qualitron Inc., Sylvania
Multipipette [®] plus	Eppendorf AG, Hamburg
Netzgerät, PowerPac Basic [™]	BioRad, Hercules
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1mm	Assistent, Sondheim
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	BRAND, Wertheim
Parafilm „M“	Pechiney, Chicago
pH Meter 744	Metrohm AG, Hennisau
Pipettierhelfer, Accu-Jet [®]	BRAND, Wertheim
Pipetten, Labmate 2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Abimed GmbH, Langenfeld
Pipetten, Pipetman [®] 2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000µl	Gilson, Middleton
Pipettenspitzen, Precision tips 10µl (PNC8/23403), 200µl (QWG8/76228), 1000µl (LNA6/23476)	Gilson, Middleton

Polystyrene Round-Bottom Tube, 5ml (352008)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Schüttelgerät, Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Serologische Einwegpipetten, Costar [®] Stripette [®] , 1ml, 2ml, 5ml (4487), 10ml (4488), 25ml (4489)	Corning, New York
Spritzen, Injekt Einmalspritzen, 2ml (4606027V), 5ml (4606051V), 10ml (4606108V)	B. Braun AG, Melsungen
Spritzen, Luer-Lok [®] Spritzen, 20 ml, 50 ml	BD Drogheda, Ireland
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S (10462200)	Whatman GmbH, Dassel
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK510	BANDELIN electronic GmbH & Co KG, Berlin
Vortexer, MS 1 Minishaker	IKA, Taquara
Zellkulturflaschen 75 cm ² (353236)	BD Biosciences, Bedford
Zellkulturflaschen 175 cm ² (353028)	BD Biosciences, Bedford
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Function line	Heraeus, Hanau

2.1.3 Zellkulturmedium, Puffer, Substanzen

Die angesetzten Lösungen und Puffer wurden, falls nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur gelagert.

Zellkulturmedium RPMI, 10 % FCS (500 ml), gelagert bei 4°C

- RPMI-1640 Medium (430 ml)
- 10 % FCS (50 ml FCS (hitzeinaktiviert, sterilfiltriert))
- 100 Units/ml Penicillin G; 100 µg/ml Streptomycin (5 ml Penicillin-Streptomycin (Gibco) (sterilfiltriert))
- 1 mM L-Glutamin (2,5 ml 200 mM L-Glutamin (sterilfiltriert))
- 25 mM HEPES-Puffer (12,5 ml 1 M HEPES-Puffer (sterilfiltriert))

Zellkulturmedium DMEM, 10 % FCS (500 ml), gelagert bei 4°C

- DMEM Medium (430 ml)
- 10 % FCS (50 ml FCS (hitzeinaktiviert, sterilfiltriert))
- 100 Units/ml Penicillin G; 100 µg/ml Streptomycin (5 ml Penicillin-Streptomycin, Gibco (sterilfiltriert))
- 1 mM L-Glutamin (2,5 ml 200 mM L-Glutamin (sterilfiltriert))
- 25 mM HEPES-Puffer (12,5 ml 1 M HEPES-Puffer (sterilfiltriert))

Nicoletti-Puffer (10 ml):

- 0,05 % Triton X-100 (5 ml 0,1 % Triton-X-100-Lösung)
- 0,05 % Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (5 ml 0,1 % Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung)
- 50 µg/ml Propidiumjodid (500 µl einer 1 mg/ml Propidiumjodid-Lösung), gelagert bei 4°C

Lysepuffer zur Proteinherstellung (100 ml), gelagert bei 4°C

- 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 (3 ml 1 M Tris-HCl)
- 150 mM NaCl (3 ml 5 M NaCl)
- 1 % Triton X-100 (1 ml Triton X-100)
- 10 % Glycerol (10 ml Glycerol)

Pro 1 ml Lysepuffer kurz vor Gebrauch zugesetzt (Zusätze zuvor bei -20°C gelagert)

- 2 mM DTT (2 µl 1 M DTT-Lösung)
- 500 µM PMSF (5 µl 100 mM PMSF-Lösung)
- 1 µg/ml SPI (10 µl 0,1 mg/ml SPI)

SPI Proteasen-Inhibitor Mischung (50 ml), gelagert bei -20°C

- 5 mg Leupeptin in 1 ml Aqua ad iniectabilia
- 5 mg Antipain in 1 ml Aqua ad iniectabilia
- 5 mg Chymostatin in 1 ml DMSO
- 5 mg Pepstatin A in 1 ml DMSO
- Aqua ad iniectabilia (ad 50 ml)

Laufpuffer (1x Running Buffer) (1000 ml):

- 1x NuPAGE[®] MES SDS Running Buffer (50 ml 20x NuPAGE[®] MES SDS Running Buffer)
- Aqua ad iniectabilia (950 ml)

Ladepuffer:

- NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4x)

Western-Transfer-Puffer (Blotting Puffer) (1000 ml):

- 48 mM Tris Base (5,8 g Tris Base)
- 39 mM Glycin (2,9 g Glycin)
- 0,037 % SDS (3,7 ml 10 % SDS)
- 20 % Methanol (200 ml Methanol)
- Aqua ad iniectabilia (ad 1000 ml)

Waschpuffer (1000 ml):

- 0,1 % Tween 20 (1 ml Tween 20)
- 1x PBS (ad 1000 ml)

Blockingpuffer (500 ml):

- 5 % Magermilchpulver (25 g)
- 1x PBS (500 ml)
- 0,1 % Tween 20 (0,5 ml Tween 20)

Strippingpuffer:

- Restore[™] Western Blot Stripping Buffer von Pierce, Rockford

Morphin-HCl-/ Fentanyl-Citrat-/ D, L-Methadon-HCl-Lösung:

Die in Pulverform bezogenen Substanzen (Morphin, Fentanyl, Methadon) wurde unmittelbar vor Versuchbeginn in sterilem Aqua ad iniectabilia gelöst und so eine

Stocklösung (1 mg/ml) hergestellt; diese wurde sterilfiltriert und mit Aqua ad iniectabilia auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Doxorubicin-HCl-Lösung

Das Doxorubicin-HCl-Pulver (Doxorubicin) wurde mit Aqua ad iniectabilia zu einer Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und anschließend mit Versuchsmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

zVAD-Lösung (50 mM Stocklösung, gelagert bei 4°C)

- 5 mg Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (zVAD), gelagert bei 4°C
- 212,5 µl DMSO

Naloxon-Fluoreszin (1mM Stocklösung, gelagert bei -20°C)

- 5 mg Naloxon-Fluoreszin (gelagert bei -20°C)
- 6,3 ml EtOH

2.1.4 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper mit Angabe von Serumtyp (m=mouse; r=rabbit), Verdünnung (mit Waschpuffer (WP) oder Blockingpuffer (BP)), Bestellnummer und Hersteller.

Primärantikörper (Serumtyp)	Verdünnung	Bestell- nummer	Hersteller
Anti-aktive Caspase 9 (r)	1:200 BP	AB3629	Chemicon
Anti-β-Aktin (m)	1:5000 WP	A-5441 Clone AC- 15	Sigma-Aldrich
Anti-Bax (r)	1:250 BP	PC 66- 100µg	Calbiochem
Anti-Bcl-x _{S/L} (r)	1:500 BP	sc-1041	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Caspase 2 (m)	1:1000 BP	611022	BD Transduction Laboratories
Anti-Caspase-3 (r)	1:1000 BP	9662	Cell-Signaling Technology
Anti-Caspase-8 (m)	1:1000 BP	9746	Cell-Signaling Technology
Anti-Caspase-9 (r)	1:1000 BP	9502	Cell-Signaling Technology

Anti-Caspase 10 (m)	1:1000 BP	MO-593 Clone 4C1	MoBiTec
Anti-Fas-Ligand (m)	1:250 WP	556387	PharMingen
Anti-FAS-Rezeptor (m)	1:1000 WP	610198	BD Transduction Laboratories
Anti-XIAP (hILP) (m)	1:1000 WP	610-716 Clone 28	BD Transduction Laboratories
Sekundärantikörper			
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:5000 WP	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:5000 WP	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5 % CO₂ in 75 cm² bzw. 175 cm² Kulturflaschen kultiviert und jeden dritten bzw. vierten Tag mit frischem Medium verdünnt, um die für jede Zelllinie optimale Zelldichte herzustellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank mit sterilen Materialien, um eine Kontamination der Kulturen mit Bakterien, Pilzen etc. zu vermeiden.

Leukämiezellen

Für die Versuche wurden sowohl die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 als auch die lymphatische Leukämiezelllinie CCRF-CEM (CEM) eingesetzt. Die CEM-Leukämiezellen wurden 1964 aus dem Blut eines an akuter lymphoblastischer T-Zell-Leukämie erkrankten 3-jährigen kaukasischen Mädchens isoliert (Foley et al. 1965), die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 hingegen stammt aus dem peripheren Blut einer 1976 an akuter myeloischer Leukämie erkrankten 35-jährigen Frau (Collins et al. 1977). Die Zellen wurden in supplementiertem RPMI Zellkulturmedium (10 % FCS) kultiviert und regelmäßig mit neuem Medium verdünnt, um so die optimale Zelldichte von ca. 5×10^5 Zellen/ml herzustellen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Umsetzmodus der Leukämiezellen in supplementiertem RPMI

	HL-60	CEM
3 Tage	1:15	1:10
4 Tage	1:30	1:15

Glioblastomzellen

Für weitere Versuche wurde die adhärenente Glioblastomzelllinie A172 eingesetzt. Diese Zelllinie wurde aus dem Gehirn eines 53-jährigen Mannes mit einem Glioblastom kultiviert (Giard et al. 1973).

Die Zellen wurden in supplementiertem DMEM kultiviert und ebenfalls regelmäßig ausverdünnt, damit der Zellbewuchs nicht zu dicht wurde. Hierzu wurde abwechselnd jeden dritten bzw. vierten Tag das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, bevor sie mit 4 ml Trypsin bei 37°C für 3 min vom Flaschenboden abgelöst und wieder in frischem Medium aufgenommen wurden. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Zellen mit Medium stets im Verhältnis 1:4.

2.2.2 Versuchsansätze

Um optimale Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Zellen am Tag vor Versuchsbeginn nochmals mit frischem Kulturmedium versorgt, damit diese die Möglichkeit zur Proliferation hatten und keine zu hohe Zelldichte aufwiesen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Umsetzmodus der Versuchszellen am Tag vor Versuchbeginn

	HL-60	CEM	A172
1 Tag	1:5	1:4	Mediumwechsel

Leukämiezellen

Für Versuche mit durchflusszytometrischer Analyse der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 und der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM wurden diese, abhängig vom angestrebten Analyseverfahren, in 96er, 24er oder 12er Wellplatten ausplattiert. Dies entspricht Endvolumina im Well von 100 µl (96er Wellplatte) bzw. 1 ml (24er Wellplatte) bzw. 2 ml (12er Wellplatte). Die eingesetzte Zellkonzentration im Well betrug, abhängig

von Inkubationszeiten, entweder $0,5 \times 10^4$ Zellen pro ml (Inkubationszeitraum 96 h -168 h) oder 1×10^5 Zellen pro ml im Kurzzeitversuch (Inkubationszeitraum 24 h-72 h).

Zur Isolierung von Proteinen wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (175 cm^2) in einer Dichte von $0,5 \times 10^4$ Zellen pro ml ausplattiert. Es wurde ein Endvolumen von 90 ml eingesetzt.

Um eine Vergleichbarkeit der Flaschenversuche mit den Wellversuchen zu gewährleisten, wurden auch aus diesen Ansätzen Proben für FSC/SSC- und Nicoletti-Analysen entnommen.

Glioblastomzellen

Die A172-Zellen wurden stets mittels Nicoletti-Methode analysiert (s.u.). Hierzu wurden diese 24 h vor der Zugabe von Morphin etc. in einer Dichte von $7000/\text{cm}^2$ in 12er Wellplatten (4 cm^2 Grundfläche) ausplattiert, entsprechend einer Zellzahl von $2,8 \times 10^4$ Zellen pro Well bei einem Gesamtvolumen von 2 ml pro Well.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl pro ml wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wie folgt ermittelt:

- Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert der gezählten Werte gebildet.
- Es gilt:

$$\text{Mittelwert} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

Für die Wellversuche wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium die gewünschte Zellzahl eingestellt; bei Ansätzen in Kulturflaschen wurde das nötige Volumen mit der gewünschten Zellzahl direkt entnommen. Die jeweils angestrebte Zellzahl richtete sich nach der geplanten Inkubationsdauer sowie der eingesetzten Zelllinie und wurde im Detail bereits oben erläutert.

Behandlung der Zellen mit Morphin oder Methadon alleine oder in Kombination mit Doxorubicin oder mit Fentanyl

Nach dem Ausplattieren der Zellen wurde Versuchmedium wie folgt zugegeben: Bei den unbehandelten Kontrollen wurde soviel Medium zugesetzt, dass das angestrebte Gesamtvolumen damit erreicht wurde. Die zu behandelnden Wells wurden mit weniger Medium bestückt, so dass erst nach Zugabe einer oder zweier Substanzen das Gesamtvolumen erreicht wurde, somit unterschied sich das Gesamtvolumen der Kontrollen

von dem der behandelten Wells nicht. Als nächstes wurden die verschiedenen Konzentrationen von Morphin-HCl (Morphin), Fentanyl-Citrat (Fentanyl), D, L-Methadon-HCl (Methadon) oder Doxorubicin-HCl (Doxorubicin) zugegeben, wobei bei Kombinationsversuchen stets zuerst die Fentanyl- bzw. die Doxorubicin-Verdünnung und dann das Morphin zugegeben wurde. Das zum Well zugegebene Volumen einer Verdünnung war so gewählt, dass es hierbei zu einer Verdünnung der Substanz um den Faktor 10 kam. Aus diesem Grund wurden die Verdünnungsreihen zuvor in einer 10 x höheren Konzentration als der jeweils angestrebten hergestellt.

Um stets gleichbleibende Versuchbedingungen zu gewährleisten, wurde das Morphin, das Methadon und das Fentanyl immer am Tag des Versuchsansatzes gelöst und steril filtriert. Als unbehandelte Kontrollen wurden bei jedem Versuch Zellen statt mit Substanz ausschließlich mit Medium bestückt; bei Kombinationsversuchen wurden zusätzlich Zellen nur mit je einer der jeweiligen Substanzen behandelt.

Die Versuchszellen wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5 % CO₂ bis zum entsprechenden Zeitwert (24 h - 168 h) inkubiert.

Vor der Zellernte wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Dichte, Güte und Kontaminationen untersucht. Nach der Zellernte wurden alle Arbeitsschritte auf Eiswasser durchgeführt, um den Stoffwechsel der Zellen zu verlangsamen und den experimentell eingetretenen Zelltod nicht zu erhöhen.

Nachweis der Caspasenabhängigkeit mit dem Caspaseninhibitor zVAD.fmk

Zum Nachweis der Caspasenabhängigkeit des induzierten Zelltodes wurde der Pancaspaseninhibitor Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon (zVAD.fmk, Bachem AG) (Borner et al. 1999) in einer Konzentration von 50 µmol/l eingesetzt. Diese wurde aus einer 50 mM Stocklösung durch Verdünnung mit dem jeweiligen Medium hergestellt.

Für den Versuch wurden die Zellen wie zuvor beschrieben ausplattiert und mit je 10 µl der zVAD.fmk-Lösung behandelt. Vor Zugabe der anderen Substanzen wurden die vorbehandelten Zellen mindestens 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte zu den entsprechenden Zeitpunkten mittels FSC/SSC Analyse.

Proliferationsstudie

Um den Einfluss von Morphin auf das Proliferationsverhalten der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zu analysieren, wurden die Zellen im 96er Wells in einer Dichte von $0,5 \times 10^4$ Zellen pro ml ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen Morphin oder mit Medium bestückt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde aus drei Wells dann jeweils 10 μ l Zellsuspension entnommen und es wurden in der Neubauer-Zählkammer sowohl die vitalen Zellen, als auch die lichtmikroskopisch durch erhöhte Granularität und Membranausstülpungen erkennbaren apoptotischen Zellen ausgezählt. Die Zellzahl wurde anschließend wie unter dem Punkt „Bestimmung der Zellzahl“ beschrieben ermittelt.

Nachweis des Opioidrezeptors durch Naloxon-Färbung

Der Nachweis des Opioidrezeptors auf den Zelllinien erfolgte durch Inkubation der Zellen mit dem unspezifischen μ -Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon (Karow et al. 2008). Hierzu wurden 5×10^5 Zellen mit Medium auf 1 ml Gesamtvolumen verdünnt und durch Zentrifugation geerntet (Leukämiezellen: 300 g bzw. Glioblastomzellen: 600 g, 10 min, RT). Nach einem Waschschrift mit 1 ml PBS mit 1 % FCS wurden die Zellen 30 Minuten mit 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M Naloxon-Fluoreszin in PBS /1 % FCS /10 % EtOH inkubiert. Als Kontrollen wurden Zellen eingesetzt, die nur mit PBS /1 % FCS /10 % EtOH behandelt wurden. Im Anschluss folgten nach Zugabe von 1,5 ml kaltem PBS /1 % FCS zwei Waschschriffe mit 2 ml derselben Lösung, das entstandene Pellet wurde in 300 μ l kaltem PBS /1 % FCS resuspendiert. Die Analyse des Fluoreszenzverhaltens der gefärbten Zellen erfolgte im Durchflusszytometer.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde in der vorliegenden Arbeit zu Detektion apoptotischer Zellen, zur Zellzyklusanalyse sowie zum Nachweis von Opioidrezeptoren auf der Zelloberfläche eingesetzt.

Prinzip

In einem Durchflusszytometer werden Zellen anhand der Streuung monochromatischen Lichts und der Anregung bestimmter Fluoreszenzen durch Laserbestrahlung der Zellen analysiert.

Hierbei werden die zu analysierenden Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt und treten in den Strahlengang des Lasers. Das Licht des Lasers wird abhängig von der zellulären Beschaffenheit zur Seite und nach vorne gestreut und kann außerdem

Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen Bestandteile der Zellen zuvor angefärbt wurden, zur Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden. Das FACScalibur™ Flow Cytometer von Becton Dickinson verfügt hierzu über einen luftgekühlten Argonlaser, welcher monochromatisches Licht von 488 nm Wellenlänge generiert.

Die gestreuten bzw. emittierten Photonen werden durch Detektoren verschiedener Spezifität aufgefangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches digitalisiert und am Computer durch spezielle Auswerteprogramme wie z. B. CellQuest™ in Grafiken dargestellt wird.

Mit dem FACScalibur™ Flow Cytometer ist es so möglich, neben dem gestreuten Licht auch vier verschiedene Fluoreszenzsignale mit unterschiedlichen Emissionsspektren zu detektieren (BD Biosciences 2000).

FSC/SSC Analyse

Apoptotische Zellen unterliegen morphologischen Veränderungen wie der Ausstülpung der Zellmembran, Abschnürung von apoptotischen Körperchen und somit Zellschrumpfung sowie Erhöhung der intrazellulären Granularität (Darzynkiewicz et al. 1997, Kumar et al. 2007a). Das Verfahren der FSC/SSC-Analyse untersucht die Zellen hinsichtlich ihrer Größe und ihrer Granularität und bietet die Möglichkeit, die kleinere und granulärere apoptotische Zellpopulation von den weniger granulären und größeren vitalen Zellen zu unterscheiden.

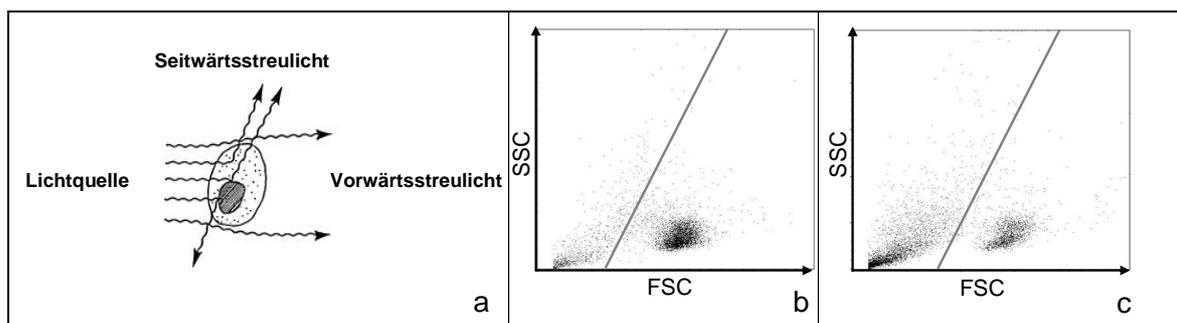


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Prinzips der FSC/SSC-Messung (a) und Beispiele für das Messergebnis einer unbehandelten Kontrollpopulation (b) sowie einer Population mit ca. 67 % apoptotischen Zellen. (a) zeigt die Ablenkung des vom Laser emittierten Lichtes an der Zelloberfläche nach vorne, während intrazelluläre Granula das Licht zur Seite hin brechen. Die weitestgehend vitale Population in (b) verfügt im Gegensatz zur Zellpopulation in (c) nicht über die in (c) deutlich erkennbare zusätzliche Population mit kleinerem FSC-Signal, die sich von den vitalen Zellen abgrenzt und den Anteil der apoptotischen Zellen repräsentiert. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter* Quelle für (a): (BD Biosciences 2000, S.14), (b) und (c): eigene Messungen

Hierbei wird das an der Zelloberfläche gebrochene Licht vom Detektor des Vorwärtsstreulichts (*Forward Light Scatter, FSC*) aufgefangen und ist ein Maß für die Größe der Zelle; im Inneren der Zelle gebrochenes Licht wird eher zur Seite gestreut und wird von dem im 90° Winkel zum Laserstrahl angeordneten Seitwärtsstreulicht-Detektor (*Side Light Scatter, SSC*) aufgefangen. Es stellt ein Maß für die Granularität einer Zelle dar (Abb. 12) (BD Biosciences 2000).

Zellzyklusanalyse nach Nicoletti

Die Methode nach Nicoletti et al. erlaubt die Detektion apoptotischer Zellen und gibt Hinweise auf den Zellzyklus. Die Messung beruht auf der Analyse des zellulären DNA-Gehalts der Zellen (Nicoletti et al. 1991). Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus besitzen einen diploiden Chromosomensatz, verdoppeln diesen während der S-Phase und verfügen schließlich in der G₂-Phase über einen tetraploiden Chromosomensatz (Kumar et al. 2007b). Die DNA apoptotischer Zellen ist fragmentiert, daher verfügen diese über subdiploide DNA, deren prozentualer Anteil mit dem Anteil der toten Zellen an einer Population übereinstimmt (Nicoletti et al. 1991).

Zur Herstellung von Nicoletti-Proben wurden die geernteten Zellen zweimal mit je 2 ml kaltem 1 x PBS (4°C) gewaschen und zentrifugiert (4°C, 10 min, A172: 700 g/ HL-60: 500 g), um sie von Zellkulturmedium zu reinigen. Anschließend wurde je nach Zellzahl 200 µl bis 500 µl kalter Nicoletti-Puffer (PI, 0,05 % NaCitrat und 0,05 % Triton X in Aqua ad iniectionem) zugegeben. Hierdurch wurden die äußeren Zellmembranen der Zellen aufgeschlossen und die Kernmembran für das im Puffer ebenfalls enthaltene Fluorophor Propidiumjodid (PI) durchlässig gemacht. Um das Aufschließen der Zellen zu begünstigen, wurden die Proben stark resuspendiert und anschließend gevortext. Das PI interkaliert in die DNA und wird im FACS bei 488 nm zur Emission von Licht angeregt. Da die Interkalierung des PI in die DNA mehrere Stunden benötigt, wurden die Proben vor der durchflusszytometrischen Analyse mindestens 12 h bei 4 °C unter Lichtabschluss inkubiert.

Die so hergestellten Proben wurden im FACS hinsichtlich ihres Fluoreszenzverhaltens (FI-3) untersucht. Dabei ist die Fluoreszenz eines Zellkerns bzw. nukleären Körperchens umso stärker, je mehr DNA er enthält. Die gemessene Fluoreszenzintensität spiegelt die Häufigkeitsverteilung der Zellzyklusphasen in der Probe wider. Typisch für eine vitale Zellpopulation ist ein G₁-Peak, eine S-Phase und ein G₂-Peak (Abb. 13).

Eine DNA-Fragmentierung, wie sie z. B. bei der Apoptose stattfindet, spiegelt sich hierbei im Auftreten eines Sub-G₁-Peaks wider. Hierbei handelt es sich um Partikel, die weniger DNA enthalten als intakte Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und die deswegen schwächer fluoreszieren (Darzynkiewicz et al. 1997).

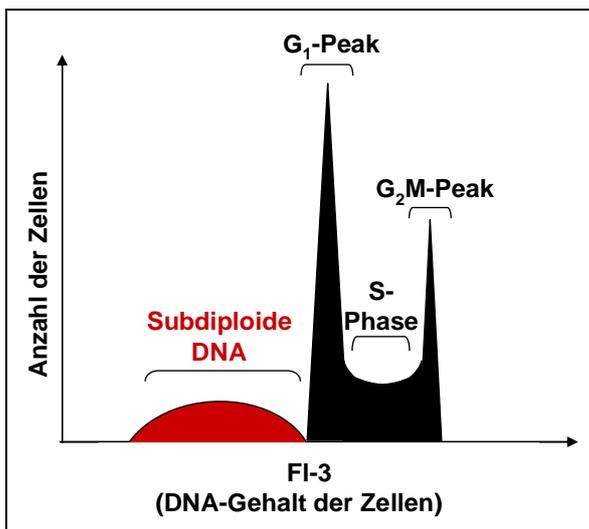


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Analyse des zellulären DNA-Gehaltes nach Nicoletti et al. Zu erkennen ist in schwarz die Zellzyklusverteilung einer Kontrollpopulation mit G₁-, S- und G₂-Phase. Ist ein Teil der Zellen apoptotisch, so tritt ein „Sub-G₁-Peak“ auf (hier in rot), der die fragmentierte DNA der apoptotischen Zellen repräsentiert. G-Phase= *gap*-Phase; S-Phase= Synthese-Phase, FI= Fluoreszenz

Auswertung durchflusszytometrischer Daten

Die grafischen Darstellungen der Messergebnisse sowohl der FSC/SSC-Analyse als auch der Nicoletti-Messungen wurden mit Hilfe des Auswerteprogramms CellQuestTM (BD Biosciences) durch Abgrenzung der vitalen von der apoptotischen Zellpopulation durch Setzen von so genannten „Gates“ durchgeführt. Das Programm errechnet den prozentualen Anteil der „gegateten“ apoptotischen Population aus der Gesamtzahl der gemessenen Zellen. Der durch Zugabe der verschiedenen Substanzen induzierte Zelltod wurde zu den unbehandelten Kontrollen durch Berechnung der spezifischen Apoptose in Bezug gesetzt; die spezifische Apoptose errechnet sich aus der Formel:

$$\text{spezifische Apoptose} = \frac{100 \times (\% \text{ tote Zellen Messung} - \% \text{ tote Zellen der Kontrolle})}{(\% \text{ tote Zellen der Kontrolle})}$$

Es wurden jeweils drei Proben untersucht und der Mittelwert aus den ermittelten Werten gebildet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Proteinisolierung

Die Zellsuspension wurde in auf Eiswasser gekühlte 50 ml Falcons überführt, bei 500 g für 10 min bei 4 °C mit der Multifuge (Heraeus) zentrifugiert und anschließend dekantiert. Das Pellet wurde mit 35 ml kaltem PBS (1x) gewaschen und wie zuvor zentrifugiert und dekantiert. Nach erneuter Aufnahme des Pellets in 1 ml kaltem PBS (1x) wurde dieses in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und mit der Biofuge fresco (Heraeus) bei 1400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde dem Pellet entsprechend des jeweiligen Volumens Lysepuffer in Verhältnis 1:1 zugegeben und mittels Pipette gut vermischt. Die Zellyse erfolgte für 15 min auf Eis. Im letzten Zentrifugationsschritt (15000 g, 15 min, 4°C in der Biofuge fresco) wurden anschließend das proteinhaltige Lysat von den übrigen Zellbestandteilen getrennt; die Proteine im Überstand wurden in weitere 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Überstand und Pellet wurden bei -20 °C eingefroren.

Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Zur Analyse von Proteinen, die bei der Apoptose beteiligt sind, wurden die aus den behandelten Zellen isolierten Proteinsyate zunächst auf ihren Gesamtgehalt an Proteinen untersucht, damit bei der im nächsten Schritt eingesetzten Elektrophorese von jeder Probe genau gleich viel Protein aufgetragen werden konnte. So sollte eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben erreicht werden. Hierzu wurde unter Verwendung des BCA[™] Protein Assay Kits (Pierce) ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) durchgeführt.

Peptidbindungen und bestimmte Aminosäuren von Proteinen reduzieren Cu^{2+} zu Cu^+ , welches mit zwei BCA-Molekülen einen Farbkomplex bildet (Abb. 14). Dieser besitzt ein Extinktionsmaximum von 562 nm. Sein Gehalt kann kolorimetrisch ermittelt werden und korreliert mit der ursprünglich enthaltenen Proteinmenge. Ein Vergleich mit einer Standardreihe ermöglicht einen Rückschluss auf die Proteinkonzentrationen (Fischer 2006).

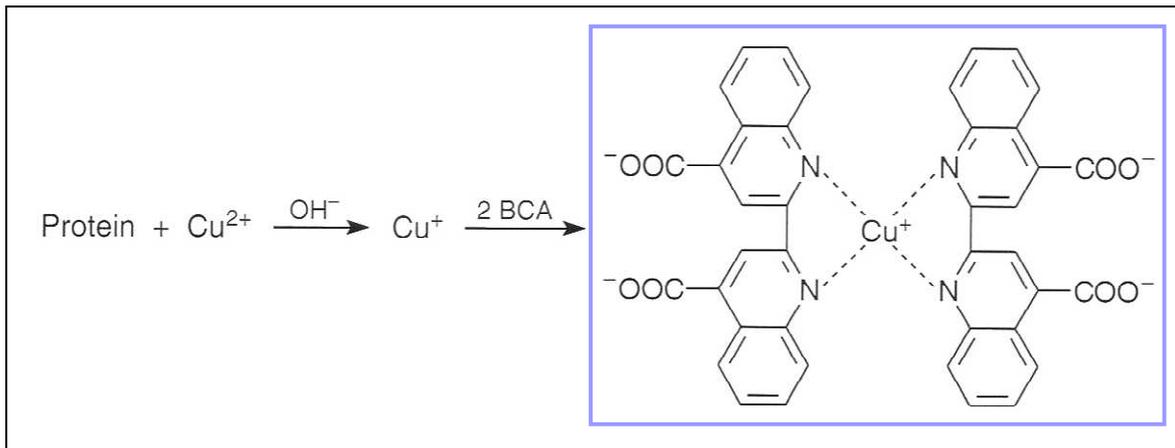


Abbildung 14: Ablauf der Reaktion des Bicinchoninsäure (BCA)-Assays: Peptidbindungen und bestimmte Aminosäuren der Proteine reduzieren Cu^{2+} zu Cu^+ , dieses bildet mit je zwei BCA-Molekülen einen farbigen Komplex mit einem Extinktionsmaximum von 562 nm. Die Menge an Farbstoff kann kolorimetrisch ermittelt werden und ermöglicht durch Vergleich mit einer Standardkurve eine Berechnung des ursprünglichen Proteingehaltes. Modifiziert nach: (Fischer 2006, S.39)

Für die Standardreihe wurden durch Verdünnung von BSA (bovines Serumalbumin) Konzentrationen von 2000 $\mu\text{g/ml}$ bis 25 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Das proteinhaltige Zelllysate wurde abhängig von der erwarteten Proteinmenge im Verhältnis 1:25 oder 1:50 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt.

Jeweils 10 μl der hergestellten Proben wurden als Dreifachwert auf eine 96-Wellplatte aufgetragen und je 200 μl frisch angesetztes Pierce Kit Reagenz (Reagenzienverhältnis 1:50) zupipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und darauf folgenden 10 min bei Raumtemperatur, beides unter Lichtabschluss, wurde die Farbintensität der entstandenen Kupferkomplexe durch Messung der Extinktion bei 562 nm im Mikrotiterplattenlesegerät (ASYS Hitech GmbH) analysiert und anhand der Standardreihe der Proteingehalt berechnet.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung eines denaturierten Proteingemischs in einem Polyacrylamidgel, auf welches eine elektrische Spannung angelegt ist. Das eingesetzte NuPAGE® Novex® 4 -12 % Bis-Tris Midi Gel ist ein Gradientengel, dessen Porengröße entlang der Laufstrecke der Proteine abnimmt und so eine schärfere Trennung der Proteine erlaubt (Görg 2006).

Zur Durchführung wurden die Proteine aus den Versuchsansätzen auf Eis aufgetaut; pro Probe wurden 50 μg Protein mit Aqua ad iniectabilia auf 11,25 μl verdünnt und anschließend 3,75 μl Ladebuffer (NuPage® LDS Sample Buffer (4x)) zugegeben, so dass dieser in 1x Verdünnung vorlag. Der Ladebuffer enthält Natriumdodecylsulfat (SDS), ein

anionisches Detergenz, welches an die Polypeptidketten der Proteine bindet und so zu deren Denaturierung führt. Außerdem überlagert SDS etwaige Eigenladungen der Proteine und eliminiert so alle für die Auftrennung relevanten Unterschiede zwischen den Proteinen mit Ausnahme ihrer Molmassen (AppliChem. 2008). Zur weiteren Denaturierung der Proteine enthält der Ladepuffer DTT (Dithiothreitol) zur Reduktion von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine (AppliChem. 2008); Erhitzen der Proteine auf 70 °C für 15 min führt zu ihrer endgültigen Denaturierung. Nach einer Minute auf Eis wurden die Proteinproben abzentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Im Ladepuffer enthaltenes Glycerin dient zum Beschweren der Proben.

Zur Vorbereitung wurde das Gel vertikal in der Criterion Gelkammer platziert und vollständig von Laufpuffer (NuPAGE® MES SDS Running Buffer) bedeckt. Dieser enthält neben SDS auch Ionen, welche für den Stromfluss im elektrischen Feld nötig sind. Luftblasen am Gel und in den Taschen wurden sorgfältig entfernt, um einen gleichmäßigen Stromfluss und somit eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine zu erreichen. Nach Beladen des Gels wurde eine Spannung von 100 V für 10 min und darauf folgend 200 V für ca. 30 min angelegt; so wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch das Gel in Richtung Anode. Ihre Laufstrecke ist abhängig von der Molmasse. Zusätzlich aufgetragene Standardmarker (Novex® Sharp Protein Standard, ProSieve® Color protein marker) mit bekannten molaren Massen dienen als Referenzwerte für die Bestimmung der Molaren Massen der aufgetrennten Proteine (Görg 2006).

Western Blotting

Die auf dem Gel aufgetrennten Proteine wurden im sogenannten Semidry-Elektroblotting-Verfahren mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die hierzu eingesetzte Blotting-Apparatur Trans-Blot® SD Cell besteht aus zwei Plattenelektroden, dazwischen ein „Sandwich“ aus Filterpapier, der Nitrozellulosemembran und dem Gel. Die Membran (Hybond™ ECL™ Nitrocellulose membrane) wurde zunächst in Aqua ad iniectionem aktiviert und dann, wie auch das Filterpapier (Gel Blotting Papier), 10 min in Blottingpuffer getränkt. Anschließend wurde auf der Anode ein Stapel aus vier Filterpapieren, der Membran und dem Gel gebildet und dieser wieder mit vier Filterpapieren bedeckt, auf die die Kathode aufgesetzt wurde. Bei jeder Schicht wurden etwaige Luftblasen sorgfältig entfernt, um einen gleichmäßigen Stromfluss und somit eine gleichmäßige Übertragung der Proteine auf die Membran zu erreichen. Nach Schließen der Blotting-Apparatur wurde für 100 min eine Stromstärke von 120 mA angelegt. Die im Gel befindlichen, negativ geladenen Proteine wandern hierbei Richtung Anode und damit auch

auf die Nitrozellulosemembran, wo sie immobilisiert werden (Görg 2006). Nach Entnahme der Blottingmembranen wurden diese für 1 h in Blockingpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Blottingmembran abzusättigen.

Immunodetektion

Die Immunodetektion diente in der vorliegenden Arbeit als Verfahren zur spezifischen Detektion einzelner Proteine auf einer Nitrozellulosemembran.

Hierzu wurden die Membranen zunächst mit einem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert, welcher eine Spezifität für ein Epitop des gesuchten Proteins aufweist. Nach drei Waschschritten à 10 min mit Waschpuffer wurden die Membranen mit einem Sekundärantikörper, der sich gegen den zuvor eingesetzten Primärantikörper richtet, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte.

Der Sekundärantikörper ist gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (HRP), ein Enzym, das Luminol zu einem energetisch angeregten Produkt oxidiert, welches unter Lichtemission in seinen Grundzustand zurückkehrt. Dieses Verfahren heißt „enhanced chemoluminescence“ (ECL) (GE Healthcare 2010). Für die ECL-Reaktion wurden die Komponenten des Kits ECL™ Western Blotting Detection Reagents im Verhältnis 1:1 gemischt, unverzüglich auf die Blots gegeben und 1 min inkubiert. Das emittierte Licht schwärzt einen im nächsten Schritt aufgelegten Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL™) entsprechend der Menge des an dieser Stelle gebundenen Sekundärantikörpers, welcher die dort vorhandene Proteinmenge repräsentiert. Je nach Bandenintensität variierte die Belichtungszeit zwischen einer Sekunde und mehreren Minuten (Kessler 2006, GE Healthcare 2010).

Für die Entfernung der Antikörper wurden die Blots drei mal à 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 25 ml Strippingpuffer für 10 min gestrippt, wieder 3x gewaschen und anschließend für 1 h mit Blockingpuffer geblockt. Im Anschluss konnte im selben Verfahren ein anderes Protein detektiert werden.

Mit Ausnahme der Inkubation der Membranen mit dem ECL-Reagenz wurden sämtliche anderen Schritte auf einem Schüttelgerät (Heidolph Instruments) durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Membran an allen Stellen gleichmäßig behandelt wurde.

Um nachzuweisen, dass in jeder Geltasche gleich viel Protein geladen war, wurde zum Schluss bei allen Blots das konstitutiv exprimierte Protein β -Aktin detektiert.

3 Ergebnisse

Bei der Behandlung von Malignomen stellen Chemo- und Radioresistenzen ein großes Problem dar (Milas et al. 2005, Friesen et al. 2010). Ein möglicher neuer Therapieansatz ist die Behandlung mit dem Opioid D, L-Methadon, welches in Leukämiezellen das Potential hat, Apoptose zu induzieren und deren Resistenzen gegenüber Strahlung und Chemotherapeutika zu durchbrechen (Friesen et al. 2008a). Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde untersucht, ob auch das in der Schmerztherapie standardmäßig eingesetzte Opioid Morphin in verschiedenen malignen Zelllinien Apoptose induzieren kann. Außerdem wurden durch Kombination von Morphin mit Fentanyl oder mit Doxorubicin Möglichkeiten getestet, die Zelltodinduktion zu verstärken, um eine mögliche Therapie mit Opioiden zu optimieren.

3.1 Nachweis des Opioidrezeptors auf der Oberfläche von Krebszelllinien

Im Rahmen erster Vorstudien für diese Arbeit wurden verschiedene humane Krebszelllinien mittels einer Naloxon-Fluoreszin-Färbung untersucht, um die Expression von Opioidrezeptoren auf den Zellen nachzuweisen und etwaige zelllinienspezifische Unterschiede in der Rezeptordichte zu entdecken.

Hierzu wurden zunächst die Leukämiezelllinien HL-60 und CEM analysiert (Abb. 15a und b). Die Messung der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer ergab für beide Zelllinien eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität der gefärbten gegenüber den ungefärbten Zellen (Abb. 15). Hierbei lag der Mittelwert der Fluoreszenzen bei der mit Naloxon-Fluoreszin gefärbten myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 bei 112,64; bei den Kontrollen lag der Mittelwert bei 5,59. Die mit Naloxon-Fluoreszin gefärbte lymphatische Leukämiezelllinie CEM wies einen Mittelwert von 101,18 auf, die mittlere Fluoreszenz der Kontrollen lag bei 5,23.

Diese Beobachtungen zeigen, dass beide Zelllinien Opioidrezeptoren in großer Dichte exprimieren. Die bei beiden Zelllinien vergleichbaren Fluoreszenzintensitäten deuten auf eine ähnliche Rezeptordichte bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM und der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 hin.

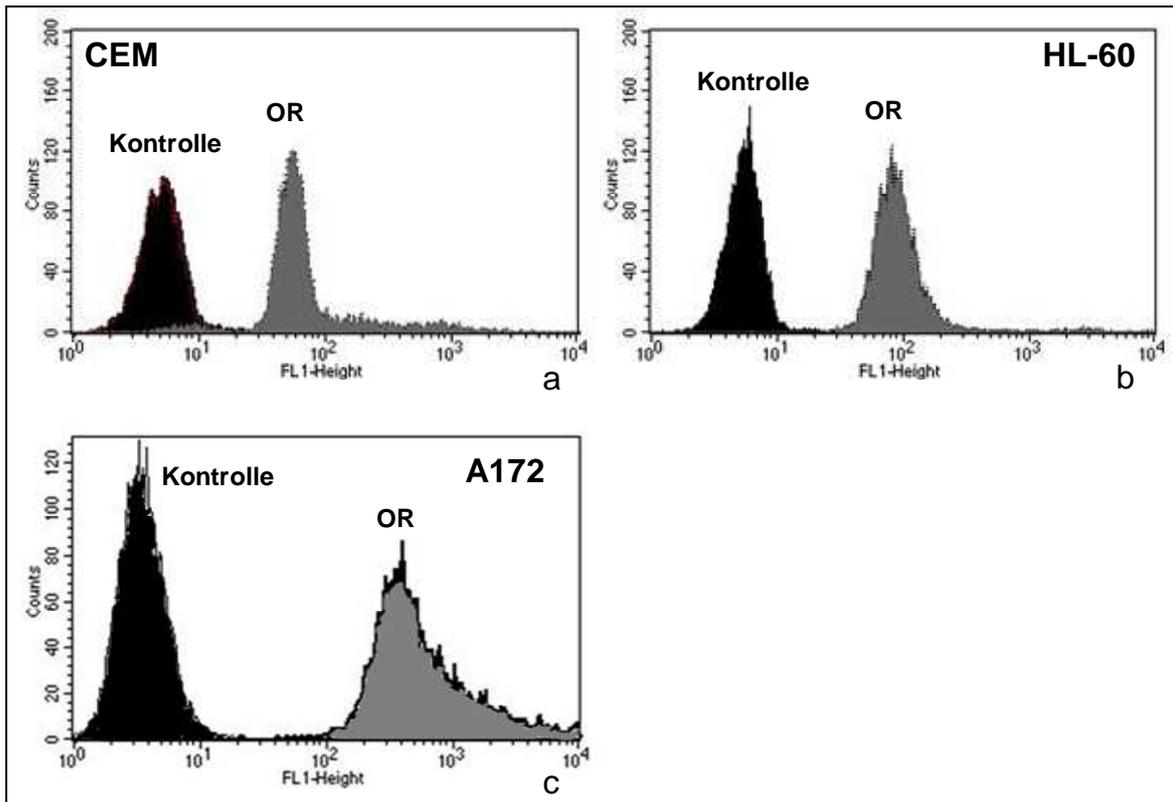


Abbildung 15: Fluoreszenzintensitäten von (a) CEM- und (b) HL-60-Leukämiezellen und (c) A172-Glioblastomzellen nach Anfärbung mit Naloxon-Fluoreszin. Die Zellen wurden jeweils mit Naloxon-Fluoreszin (= Opioidrezeptor, OR, grau hinterlegt) inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zum Vergleich wurden jeweils ungefärbte Krebszellen im Durchflusszytometer gemessen (schwarz hinterlegt). Gezeigt ist die Eigenfluoreszenz der ungefärbten Kontrollen (schwarz) und der mit 10^{-5} M Naloxon-Fluoreszin (Leukämiezellen) bzw. 10^{-5} M Naloxon-Fluoreszin (A172-Zellen) gefärbten Zellen (grau).

Auch die Glioblastomzellen A172 wurden mittels Naloxon-Färbung hinsichtlich ihrer Expression von Opioidrezeptoren analysiert (Abb. 15c). Auch bei dieser Krebszelllinie war nach Färbung mit Naloxon-Fluoreszin eine stärkere Fluoreszenz detektierbar. Hierbei erhöhte sich der Mittelwert der Fluoreszenzen von 3,74 bei den ungefärbten Zellen auf 805,83 bei den gefärbten Glioblastomzellen. Dies deutet darauf hin, dass auch diese Glioblastomzellen Opioidrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen und dass sie möglicherweise durch Behandlung mit Opioiden beeinflusst werden können.

3.2 Wirkung von Morphin auf Krebszellen verschiedener Herkunft

Auf Grundlage des Nachweises von Opioidrezeptoren auf den Leukämiezelllinien CEM und HL-60 sowie auf der Glioblastomzelllinie A172 wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, inwieweit das bei Krebspatienten häufig eingesetzte Opioid Morphin eine Apoptose induzierende Wirkung auf Krebszellen hat.

In ersten Versuchen wurde geprüft, ob die Behandlung der Zelllinien mit Morphin-HCl (Morphin) die Vitalität der Zellen beeinflusst und zu welchen Zeitpunkten sowie bei welchen Konzentrationen etwaige Effekte auftreten.

Hierbei wurden die Leukämiezelllinien CEM und HL-60 und die Glioblastomzellen A172 mit einem breiten Spektrum an Morphinkonzentrationen über 24 h bis 168 h inkubiert und in Hinblick auf den Zelltod analysiert.

3.2.1 Wirkung der Morphin-Behandlung auf Glioblastomzellen

Die Glioblastomzelllinie A172 wurde mit Morphin-Konzentrationen zwischen 0,1 und 30 µg/ml behandelt und sowohl im Kurzzeitversuch (24 h bis 72 h Inkubationsdauer, Abb. 16a) als auch nach Inkubationszeiten zwischen 96 h und 168 h (Abb. 16b) untersucht.

Zur Feststellung des Zelltodes wurden die Zellkerne zum entsprechenden Zeitpunkt gemäß der Methode nach Nicoletti et al im Durchflusszytometer hinsichtlich des Auftretens von subdiploider DNA analysiert (Nicoletti et al. 1991).

Hierbei war der prozentuale Anteil der Zellen mit subdiploider DNA in den behandelten Proben zu allen Zeitpunkten vergleichbar hoch wie in den unbehandelten Kontrollen (Abb. 16). Während die Spontanapoptose der Kurzzeitwerte zwischen 4 % und 8 % lag, betrug der Zelltod bei den behandelten Proben maximal 12 %. Bei den für 96 h bis 168 h inkubierten A172-Glioblastomzellen waren Zelltodraten von maximal 6 % in den unbehandelten Kontrollen versus maximal 11 % bei den mit Morphin behandelten Zellen zu beobachten. Bei keinem der untersuchten Zeitwerte war durch die Behandlung mit Morphin gegenüber den unbehandelten Kontrollen ein veränderter Zellzyklus erkennbar. Diese Untersuchungen zeigen, dass Morphin in der Glioblastomzelllinie A172 weder den Zellzyklus beeinflusst noch einen Zelltod induziert.

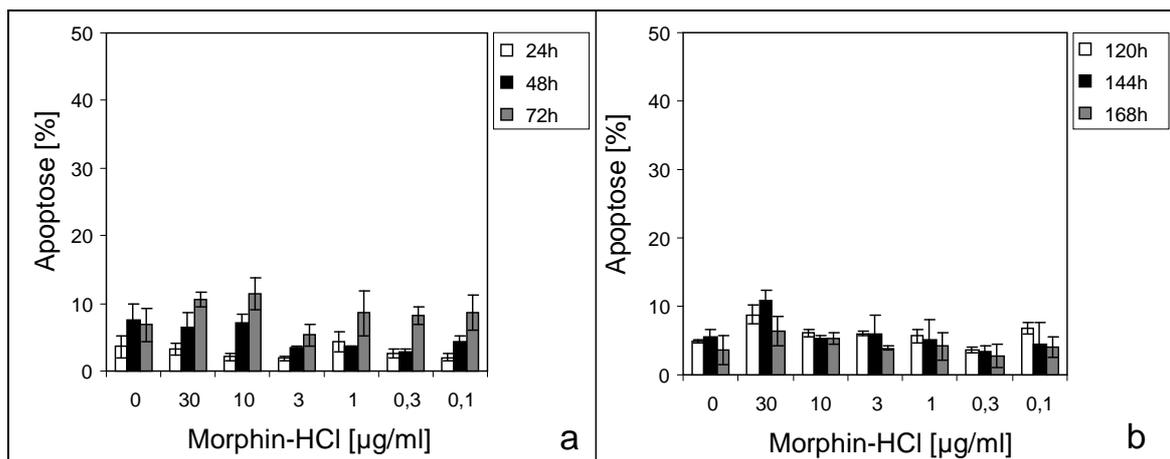


Abbildung 16: Zelltoderate (in %) der Glioblastomzelllinie A172 nach Behandlung mit Morphin. Nach Behandlung mit verschiedenen Morphinkonzentrationen wurden die Zellen (a) für 24 bis 72 h bzw. (b) 120 bis 168 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne nach der Methode nach Nicoletti et al. am Durchflusszytometer auf ihren Gehalt an subdiploider DNA („*deoxyribonucleic acid*“) hin untersucht. Die aufgetragene Apoptoserate entspricht dem prozentualen Anteil an Kernen mit subdiploider DNA an der Gesamtzahl. Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen.

3.2.2 Wirkung der Morphin-Behandlung auf Leukämiezellen

Die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 und die lymphatische Leukämiezelllinie CEM wurden mit 50, 30 und 10 µg/ml Morphin für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert und anschließend mittels FSC/SSC-Analyse untersucht (Abb. 17a und b). Als Positivkontrolle wurden Zellen parallel mit denselben Konzentrationen D, L-Methadon (Methadon) behandelt (Abb. 17c und d), da die Apoptoseinduktion durch diese Substanz bereits belegt werden konnte (Friesen et al. 2008a).

Es zeigte sich, dass weder bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM, noch bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 die mit Morphin behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen eine erhöhte Zelltoderate aufwiesen (Abb. 17a und b). Der Prozentsatz an toten Zellen nach Behandlung mit Morphin wich sowohl bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM als auch bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zu allen betrachteten Zeitwerten maximal 2 Prozentpunkte vom Wert der unbehandelten Kontrolle ab.

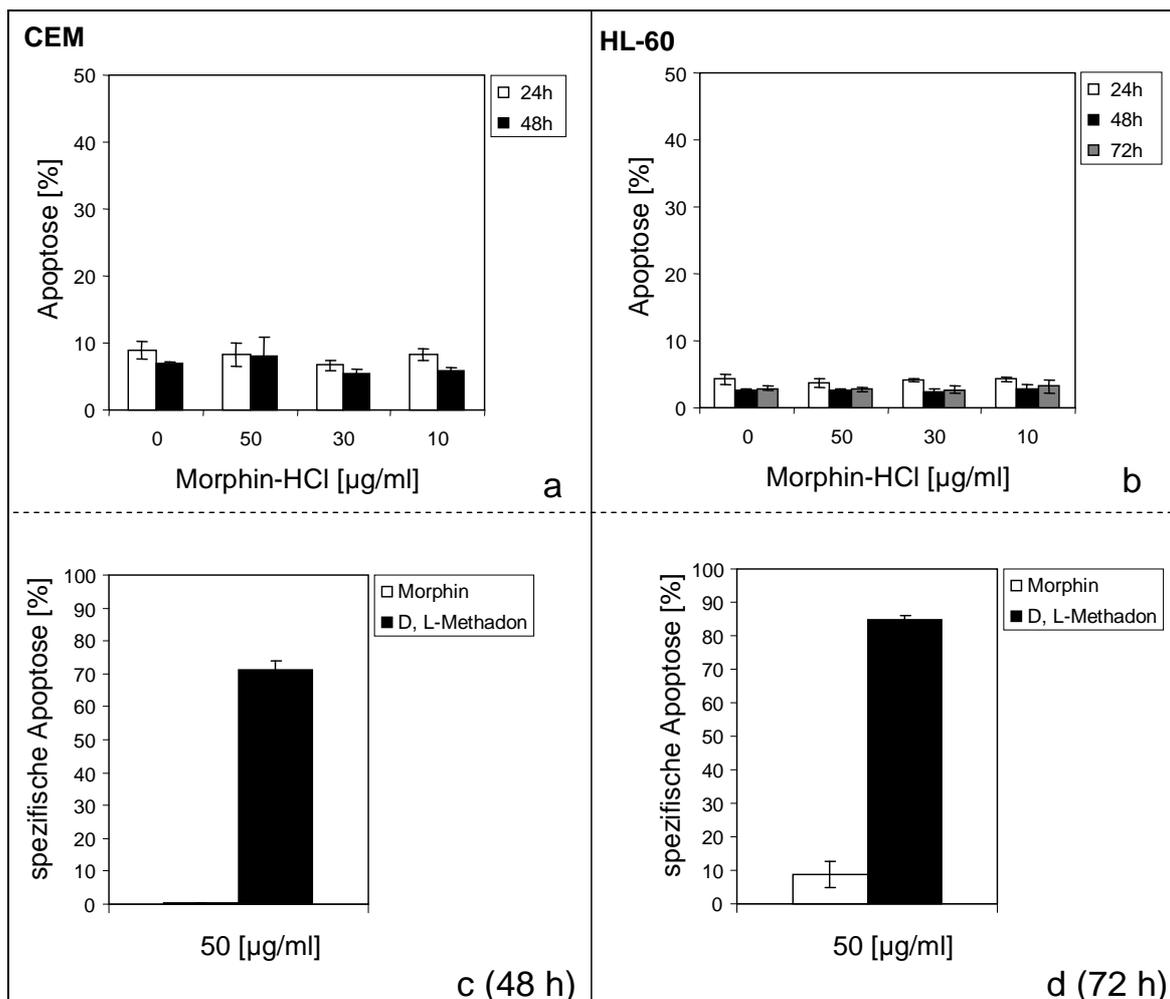


Abbildung 17: Zelltoderate (in %) nach Behandlung von CEM- oder HL-60-Leukämiezellen mit Morphin und Vergleich mit dem durch Methadon-Behandlung induzierten Zelltod. Obere Reihe [(a) und (b)]: Nach Behandlung mit 50, 30 oder 10 µg/ml Morphin wurden die Zellen für 24 und 48 h (CEM) bzw. 24 h bis 72 h (HL-60) inkubiert und anschließend mittels FSC/SSC (FSC= forward light scatter; SSC= side light scatter) analysiert. Aufgetragen ist die spontane Apoptoserate. Untere Reihe [(c) und (d)]: Beispielhafte Darstellung des durch Behandlung mit 50 µg/ml Morphin (weiße Balken) bzw. 50 µg/ml D, L-Methadon als Positivkontrolle (schwarzer Balken) induzierten Zelltodes in CEM- bzw. HL-60 Leukämiezellen, gemessen mittels FSC/SSC, angegeben als spezifische Apoptose in %. Gezeigt ist jeweils der späteste gemessene Zeitwert; (c) bei den CEM-Leukämiezellen nach 48 h, (d) bei den HL-60-Leukämiezellen nach 72 h. Ermittlung der spezifischen Apoptose entsprechend der Formel aus 2.2.3:

$$\text{spezifische Apoptose} = \frac{100 \times (\% \text{ tote Zellen Messung} - \% \text{ tote Zellen der Kontrolle})}{(\% \text{ tote Zellen der Kontrolle})}$$

Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen.

Im Gegensatz dazu war, entsprechend den bereits bekannten Erkenntnissen (Friesen et al. 2008a), eine starke Zelltodinduktion in den parallel mit Methadon behandelten Zellen zu beobachten. Die Apoptoseraten nach Methadon-Behandlung übertrafen bei beiden Zelllinien zu jedem Zeitpunkt die der Morphin behandelten Zellen.

Nach Behandlung mit 50 µg/ml Morphin bzw. D, L-Methadon und 72-stündiger Inkubation war bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 eine um ca. 76 Prozentpunkte erhöhte spezifische Apoptose erkennbar, bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM zeigte sich nach 48 h Inkubationszeit ein Unterschied von ca. 70 Prozentpunkten (Abb 17c und d).

Bei anderen Opioiden wie Fentanyl tritt erst nach Inkubationszeiten ab 96 h Zelltod in Leukämiezellen auf (Hagemeier 2009). Es sollte nun untersucht werden, ob auch durch Morphin bei längeren Inkubationszeiten Zelltod induziert werden kann. Hierzu wurden, analog zu den Kurzzeitversuchen, die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 und die lymphatische Leukämiezelllinie CEM mit 50, 30 und 10 µg/ml Morphin behandelt und für einen Zeitraum von 96 h bis 168 h inkubiert.

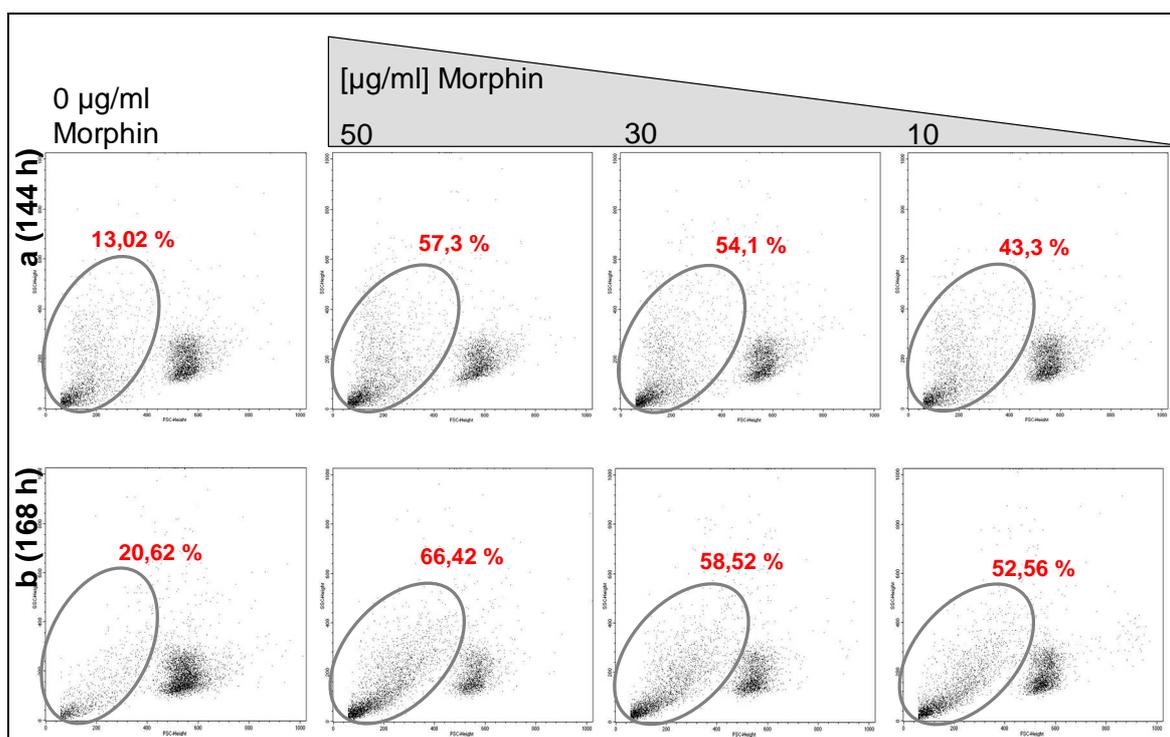


Abbildung 18: Mit Morphin behandelte HL-60-Leukämiezellen nach (a) 144 h bzw. (b) 168 h Inkubationszeit. Die HL-60-Zellen wurden für 144 bzw. 168 h mit Medium oder einer Morphin-Verdünnung inkubiert. Die FSC/SSC-Analyse am Durchflusszytometer zeigte die repräsentativ dargestellten Dotplots. Die roten Zahlen entsprechen dem eingekreisten Anteil toter Zellen in % in der Negativkontrolle sowie nach Behandlung mit 50, 30 oder 10 µg/ml Morphin. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

Während sich bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM kein vermehrtes Auftreten eines Zelltodes beobachten ließ (Daten nicht gezeigt), zeigte die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 nach 144 h und 168 h einen Anstieg der Zelltodrate gegenüber

der unbehandelten Kontrolle. Dies war sowohl lichtmikroskopisch durch eine erhöhte Granularität, Membranausstülpungen und das Auftreten apoptotischer Körperchen, als auch in der FSC/SSC-Analyse ersichtlich.

In den gezeigten Dotplots der FACS-Analyse (Abb. 18) ist erkennbar, dass die vitale Population nach 144 h und 168 h bei den behandelten Proben gegenüber den unbehandelten Kontrollen kleiner wird. In Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen findet sich stattdessen eine neue, teils auch granulärere Population mit geringerem FSC-Signal, also kleineren Zellen, wie es bei der Apoptose der Fall ist (Darzynkiewicz et al. 1997). Diese Population toter Zellen umfasste nach 144 h Inkubation abhängig von der eingesetzten Morphinkonzentration zwischen 57 % und 43 % aller analysierten Zellen, während die unbehandelte Kontrolle nur 13 % tote Zellen enthielt. Nach einer Inkubationsdauer von 168 h steigerte sich die Zelltodrate auf 66 % bis 53 % nach Morphinbehandlung gegenüber 21 % in den Kontrollen.

Auch hier wurde zur zusätzlichen Verifizierung der Ergebnisse die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 mit D, L-Methadon inkubiert (Abb. 19). Während in den mit Methadon behandelten Proben die spezifische Apoptose nach 168 h stets bei über 90 % lag, wurde durch Behandlung mit gleichen Morphinkonzentrationen deutlich geringere spezifische Apoptoseraten von 35 bis 25 % erzielt. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass Morphin in der Lage ist, nach einer Inkubationszeit von mindestens 144 h in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Zelltod zu induzieren. Aus diesem Grund wurden im Folgenden weitere Untersuchungen durchgeführt, um den beobachteten Einfluss von Morphin auf die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 näher zu charakterisieren. Da bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM keine Zelltodinduktion beobachtet wurde, wurde bei diesen auf weitere Untersuchungen verzichtet.

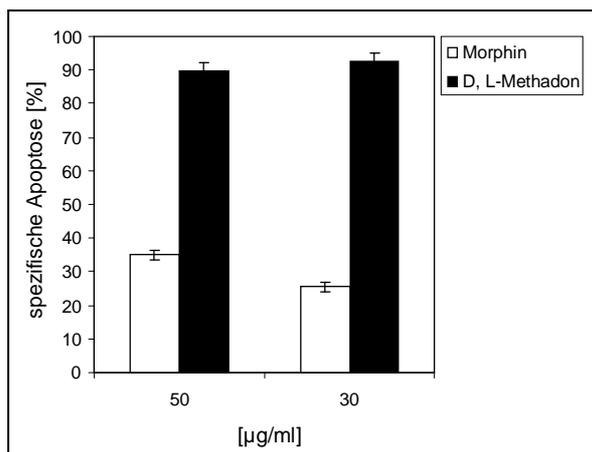


Abbildung 19: Vergleich des durch Morphin induzierten Zelltodes in HL-60-Leukämiezellen mit dem durch gleiche Konzentrationen D, L-Methadon induzierten Zelltod als Positivkontrolle. Dargestellt ist die spezifische Apoptose nach Behandlung mit 50 oder 30 µg/ml Morphin bzw. Methadon und Inkubation für 168 h, ermittelt durch FSC/SSC-Analyse am Durchflusszytometer. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

3.3 Charakterisierung des Morphin induzierten Zelltodes bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60

3.3.1 Analysen zur Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des durch Morphin induzierten Zelltodes der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60

Bei der Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin ließ sich, wie unter 3.2 beschrieben, eine Zelltodinduktion beobachten. Um diesen Zelltod näher zu charakterisieren, wurde, basierend auf den vorangegangenen ersten Versuchen, ein breiterer Bereich an untersuchten Konzentrationen in die Untersuchung mit einbezogen und die spezifische Apoptose berechnet, um Aussagen über die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Zelltodes treffen zu können.

Zu diesem Zweck wurden sowohl Bereiche mit hohen Morphinkonzentrationen zwischen 50 µg/ml und 3 µg/ml als auch Bereiche mit niedrigeren Morphinkonzentrationen (0,3 µg/ml bis 0,01µg/ml) eingesetzt, wie sie auch im Plasma von Schmerzpatienten auftreten (Faura et al. 1996, McQuay et al. 1990).

Zunächst wurde die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 mit den höheren Morphin-Konzentrationen (50 µg/ml bis 3 µg/ml) behandelt. Es sollte analysiert werden, ob das Ausmaß des durch Morphin induzierten Zelltodes von der Morphinkonzentration und der Inkubationszeit abhängig ist. Hierfür wurden die AML-Zellen mit den beschriebenen

Morphinkonzentrationen für 96 h, 120 h, 144 h und 168 h inkubiert und anschließend der Zelltod mittels FSC/SSC Analyse ermittelt (Abb. 20a).

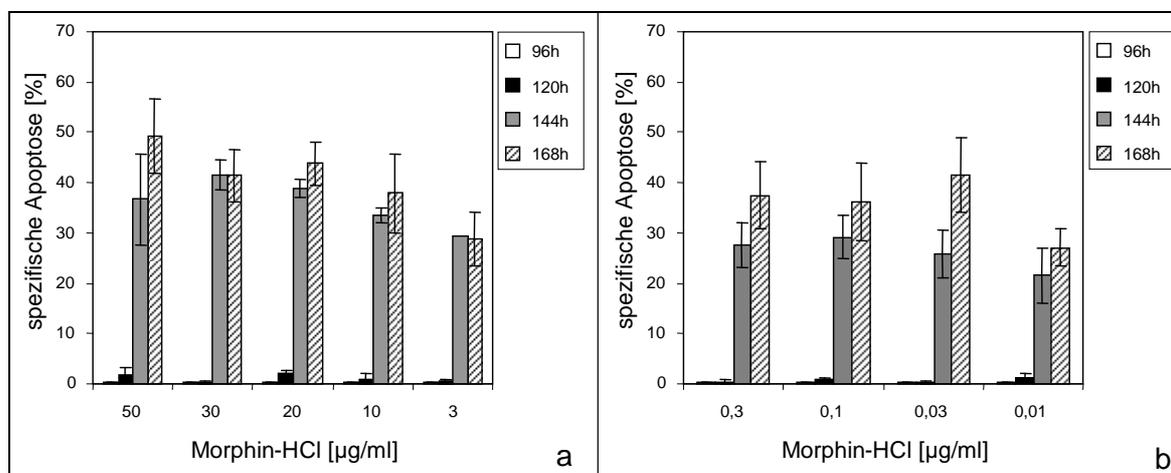


Abbildung 20: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des durch Behandlung mit Morphin induzierten Zelltodes der HL-60-Zellen bei (a) suprathérapeutischen und (b) therapeutisch eingesetzten Morphinkonzentrationen. Aufgetragen ist die spezifische Apoptose in %, gemessen mittels FSC/SSC, nach Inkubation der jeweiligen Morphinkonzentration für 96, 120, 144 oder 168 h. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

Im untersuchten Konzentrationsbereich bis zu einer Inkubationsdauer von einschließlich 120 h konnte keine Zelltodinduktion bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nachgewiesen werden.

Ab einer 144-stündigen Inkubationszeit war wiederum bei allen verwendeten Morphinkonzentrationen eine deutliche Zunahme der spezifischen Apoptose auf Werte zwischen 37 % nach Behandlung mit 50 µg/ml Morphin und 29 % nach Inkubation mit 3 µg/ml Morphin detektierbar. Bei einer Inkubationszeit von 168 h erhöhte sich der Anteil toter Zellen an der Gesamtzahl der analysierten Zellen um maximal 13 Prozentpunkte gegenüber dem 144 h-Wert, die Korrelation der Zelltodraten mit der eingesetzten Morphinkonzentration verstärkte sich: Die Differenz zwischen der spezifischen Apoptose nach Behandlung mit 50 µg/ml und der spezifischen Apoptose nach Behandlung mit 3 µg/ml Morphin stieg von nur 8 Prozentpunkten nach 144 h auf 21 Prozentpunkte.

Somit lässt sich der beobachtete Zelltod der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 als konzentrations- und zeitabhängig charakterisieren.

Diese Versuche zeigen, dass Morphin auch bei abnehmenden Konzentrationen noch Zelltod in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 induziert. Daher stellte sich uns die

Frage, ob dies auch für Konzentrationen von weit unter 1 µg/ml Morphin zutrifft, wie sie im Plasma von Patienten auftreten, die eine Morphinmedikation erhalten (McQuay et al. 1990, Faura et al. 1996). Dies ist insofern von Interesse, als dass typische Patienten, welche eine dauerhafte Analgesie mit hochpotente Opioiden wie Morphin erhalten, oft Krebspatienten sind.

Für diese Untersuchung wurde, analog zum oben erläuterten Vorgehen, die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 mit niedrigeren Morphin-Konzentrationen von 0,3, 0,1, 0,03 und 0,01 µg/ml für 96 h bis 168 h inkubiert. Die mittels FSC/SSC-Analyse ermittelten spezifischen Apoptoseraten lagen nach 144 h zwischen 29,2 und 21,6 %; nach 168 h betragen sie 41,5 bis 27,1 % (Abb. 20b). Die Konzentrationsabhängigkeit ist, verglichen mit der Konzentrationsabhängigkeit bei den höheren Morphinkonzentrationen, weniger stark ausgeprägt. Wie auch bei den höheren Morphinkonzentrationen zeigte sich jedoch eine deutliche Abhängigkeit des induzierten Zelltodes von der Inkubationszeit. Das Ausmaß des induzierten Zelltodes bei Verwendung von Morphindosen im therapeutischen Bereich zeigte eine vergleichbare Zelltodrate wie nach Behandlung mit 3 µg/ml Morphin.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin einen zeit- und konzentrationsabhängigen Zelltod einleitet, wobei dieser auch durch Morphin-Konzentrationen im therapeutischen Bereich eingeleitet werden kann.

3.3.2 Einfluss von Morphin auf das Proliferationsverhalten und den Zellzyklus der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60

Die Behandlung mit Krebsmedikamenten kann den Zellzyklus beeinflussen (Schwartz et al. 2005). Wie sich die Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin auf den Zellzyklus der Zellen auswirkt und ob sich etwaige Zellzyklusveränderungen in einem veränderten Proliferationsverhalten der Zellen widerspiegeln, sollte im nächsten Schritt analysiert werden. Hierzu wurde die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 wiederum mit Morphin in Konzentrationen von 30 µg/ml oder 10 µg/ml behandelt und für 120 h, 144 h und 168 h inkubiert. Mit Hilfe der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti et al wurde der DNA-Gehalt der Zellen erkennbar gemacht (Abb. 21) (Nicoletti et al. 1991).

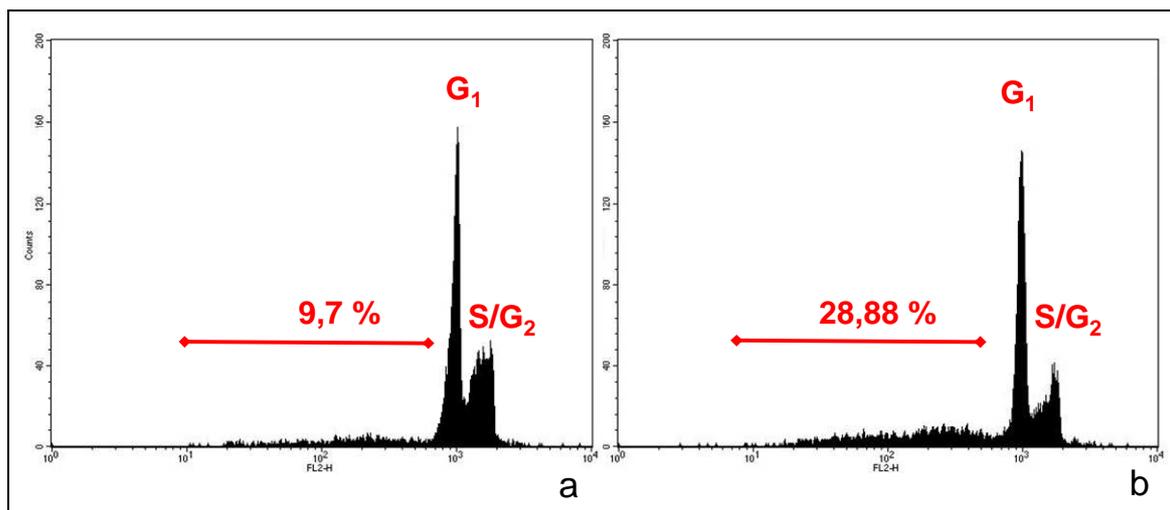


Abbildung 21: Mittels Zellzyklusanalyse nach Nicoletti ermittelter DNA-Gehalt der HL-60-Leukämiezellen nach 144-stündiger Inkubation (a) mit Medium und (b) mit 30 µg/ml Morphine. Es handelt sich um repräsentative, durchflusszytometrisch ermittelte Messungen. In Rot ist der prozentuale Anteil von Zellen mit subdiploider DNA an der gesamten Zellzahl angegeben.

Nach Inkubation mit 30 µg/ml und 10 µg/ml Morphine war ein gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 21a) um ca. 19 Prozentpunkte erhöhter Anteil an subdiploider DNA zu verzeichnen (Abb. 21b). Der im FSC/SSC gefundene Zelltod konnte hierbei bestätigt werden, wobei der Anteil der Zellen mit subdiploider DNA jedoch geringer war als der Prozentsatz, der bei der FSC/SSC-Messung aufgrund der Änderung der Zellmorphologie als „tot“ gemessen wurde. Neben der Detektion subdiploider Zellen erlaubt die Methode nach Nicoletti weitere Aussagen bezüglich des Einflusses, den die Behandlung mit Morphine auf den Zellzyklus der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 hat.

Wie in den beiden repräsentativen Abbildungen (Abb. 21) zu erkennen ist, unterscheidet sich der Zellzyklus der behandelten Zellen nicht maßgeblich von der unbehandelten Kontrolle und zeigt ein für HL-60-Leukämiezellen charakteristisches Bild. In beiden Fällen überragt der Peak mit Zellen, die sich in der G₁-Phase befinden, den Peak mit den Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus; das Verhältnis des Peaks zueinander ist ähnlich und es ist kein eindeutiger Zellzyklusblock erkennbar. Zwischen diesen Peaks befinden sich Zellen in der S-Phase.

Daraus lässt sich schließen, dass Morphine auf den Zellzyklus der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nur einen geringfügigen Einfluss ausübt.

Die Behandlung von Leukämiezellen mit Methadon hemmt deren Proliferation (Friesen et al. 2008a). Ob dieser Effekt auch bei Morphine nachweisbar ist, wurde im Folgenden mittels Proliferationsstudien näher untersucht.

Hierzu wurde nach Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit 30 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ Morphin und Inkubation für 96 h bis 168 h die vitalen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt (Abb. 22).

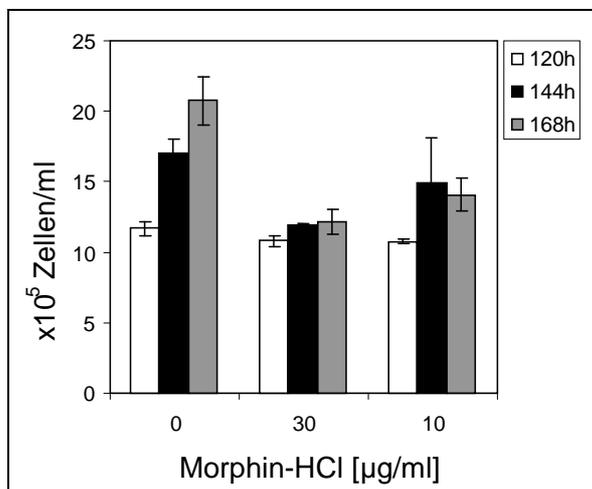


Abbildung 22: Proliferationsverhalten von HL-60-Leukämiezellen nach Inkubation mit 30 $\mu\text{g/ml}$ oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Morphin für 120 h, 144h und 168 h. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die lichtmikroskopisch unterscheidbaren vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Gezeigt ist der Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und der Anzahl vitaler Zellen, abhängig von der Behandlung der HL-60-Leukämiezellen mit Medium, 30 $\mu\text{g/ml}$ oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Morphin. Grundlage der dargestellten Werte sind dreifache Auszählungen.

Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der vitalen Zellen bis zu einer Inkubationszeit von einschließlich 120 h bei den behandelten Zellen sich kaum von derjenigen der unbehandelten Kontrollzellen unterscheidet (Abb. 22). Daraus lässt sich schließen, dass das Wachstumsverhalten der HL-60-Leukämiezellen im Zeitraum vor der Zelltodinduktion nicht durch Morphin beeinflusst wird. Nach 144 h Inkubationszeit kommt es bei den behandelten Zellen mit Eintritt des Zelltodes zum Sistieren der Proliferation. Während nach 120 h in den behandelten und unbehandelten Proben noch ungefähr gleich viele vitale Zellen/ml vorhanden waren (ca. 11×10^5 Zellen/ml), stagnierte die Zahl an vitalen Zellen bei beiden mit Morphin behandelten Proben auf nahezu demselben Niveau, während nach 144 h bzw. 168 h in den unbehandelten Proben eine deutliche Proliferation auf bis zu 21×10^5 Zellen/ml (nach 168 h) erkennbar war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Morphin den Zellzyklus und das Proliferationsverhalten der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nur geringfügig beeinflusst. Der im FSC/SSC festgestellte Zelltod der mit Morphin behandelten Zellen nach 144-stündiger Inkubation konnte mittels Analyse des subdiploiden DNA-Gehaltes

nach Nicoletti bestätigt werden. Die Zunahme an Kernfragmenten mit subdiploider DNA stellt einen Hinweis auf einen apoptotischen Zelltod dar (Darzynkiewicz et al. 1997).

3.3.3 Molekulare Mechanismen des Morphin induzierten Zelltodes

Es ist bekannt, dass verschiedene Opioide in Leukämiezellen Caspasen aktivieren und Apoptosewege regulieren (Friesen et al. 2008a, Drost 2009, Hagemeyer 2009). Für Methadon konnte eine Aktivierung von Caspase 9 und des mitochondrialen Apoptosewegs nachgewiesen werden (Friesen et al. 2008a). Die molekularen Mechanismen, die bei Behandlung mit Morphin zum Zelltod führen, sind hingegen wenig charakterisiert und sollten durch die folgenden Untersuchungen näher beleuchtet werden. Die zuvor gemachten Beobachtungen, dass der Zelltod der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit lichtmikroskopisch erhöhter Granularität und Bildung eines Sub-G₁-Peaks im Verfahren nach Nicoletti einhergeht, deuten auf einen apoptotischen Zelltod hin.

Zuerst wurde untersucht, ob es sich bei dem Morphin induzierten Zelltod um einen caspasenabhängigen Prozess handelt. Weitere Analysen der zellulären Proteine zeigten, welche Caspasen in diesem Prozess aktiviert und welche zellulären Regulationsmechanismen durch die Inkubation mit Morphin beeinflusst werden und so bei einer etwaigen Apoptoseinduktion eine Rolle spielen.

3.3.3.1 Caspasenabhängigkeit des Morphin induzierten Zelltodes

Das Auftreten subdiploider Kerne nach Behandlung mit Morphin deutet auf einen apoptotischen Zelltod hin (Kumar et al. 2007a). Um erste Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen des beobachteten Zelltods der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zu gewinnen, wurde mittels Inhibitionsversuchen getestet, ob Caspasen hierbei eine Rolle spielen.

Hierzu wurde die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 vor der Behandlung mit Morphin (50, 30, 10, 3 µg/ml) mit dem unspezifischen Pancaspaseninhibitor zVAD.fmk (Borner et al. 1999) vorinkubiert und der nach 144 h bzw. 168 h im FSC/SSC auftretende Zelltod mit dem Zelltod bei nur mit Morphin behandelten Leukämiezellen verglichen (Abb. 23).

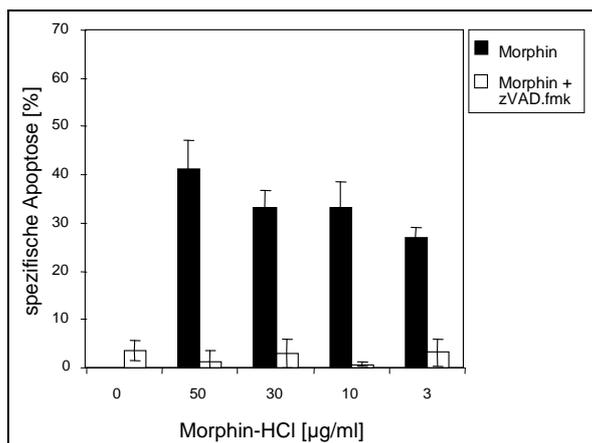


Abbildung 23: Caspasenabhängigkeit des Morphin induzierten Zelltodes bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60. Spezifische Apoptose (%) der HL-60-Leukämiezellen nach 144-stündiger Inkubation mit verschiedenen Morphin-Konzentrationen sowie mit oder ohne Vorbehandlung mit dem Caspaseninhibitor zVAD.fmk, ermittelt durch FSC/SSC-Analyse. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. zVAD.fmk= Z-Val-Ala-D, L-Asp-fluoromethylketon; FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

Die Zelltodinduktion durch Morphin nach 144 h konnte durch Zugabe von 50 µM zVAD.fmk vollständig aufgehoben werden. So lässt sich die spezifische Apoptose von Werten zwischen 27 und 41 % (nur Morphin) auf Anteile senken, die von den ausschließlich mit zVAD.fmk behandelten Kontrollzellen um maximal 2,9 Prozentpunkte abweichen. Auch nach 168-stündiger Inkubationszeit ließ sich beobachten, dass der durch Morphin induzierte Zelltod durch Caspaseninhibition vollständig aufgehoben werden kann (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem durch Morphin induzierten Zelltod um eine caspasenabhängige Apoptose handelt.

3.3.3.2 Aktivierung von Caspasen

Zytostatika, aber auch Opioide wie Methadon, induzieren Apoptose durch Aktivierung von Caspasen (Friesen et al. 1996, Kaufmann et al. 2000, Friesen et al. 2008a).

Nachdem die Caspasenabhängigkeit der durch Morphin induzierten Apoptose bestätigt werden konnte, sollte im Folgenden genauer untersucht werden, welche dieser Enzyme durch Morphin aktiviert werden, um möglicherweise Rückschlüsse auf den hierbei aktivierten Apoptoseweg ziehen zu können.

Zu diesem Zweck wurde die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphinkonzentrationen von 30, 3, 0,3 und 0,03 µg/ml behandelt und für 120 h und 144 h inkubiert, bevor aus den Zellen Proteine isoliert wurden. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die für die verschiedenen apoptotischen Kaskaden

relevanten Caspasen per Immunodetektion nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente jeweils das konstitutiv exprimierte Protein β -Aktin (Abb. 24).

Als erstes wurde die für die Endstrecke der Apoptosekaskaden zentrale Effektorcaspase 3 untersucht. Der eingesetzte Anti-C3-Antikörper bindet sowohl an die Procaspase, die inaktive Form der Caspase 3, mit einer molaren Masse von 32 kDa, als auch an deren aktives Spaltprodukt (17 kDa), welches während der Apoptose von Initiatorcaspasen proteolytisch abgespalten wird (Nicholson et al. 1995, Fernandes-Alnemri et al. 1996). Dieses Spaltprodukt konnte nach 120-stündiger Inkubation mit Morphin nicht nachgewiesen werden, was bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine Aktivierung von Caspase 3 stattgefunden hat (Abb. 24).

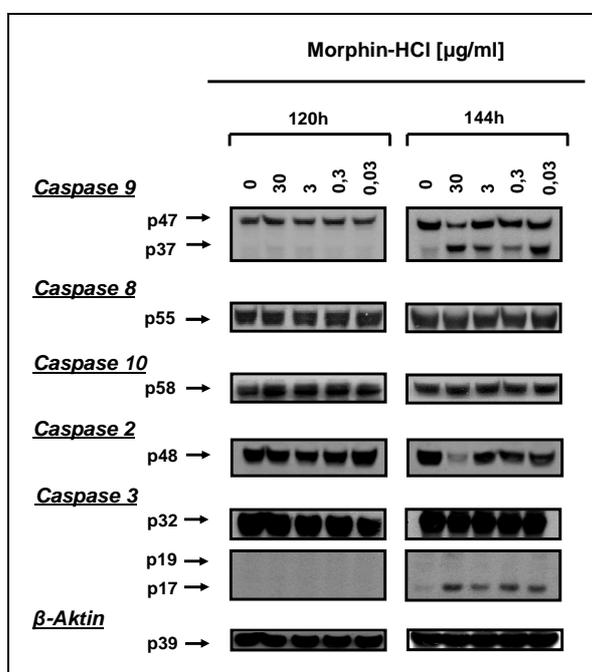


Abbildung 24: Immunodetektion von Caspase 2 und 10 sowie Caspase 9, 8 und 3 und ihrer aktiven Spaltprodukte. Gezeigt sind die nach 120- bzw. 144-stündiger Inkubation der HL-60-Leukämiezellen mit absteigenden Morphin-Konzentrationen oder Medium isolierten und mittels Western Blot-Verfahren und Immunodetektion nachgewiesenen Proteine Procaspase 9 (47kDa) und ihr bei Aktivierung entstehendes, 37 kDa großes Spaltprodukt, Procaspase 8 (55 kDa), Procaspase 10 (58 kDa), Procaspase 2 (48 kDa) sowie Procaspase 3 (32 kDa) und deren aktives Spaltprodukt (17/19 kDa). Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Protein β -Aktin (39 kDa) verwendet.

Nach 144 h Inkubationszeit fand sich hingegen bei allen Morphinkonzentrationen das aktive Caspase 3-Spaltprodukt bei 17 kDa, wobei bei der höchsten Morphinkonzentration die größte Menge des 17 kDa-Proteins nachweisbar war. In den unbehandelten Kontrollzellen war hingegen kein Spaltprodukt von Caspase 3 detektierbar.

Schon vorangegangene Arbeiten (Friesen et al. 2008a, Drost 2009, Hagemeyer 2009) zeigten, dass eine durch Opioid-induzierte Apoptose über den intrinsischen Apoptoseweg ausgelöst wird. Daher wurde im nächsten Schritt die hierbei zentrale Caspase 9 untersucht (Abb. 24).

Der eingesetzte Antikörper bindet sowohl an die inaktive Procaspase 9, als auch an deren aktives Spaltprodukt, welches bei der Aktivierung der Procaspase 9 auftritt (Zou et al. 1999). Nach 120 h Inkubation mit Morphin war dieses Spaltprodukt noch nicht nachweisbar, auch die Menge der Procaspase nahm im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle nicht ab. Nach 144 h hingegen konnte bei allen Morphin-Konzentrationen eine deutlich verminderte Menge an Procaspase 9 nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigte sich eine Zunahme des aktiven Spaltproduktes von Caspase 9 in den behandelten Zellen. Insbesondere nach Behandlung mit 30 µg/ml Morphin zeigte sich im Vergleich zu den geringeren Konzentrationen eine große Menge der gespaltenen Caspase 9 sowie die deutlichste Abnahme der Procaspase.

Als nächstes wurden die für den extrinsischen Apoptoseweg wichtigen Exekutivcaspasen, Caspase 8 (Juo et al. 1998) und Caspase 10 (Kischkel et al. 2001), nachgewiesen (Abb. 24).

Hierbei konnte bei keinem Zeitwert eine Abnahme der inaktiven Vorstufen Procaspase 10 (58 kDa) oder Procaspase 8 (55 kDa) in den mit Morphin behandelten Proben, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, nachgewiesen werden. Auch aktive Spaltprodukte von Caspase 8 (43/44 kDa oder 18/10 kDa) konnten nach Morphinbehandlung nicht gefunden werden. Dies spricht gegen eine Aktivierung von Caspase 8 oder 10 im Rahmen der Behandlung mit Morphin. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass der extrinsische Apoptoseweg bei der durch Morphin induzierten Apoptose der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nicht involviert ist. Aus diesem Grund wurde auf die weitergehende Untersuchung regulatorischer Proteine des extrinsischen Apoptosewegs im Folgenden verzichtet.

Bei der anschließenden Untersuchung der 48 kDa großen Procaspase 2 (Abb. 24) (Guo et al. 2002) zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 120 h keine Änderung der nachweisbaren Proteinmenge in den nach Morphinbehandlung isolierten Proben. Bei den nach 144 h gewonnenen Lysaten konnte hingegen bei der höchsten Morphinkonzentration (30 µg/ml) eine deutlich geringere Menge an Procaspase 2 gefunden werden, was auf eine Aktivierung dieses Enzyms hindeutet (Guo et al. 2002).

3.3.3.3 Einfluss von Morphin auf die regulatorischen Proteine des mitochondrialen Apoptosewegs

Bei Schädigung der Mitochondrien kommt es zur Bildung des Apoptosoms, in welchem die Caspase 9 aktiviert wird (Li et al. 1997). Der Nachweis der aktiven Spaltprodukte von Caspase 9 deutet auf eine mögliche Involvierung des mitochondrialen Apoptosewegs bei dem durch Morphin induzierten Zelltod hin. Dieser unterliegt einer restriktiven Regulation verschiedener pro- und antiapoptotischer Proteine, welche z.B. von Strahlung, aber auch von Opioiden beeinflusst werden (Friesen et al. 2007, Friesen et al. 2008a). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Behandlung mit Morphin ebenfalls Einfluss auf den zellulären Gehalt verschiedener pro- und antiapoptotischer Proteine ausübt.

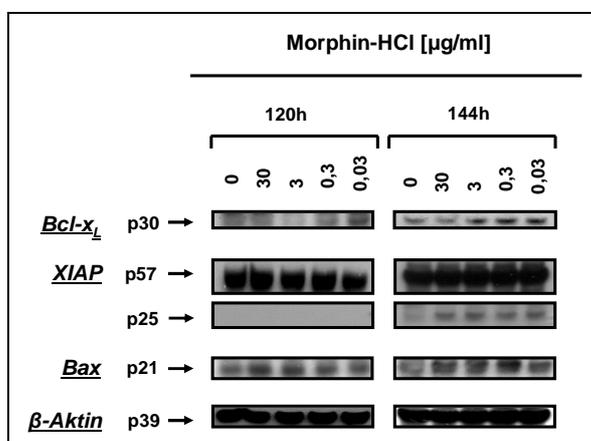


Abbildung 25: Immunodetektion von am mitochondrialen Apoptoseweg beteiligten regulatorischen Proteinen: Die antiapoptotischen Proteine Bcl-x_L (30 kDa) und XIAP (57 kDa) mit dessen ca. 25 kDa großen Abbauprodukt, sowie das proapoptotische Bax (30 kDa). Gezeigt sind die nach 120- bzw. 144-stündiger Inkubation der HL-60-Leukämiezellen mit absteigenden Morphin-Konzentrationen oder Medium isolierten und mittels Western Blot-Verfahren und Immunodetektion sichtbar gemachten Proteine Bcl-x_L, XIAP (mit Spaltprodukt) und Bax. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Protein β-Aktin (39 kDa) detektiert. Bcl-x_L= *B-cell-lymphoma extra long*, XIAP= *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein*; Bax= *Bcl-2 associated x-protein*

Ein wichtiger antiapoptotischer Faktor ist Bcl-x_L, ein Mitglied der Bcl-2 Protein-Familie (Boise et al. 1993). Nach 144 h war bei der höchsten Morphinkonzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen eine geringere Menge an Bcl-x_L nachweisbar, wohingegen nach 120 h keine Regulation erkennbar war (Abb. 25).

Ein weiteres antiapoptotisches Protein ist „*X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein*“ (XIAP), das die aktivierten Caspasen 3 und 9 inhibiert (Schimmer et al. 2006). Beim Abbau von XIAP (57 kDa) im Rahmen der Apoptose entsteht ein ca. 25 kDa großes Abbauprodukt, welches durch den eingesetzten Antikörper genauso wie das vollständige

Protein gebunden werden kann (Song et al. 2003). Nach Immunodetektion der Proteine aus den Zelllysaten konnte für keinen Zeitwert eine Abnahme der XIAP-Bande gefunden werden (Abb. 25). Es zeigte sich allerdings ein Auftreten des XIAP-Spaltproduktes nach 144 h Inkubationsdauer in allen mit Morphin behandelten Proben (Abb. 25).

Im Gegensatz zu XIAP und Bcl-x_L hat Bax proapoptotische Funktion (Oltvai et al. 1993). Anhand der Immunodetektion von Bax wurde deutlich, dass schon nach 120 h Inkubation insbesondere bei höheren Morphindosen von 30 und 3 µg/ml Morphin eine vermehrte Bax-Expression in Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar ist (Abb. 25). Diese Hochregulation zeigte sich in verstärkter Weise auch nach 144 h, wobei nun auch die mit der niedrigsten Morphinkonzentration behandelten Proben betroffen waren (Abb. 25).

Zusammenfassend zeigte sich bei der Untersuchung der molekularen Mechanismen des Morphin induzierten Zelltodes bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60, dass dieser durch eine Caspaseninhibition aufhebbar ist und somit eine Caspasenabhängigkeit besteht. Die Ergebnisse der Immunodetektion deuten darauf hin, dass durch Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin der intrinsische Apoptoseweg aktiviert wird. Es konnte eine Aktivierung der Procaspase 9 und 3 nachgewiesen werden. Das pro-apoptotische Protein Bax wird verstärkt exprimiert, während antiapoptotische Faktoren, wie insbesondere XIAP, gespalten werden. Hinweise für eine Beteiligung des Rezeptor vermittelten Apoptosewegs, wie z. B. eine Aktivierung von Caspase 8 oder 10, fanden sich nicht. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den zuvor gemachten Beobachtungen eines caspasenabhängigen Zelltodes, der konzentrations- und zeitabhängig nach Morphinbehandlung auftritt.

3.4 Synergistische Wirkung von Morphin und Fentanyl bei der Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60

3.4.1 Synergistische Wirkung von Fentanyl und Morphin auf die Zelltodinduktion bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60

Einige Schmerzpatienten erhalten im Rahmen ihrer Erkrankung gleichzeitig mehrere Opioide mit unterschiedlichen Eigenschaften. So wird für beispielsweise für die Behandlung sogenannter Durchbruchschmerzen zusätzlich zu einer Basistherapie mit Fentanyl ein schnell verfügbares Opioid wie Morphin eingesetzt (Coluzzi et al. 2001).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Fentanyl alleine in der Lage ist, Leukämiezellen für Apoptoseinduktion zu sensitivieren (Hagemeier 2009), wollten wir im Weiteren

untersuchen, ob Morphin und Fentanyl in Kombination eine Steigerung der Apoptoseinduktion in Leukämiezellen bewirken können.

Hierzu wurde die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 mit 50, 30 oder 10 µg/ml Fentanyl-Citrat (Fentanyl) in Kombination mit 30, 10, 5, 3 oder 1 µg/ml Morphin behandelt, wobei jeweils auch Zellen mit denselben Konzentrationen nur einer der beiden Substanzen bestückt wurden. Nach Inkubation für 24 h, 48 h oder 72 h beziehungsweise für 96 h bis 168 h wurden die Proben mittels FSC/SSC analysiert (Abb. 26 und 27).

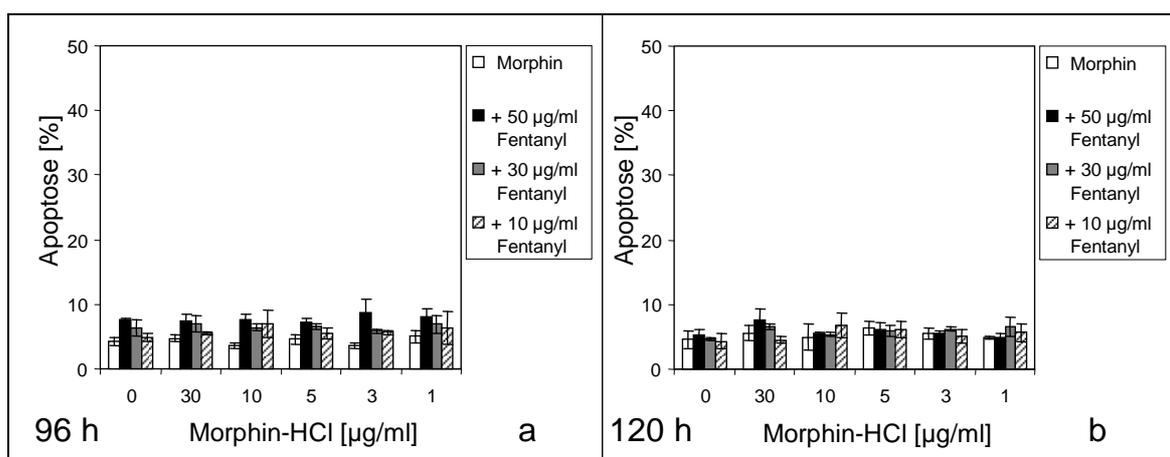


Abbildung 26: Kombinationsbehandlung von HL-60-Leukämiezellen mit Morphin und Fentanyl bis zu einer Inkubationszeit von 120 h. Die HL-60-Leukämiezellen wurden mit verschiedenen Morphinkonzentrationen oder Fentanyl (50, 30, oder 10 µg/ml) alleine oder mit entsprechenden Kombinationen beider Substanzen gemeinsam für (a) 96 h und (b) 120 h inkubiert und anschließend mittels FSC/SSC im Durchflusszytometer analysiert. Aufgetragen ist die spontane Apoptose (in %) der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

In den Zeitwerten bis einschließlich 120 h konnte hierbei wie schon bei Morphin alleine (Abb. 21) keine verstärkte Zelltodinduktion in der Kombinationsbehandlung (Abb. 26, exemplarische Darstellung des 96 h- (a) und des 120 h-Wertes (b)) festgestellt werden. Die durch die Behandlung erzielten Apoptoseraten erreichten maximal 8,7 % (96 h, Abb. 26a) bzw. 7,7 % (120 h, Abb. 26b), während die unbehandelten Kontrollen zu beiden Zeitwerten etwa 4 % tote Zellen enthielten.

Wurden die Zellen jedoch für 144 h oder 168 h behandelt, so zeigte sich in den Proben, die mit einer Kombination aus Morphin und Fentanyl behandelt wurden, eine gegenüber den unbehandelten Kontrollen und den mit nur einer Substanz behandelten Zellen stark erhöhte Zelltodrate (Abb. 27). Die beispielhaft dargestellten FSC/SSC-Ergebnisse nach Behandlung mit 30 µg/ml Fentanyl und 30 bzw. 10 µg/ml Morphin zeigen in der Kombinationsbehandlung eine Verkleinerung der vitalen Zellpopulation und das

Auftauchen einer neuen Population mit geringerem FSC-Wert, was auf ein vermindertes Zellvolumen hindeutet (Darzynkiewicz et al. 1997). Der prozentuale Anteil der neuen Population liegt nach 144 h bei über 40 % und nach 168-stündiger Inkubation bei etwa 60 % und ist gegenüber den unbehandelten Kontrollen (11 % bzw. 22 %) und den einfach behandelten Vergleichszellen (30 µg/ml Morphin: 25 % bzw. 38 %, 10 µg/ml Morphin: 21 % bzw. 35 %, 30 µg/ml Fentanyl 13 % bzw. 24 %) deutlich vergrößert. Da diese morphologischen Veränderungen typischerweise bei der Apoptose auftreten (Darzynkiewicz et al. 1997), weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass sich durch Zusatz von Fentanyl der Morphin induzierte Zelltod verstärken lässt. Dies wird in der graphischen Darstellung dieser Ergebnisse (Abb. 28) weiter verdeutlicht.

Nachdem somit die für die Zelltodinduktion kritischen Zeitpunkte zwischen 120 h und 168 h eingegrenzt waren, wurden diese Ergebnisse für die effektivsten Fentanyl- und Morphin Konzentrationen (30 und 10 µg/ml Fentanyl, 10, 3, 1 µg/ml Morphin) zusätzlich mit der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti (Nicoletti et al. 1991) überprüft. Hierbei war in der Kombinationsbehandlung ein vermehrtes Auftreten subdiploider DNA zu verzeichnen, was auf Induktion eines apoptotischen Zelltodes durch die Kombination aus Morphin und Fentanyl hindeutet (Darzynkiewicz et al. 1997) (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Kombination dieser beiden Opioide den Zelltod bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 verstärkt.

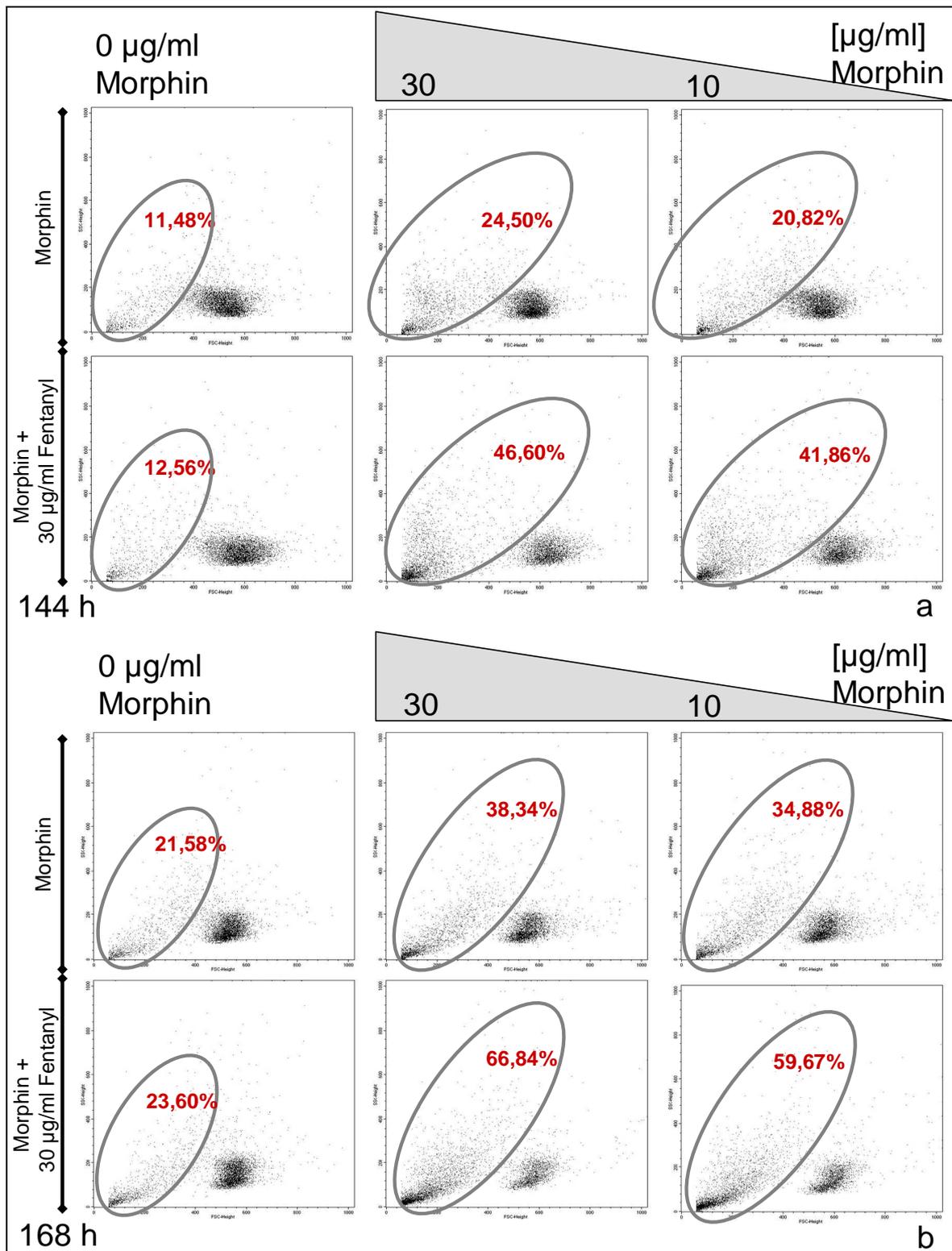


Abbildung 27: Behandlung von HL-60-Leukämiezellen mit Morphin allein und/oder Fentanyl nach 144 h oder 168 h Inkubationszeit. Die Ergebnisse der FSC/SSC-Analyse vergleichen die unbehandelte Kontrolle, die einfache Behandlung mit 30 µg/ml Morphin, mit 10 µg/ml Morphin oder mit 30 µg/ml Fentanyl mit dem Effekt einer Kombinationsbehandlung aus 30 µg/ml Fentanyl und 30 µg/ml Morphin bzw. 10 µg/ml Morphin. Die repräsentativen Messungen wurden nach (a) 144 h bzw. (b) 168 h durchgeführt. Die roten Zahlen geben den Anteil der mit grauem Oval umrundeten, toten Zellpopulation in Prozent der gesamten gemessenen Zellzahl an. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

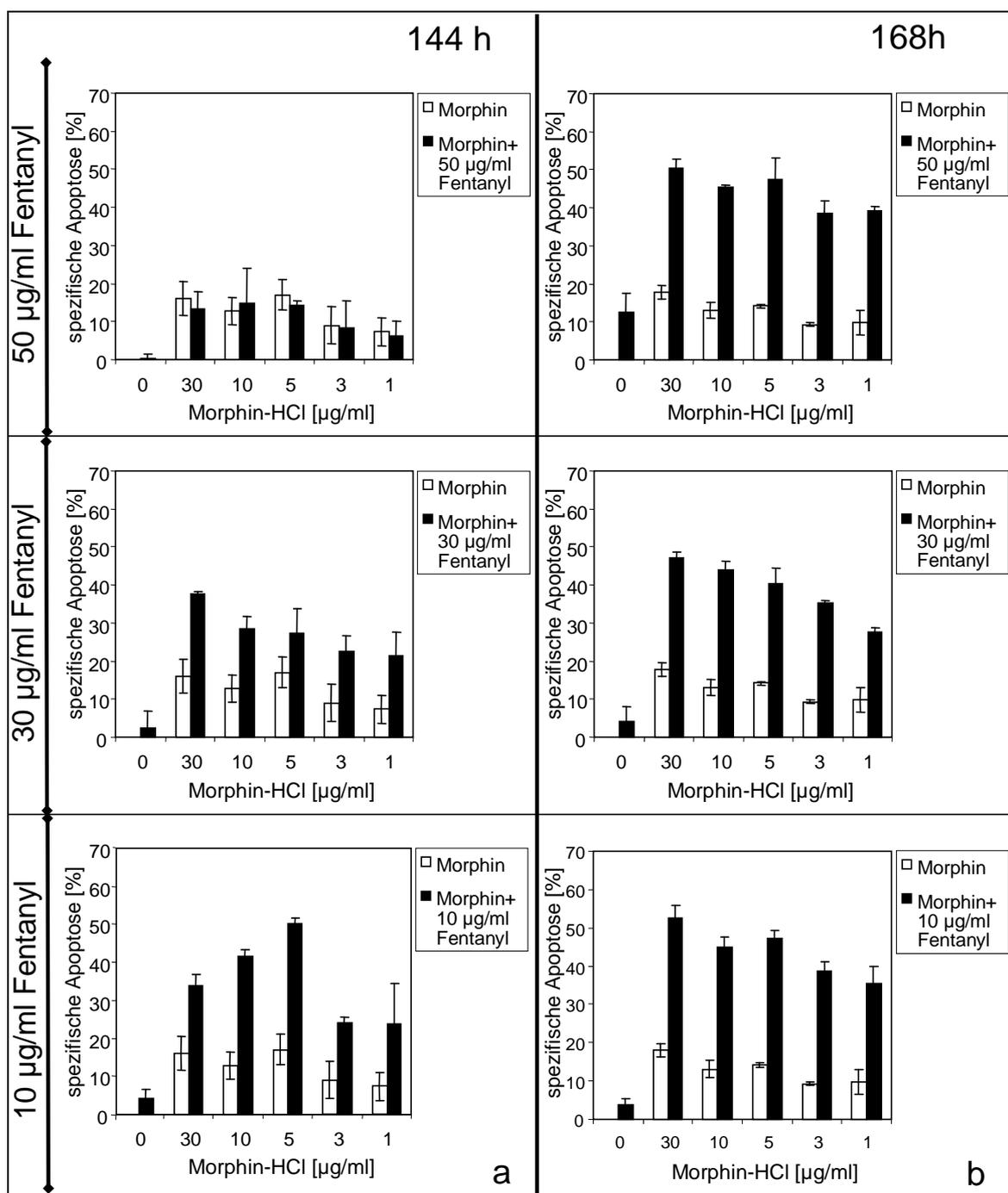


Abbildung 28: Synergistischer Effekt von Morphin und Fentanyl auf die Apoptoseinduktion in HL-60-AML-Zellen. Gezeigt ist der Zusammenhang zwischen der spezifischen Apoptose (in %) gemessen mittels FSC/SSC, und den Wirkstoffkonzentrationen. Es wird die Wirkung von Morphin alleine (weiße Balken) mit der Wirkung der Kombinationbehandlung mit Fentanyl (schwarze Balken, 50, 30 oder 10 µg/ml Fentanyl) verglichen. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. FSC= forward light scatter; SSC= side light scatter

Aufgrund der Darstellung der spezifischen Apoptose der durch FSC/SSC ermittelten Daten (Abb. 28) lässt sich ein synergistischer Effekt von Morphin und Fentanyl auf die Zelltodinduktion in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 ableiten. Ein Synergismus ist laut Pschyrembel die „gegenseitige Beeinflussung mehrerer Arzneimittel im Sinne einer

additiven oder potenzierten, unter Umständen auch neuartigen Wirkung“ (de Gruyter (Hrsg) 2010, S. 2020), eine potenzierte Wirkung ist eine „Wirkung zweier verabreichter Arzneimittel, die über die Addition ihrer Einzeleffekte hinausgeht“ (de Gruyter (Hrsg) 2010, S. 2239).

Nach 144-stündiger Inkubationsdauer konnte bei den mit 30 µg/ml oder 10 µg/ml Fentanyl und Morphin behandelten Proben Zelltodraten ermittelt werden, die gegenüber den mit den entsprechenden Einzelkonzentrationen behandelten Proben deutlich erhöht waren (Abb. 28a). So konnte beispielsweise nach Behandlung mit 30 µg/ml Fentanyl eine spezifische Apoptose von 2,5 % und nach Inkubation mit 30 µg/ml Morphin eine spezifische Apoptose von 16 % beobachtet werden. Wurden die Zellen mit je 30 µg/ml Morphin und Fentanyl gleichzeitig behandelt, so betrug die spezifische Apoptose ca. 38 %. Diese war also höher als die Summe der Einzelwirkungen der Substanzen und entspricht somit einer Wirkungspotenzierung. Diese Beobachtung wiederholte sich bei gemeinsamer Inkubation von 30 µg/ml Fentanyl mit 10, 5, 3 und 1 µg/ml Morphin (Abb. 28a). Hier konnten die durch Morphin alleine erreichten spezifischen Apoptosewerte zwischen 7,3 und 17 % durch Zusatz von Fentanyl (spezifische Apoptose nur Fentanyl: 2,5 %) auf Werte zwischen 21,3 und 28,5 % gesteigert werden.

Analoge Ergebnisse ließen sich nach 144 h auch durch Koinkubation von Morphin mit 10 µg/ml Fentanyl erzielen (Abb. 28a). Die hier durch Einzelbehandlung mit Fentanyl erzielte spezifische Apoptose betrug 4,2 %, bei Behandlung mit Morphin betrugen die gemessenen Raten zwischen 8 und 17 %. In der Kombination mit Morphin ließen sich diese Raten um rund 20 Prozentpunkte auf 24 bis 50 % steigern. In jedem Fall überstieg die gemeinsame Wirkung von Morphin und Fentanyl die Summe der einzeln verabreichten Substanzen.

Dieser ausgeprägte Effekt konnte nach 144 h bei Koinkubation mit 50 µg/ml Fentanyl nicht beobachtet werden (Abb. 28a). Hier ließ sich der mit Morphin allein erreichte Zelltod durch Zugabe des Fentanyls nicht steigern; die gemessenen Raten blieben in der Kombination weitestgehend konstant.

Die nach 144 h Inkubationszeit gemachten Beobachtungen traten nach 168 h in verstärkter Weise auf (Abb. 28b). Zum einen steigerte sich die spezifische Apoptoserate gegenüber dem 144 h-Wert bei Kombination mit jeder Fentanyl-Konzentration. Besonders deutlich zeigte sich dies bei Zugabe von 50 µg/ml Fentanyl, da hier nach 144 h noch kein Synergismus erkennbar war (Abb. 28a/b). In der Kombination mit 50 µg/ml Fentanyl traten nach 168 h spezifische Apoptosewerte von 30 % (1 µg/ml Morphin) bis 51 % (30

µg/ml Morphin) auf; nach 144 h lagen diese Werte lediglich zwischen 6 % (1 µg/ml Morphin) und 15 % (10 µg/ml Morphin).

In der Kombination mit 30 µg/ml und 10 µg/ml Fentanyl steigerte sich zwischen 144-stündiger und 168-stündiger Inkubation die spezifische Apoptose in den kombinationsbehandelten Proben ebenfalls. So erhöhten sich die Werte der spezifische Apoptose gegenüber dem 144 h-Wert in der 30 µg/ml Fentanyl-Kombination um ca. 6-17 Prozentpunkte und bei der Kombination mit 10 µg/ml Fentanyl um bis zu 18 Prozentpunkte (Abb. 28b). Diese Beobachtung belegt eine deutliche Zeitabhängigkeit des durch die Behandlung mit Morphin und Fentanyl erzielten synergistischen Effektes.

Eine Abhängigkeit von der Fentanylkonzentration zeigte sich hingegen nur insofern, als dass der synergistische Effekt bei Kombination mit 50 µg/ml Fentanyl erst nach 168 h und nicht, wie bei den anderen Konzentrationen, nach 144 h eintrat. Eine Steigerung des Zelltodes durch Erhöhung der Fentanylkonzentration war ansonsten nicht möglich.

Dem entgegen steht der Einfluss der Morphinkonzentration: Besonders nach 168 h nahm der beobachtete Zelltod mit der Morphinkonzentration ab (Abb. 28b). Dies gilt sowohl für die Behandlung mit Morphin alleine als auch für die mit Fentanyl koinkubierten Proben. Hier sank die spezifische Apoptose unabhängig von der zugegebenen Fentanylverdünnung von ca. 50 % bei Zugabe von 30 µg/ml Morphin auf Werte zwischen ca. 28-39 % in Kombination mit 1 µg/ml Morphin.

Der synergistische Effekt der Kombinationsbehandlung als solcher war nach 168-stündiger Inkubation stärker ausgeprägt als noch nach 144 h. Abbildung 29 stellt die zuvor dargestellten spezifischen Apoptose-Raten der Kombinationsbehandlung (Abb. 28) den „Summen“ der jeweiligen Einzelbehandlungen gegenüber und verdeutlicht, dass die Kombination von Morphin und Fentanyl auch nach 168 h die Zelltodinduktion überproportional steigert.

Vergleicht man die Summe der Effekte der einzeln zugegebenen Substanzen mit der Wirkung der Substanzkombination, so ist die Zelltodrate bei der letzteren gegenüber den addierten Einzelwirkungen stets deutlich erhöht. Bei Kombination mit 30 µg/ml Fentanyl mit Morphin konnte eine Zelltodinduktion beobachtet werden, die zwischen 14 und 26 Prozentpunkte über dem durch die Einzeleffekte zu erwartenden Wert lag. Bei Koinkubation mit 50 µg/ml lag die Steigerung durch den Synergismus bei 16 bis 21 Prozentpunkten. Die stärkste Steigerungsrate war jedoch bei Zugabe von 10 µg/ml Fentanyl zu beobachten. In Kombination mit 30 µg/ml Morphin erhöhte sich die spezifische Apoptose gegenüber der Summe der Einzelbehandlung um 31 Prozentpunkte,

die geringste Steigerung um 22 Prozentpunkte zeigte sich in der Kombination mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Morphin (Abb. 29).

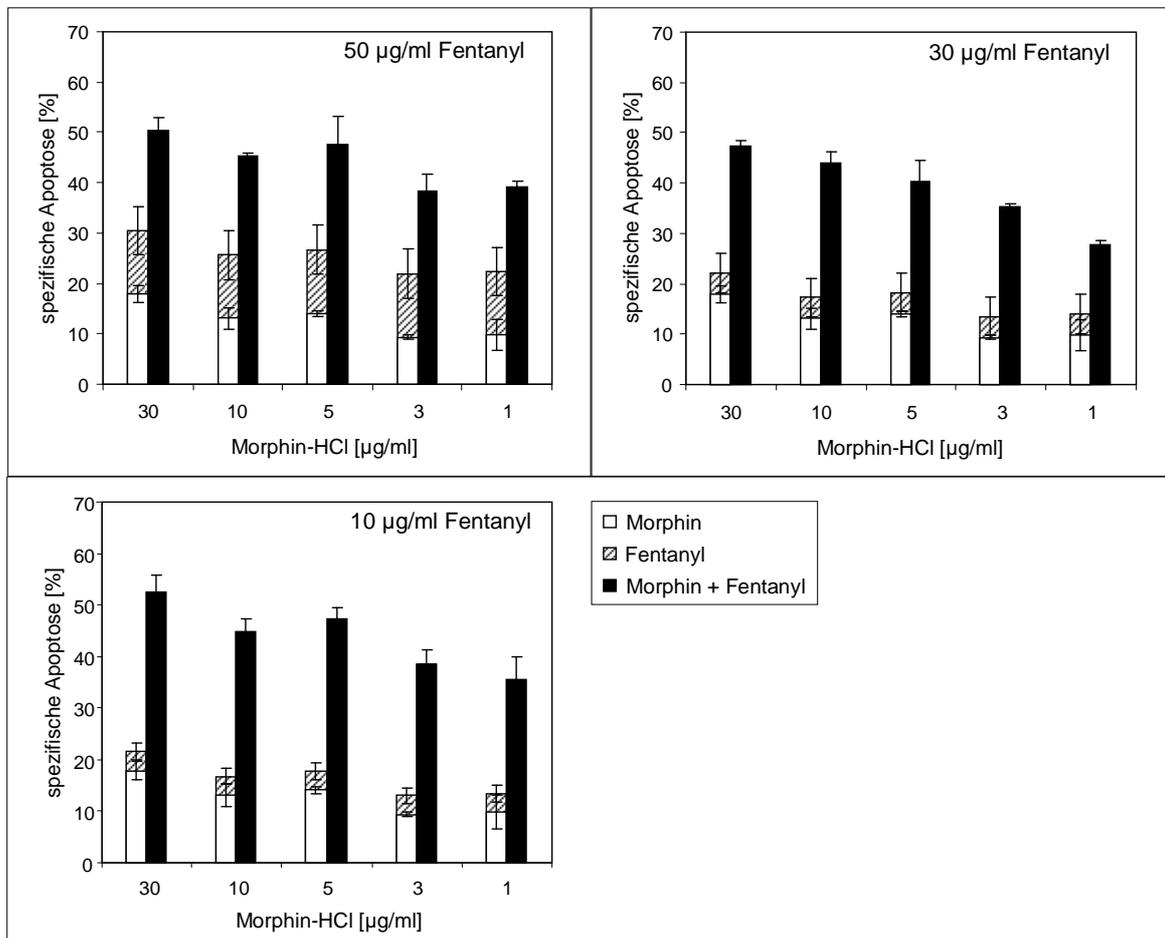


Abbildung 29: Synergistischer Effekt auf die Zelltodinduktion in HL-60-Leukämiezellen nach 168 h Inkubation. Gezeigt ist der Unterschied zwischen dem aufgrund der Einzelwirkung von Morphin bzw. Fentanyl zu erwartenden Zelltod und dem Zelltod in der Kombination. Die jeweiligen durch Behandlung mit den Einzelsubstanzen induzierten spezifischen Apoptoseraten wurden entsprechend der zum Vergleich stehenden Kombinationsbehandlung addiert (weißer bzw. schraffierter Balken) und der tatsächlich mittels FSC/SSC ermittelten spezifischen Apoptose nach Koinkubation mit den jeweiligen Konzentrationen der Einzelsubstanzen (schwarzer Balken) gegenübergestellt. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

Diese Untersuchungen belegen einen synergistischen Effekt der Kombinationsbehandlung mit Morphin und Fentanyl auf die Zelltodinduktion bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nach 144- und 168-stündiger Inkubationszeit. Diese ist abhängig von der Inkubationszeit und der Morphinkonzentration, eine Erhöhung der Fentanylkonzentration steigert diesen Effekt jedoch nicht, sondern wirkt sich eher nachteilig aus.

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob der beschriebene synergistische Effekt auf den Zelltod der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 auch bei niedrigeren Konzentrationen von Fentanyl auftritt. Hierzu wurden Fentanylkonzentrationen von 3 µg/ml und 1 µg/ml in Kombination mit den unveränderten Morphinkonzentrationen untersucht. Es zeigte sich, dass bei diesen Konzentrationen der zuvor beobachtete synergistische Effekt nicht auftrat (Daten nicht gezeigt), so dass von Untersuchungen mit noch niedrigeren Dosierungen abgesehen wurde.

3.4.2 Vergleich der Empfindlichkeit der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 auf verschieden zusammengesetzte Gesamtmengen an Opioiden

Weitere Versuche sollten zeigen, dass auch bei Behandlung mit vergleichbaren Gesamtmengen an Opioiden die kombinierte Behandlung mit Morphin und Fentanyl bezüglich der Zelltodinduktion effektiver ist als die Verabreichung einer dieser Substanzen alleine. Hierzu wurden die Zellen entweder mit 3 µg Morphin oder 3 µg Fentanyl alleine oder mit einer Kombination aus 1 µg Morphin und 1 µg Fentanyl, also insgesamt 2 µg an Substanzen, behandelt und nach 120 h, 144 h und 168 h mittels FSC/SSC analysiert. Als Vergleich wurden Zellen im selben Ansatz mit einer Kombination aus 3 µg Morphin und 3 µg Fentanyl behandelt (Abb. 30).

Die kombinierte Gabe von 1 µg Morphin und 1 µg Fentanyl induzierte trotz einer geringeren Gesamtmenge einen wesentlich stärkeren Zelltod der HL-60-Leukämiezellen als die Behandlung mit 3 µg der jeweiligen Einzelsubstanz Morphin oder Fentanyl.

Lag die spezifische Apoptose bei Behandlung mit Morphin alleine stets unter 20 %, so steigerte sich dies bei Behandlung mit der Substanzmischung auf 39 % nach 144 h bzw. auf ca. 45 % nach 168 h. Weiterhin zeigte sich, dass die spezifischen Apoptoseraten nach kombinierter Zugabe von je 3 µg Morphin und Fentanyl verglichen mit den Werten bei den mit 1 µg + 1µg behandelten Zellen bei Unterschieden von ca. 2 Prozentpunkten durchaus vergleichbar sind.

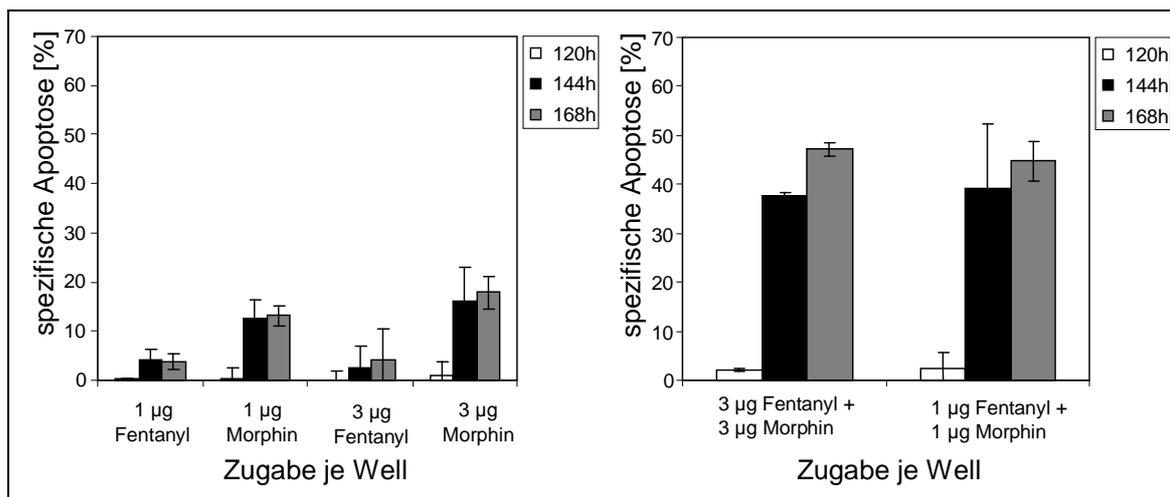


Abbildung 30: Spezifische Apoptose von HL-60-Leukämiezellen nach Behandlung mit vergleichbaren, jedoch unterschiedlich zusammengesetzten Gesamtmengen an Opioiden. Dargestellt sind die mittels FSC/SSC ermittelten spezifischen Apoptoseraten von HL-60-Zellen, welche insgesamt mit maximal 3 µg Morphin oder Fentanyl alleine oder mit einer Mischung beider Substanzen behandelt und für 120, 144 oder 168 h inkubiert wurden. Zum Vergleich ist auch die spezifische Apoptose nach Behandlung mit je 1 µg Morphin bzw. Fentanyl sowie die Apoptoseinduktion nach Kombination von je 3 µg Fentanyl und 3 µg Morphin gezeigt. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

Diese Beobachtungen zeigen, dass eine geringere Gesamtmenge dieser beiden Opiode in Kombination eine stärkere Potenz hat, Zelltod in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zu induzieren, als die größere Menge nur einer Substanz und dass der synergistische Effekt auf den Zelltod kein Artefakt der höheren Dosis der „toxischen“ Opiode ist.

3.4.3 Molekulare Mechanismen des synergistischen Zelltodes der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 durch Fentanyl und Morphin

Die als Nächstes unternommenen Versuche hatten das Ziel, den synergistischen Zelltod durch die Kombinationsbehandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin und Fentanyl auf molekularer Ebene zu untersuchen und dessen Mechanismen herauszustellen.

Zunächst wurde hierzu untersucht, ob der Zelltod der Leukämiezellen caspasenabhängig ist, um dann im Folgenden mit Hilfe des Western Blot Verfahrens per Immunodetektion die Veränderungen einiger für die Apoptose relevanter Proteine wie den Caspasen nachzuweisen.

3.4.3.1 Caspasenabhängigkeit des synergistischen Zelltodes der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60

Da Morphin alleine bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Apoptose induziert, liegt der Schluss nahe, dass auch der bei der Kombinationsbehandlung beobachtete Zelltod caspasenabhängig sein könnte. Diese Hypothese wurde mittels des unspezifischen Breitspektrumcaspaseninhibitors zVAD.fmk überprüft (Borner et al. 1999), indem die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 vor der Kombinationsbehandlung mit 30 oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Fentanyl und 30 bis 1 $\mu\text{g/ml}$ Morphin mit 50 μM zVAD.fmk für 1 h vorbehandelt wurde (Abb. 31).

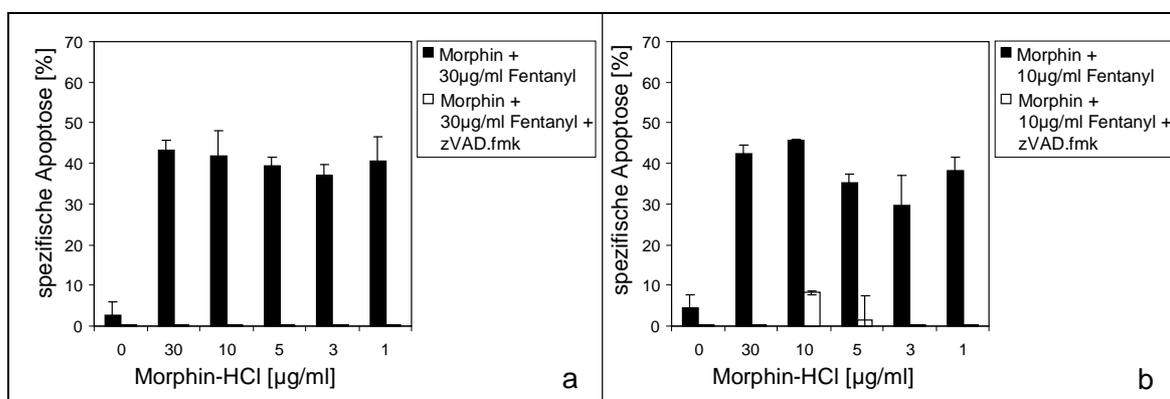


Abbildung 31: Caspasenabhängigkeit des durch die Morphin-Fentanyl-Kombination induzierten Zelltodes bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60. Dargestellt ist die Zelltodinduktion bei den HL-60-Leukämiezellen nach Behandlung mit Morphin und (a) 30 $\mu\text{g/ml}$ oder (b) 10 $\mu\text{g/ml}$ Fentanyl alleine oder nach Vorinkubation mit zVAD.fmk und anschließender Behandlung mit derselben Kombination. Aufgetragen ist die spezifische Apoptose nach 168 h Inkubationszeit. Zu sehen ist die Inhibierbarkeit des in der Morphin/Fentanyl-Kombination nach 168 h auftretenden Zelltodes durch Vorbehandlung mit zVAD.fmk. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. zVAD.fmk= Z-Val-Ala-D, L-Asp-fluoromethylketon; FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

Der durch die kombinierte Behandlung mit Morphin und Fentanyl nach 168 h induzierte Zelltod konnte durch Vorbehandlung mit zVAD.fmk deutlich reduziert werden. So ließen sich die Apoptoseraten von ca. 50 % nach Behandlung mit Morphin und Fentanyl durch Vorbehandlung mit zVAD.fmk auf Apoptoseraten zwischen 10 % und 25 % senken (Abb. 31).

Wie auch bei dem durch Morphin alleine induzierten Zelltod konnte auch in der Kombination von Morphin mit Fentanyl eine caspasenabhängige Zelltodinduktion nachgewiesen werden, bei der es sich wahrscheinlich ebenfalls um eine caspasenabhängige Apoptose handelt.

3.4.3.2 Aktivierung der Caspasen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass auch in der Kombinationsbehandlung eine caspasenabhängige Form des Zelltodes stattfindet, sollte im nächsten Schritt herausgearbeitet werden, welche Caspasen hierbei eine Rolle spielen und welche Apoptosewege somit möglicherweise an der synergistischen Apoptoseinduktion beteiligt sind.

Es wurde die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 mit 10, 3 und 1 µg/ml Morphin alleine und in Kombination mit 30 µg/ml bzw. 10 µg/ml Fentanyl behandelt und nach 120 h und 144 h deren Proteine isoliert. Nach Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese sowie Semidry-Blotting wurden diese mittels Immunodetektion mit verschiedenen Antikörpern sichtbar gemacht (Abb. 32).

Bei Detektion der Procaspase 3 (32 kDa) und ihrem aktiven Spaltprodukt (17 kDa) (Nicholson et al. 1995, Fernandes-Alnemri et al. 1996) konnte nach 120 h allenfalls in den kombiniert behandelten Proben eine sehr geringe Menge an aktivem Spaltprodukt nachgewiesen werden (Abb 33a). Dies stimmt mit den vorherigen Beobachtungen überein, dass nach 120 h Inkubationszeit noch keine Apoptose auftritt. Im Gegensatz dazu war nach 144-stündiger Inkubation eine Caspase 3-Spaltung in allen behandelten Proben, nicht jedoch bei der unbehandelten Kontrolle, nachweisbar. Es war zu erkennen, dass in den nur mit Morphin oder nur mit Fentanyl behandelten Proben das 17 kDa große, aktive Spaltprodukt von Caspase 3 auftritt. In den mit der Kombination behandelten Zellen zeigte sich eine im Vergleich dazu deutlich größere Menge an gespaltener Caspase 3, was auf eine stärkere Aktivierung dieser Effektorcaspase in der Kombination hindeutet.

Als nächstes wurde die für den mitochondrialen Apoptoseweg wichtige Initiatorcaspase, Caspase 9, untersucht. Zunächst wurde hierzu die Procaspase 9 (47 kDa) und ihr aktives 37 kDa Spaltprodukt detektiert (Zou et al. 1999). Hierbei konnte nach 120 h weder eine Abnahme der Procaspase, noch die aktive Caspase 9 nachgewiesen werden. Nach 144 h war im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle jedoch in allen behandelten Proben das 37 kDa große, aktive Spaltprodukt nachweisbar, wobei, wie auch bei Caspase 3, in den kombiniert behandelten Zellen die Menge an aktiver Caspase 9 größer war als in jeweiligen einfach behandelten Proben. Es war keine Verminderung der Proteinmenge der Procaspase erkennbar.

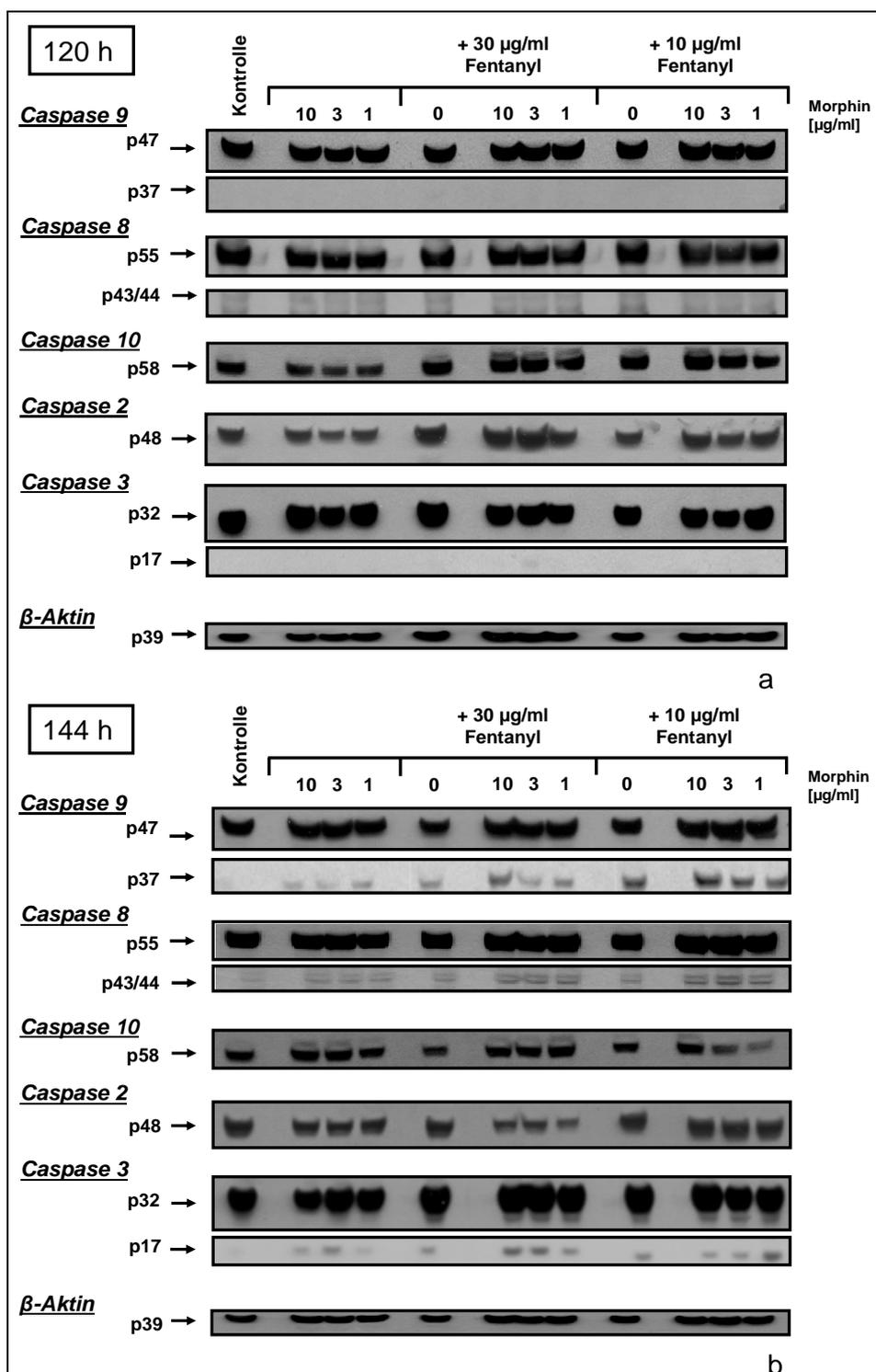


Abbildung 32: Immunodetektion von Caspase 9, 8, 10, 2 und 3 sowie ggf. deren aktiver Spaltprodukte. Gezeigt sind die mit Medium, 10, 3 oder 1 μ g/ml Morphin, 30 oder 10 μ g/ml Fentanyl oder den Kombinationen dieser Verdünnungen inkubierten, nach (a) 120 h oder (b) 144 h isolierten und mittels Western Blot-Verfahren und Immunodetektion nachgewiesenen Caspasen. Untersucht wurde die Procaspase 9 (47kDa) und ihr bei Aktivierung entstehendes, 37 kDa großes Spaltprodukt; Procaspase 8 (55 kDa) mit ihrem bei Aktivierung entstehenden Spaltprodukt (43/44 kDa), Procaspase 10 (58 kDa), Procaspase 2 (48 kDa) sowie Procaspase 3 (32 kDa) und deren aktives Spaltprodukt (17/19 kDa). Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Protein β -Aktin (39 kDa) detektiert.

Um eine etwaige Aktivierung des Rezeptor vermittelten Apoptosewegs zu erkennen, wurden als nächstes die Caspases 8 und 10 hinsichtlich ihrer Aktivierung untersucht. Für Caspase 10 (58 kDa) konnte bei keinem der Zeitwerte eine Veränderung in der detektierbaren Menge der Procaspase beobachtet werden (Kischkel et al. 2001). Bei Untersuchung von Caspase 8 war nach 120 h gleichfalls keine Aktivierung nachweisbar; es war weder eine Abnahme der Procaspase (55 kDa) noch das Auftreten von Spaltprodukten (43/44 kDa oder 18 kDa) zu erkennen (Medema et al. 1997, Juo et al. 1998). Im Gegensatz hierzu konnte nach 144 h Inkubationszeit ein 43/44 kDa Spaltprodukt der Caspase 8 gefunden werden. Die nachweisbare Menge des 43/44 kDa Proteins ist in den mit Morphin und Fentanyl gemeinsam behandelten HL-60-Leukämiezellen gegenüber allen anderen Proben deutlich erhöht; in den einfach behandelten Zellen ist das Spaltprodukt kaum detektierbar.

Die Untersuchung der 48 kDa großen Procaspase 2 (Guo et al. 2002) ergab, dass deren Menge an Protein nach 120 h, verglichen mit der Negativkontrolle, ungefähr konstant blieb. Nach 144 h zeigte sich hingegen eine schwache Abnahme der Menge an Procaspase 2 bei den mit Morphin alleine behandelten Zellen. Bei Koinkubation von 30 µg/ml Fentanyl und Morphin ist eine deutliche Abnahme der Procaspase 2 zu verzeichnen. Dies ist in der Kombination mit 10 µg/ml Fentanyl nicht erkennbar.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass bei dem synergistischen Effekt von Morphin und Fentanyl auf die Apoptose bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 neben der Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs auch eine Spaltung von Caspase 8 stattfindet.

3.4.3.3 Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die regulatorischen Proteine des mitochondrialen Apoptosewegs

Da die Untersuchung von Caspase 9 eine verstärkte Aktivierung in der Kombinationsbehandlung ergab, wurde im Folgenden die Rolle der antiapoptotischen regulatorischen Proteine Bcl-x_L und XIAP sowie des proapoptotischen Proteins Bax bei der synergistischen Apoptoseinduktion beleuchtet.

Der zelluläre Gehalt von Bcl-x_L (30 kDa) (Boise et al. 1993) in den mit einer oder beiden Substanzen behandelten HL-60-Leukämiezellen unterschied sich zu beiden Zeitwerten nicht von der Proteinmenge, wie sie in der unbehandelten Kontrolle nachweisbar war.

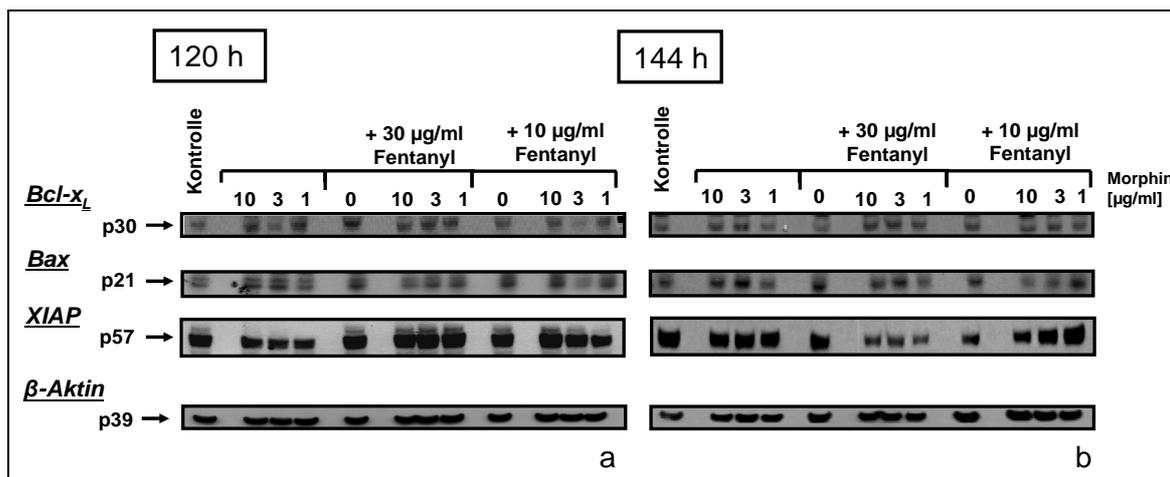


Abbildung 33: Immunodetektion von am mitochondrialen Apoptoseweg beteiligten Proteinen: Die antiapoptotischen Proteine Bcl-x_L (30 kDa) und XIAP (57 kDa) sowie das proapoptotische Bax (30 kDa). Gezeigt sind die mit Medium, 10, 3 oder 1 µg/ml Morphin, 30 oder 10 µg/ml Fentanyl oder den Kombinationen dieser Verdünnungen inkubierten, nach (a) 120 h oder (b) 144 h isolierten und mittels Western Blot-Verfahren und Immunodetektion sichtbar gemachten Proteine Bcl-x_L, XIAP und Bax. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Protein β-Aktin (39 kDa) detektiert. Bcl-x_L= *B-cell-lymphoma extra long*, XIAP= *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein*; Bax= *Bcl-2 associated x-protein*

Im nächsten Schritt wurde das proapoptotische, 21 kDa große Protein Bax untersucht (Oltvai et al. 1993). Es war zu beobachten, dass sowohl nach 120 h als auch nach 144 h durch die Behandlung mit Morphin und/oder Fentanyl eine Hochregulation von Bax gegenüber den unbehandelten Zellen stattfindet. Die Kombination der Substanzen führt, verglichen mit den einzeln behandelten Proben, jedoch nicht zu einer vermehrten Nachweisbarkeit des Proteins.

Als weiterer antiapoptotischer Faktor des intrinsischen Apoptosewegs wurde XIAP (57 kDa) untersucht (Schimmer et al. 2006). Nach 120-stündiger Inkubation konnte keine Verminderung der Proteinmenge von XIAP nachgewiesen werden. Eine Abnahme der Menge dieses 57 kDa großen Proteins war erst nach 144 h erkennbar. Dies zeigte sich besonders deutlich in der Kombination von Morphin mit 30 µg/ml Fentanyl, in welcher nur noch eine schwache Bande nachweisbar war.

Nach Untersuchung des intrinsischen Apoptosewegs kann zusammenfassend festgestellt werden, dass durch die kombinierte Inkubation mit Morphin und Fentanyl nach 144 h eine verstärkte Caspase 9-Aktivierung stattfindet, bei Kombination von Morphin mit hohen Fentanylkonzentrationen zeigt sich auch eine Aktivierung von Caspase 2. XIAP wird bei hohen Fentanylkonzentrationen in Kombination mit Morphin herunterreguliert. Das proapoptotische Protein Bax wird hochreguliert.

3.4.3.4 Einfluss der Kombinationsbehandlung auf Fas-Rezeptor und Fas-Ligand
Zytostatika induzieren Apoptose über die Regulation von Proteinen des Rezeptor vermittelten Apoptosewegs (Friesen et al. 1996, Micheau et al. 1999). Eine Regulation des Fas-Rezeptor/-Ligandensystems wäre ein möglicher Mechanismus für die in der Kombinationsbehandlung spezifische Caspase 8-Aktivierung. Aus diesem Grunde untersuchten wir als nächstes die Expression von CD95, dem sogenannten Fas-Rezeptor, sowie des Fas-Liganden (CD95-Ligand), welche bei der Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs eine zentrale Rolle spielen (Krammer 2000).

Diese Untersuchung ergab, dass sowohl nach 120 h als auch nach 144 h der Fas-Rezeptor auf den mit der Morphin-Fentanyl Kombination behandelten Zellen verstärkt exprimiert wird, während seine Menge bei Behandlung nur mit Morphin deutlich geringer ist.

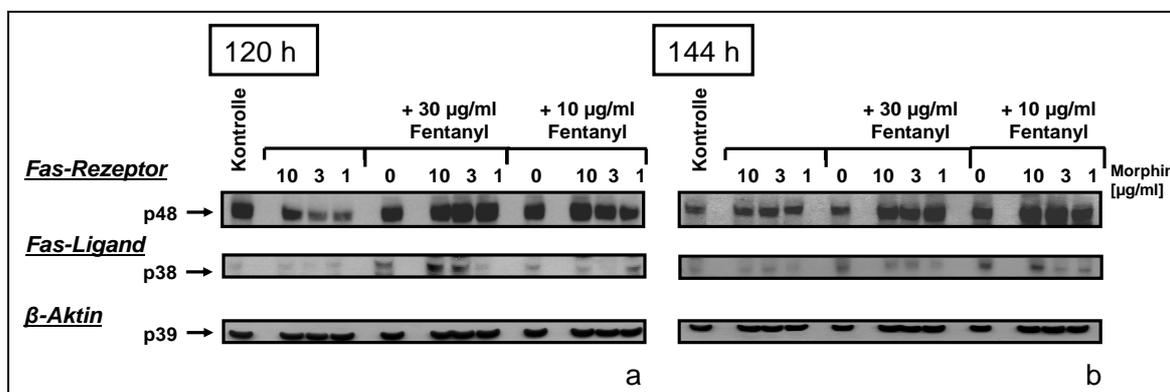


Abbildung 34: Immunodetektion von am Rezeptor vermittelten Apoptoseweg beteiligten Proteinen: Fas-Rezeptor (48 kDa) und Fas-Ligand (38 kDa). Gezeigt sind die mit Medium, 10, 3 oder 1 µg/ml Morphin, 30 oder 10 µg/ml Fentanyl oder den Kombinationen dieser Verdünnungen inkubierten, nach (a) 120 h oder (b) 144 h isolierten und mittels Western Blot-Verfahren und Immunodetektion sichtbar gemachten Proteine Fas-Rezeptor und Fas-Ligand. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Protein β-Aktin (39 kDa) detektiert.

Auch die Expression des Fas-Liganden wurde durch die Kombinationsbehandlung erhöht. Bei Koinkubation von 30 µg/ml Fentanyl mit Morphin ließ sich bereits nach 120 h eine gegenüber allen anderen Proben vermehrte Proteinmenge an Fas-Ligand detektieren. Diese Beobachtung wiederholte sich für die Kombination mit 10 µg/ml Fentanyl nach 144 h. Auch hier wurde Fas-Ligand vermehrt nachgewiesen, während bei 30 µg/ml Fentanyl dieser nicht mehr nachweisbar war.

Zusammenfassend zeigte sich bei der Untersuchung des extrinsischen Apoptosewegs, dass durch die Koinkubation von Morphin und Fentanyl der Fas-Rezeptor auf der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 exprimiert bleibt und der Fas-Ligand konzentrationsabhängig

nach einer Inkubationszeit von mindestens 120 h hochreguliert wird. Nach 144 h ist in den kombinationsbehandelten Zellen die Aktivierung der Caspase 8 nachweisbar.

3.5 Kombinationsbehandlung von Krebszellen mit Doxorubicin und Morphin

Das Anthrazyklin Doxorubicin wird bei der Behandlung von soliden Tumoren und malignen Lymphomen eingesetzt (Aktories et al. 2009). Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass Opioide wie Methadon, Fentanyl oder Buprenorphin Krebszellen für eine Apoptoseinduktion durch Doxorubicin sensitivieren können (Drost 2009, Hagemeyer 2009, Hormann et al. 2010). Es sollte nun bei den Glioblastomzellen A172 und der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 untersucht werden, ob Morphin ebenfalls eine Sensitivierung für dieses Zytostatikum erzielen kann.

3.5.1 Behandlung von Glioblastomzellen mit einer Morphin-Doxorubicin-Kombination.

Die A172-Hirntumorzelllinie wurde mit 10, 3 oder 1 µg/ml Morphin alleine oder in Kombination mit 0,15 bzw. 0,1 µg/ml Doxorubicin behandelt und für 96 bis 168 h inkubiert, bevor mittels Sub-G₁-Analyse der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt wurde. Hierbei wurden Doxorubicin-Konzentrationen gewählt, die alleine in den Glioblastomzellen keinen Zelltod auslösen und in den A172-Glioblastomzellen Apoptoseraten von max. 15 % induzieren (Abb. 35).

Nach 120- und 144-stündiger Stimulation (Abb 35a bzw.35b) erhöhte sich die Rate toter Zellen durch Koinkubation von Morphin mit Doxorubicin um maximal. 2 bis 6 Prozentpunkte gegenüber den nur mit Doxorubicin behandelten Proben. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich auch bei den anderen Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt).

Wie schon bei der Behandlung von A172-Glioblastomzellen mit Morphin allein gezeigt werden konnte (Abb. 16), bestätigen auch diese Versuche, dass Morphin bei dieser Glioblastomzelllinie weder Apoptose induziert noch eine Sensitivierung für Doxorubicin ermöglichen kann.

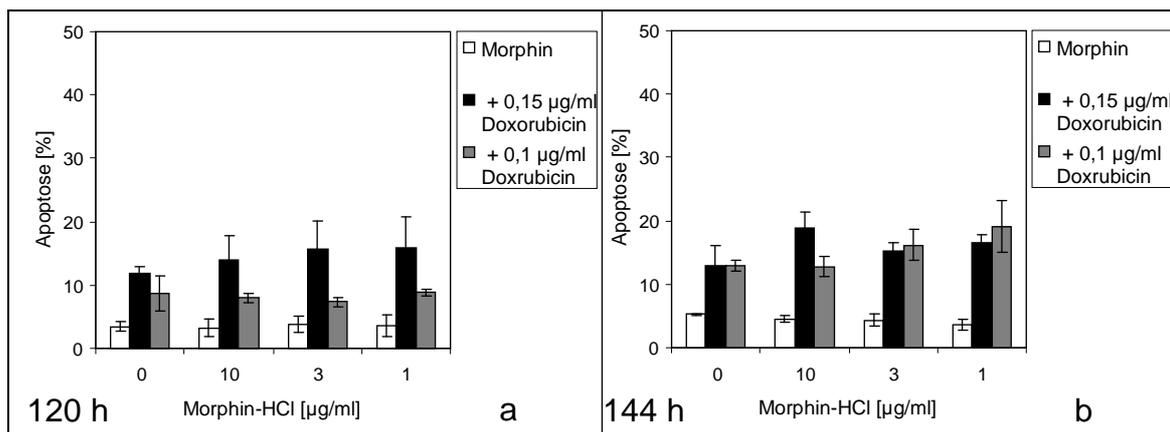


Abbildung 35: Apoptose (in %) nach Behandlung der Glioblastomzelllinie A172 mit Morphine alleine und in Kombination mit Doxorubicin. Die A172-Zellen wurden mit 10, 3 oder 1 µg/ml Morphine alleine oder in Kombination mit 0,15 oder 0,1 µg/ml Doxorubicin behandelt und nach (a) 120 h bzw. (b) 144 h mittels Färbung mit Propidiumjodid auf subdiploide DNA untersucht. Aufgetragen ist die Spontanapoptose in Prozent. Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen.

3.5.2 Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit einer Morphine-Doxorubicin-Kombination

Als Nächstes wurden an der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 analoge Versuche unternommen. Die gegenüber Doxorubicin im Vergleich zu den A172-Zellen sensiblere myeloische Leukämiezelllinie HL-60 wurde mit 10, 3 oder 1 µg/ml Morphine alleine oder in Kombination mit 0,003 µg/ml Doxorubicin behandelt und nach 96 h bis 168 h Inkubationsdauer mittels FSC/SSC-Analyse untersucht (Abb. 37).

Die Inkubationszeiten von 144 h und 168 h erwiesen sich wiederum als kritisch für das Auftreten von Zelltod. Während die ausschließlich mit Doxorubicin behandelten Proben spezifische Apoptoseraten von maximal 4,2 % nach 144 h bzw. 7,1 % nach 168 h aufwiesen, induzierte Morphine alleine spezifische Apoptoseraten von bis zu knapp 20 % (144 h) bzw. ca. 35 % nach 168 h. Durch Kombination mit Doxorubicin trat jedoch erst nach 168 h ein verstärkter Zelltod auf, während nach 144 h Inkubation die zusätzliche Behandlung keinen additiven Effekt zeigte. Nach 168 h ließ sich die durch Morphine induzierte Apoptose um bis zu ca. 10 Prozentpunkte steigern. In der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 scheint eine Sensitivierung für Doxorubicin mittels einer zusätzlichen Morphinebehandlung also nicht effektiv zu sein.

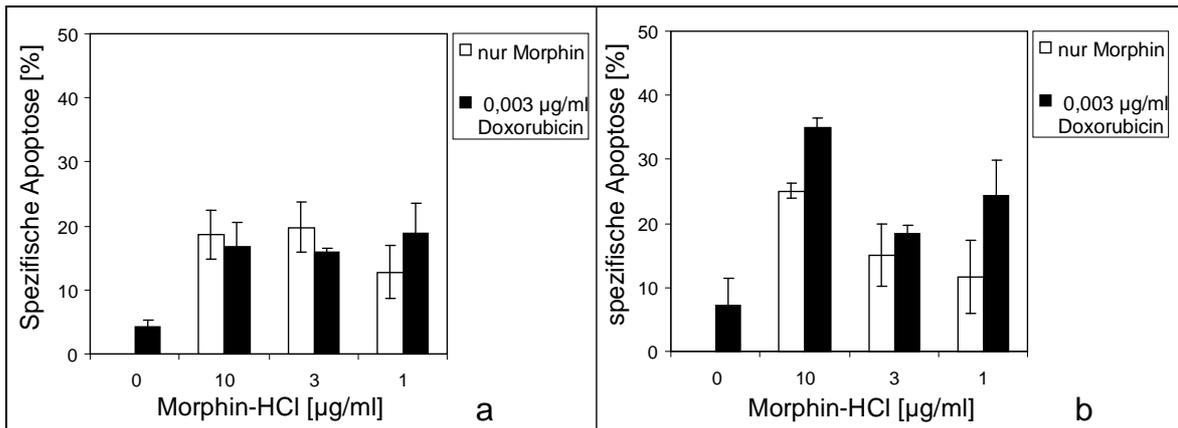


Abbildung 36: Behandlung der HL-60-Leukämiezellen mit Morphin alleine oder in Kombination mit Doxorubicin. Die Leukämiezellen HL-60 wurden mit 10, 3 oder 1 $\mu\text{g/ml}$ Morphin alleine bzw. in Kombination mit 0,003 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin behandelt, für (a) 144 h bzw. (b) 168 h inkubiert und anschließend mittels FSC/SSC analysiert. Aufgetragen ist die spezifische Apoptose. Errechnung der spezifischen Apoptose wie in Abb. 17, Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. FSC= *forward light scatter*; SSC= *side light scatter*

4 Diskussion

Maligne Erkrankungen gelten heute nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen als die „Volkskrankheit“, die in der Bundesrepublik Deutschland die häufigsten Krankheits- und Todesfälle bedingt (Statistisches Bundesamt 2008). In den letzten Jahren wurden in der Chemo- und Radiotherapie große Fortschritte erzielt, dennoch beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate aller Krebserkrankungen im Durchschnitt nur 26,5-38,9 % (Männer) bzw. 44,8-50,4 % (Frauen) (Wahrendorf et al. 2007).

Ein großes Problem in der Therapie von Malignomen besteht in Resistenzen gegen Therapien mit Zytostatika und Strahlung (Milas et al. 2005). Die Wirkung von Zytostatika wird sowohl in Leukämien als auch in soliden Tumoren häufig über eine Aktivierung der Apoptosekaskaden vermittelt (Friesen et al. 1996, Fulda et al. 1998c, Friesen et al. 1999). Deregulationen dieser Signalwege tragen zu Radio- und Chemoresistenzen bei (Friesen et al. 1997, Reed 2008).

Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze stellt deshalb einen Schwerpunkt der aktuellen Forschungsbemühungen dar.

Patienten mit Malignomen erhalten häufig eine Schmerztherapie, die im Normalfall auch Opioide beinhaltet. Verwendet werden hierbei unter anderem Morphin, Methadon und Buprenorphin, die zur Gruppe der hochpotenten Opioide gehören (World Health Organization 1996).

In vorangegangenen *in vitro* Forschungsarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Opioide einen Einfluss auf Vitalität und Proliferationsaktivität von Krebszellen ausüben können. Methadon, welches sonst in der Substitutionstherapie bei Opioidabhängigen eingesetzt wird, induziert beispielsweise in Leukämiezellen Apoptose und hemmt deren Proliferation, während gesunde Blutlymphozyten unversehrt bleiben (Friesen et al. 2008a). Buprenorphin und Fentanyl können alleine oder in Kombination mit dem Zytostatikum Doxorubicin Apoptose in Leukämiezellen induzieren (Drost 2009, Hagemeyer 2009). Auch für die häufig eingesetzte Substanz Morphin konnte eine Apoptoseinduktion sowohl in Leukämiezellen (Singhal et al. 1999, Hatsukari et al. 2007) als auch in soliden Tumorzellen (Yeager et al. 1991, Tegeder et al. 2003) nachgewiesen werden. Untersuchungen mit Glioblastomzellen zeigten ebenfalls, dass die Behandlung mit

Methadon Apoptose induziert und die Zellen für Doxorubicin sensitiviert (Hormann et al. 2010).

Der Einsatz von Opioiden scheint also ein möglicher neuer Therapieansatz zu sein, um Standardtherapien zu optimieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Morphin in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Apoptose über eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs induziert werden kann. Weitere Untersuchungen derselben Zelllinie zeigten, dass eine Sensitivierung von AML-Zellen für Doxorubicin vermittelten Zelltod, wie sie bei Methadon nachgewiesen werden konnte (Roscher et al. 2010), nicht möglich ist. Als nächstes wurde eine Kombinationstherapie aus Morphin und Fentanyl auf ihr Potential hin untersucht, in der myeloischen Leukämiezelllinie Apoptose zu induzieren. Hierbei konnte ein synergistischer Effekt auf die Zelltodinduktion nachgewiesen werden, der neben der Aktivierung des intrinsischen Signalweges auf die zusätzliche Aktivierung von Caspase 8 zurückzuführen ist. Bei der Behandlung der Glioblastomzelllinie A172 konnte durch Morphin kein Zelltod induziert werden. Auch eine Sensitivierung der Tumorzellen für Doxorubicin, wie sie bei der Behandlung mit Methadon auftritt (Hormann et al. 2010), war nicht möglich.

Es ist bekannt, dass Opioidrezeptoren nicht nur im ZNS, sondern auch auf Immunzellen exprimiert werden (Stefano et al. 1993a, Makman et al. 1995). Solide Malignomzellen verschiedenster Herkunft exprimieren ebenfalls Bindungsstellen für Opioide (Fichna et al. 2004). Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 und der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM sowie bei den A172-Glioblastomzellen konnte eine hohe Expression von Opioidrezeptoren nachgewiesen werden (Friesen et al. 2011).

In der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 und der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM kann Methadon, aber auch Buprenorphin, bereits innerhalb 24 h Apoptose induzieren (Friesen et al. 2008a, Drost 2009). Morphin stellt heutzutage in der Schmerztherapie von Krebspatienten die Standardmedikation dar. Ob Morphin jedoch, ähnlich wie andere Opioide, ebenfalls Apoptose in diesen Krebszelllinien induzieren kann, ist noch nicht hinlänglich geklärt.

Untersuchungen an der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM und der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zeigten, dass Morphin nach kurzen Inkubationszeiten (24 bis 72 h) keinen Zelltod auslösen kann. Auch bei längeren Inkubationszeiten (96 bis 168 h) trat bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM ebenfalls kein Zelltod auf. Bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 hingegen zeigte sich hierbei mittels lichtmikroskopischer Veränderungen, FSC/SSC-Analyse und dem Nachweis von subdiploider DNA eine konzentrationsabhängige Zelltodinduktion. Es konnte gezeigt werden, dass auch therapeutische Morphinkonzentrationen von 0,3 µg/ml und weniger (McQuay et al. 1990, Faura et al. 1996) in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Zelltod induzieren.

Tegeder et al. konnten zeigen, dass es bei *in vitro* Behandlung von Adenokarzinomzellen mit Morphin zu einer Hemmung der Proliferation und einem Zellzyklusblock in der G₁-Phase kommt (Tegeder et al. 2003). Eine Hemmung der Proliferation von Leukämiezellen konnte auch schon bei Behandlung mit Methadon (Friesen et al. 2008a) und Buprenorphin gezeigt werden (Drost 2009). In unseren Studien konnten wir im Gegensatz dazu nach Behandlung mit Morphin keine Veränderung des Zellzyklus der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nachweisen. Auch die Proliferation der Zellen wurde durch Behandlung mit Morphin bis zum Zeitpunkt der Apoptoseinduktion, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, nicht verändert.

Bei der Untersuchung des durch die Morphin-Behandlung induzierten Zelltodes konnten einige Veränderungen beobachtet werden, von denen bekannt ist, dass sie charakteristisch für eine Apoptoseinduktion sind. Ähnliche Veränderungen konnten auch nach der Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Methadon beobachtet werden (Friesen et al. 2008a). Hierzu gehören die lichtmikroskopisch beobachtbaren Veränderungen, nämlich vermehrte Granularität der Zellen, Verkleinerung des Zellvolumens und Abschnürung von Zellpartikeln (Darzynkiewicz et al. 1997, Kumar et al. 2007a). Auch die durchflusszytometrischen Analysen belegen aufgrund der Zellverkleinerung und der DNA-Fragmentierung einen apoptotischen Zelltod (Darzynkiewicz et al. 1997, Kumar et al. 2007a).

Zusammenfassend zeigte sich im ersten Teil unserer Untersuchungen, dass Morphin nur bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Apoptose induzieren kann. Während Methadon und Buprenorphin schon nach kurzer Inkubationszeit in Leukämiezellen Apoptose einleiten (Friesen et al. 2008a, Drost 2009), konnte ein Einsetzen des Zelltodes

nach Behandlung mit Morphin bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 erst nach sehr viel längeren Zeiten beobachtet werden. Bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM hingegen war die Induktion des Zelltodes mit Morphin nicht möglich. Dies unterscheidet die Wirkung von Morphin von den durch Methadon ausgelösten Effekten, da Methadon im Gegensatz zu Morphin innerhalb kurzer Inkubationszeiten (ab 24 h) sowohl in der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM als auch bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Apoptose induzieren kann.

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass bei der Behandlung von Leukämiezellen mit Opioiden Caspasen aktiviert werden (Hatsukari et al. 2007, Friesen et al. 2008a, Drost 2009, Hagemeyer 2009). Nach Inkubation mit Methadon kommt es in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 wie auch in der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs (Friesen et al. 2008a). Morphin hingegen kann bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60, nicht aber bei der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM Apoptose induzieren.

Durch Studien mit dem Pancaspseninhibitor zVAD.fmk (Borner et al. 1999) konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion des Zelltodes nach Behandlung von HL-60-AML-Zellen mit Morphin caspasenabhängig ist.

Bei ihrer Aktivierung durch Initiatorcaspasen wie Caspase 9 oder 8 wird die Procaspase 3 entweder direkt in zwei Fragmente gespalten (Nicholson et al. 1995), oder diese entstehen durch Autokatalyse aus einem Zwischenprodukt (Fernandes-Alnemri et al. 1996). Nach der Behandlung mit Morphin konnte bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 eine konzentrationsabhängige Caspase 3-Aktivierung nachgewiesen werden.

Diese Aktivierung kann auf einer vorherigen Spaltung von Initiatorcaspasen des intrinsischen oder extrinsischen Apoptosesignalwegs beruhen (Hengartner 2000).

Methadon bewirkt eine Apoptoseinduktion über eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs (Friesen et al. 2008a). Ein zentrales Ereignis ist hierbei die Aktivierung von Caspase 9 im Apoptosom, einem Holoenzymkomplex, welcher sich aus Cytochrom c, Apaf-1, dATP und der Procaspase 9 zusammensetzt (Li et al. 1997, Zou et al. 1999) und der gebildet wird, wenn die äußere Mitochondrienmembran ihre Integrität verliert (Brunelle et al. 2009). Bei der Aktivierung von Caspase 9 kommt es zur proteolytischen Spaltung der Procaspase und zur Bildung von aktiven Spaltprodukten (Zou et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Morphinbehandlung eine konzentrationsabhängige Caspase 9-Aktivierung stattfindet. Dies belegt eine Aktivierung

der Caspasenkaskade durch Morphin und erklärt auch die gleichzeitig auftretende Aktivierung von Caspase 3, welche durch die aktive Caspase 9 erfolgen kann (Li et al. 1997).

Wie auch schon für Methadon bekannt ist (Friesen et al. 2008a), zeigen diese Ergebnisse eine Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs in Folge der Morphinbehandlung. Auch Hatsukari und Kollegen konnten nach der Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin eine Aktivierung von Caspase 2, 3 und 9, nicht aber von Caspase 8 beobachten (Hatsukari et al. 2007).

Caspase 2 kann sowohl im Rahmen des intrinsischen als auch des Rezeptor vermittelten Apoptosewegs aktiviert werden (Guo et al. 2002, Lavrik et al. 2006). Eine Aktivierung von Caspase 2 konnte jedoch nur nach Behandlung mit hohen Morphinkonzentrationen im toxischen Bereich (30 µg/ml) nachgewiesen werden.

Die Bildung des Apoptosoms beruht auf der Freisetzung von Cytochrom c (Zou et al. 1999). Die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran für Cytochrom c wird bestimmt durch die Interaktion zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie (Brunelle et al. 2009).

Bax ist ein proapoptotisches Protein (Oltvai et al. 1993), welches sich bei Apoptoseinduktion in die Mitochondrienmembran integriert (Hsu et al. 1997) und Poren formt, durch die z. B. Cytochrom c austreten kann (Saito et al. 2000). Während Bax durch die Behandlung mit Methadon und Buprenorphin nicht beeinflusst wird (Friesen et al. 2008a, Drost 2009), konnten wir bei den mit höheren Morphinkonzentrationen (30 und 3 µg/ml Morphin) behandelten Zellen schon zeitlich vor der Caspasenaktivierung eine Hochregulation von Bax beobachten.

Ein Gegenspieler von Bax ist Bcl-x_L, ein antiapoptotisches Protein derselben Familie (Boise et al. 1993). Es verhindert die Permeabilitätserhöhung direkt durch Bindung proapoptotischer Faktoren wie Bax (Billen et al. 2008) oder indirekt durch Bindung Bax-aktivierender Proteine (Cheng et al. 2001). Die Opioiden Methadon und Buprenorphin induzieren Apoptose unter anderem durch Herunterregulation von Bcl-x_L (Friesen et al. 2008a, Drost 2009). Nach Inkubation mit Morphin ließ sich eine Herunterregulation von Bcl-x_L nur bei hohen Morphinkonzentrationen (30 µg/ml) nachweisen.

Es ist bekannt, dass Buprenorphin und Methadon auch den zellulären Gehalt des Caspasen-inhibierenden Proteins XIAP (*X-chromosome linked IAP*) regulieren (Friesen et al. 2008a, Drost 2009). XIAP hemmt Caspase 3 und 7 sowie Caspase 9 in ihrer Aktivität (Takahashi et al. 1998) und kann gleichzeitig Caspasen, aber auch sich selbst, durch Ubiquitylierung

zur Degradierung durch Proteasomen freigegeben (Yang et al. 2000). Beim proteosomalen Abbau von XIAP entsteht ein 25 kDa großes, inaktives Fragment, dessen Nachweis neben der Abnahme des aktiven, 57 kDa großen Proteins ein zusätzliches Zeichen einer XIAP-Inaktivierung im Rahmen der Apoptose darstellt (Song et al. 2003). Eine weitere Möglichkeit des Abbaus von XIAP besteht in der Spaltung des Proteins durch aktive Caspasen, bei der das Auftreten eines ca. 30 kDa großen Fragments beschrieben wurde (Deveraux et al. 1999). Nach Behandlung mit Morphin konnte in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Spaltprodukte von XIAP nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass die Wirkung von Zytostatika auch über die Aktivierung des Fas-Rezeptor/Fas-Liganden-Signalwegs vermittelt wird (Friesen et al. 1996, Micheau et al. 1999). Hierbei kommt dem Fas-Rezeptor innerhalb der Familie der Todesrezeptoren eine Schlüsselstellung bei der Apoptoseinduktion zu (Walczak et al. 2000). Die Aktivierung von Caspase 8 oder 10 im so genannten „*Death inducing signalling complex*“, DISC, ist zur Vermittlung eines proapoptotischen Signals ausgehend vom Fas-Rezeptor von zentraler Bedeutung (Juo et al. 1998, Muzio et al. 1998, Kischkel et al. 2001). Bei Aktivierung von Caspase 8 entsteht ein Spaltprodukt, das anschließend zu zwei kleineren, aktiven Fragmenten zerfällt (Medema et al. 1997). Auch bei der Aktivierung von Caspase 10 treten Spaltprodukte auf (Kischkel et al. 2001). Die Untersuchung auf Spaltung von Caspase 8 und 10 lässt somit Rückschlüsse auf eine Involvierung des extrinsischen Apoptosesignalwegs zu. Unsere Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine Aktivierung des Rezeptor vermittelten Apoptosewegs bei den mit Morphin behandelten Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit bekannten Daten überein, nach denen auch durch die Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Methadon keine Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs nachweisbar war (Friesen et al. 2008a).

Zusammenfassend konnten durch die Western Blot Analyse die molekularen Mechanismen, welche zu der beobachteten Apoptoseinduktion durch Morphin in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 führen, dargestellt werden. Es zeigte sich, dass Morphin den Zelltod über eine Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs induziert. Über eine verminderte Menge an Bcl-x_L, vor allem aber über eine Erhöhung des Gehalts an Bax in der Zelle wird das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren in Richtung Apoptose verschoben. Dies resultiert in einer Aktivierung von Caspase 9 und im Abbau von XIAP. Caspase 9 wiederum spaltet Caspase 3 und besiegelt damit die Ausführung des Apoptosesignals. Eine Aktivierung des Rezeptor vermittelten Apoptosewegs war nicht nachweisbar.

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass in Leukämiezellen nicht nur durch bestimmte Opioide Apoptose induziert wird, sondern dass Substanzen wie Buprenorphin oder Fentanyl die Zellen auch für das Chemotherapeutikum Doxorubicin sensitivieren können (Hagemeier 2009, Roscher et al. 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu der Behandlung mit anderen Opioiden (Drost 2009, Hagemeier 2009, Roscher et al. 2010) eine Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit dem Standardopioide Morphin und dem Zytostatikum Doxorubicin die Zelltodraten nicht steigert. Somit findet keine Sensitivierung der Leukämiezellen für Doxorubicin statt.

In der Krebstherapie erhalten Patienten regelmäßig nicht nur eine Monotherapie mit Opioiden, sondern werden mit verschiedenen Opioiden behandelt, die z. B. über unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften verfügen. Ein häufiges Prinzip ist beispielsweise die Kombination eines langwirksamen Fentanylpflasters mit kurz wirksamen und schnell verfügbaren Opioiden wie Morphin oder Fentanyl (Coluzzi et al. 2001). Bisher wurden Kombinationen zweier Opioide nur hinsichtlich einer Verstärkung der analgetischen Wirkung untersucht. Es ist bekannt, dass eine solche Kombination keinen synergistischen Effekt auf die Analgesie hat. Zwei klinische Studien an Patienten, welche nach einem operativen Eingriff entweder nur Morphin oder Morphin in Kombination mit Fentanyl bzw. dessen Abkömmling Alfentanil erhielten, konnten keine Verstärkung der analgetischen Wirkung in der Kombinationsbehandlung feststellen (Ngan Kee et al. 1999, Friedman et al. 2008).

Bolan et al. konnten 2002 im Mausmodell beobachten, dass ausschließlich die Kombinationen von Methadon mit verschiedenen μ -Rezeptor-Agonisten, nicht aber beispielsweise eine Morphin/Fentanyl-Kombination, einen synergistischen Effekt auf die Analgesie ausübt (Bolan et al. 2002). Es ist bekannt, dass Fentanyl die lymphatische Leukämiezelllinie CEM für Doxorubicin-induzierte Apoptose sensitiviert (Hagemeier 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in der für Morphin sensiblen myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 durch eine Kombinationsbehandlung mit vergleichbaren Konzentrationen von Morphin und Fentanyl eine verstärkte Zelltodinduktion möglich ist. Diese konnte jedoch nur bei Konzentrationen beobachtet werden, die über den in der Literatur beschriebenen toxischen Blutplasmaspiegeln liegen. Je nach Publikation werden hierfür Werte zwischen 2 ng/ml und 170 ng/ml Fentanyl im Plasma bzw. Serum angegeben (Poklis 1995, Repetto et al. 1997, TIAFT 2004).

Hierbei trat durch diese Kombinationsbehandlung ab einer Inkubationszeit von 144 h bei den Leukämiezellen lichtmikroskopisch, aber auch in der FSC/SSC-Untersuchung und bei der Sub-G₁-Analyse ein verstärkter Zelltod auf. Durch die Kombination von Morphin und Fentanyl konnte bei stärkerer Zelltodinduktion die eingesetzte Gesamtdosis gesenkt werden. Der hierbei erzielte Zelltod überstieg die Zelltodraten, die durch eine höhere Einzeldosis erreicht werden konnten. Dies belegt, dass es sich bei der gezeigten Wirkungspotenzierung nicht um einen „*off target*“-Effekt handelt, also um die „Vergiftung“ der Zellen durch die höheren Opioidmengen. Das Absenken der benötigten Gesamtdosis könnte potentiell auch von therapeutischem Nutzen sein.

Wir konnten zeigen, dass diese Zelltodinduktion der klassischen Definition eines syergistischen Effektes entspricht. Dieser wird in der Literatur als eine „gegenseitige Beeinflussung mehrerer Arzneimittel im Sinne einer additiven oder potenzierten, unter Umständen auch neuartigen Wirkung“ (de Gruyter (Hrsg) 2010, S. 2020) definiert; eine potenzierte Wirkung ist eine „Wirkung zweier verabreichter Arzneimittel, die über die Addition ihrer Einzeleffekte hinausgeht“ (de Gruyter (Hrsg) 2010, S. 2239). Entsprechend dieser Definition konnte in der vorliegenden Arbeit ein synergistischer Effekt der Kombinationsbehandlung mit Morphin und Fentanyl auf die Induktion des Zelltodes bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nachgewiesen werden.

Es konnte in weiteren Untersuchungen allerdings gezeigt werden, dass bei der *in vitro*-Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nach Behandlung mit niedrigeren Fentanylkonzentrationen in Kombination mit Morphin kein verstärkender Effekt auf die Zelltodinduktion mehr zu beobachten war, obwohl auch diese Konzentrationen noch über der in der Literatur beschriebenen toxischen Plasmakonzentration liegen (Poklis 1995, Repetto et al. 1997, TIAFT 2004).

Diese Daten lassen darauf schließen, dass der *in vitro* aufgetretene Synergismus zwischen Morphin und Fentanyl bei Patienten, bei denen Fentanylkonzentrationen von 1 bis 10 ng/ml als therapeutischer Plasmaspiegel gemessen wurden (Repetto et al. 1997, Winek et al. 2001, TIAFT 2004), *in vivo* wahrscheinlich nicht auftritt. Auch die eingesetzten Morphinkonzentrationen lagen außerhalb des therapeutischen Bereiches von unter 0,3 µg/ml (McQuay et al. 1990, Faura et al. 1996).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Kombination von Opioiden in Bezug auf die Apoptoseinduktion einen synergistischen Effekt aufweist. Da die dafür notwendigen Morphin- und Fentanylkonzentrationen jedoch über den für den Menschen tolerablen

Dosierungen liegen, ist fraglich, ob diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar oder therapeutisch nutzbar sind. Allerdings könnte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, ob ähnliche synergistische Effekte auch bei Kombinationen von anderen Opioiden in niedrigeren, nicht toxischen Dosierungen auftreten.

Der beobachtete synergistische Zelltod weist dieselben Charakteristika auf wie der durch Morphin alleine induzierte Zelltod: Zellverkleinerung, erhöhte Granularität, Abschnürung apoptotischer Körperchen, sowie erhöhter Anteil subdiploider DNA. Wie oben bereits dargestellt, belegen diese Veränderungen einen apoptotischen Zelltod auch nach der Morphin-Fentanyl-Kombinationsbehandlung.

Die bisher dargelegten Untersuchungen der Leukämiezelllinie HL-60 sowie zahlreiche vorangegangene Untersuchungen belegen, dass die Behandlung von Leukämiezellen mit einem Opioid Caspasen aktiviert und den mitochondrialen Apoptoseweg aktiviert (Singhal et al. 1999, Hatsukari et al. 2007, Friesen et al. 2008a, Drost 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei Behandlung dieser AML-Zellen mit Morphin und Fentanyl ein synergistischer Effekt auf die Apoptoseinduktion auftritt. Die molekularen Mechanismen, die bei diesem Effekt der Kombinationsbehandlung mit zwei Opioiden eine Rolle spielen, sind hingegen noch nicht bekannt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die synergistische Apoptoseinduktion mit Morphin und Fentanyl caspasenabhängig ist.

Eine Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin alleine, wie auch mit anderen Opioiden (Friesen et al. 2008a, Drost 2009) bewirkt eine Aktivierung von Caspase 3 und 9. Wir konnten zeigen, dass auch nach der Kombinationsbehandlung mit Morphin und Fentanyl eine zeitabhängige Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9 stattfindet. Außerdem konnten wir darstellen, dass diese Aktivierung durch die Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den mit den Einzelsubstanzen behandelten Zellen verstärkt auftritt. Auch hier ließ sich also eine Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs nachweisen.

Eine Aktivierung von Caspase 8 oder 10 konnte bei einer Behandlung mit Morphin (s.o.) oder Methadon alleine (Friesen et al. 2008a) nicht gefunden werden. Bei einer Inkubation mit Buprenorphin hingegen kam es zu einer Aktivierung beider Caspasen (Drost 2009). Auch bei der Kombinationsbehandlung der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM mit Fentanyl und Doxorubicin traten aktive Spaltprodukte auf, jedoch ohne dass es zu einer Veränderung der Fas-Rezeptorexpression kam (Hagemeier 2009).

Eine Aktivierung von Caspase 10 konnte auch nach Koinkubation der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Morphin und Fentanyl nicht gefunden werden. Im Gegensatz dazu konnte in den mit der Kombination behandelten Zellen eine deutliche Aktivierung von Caspase 8 nachgewiesen werden. In den mit nur einem Opioid behandelten Vergleichsproben war die Caspase 8-Aktivierung nicht nachweisbar.

Die Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin alleine führt nur in hohen Dosen auch zu einer Caspase 2-Aktivierung. Eine Rekrutierung von Caspase 2 war durch die Kombinationsbehandlung mit Morphin und Fentanyl ebenfalls nachweisbar. Die im Gegensatz zu den obigen Ergebnissen nur schwach ausgeprägte Aktivierung nach der Behandlung mit Morphin alleine erklärt sich aus den eingesetzten niedrigeren Morphin-Konzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin alleine zu einer Hochregulation des proapoptotischen Proteins Bax (Oltvai et al. 1993) sowie einer Verminderung des antiapoptotischen Faktors Bcl-x_L (Boise et al. 1993) führt. Bei der weiteren Analyse des intrinsischen Apoptoseweg der koinkubierten Zellen konnten wir einen erhöhten zellulären Gehalt an Bax nachweisen, der jedoch in der Kombination nicht stärker ausgeprägt war als bei den einfach behandelten Zellen und zeitlich vor der Aktivierung der Caspasenkaskade auftrat. Die Untersuchung des antiapoptotischen Faktors Bcl-x_L (Boise et al. 1993) ergab keine Veränderung der Proteinmenge durch die Behandlung mit Morphin und/oder Fentanyl.

XIAP inhibiert Caspase 3, 7 und 9 und ist somit ein negativer Regulator insbesondere des intrinsischen Apoptosewegs (Takahashi et al. 1998). Bei Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Opioiden kommt es regelhaft zu einer Herunterregulation von XIAP (Friesen et al. 2008a, Drost 2009). Es konnte gezeigt werden, dass XIAP in mit Morphin und Fentanyl behandelten HL-60-Leukämiezellen ebenfalls abgebaut wird. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf der in der Kombination verstärkten Aktivierung von Caspasen, welche zur verstärkten XIAP-Degradierung beitragen können (Deveraux et al. 1999).

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass Chemotherapeutika über eine Aktivierung der Fas-Rezeptor/Fas-Liganden Interaktion Apoptose induzieren (Friesen et al. 1996, Kasibhatla et al. 1998, Micheau et al. 1999) und dabei Caspase 8 aktivieren (Juo et al. 1998, Micheau et al. 1999). Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Morphin in humanen Lymphozyten zu einer verstärkten Fas-Rezeptor-

Expression führt (Yin et al. 1999). Auch bei der Kombinationsbehandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin und Fentanyl konnte eine Caspase 8-Aktivierung nachgewiesen werden, die bei der Einzelbehandlung mit Opioiden nicht auftrat. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass HL-60-Leukämiezellen, die mit Morphin und Fentanyl behandelt wurden, eine verstärkte Fas-Rezeptor-Expression aufweisen. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit der oben erwähnten Arbeit, in der eine Morphin-Behandlung auch in Lymphozyten eine Fas-Rezeptor-Hochregulation bewirkte (Yin et al. 1999).

In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass durch die Koinkubation mit Morphin und Fentanyl in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 eine zeitabhängige Hochregulation des Fas-Liganden stattfindet. Diese Hochregulation trat bei den HL-60-Leukämiezellen, die mit der höheren Fentanylkonzentration behandelt worden waren, zeitlich früher auf als nach Behandlung mit einer niedrigen Fentanylkonzentration.

Der Nachweis, dass durch die Kombinationsbehandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin und Fentanyl das Fas-Rezeptor/Fas-Ligandensystem hochreguliert wird, bietet auch eine Erklärungsmöglichkeit für die ebenfalls beobachtete Aktivierung von Caspase 8 durch die Kombinationstherapie.

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die zum synergistischen Zelltod der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nach Koinkubation mit Morphin und Fentanyl führen, dass sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptosesignalweg hierbei involviert ist.

Ein direkter Vergleich der molekularen Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Morphin alleine und durch die Morphin-Fentanyl-Kombination zeigt Unterschiede, aber auch Parallelen.

Die Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9 ist nach der Kombinationsbehandlung stärker ausgeprägt als durch Inkubation mit Morphin alleine. Eine verstärkte Expression von Bax vor der Aktivierung der Caspasenkasade findet sich gleichermaßen nach beiden Behandlungen, sie wird jedoch nicht spezifisch verstärkt durch die Kombinationsbehandlung.

Im Gegensatz zu den Veränderungen des mitochondrialen Apoptosewegs, die nicht spezifisch für die Morphin-Fentanyl Kombinationsbehandlung sind, konnte eine Aktivierung von Caspase 8 nur nach der kombinierten Behandlung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 mit Morphin und Fentanyl festgestellt werden. Es ist bekannt, dass Caspase 8 auf verschiedenen Wegen aktiviert werden kann. Forschungsergebnisse zeigen, dass die Caspase 8-Spaltung im Rahmen einer Aktivierung des Fas-Rezeptors, z. B.

nach Zytostatika-Therapie auftritt (Friesen et al. 1996, Micheau et al. 1999). Wir konnten zeigen, dass auch die Kombinationstherapie der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 eine Hochregulation des Fas Rezeptor/Fas-Ligandensystems nach sich zieht, so dass eine Aktivierung von Caspase 8 über diesen Weg denkbar wäre. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Aktivierung von Caspase 8 im Rahmen der Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs, wie sie von Friesen und Kollegen in Studien mit α -Strahlern beobachtet werden konnte. Diese fand unabhängig vom Fas-Rezeptor/-Ligandensystem statt (Friesen et al. 2007). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Caspase 8-Aktivierung bei Schädigung der Mitochondrien stattfinden kann (Fulda et al. 1998c).

Es ist bekannt, dass Opioide nicht nur in Leukämiezelllinien Apoptose induzieren. Auch in Zelllinien, die von Glioblastomen abstammen, kann Methadon Zelltod auslösen und die Glioblastomzellen für Doxorubicin induzierte Apoptose sensitivieren (Hormann et al. 2010). Unsere Untersuchungen an der Glioblastomzelllinie A172 zeigten, dass im Gegensatz zu Methadon das Standardopioide Morphin keine Apoptose in diesen Zellen auslöst. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch eine Sensitivierung der Glioblastomzelllinie A172 für Doxorubicin-induzierten Zelltod nicht möglich ist.

Auch diese Untersuchungen zeigen, dass Morphin, verglichen mit Methadon, hinsichtlich der Zelltodinduktion weniger effektiv ist und decken sich mit den Untersuchungen an den Leukämiezelllinien HL-60 und CEM, bei denen Morphin entweder keinen, oder wie bei der myeloischen Zelllinie HL-60 gezeigt, einen schwächeren Zelltod auslöst.

Ziel dieser Arbeit war es, aufbauend auf bereits vorhandene Erkenntnisse über die Apoptoseinduktion bei Krebszellen durch Opioide, darzustellen, inwieweit das Standardanalgetikum Morphin ebenfalls Apoptosemechanismen in Krebszelllinien aktivieren kann. Außerdem sollten weitere, zuvor noch nicht untersuchte Ansätze wie die Kombination zweier Opioide untersucht werden. Die Behandlung mit Morphin alleine erwies sich, verglichen mit dem Effekt von Methadon oder Buprenorphin, als weniger effektiv (Friesen et al. 2008a, Drost 2009). Nur in einer der untersuchten Zelllinien konnte Morphin Apoptose induzieren. Dieser Zelltod wird zwar, wie auch bei Methadon oder Buprenorphin, über eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs vermittelt (Friesen et al. 2008, Drost 2009); jedoch werden dabei nicht Bcl-x_L und XIAP, sondern vor allem Bax beeinflusst.

Sowohl das Ausmaß der Apoptose, ihr zeitliches Auftreten, als auch der Einfluss auf den mitochondrialen Apoptoseweg sind bei Methadon und Buprenorphin ähnlich und unterscheiden sich von der Wirkung des Morphins. Auch induziert Morphin Apoptose nur in der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60, während Methadon und Buprenorphin auch bei der lymphatischen Zelllinie CEM auslöst (Friesen et al. 2008a, Drost 2009). Es besteht somit die Möglichkeit, dass der Wirkmechanismus der Zelltodinduktion von Morphin sich von dem der beiden anderen Substanzen unterscheidet.

Die Erforschung möglicher Mechanismen, über die die Apoptoseinduktion von Opioiden vermittelt wird, wäre, besonders bei Berücksichtigung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, ein spannender Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Naloxonfärbung konnte eine Expression von Opioidrezeptoren auf den Krebszellen nachgewiesen werden. Eine mögliche weiterführende Fragestellung wäre beispielsweise, die Subtypen dieser Opioidrezeptoren genauer zu charakterisieren. Da ein bestimmter Subtyp des μ -Opioidrezeptors beschrieben wurde, der selektiv von Opioid-Alkaloiden wie Morphin (Cadet et al. 2003), nicht aber von synthetischen Substanzen wie Fentanyl (Bilfinger et al. 1998) aktiviert wird, könnten Unterschiede in der Expression solcher Rezeptoren auch die unterschiedliche Sensitivität von Krebszellen für Morphin erklären. Tatsächlich wurde dieser Subtyp, der μ_3 -Rezeptor, bereits auf Krebszellen nachgewiesen (Cruciani et al. 1994). Darüber hinaus konnte anhand von Untersuchungen unterschiedlich gespleißter Varianten des MOR-Gens belegt werden, dass Morphin und Fentanyl mit verschiedenen Anteilen der μ -Opioidrezeptoren interagieren (Pasternak 2001).

Die Behandlung von Leukämiezellen mit einer Kombination zweier Opioide wie Morphin und Fentanyl könnte möglicherweise einen neuen Forschungsansatz darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dadurch eine Wirkungspotenzierung einzelner Substanzen möglich ist. Bei der Kombination von Morphin und Fentanyl ist dies allerdings nur bei für den Menschen toxischen Konzentrationen beider Substanzen möglich. Auf molekularer Ebene kommt es hierbei durch eine Kombinationsbehandlung zusätzlich zur Induktion des intrinsischen Apoptosewegs auch zu einer Aktivierung von Caspase 8.

In diesem neuen Feld werden sicherlich in Zukunft noch viele spannende und interessante Erkenntnisse gewonnen werden. Trotz der in dieser Arbeit nachgewiesenen Apoptoseinduktion durch Morphin in Leukämiezellen wird die Hauptindikation dieser Substanz wahrscheinlich weiterhin die Analgesie bleiben, da andere Opioide, wie

beispielsweise das in der Analgesie weniger häufig eingesetzte Methadon, Apoptose in Krebszellen wesentlich schneller und effektiver einleiten können (Friesen et al. 2008a). Auch die Kombination von Methadon mit anderen Opioiden wäre möglicherweise ein weiterer, viel versprechender Ansatzpunkt, um die Therapie von Malignomen weiter zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Die Behandlung von Krebserkrankungen gehört heute zu den zentralen Herausforderungen der modernen Medizin. Trotz aller Fortschritte werden die konventionellen Therapien häufig durch Resistenzentwicklung, aber auch durch schwere Nebenwirkungen der eingesetzten Medikamente eingeschränkt. Ein neuer therapeutischer Ansatz besteht in der *in vitro* Untersuchung der Induktion von Zelltod durch Opioide in Krebszellen. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass D, L-Methadon, sonst als Medikament bei der Substitution Drogenabhängiger eingesetzt, sowie das Opioidanalgetikum Buprenorphin in Leukämiezellen Caspasen aktivieren und effektiv Apoptose induzieren. D, L-Methadon, Buprenorphin und Fentanyl sensitivieren darüber hinaus auch Leukämie- und Glioblastomzellen für die Apoptoseinduktion durch Doxorubicin.

Ziel dieser Arbeit war es, die Induktion von Apoptose in Leukämie- und Glioblastomzellen durch das Standardopioidanalgetikum Morphin zu charakterisieren und zu beleuchten, ob auch Morphin Krebszellen für die Doxorubicinbehandlung sensitiviert. Außerdem wurde der zuvor noch nicht getestete Ansatz einer Kombination zweier Opioide untersucht.

Die myeloische Leukämiezelllinie HL-60, die T-Zell-Leukämiezelllinie CEM sowie die Glioblastomzelllinie A172 wurden für die Analysen eingesetzt und die Expression von Opioidrezeptoren auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Die Messung apoptotischer Zellen erfolgte durchflusszytometrisch durch *Forward-Side-Scatter (FSC/SSC)*-Messung und der Sub-G₁-Analyse nach Nicoletti. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen erfolgte mittels Caspaseninhibition durch Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (zVAD.fmk) und durch Western Blot-Untersuchungen.

Während bei der Behandlung mit dem Standardopioidanalgetikum Morphin in der lymphatischen Leukämiezelllinie CEM und der Glioblastomzelllinie A172 kein Zelltod auftrat, ergaben die Untersuchung der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60, dass Morphin hier erst nach längeren Inkubationszeiten von 144 h und 168 h und in geringerem Ausmaß als Methadon Apoptose induziert.

Die genauere Untersuchung des durch Morphin induzierten Zelltodes der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zeigte eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des Zelltodes. Dieser trat bei toxischen, aber auch bei therapeutischen Morphinkonzentrationen auf und erwies sich in Inhibitionsversuchen als caspasenabhängig. Die Western Blot-Analyse ergab eine Aktivierung von Caspase 9 und 3 nach Morphinbehandlung. Das proapoptotische

Protein Bax wurde hochreguliert und das Caspasen-inhibierende Protein XIAP (*X-chromosome linked IAP*) degradiert. Dies weist auf eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs hin.

Ein weiterer Ansatz war die Untersuchung des Zelltodes der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 nach einer Kombinationsbehandlung mit Morphin und Fentanyl. Nach 144- und 168-stündiger Inkubation trat wiederum ein Zelltod auf, dessen Ausmaß durch die Kombination der beiden Opioide potenziert wurde. Mittels Western Blot-Analysen konnte erneut eine Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs nachgewiesen werden. Dies ging einher mit einer nach Koinkubation mit Morphin und Fentanyl verstärkten Aktivierung von Caspase 9 und 3 sowie einer Hochregulation von Bax in allen mit Morphin behandelten Proben. Nach 144 h wurde in den mit der höheren Fentanylkonzentration behandelten HL-60-Leukämiezellen XIAP herunterreguliert. Zusätzlich kam es jedoch nach der Kombinationsbehandlung zu einer Aktivierung von Caspase 8. Eine denkbare Erklärung hierfür bietet die Hochregulation des Fas-Rezeptor/Fas-Ligandensystems, welche in der Kombinationsbehandlung nachweisbar war. In abschließenden Versuchen wurde gezeigt, dass Morphin im Gegensatz zu anderen Opioiden weder die myeloische Leukämiezelllinie HL-60 noch die Glioblastomzelllinie A172 effektiv für Doxorubicin sensitivieren kann.

In der zusammenfassenden Betrachtung konnte in der vorliegenden Arbeit dargelegt werden, dass bei der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 Morphin alleine Apoptose auslöst und dass die Behandlung mit Morphin und Fentanyl diese Apoptoseinduktion, allerdings nur in für den Menschen toxischen Konzentrationen, potenziert. Es kommt zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs; die Kombinationsbehandlung erzeugt zusätzliche eine Aktivierung von Caspase 8.

Der mögliche therapeutische Nutzen der Behandlung mit Morphin alleine scheint bezogen auf die Zelltodinduktion in Krebszellen fraglich, da unsere Studien zeigten, dass Methadon in Krebszellen deutlich schneller und effektiver Apoptose induziert. Während Morphin das Analgetikum der Wahl bleibt, wäre für die Krebstherapie Methadon oder auch Buprenorphin besser geeignet. Der in der Kombination zweier Opioide erzielte synergistische Zelltod bietet aufgrund der Toxizität der eingesetzten Substanzkonzentrationen ebenfalls keine Alternative zur Methadonbehandlung, zeigt aber, dass synergistische Effekte von Opioiden auf die Zelltodinduktion prinzipiell möglich sind und weiter untersucht werden könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbadie C, Pan Y, Drake CT, Pasternak GW (2000a)

Comparative immunohistochemical distributions of carboxy terminus epitopes from the mu-opioid receptor splice variants MOR-1D, MOR-1 and MOR-1C in the mouse and rat CNS

Neuroscience 100: 141-153

2. Abbadie C, Pan YX, Pasternak GW (2000b)

Differential distribution in rat brain of mu opioid receptor carboxy terminal splice variants MOR-1C-like and MOR-1-like immunoreactivity: evidence for region-specific processing

J Comp Neurol 419: 244-256

3. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002)

Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation

Mol Cell 9: 423-432

4. Aktories K, Unger C: (2009)

Mittel zur Behandlung von Tumoren- Tumorchemotherapie

In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, S.929-984,

10. Aufl., Urban & Fischer, München

5. AppliChem. (2008)

URL:<http://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/Detergenzien.pdf> 14.08.2010

6. Baliga BC, Read SH, Kumar S (2004)

The biochemical mechanism of caspase-2 activation

Cell Death Differ 11: 1234-1241

7. BD Biosciences (Hrsg) (2000)

Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, San Jose

URL:http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf 22.02.2010

8. Belcheva MM, Clark AL, Haas PD, Serna JS, Hahn JW, Kiss A, Coscia CJ (2005) Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes

J Biol Chem 280: 27662-27669

9. Bigioni M, Zunino F, Capranico G (1994)

Base mutation analysis of topoisomerase II-idarubicin-DNA ternary complex formation. Evidence for enzyme subunit cooperativity in DNA cleavage

Nucleic Acids Res 22: 2274-2281

10. Bilfinger TV, Fimiani C, Stefano GB (1998)

Morphine's immunoregulatory actions are not shared by fentanyl

Int J Cardiol 64 Suppl 1: S61-6

11. Billen LP, Kokoski CL, Lovell JF, Leber B, Andrews DW (2008)

Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax

PLoS Biol 6: e147

12. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB (1993)

Bcl-X, a Bcl-2-Related Gene that Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death

Cell 74: 597-608

13. Bolan EA, Tallarida RJ, Pasternak GW (2002)

Synergy between mu opioid ligands: evidence for functional interactions among mu opioid receptor subtypes

J Pharmacol Exp Ther 303: 557-562

14. Bolan EA, Pan YX, Pasternak GW (2004)
Functional analysis of MOR-1 splice variants of the mouse mu opioid receptor gene Oprm
Synapse 51: 11-18

15. Borgland SL, Connor M, Osborne PB, Furness JB, Christie MJ (2003)
Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid
desensitization, and endocytosis of mu-opioid receptors
J Biol Chem 278: 18776-18784

16. Borner C Monney L (1999)
Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?
Cell Death Differ 6: 497-507

17. Brandt U (2007)
Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung
In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (Hrsg), Biochemie und Pathobiochemie, S.489-514,
8. Aufl., Springer, Heidelberg

18. Bredenberg S, Duberg M, Lennernas B, Lennernas H, Pettersson A, Westerberg M,
Nystrom C (2003)
In vitro and in vivo evaluation of a new sublingual tablet system for rapid oromucosal
absorption using fentanyl citrate as the active substance
Eur J Pharm Sci 20: 327-334

19. Brunelle JK, Letai A (2009)
Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family
J Cell Sci 122: 437-441

20. Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB (2003)
Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced
variant of the human mu opiate receptor gene
J Immunol 170: 5118-5123

21. Caraceni A, Portenoy RK (1999)

An international survey of cancer pain characteristics and syndromes

IASP Task Force on Cancer Pain. International Association for the Study of Pain

Pain 82: 263-274

22. Celver JP, Lowe J, Kovoov A, Gurevich VV, Chavkin C (2001)

Threonine 180 is required for G-protein-coupled receptor kinase 3- and beta-arrestin 2-mediated desensitization of the mu-opioid receptor in *Xenopus* oocytes

J Biol Chem 276: 4894-4900

23. Chai J, Wu Q, Shiozaki E, Srinivasula SM, Alnemri ES, Shi Y (2001)

Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding

Cell 107: 399-407

24. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001)

BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis

Mol Cell 8: 705-711

25. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977)

Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture

Nature 270: 347-349

26. Coluzzi PH, Schwartzberg L, Conroy JD, Charapata S, Gay M, Busch MA, Chavez J, Ashley J, Lebo D, McCracken M, Portenoy RK (2001)

Breakthrough cancer pain: a randomized trial comparing oral transmucosal fentanyl citrate (OTFC) and morphine sulfate immediate release (MSIR)

Pain 91: 123-130

27. Connor M ,Christie MD (1999)
Opioid receptor signalling mechanisms
Clin Exp Pharmacol Physiol 26: 493-499
28. Connor M, Osborne PB, Christie MJ (2004)
Mu-opioid receptor desensitization: is morphine different?
Br J Pharmacol 143: 685-696
29. Cruciani RA, Dvorkin B, Klinger HP, Makman MH (1994)
Presence in neuroblastoma cells of a mu 3 receptor with selectivity for opiate alkaloids but without affinity for opioid peptides
Brain Res 667: 229-237
30. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F (1997)
Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)
Cytometry 27: 1-20
31. de Gruyter (Hrsg) (2010)
Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch 2011, S.2020 und S. 2239
261. Auflage, Walter de Gruyter GmbH& Co KG, Berlin
32. Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003)
A decade of caspases
Oncogene 22: 8543-8567
33. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997)
X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases
Nature 388: 300-304
34. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC (1999)
Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases
EMBO J 18: 5242-5251

35. Drost J (2009)

The Investigation of the Influence of Buprenorphine on Leukemia Cells

Master Thesis Universität Ulm

36. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998)

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD

Nature 391: 43-50

37. Faura CC, Moore RA, Horga JF, Hand CW, & McQuay HJ (1996)

Morphine and morphine-6-glucuronide plasma concentrations and effect in cancer pain

J Pain Symptom Manage 11: 95-102

38. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES (1996)

In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains

Proc Natl Acad Sci USA 93: 7464-7469

39. Fichna J, Janecka A (2004)

Opioid peptides in cancer

Cancer Metastasis Rev 23: 351-366

40. Fischer L: (2006)

Proteinbestimmungen, Quantitative Bestimmung durch Färbetests

In: Lottspeich F, Engels J (Hrsg), Bioanalytik, S.37-40,

2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

41. Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965)

Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia

Cancer 18: 522-529

42. Friedman Z, Katznelson R, Phillips SR, Zanchetta C, Nistor OI, Eisen LB, Siddiqui N (2008)

A randomized double-blind comparison of a morphine-fentanyl combination vs. morphine alone for patient-controlled analgesia following bowel surgery

Pain Pract 8: 248-252

43. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM (1996)

Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells

Nat Med 2: 574-577

44. Friesen C, Fulda S, Debatin KM (1997)

Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells

Leukemia 11: 1833-1841

45. Friesen C, Fulda S, Debatin KM (1999)

Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive- and drug-resistant tumor cells

Cell Death Differ 6: 471-480

46. Friesen C, Glatting G, Koop B, Schwarz K, Morgenstern A, Apostolidis C, Debatin KM, Reske SN (2007)

Breaking chemoresistance and radioresistance with [²¹³Bi]anti-CD45 antibodies in leukemia cells

Cancer Res 67: 1950-1958

47. Friesen C, Roscher M, Alt A, Miltner E (2008a)

Methadone, commonly used as maintenance medication for outpatient treatment of opioid dependence, kills leukemia cells and overcomes chemoresistance

Cancer Res 68: 6059-6064

48. Friesen C, Uhl M, Pannicke U, Schwarz K, Miltner E, Debatin KM (2008b)
DNA-ligase IV and DNA-protein kinase play a critical role in deficient caspases activation
in apoptosis-resistant cancer cells by using doxorubicin
Mol Biol Cell 19: 3283-3289
49. Friesen C, Hormann I, Roscher M, Bacher S, Miltner E (2010)
Overcoming of radiation resistances
Nuklearmedizin 49: S31-S36
50. Friesen C, Bacher S, Hormann I, Roscher M, Miltner E (2011)
Cytotoxic effects of opioids in cancer cell lines
Int J Clin Pharmacol Ther. 49(1): S60-62
51. Fulda S, Friesen C, Debatin KM (1998a)
Molecular determinants of apoptosis induced by cytotoxic drugs
Klin Padiatr 210: 148-152
52. Fulda S, Los M, Friesen C, Debatin KM (1998b)
Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system
Int J Cancer 76: 105-114
53. Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM (1998c)
Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells
Cancer Res 58: 4453-4460
54. GE Healthcare.
URL:<http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=46853> 06.08.2010
55. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973)
In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of
solid tumors
J Natl Cancer Inst 51: 1417-1423

56. Görg A: (2006)
Elektrophoretische Verfahren
In: Lottspeich F, Engels J (Hrsg), Bioanalytik, S.235-268,
2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
57. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002)
Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria
J Biol Chem 277: 13430-13437
58. Hagemeyer K (2009)
Analysis of the Molecular Mechanisms of Cell Death in Leukemia Cells Induced by the
Treatment with Fentanyl
Master Thesis Universität Ulm
59. Harvey NL, Trapani JA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES, Kumar S
(1996)
Processing of the Nedd2 precursor by ICE-like proteases and granzyme B
Genes Cells 1: 673-685
60. Hatsukari I, Hitosugi N, Ohno R, Hashimoto K, Nakamura S, Satoh K, Nagasaka H,
Matsumoto I, Sakagami H (2007)
Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro
Anticancer Res 27: 857-864
61. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992)
Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death
Nature 356: 494-499
62. Hengartner MO (2000)
The biochemistry of apoptosis
Nature 407: 770-776

63. Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997)
The CARD domain: a new apoptotic signalling motif
Trends Biochem Sci 22: 155-156
64. Höllt V, Allgaier C: (2009)
Analgetika
In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, S.219-244,
10. Aufl., Urban & Fischer, München
65. Hormann I, Mähler A, Roscher M, Miltner E, Friesen C (2010)
Vergleichende Analysen der zytotoxischen Effekte von Morphin und D,L-Methadon auf Hirntumorzellen
Rechtsmedizin 20: 337 (Abstract)
66. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997)
Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis
Proc Natl Acad Sci USA 94: 3668-3672
67. Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ (1999)
Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence
J Neurosci 19: 56-63
68. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Niki H, Yano R (2000)
Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K (GIRK) channels in opioid-induced analgesia
Neurosci Res 38: 113-116
69. Johnson PS, Wang JB, Wang WF, Uhl GR (1994)
Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidyl inositol turnover
Neuroreport 5: 507-509

70. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998)
Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade
Curr Biol 8: 1001-1008
71. Karow T, Lang-Roth R (2008)
Analgetika und Schmerztherapie
In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, S.531-608,
16. Aufl., Thomas Karow Verlag, Pulheim
72. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR (1998)
DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1
Mol Cell 1: 543-551
73. Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000)
Induction of apoptosis by cancer chemotherapy#
Exp Cell Res 256: 42-49
74. Kessler C: (2006)
Nachweissysteme, Nichtradioaktive Systeme
In: Lottspeich F, Engels J (Hrsg), Bioanalytik, S.734,
2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
75. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995)
Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor
EMBO J 14: 5579-5588

76. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001)

Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8

J Biol Chem 276: 46639-46646

77. Kramer HK, Simon EJ (1999)

Role of protein kinase C (PKC) in agonist-induced mu-opioid receptor down-regulation: II. Activation and involvement of the alpha, epsilon, and zeta isoforms of PKC

J Neurochem 72: 594-604

78. Krammer PH (2000)

CD95's deadly mission in the immune system

Nature 407: 789-795

79. Krantz MJ, Mehler PS (2004)

Treating opioid dependence. Growing implications for primary care

Arch Intern Med 164: 277-288

80. Kumar V, Abbas, A., Fausto, N., Mitchell R (Hrsg) (2007a)

Cell Injury, Cell Death, and Adaptions

In: Robbins Basic Pathology S.1-30

8. Aufl., Saunders Elsevier, Philadelphia

81. Kumar V, Abbas, A., Fausto, N., Mitchell R (Hrsg) (2007b)

Tissue Repair: Regeneration, Healing, and Fibrosis

In: Robbins Basic Pathology, S.59-79

8. Aufl., Saunders Elsevier, Philadelphia

82. Kumar V, Abbas, A., Fausto, N., Mitchell R (Hrsg) (2007c)

Diseases of the Immun Systeme

In: Robbins Basic Pathology, S.107-172

8. Aufl., Saunders Elsevier, Philadelphia

83. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG (2008)
IAP-targeted therapies for cancer
Oncogene 27: 6252-6275
84. Lavrik IN, Golks A, Baumann S, Krammer PH (2006)
Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of
CD95-induced apoptosis
Blood 108: 559-565
85. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998)
Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of
apoptosis
Cell 94: 491-501
86. Li L, Zou L (2005)
Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint
pathways in mammalian cells
J Cell Biochem 94: 298-306
87. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X
(1997)
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an
apoptotic protease cascade
Cell 91: 479-489
88. Liston P, Fong WG, Korneluk RG (2003)
The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2
Oncogene 22: 8568-8580
89. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996)
Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and
cytochrome c
Cell 86: 147-157

90. Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R (1997)
Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma
Science 275: 394-397
91. Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, Andrews DW (2008)
Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax
Cell 135: 1074-1084
92. Macey TA, Lowe JD, Chavkin C (2006)
Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons
J Biol Chem 281: 34515-34524
93. Majno G, Joris I (1995)
Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death
Am J Pathol 146: 3-15
94. Makman MH, Bilfinger TV, Stefano GB (1995)
Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis
J Immunol 154: 1323-1330
95. McClendon AK, Osheroff N (2007)
DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer
Mutat Res 623: 83-97
96. McQuay HJ, Carroll D, Faura CC, Gavaghan DJ, Hand CW, Moore RA (1990)
Oral morphine in cancer pain: influences on morphine and metabolite concentration
Clin Pharmacol Ther 48: 236-244

97. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997)

FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)

EMBO J 16: 2794-2804

98. Micheau O, Hammann A, Solary E, Dimanche-Boitrel MT (1999)

STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs

Biochem Biophys Res Commun 256: 603-607

99. Milas L, Raju U, Liao Z, Ajani J (2005)

Targeting molecular determinants of tumor chemo-radioresistance

Semin Oncol 32: S78-81

100. Montenarh M (2007)

Replikation und Gentechnik

In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (Hrsg), Biochemie und Pathobiochemie, S.219-254, 8. Aufl., Springer, Heidelberg

101. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996)

FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex

Cell 85: 817-827

102. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998)

An induced proximity model for caspase-8 activation

J Biol Chem 273: 2926-2930

103. Nersesyan H, Slavin KV (2007)

Current approach to cancer pain management: Availability and implications of different treatment options

Ther Clin Risk Manag 3: 381-400

104. Ngan Kee WD, Khaw KS, Wong EL (1999)
Randomised double-blind comparison of morphine vs. a morphine-alfentanil combination for patient-controlled analgesia
Anaesthesia 54: 629-633
105. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995)
Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis
Nature 376: 37-43
106. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991)
A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry
J Immunol Methods 139: 271-279
107. Olsson M, Vakifahmetoglu H, Abruzzo PM, Hogstrand K, Grandien A, Zhivotovsky B (2009)
DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis
Oncogene 28: 1949-1959
108. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993)
Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death
Cell 74: 609-619
109. Orlinick JR, Elkon KB, Chao MV (1997)
Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding
J Biol Chem 272: 32221-32229
110. Pan YX, Xu J, Bolan E, Moskowitz HS, Xu M, Pasternak GW (2005)
Identification of four novel exon 5 splice variants of the mouse mu-opioid receptor gene: functional consequences of C-terminal splicing
Mol Pharmacol 68: 866-875

111. Pasternak GW (1993)
Pharmacological mechanisms of opioid analgesics
Clin Neuropharmacol 16: 1-18
112. Pasternak GW (2001)
The pharmacology of mu analgesics: from patients to genes
Neuroscientist 7: 220-231
113. Payne R (2007)
Recognition and diagnosis of breakthrough pain
Pain Med 8 Suppl 1: S3-7
114. Pharo GH, Zhou L (2005)
Pharmacologic management of cancer pain
J Am Osteopath Assoc 105: S21-8
115. Pimienta G, Pascual J (2007)
Canonical and alternative MAPK signalling
Cell Cycle 6: 2628-2632
116. Poklis A (1995)
Fentanyl: a review for clinical and analytical toxicologists
J Toxicol Clin Toxicol 33: 439-447
117. Reed JC (2008)
Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects
Blood 111: 3322-3330
118. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS (2001)
Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9
Proc Natl Acad Sci USA 98: 14250-14255

119. Repetto MR, Repetto M (1997)

Habitual, toxic, and lethal concentrations of 103 drugs of abuse in humans

J Toxicol Clin Toxicol 35: 1-9

120. Rohn TT, Kokoulina P, Eaton CR, Poon WW (2009)

Caspase activation in transgenic mice with Alzheimer-like pathology: results from a pilot study utilizing the caspase inhibitor, Q-VD-OPh

Int J Clin Exp Med 2: 300-308

121. Rohn TT (2010)

The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities

Apoptosis 15: 1403-1409

122. Roscher M, Hormann I, Köhler C, Mähler A, Miltner E, Friesen C (2010)

Charakterisierung der Zytotoxizität analgetischer Opioide auf leukämische Zellen
Rechtsmedizin 20: 338 (Abstract)

123. Rudel T, Bokoch GM (1997)

Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2

Science 276: 1571-1574

124. Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH (2000)

BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes

Nat Cell Biol 2: 553-555

125. Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998)

Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis

Nature 391: 96-99

126. Sauer O, Weilemann S (2001)

Opiate: Heroin und Opium– Schlafmohn (Papaver Somniferum)

In: Drogen: Eigenschaften, Wirkungen, Intoxikationen, S.69-77,

Schlütersche, Hannover

127. Saunders PO, Cisterne A, Weiss J, Bradstock KF, Bendall LJ (2010)
The mTOR inhibitor RAD001 (Everolimus) synergizes with chemotherapeutic agents,
ionizing radiation and proteasome inhibitors in pre-B ALL
Haematologica 96: 69-77
128. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM,
Krammer PH, Peter ME (1998)
Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways
EMBO J 17: 1675-1687
129. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ (2006)
Targeting XIAP for the treatment of malignancy
Cell Death Differ 13: 179-188
130. Schwartz GK, Shah MA (2005)
Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy
J Clin Oncol 23: 9408-9421
131. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999)
Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the
mitochondrial channel VDAC
Nature 399: 483-487
132. Siderovski DP, Willard FS (2005)
The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits
Int J Biol Sci 1: 51-66
133. Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G (1999)
Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells
J Leukoc Biol 66: 650-658

134. Smart D, Smith G, Lambert DG (1995)
Mu-opioids activate phospholipase C in SH-SY5Y human neuroblastoma cells via calcium-channel opening
Biochem J 305 (Pt 2): 577-581
135. Soares LG (2005)
Methadone for cancer pain: what have we learned from clinical studies?
Am J Hosp Palliat Care 22: 223-227
136. Song JH, Song DK, Pyrzynska B, Petruk KC, Van Meir EG, Hao C (2003)
TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways
Brain Pathol 13: 539-553
137. Spector MS, Desnoyers S, Hoepfner DJ, Hengartner MO (1997)
Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4
Nature 385: 653-656
138. Statistisches Bundesamt. (2008)
URL:http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/08/PD08__303__232,templateId=renderPrint.psml 02.08.2010
139. Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN (1993a)
Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression
Proc Natl Acad Sci USA 90: 11099-11103
140. Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN (1993b)
Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression
Proc Natl Acad Sci USA 90: 11099-11103

141. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS (1995)

Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation

J Biol Chem 270: 30290-30293

142. Stricker T, Kumar V: (2007)

Neoplasia

In: Kumar V, Abbas, A., Fausto, N., Mitchell R (Hrsg), Robbins Basic Pathology,

8. Aufl. Saunders Elsevier S. 173-223, Philadelphia

143. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC (1998)

A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases

J Biol Chem 273: 7787-7790

144. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993)

A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death

Cell 74: 845-853

145. Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003)

Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation

Ann Neurol 53 Suppl 3: S61-70; discussion S70-2

146. Tegeder I, Grosch S, Schmidtko A, Haussler A, Schmidt H, Niederberger E, Scholich K, Geisslinger G (2003)

G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation

Cancer Res 63: 1846-1852

147. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997)

A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis
J Biol Chem 272: 17907-17911

148. TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists) (2004)

TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances

URL:http://www.gtfch.org/cms/images/stories/Updated_TIAFT_list_202005.pdf
08.08.2010

149. Tinel A, Tschopp J (2004)

The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress
Science 304: 843-846

150. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989)

Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis
Science 245: 301-305

151. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985)

Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma
Science 228: 1440-1443

152. Upton JP, Austgen K, Nishino M, Coakley KM, Hagen A, Han D, Papa FR, Oakes SA (2008)

Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress
Mol Cell Biol 28: 3943-3951

153. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P (2002)

The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet
Cell Death Differ 9: 1031-1042

154. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003)

The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer
Cell Prolif 36: 131-149

155. Wahrendorf J, Becker N. (2007)

URL:http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_4.html 02.08.2010

156. Walczak H, Krammer PH (2000)

The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems
Exp Cell Res 256: 58-66

157. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000)

tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c
Genes Dev 14: 2060-2071

158. Whistler JL, von Zastrow M (1998)

Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin
Proc Natl Acad Sci USA 95: 9914-9919

159. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC (2007)

Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak
Science 315: 856-859

160. Winek CL, Wahba WW, Winek CL, Jr, Balzer TW (2001)

Drug and chemical blood-level data 2001
Forensic Sci Int 122: 107-123

161. Woolcock K, Specht SC (2006)

Modulation of Na, K-ATPase activity by prostaglandin E1 and [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin

Life Sci 78: 1653-1661

162. World Health Organization: (1996)

Part 1: Cancer Pain Relief.

In: World Health Organization (Hrsg), Cancer Pain Relief: with a guide to opioid availability

2. Aufl. S.1-38, Genf

163. Xu J, Xu M, Hurd YL, Pasternak GW, Pan YX (2009)

Isolation and characterization of new exon 11-associated N-terminal splice variants of the human mu opioid receptor gene

J Neurochem 108: 962-972

164. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD (2000)

Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli

Science 288: 874-877

165. Yeager MP, Colacchio TA (1991)

Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo

Arch Surg 126: 454-456

166. Yin D, Mufson RA, Wang R, Shi Y (1999)

Fas-mediated cell death promoted by opioids

Nature 397: 218

167. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M (1989)

A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor

J Exp Med 169: 1747-1756

168. Yu Y, Zhang L, Yin X, Sun H, Uhl GR, Wang JB (1997)
Mu opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy
J Biol Chem 272: 28869-28874
169. Yuan J, Horvitz HR (1992)
The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death
Development 116: 309-320
170. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993)
The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme
Cell 75: 641-652
171. Zhen YZ, Lin YJ, Li Y, Zhen YS (2009)
Lidamycin shows highly potent cytotoxic to myeloma cells and inhibits tumor growth in mice
Acta Pharmacol Sin 30: 1025-1032
172. Zheng H, Loh HH, Law PY (2008)
Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) Translocate to Nucleus in Contrast to G protein-dependent ERK activation
Mol Pharmacol 73: 178-190
173. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997)
Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3
Cell 90: 405-413
174. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999)
An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9
J Biol Chem 274: 11549-11556

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Hr. Prof. Dr. Miltner und Fr. Dr. Friesen für die Vergabe dieses interessanten und spannenden Themas meiner Dissertation bedanken. Fr. Dr. Friesen gilt mein besonderer Dank für die freundliche und offene Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die intensive Betreuung während und nach meiner Laborarbeit.

Fr. PD Dr. Brunner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Eine große Unterstützung und Bereicherung in der Zeit meiner Laborarbeit war auch die Möglichkeit, am Promotionsprogramm „experimentelle Medizin“ der medizinischen Fakultät der Universität Ulm teilzunehmen.

Mein besonderer Dank gilt Inis Hormann und Mareike Roscher, die mich in die Laborarbeit eingeführt haben, mir stets mit Rat und Tat zu Hilfe kamen und mir halfen, die vorliegende Arbeit vom Rohzustand in eine präsentable Form zu bringen.

Außerdem möchte ich mich bei Gabi Aggeler und Sabrina Nothdurft für die nette Aufnahme ins Labor und die Unterstützung bedanken. Andreas Alt gilt mein Dank für die Versorgung mit den für meine Arbeit nötigen Substanzen.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und besonders meinem Freund danken, die sehr viel Geduld mit mir hatten und mich mit Korrekturlesen und dem Lösen von Computerproblemen tatkräftig unterstützten.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Publikationsliste

Hormann I, Mähler A, Roscher M, Miltner E, Friesen C (2010)

Vergleichende Analysen der zytotoxischen Effekte von Morphin und D,L-Methadon auf Hirntumorzellen

Rechtsmedizin 20: 337 (Abstract)

Roscher M, Hormann I, Köhler C, Mähler A, Miltner E, Friesen C (2010)

Charakterisierung der Zytotoxizität analgetischer Opiode auf leukämische Zellen

Rechtsmedizin 20: 338 (Abstract)