

Universitätsklinikum Ulm - Institut für Rechtsmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Erich Miltner

**Studien zur Optimierung der konventionellen
Therapie bei der T-Zell- und myeloischen
Leukämie unter Verwendung von D,L-Methadon**

Dissertation

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

Tilman Christian Fischer

Freiburg i. Br.

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Erich Miltner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Brunner

Tag der Promotion: 10.02.2017

Meiner Frau und meinem Sohn

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Mechanismen des Zelltods	1
1.1.1 Nekrose	1
1.1.2 Apoptose	2
1.2 Apoptose - zwei Wege, ein Ziel	3
1.2.1 Effektormoleküle der Apoptose	3
1.2.2 Der extrinsische apoptotische Signalweg	7
1.2.3 Der intrinsische apoptotische Signalweg	9
1.3 Karzinogenese und Apoptose	11
1.4 Der Zellzyklus	13
1.5 Zytostatika	14
1.5.1 Cisplatin	15
1.5.2 Etoposid	16
1.6 Opioide und deren Rezeptoren	18
1.6.1 Opioide	18
1.6.2 Opioidrezeptoren	19
1.7 Opioide in der Schmerz- und Tumorthherapie	20
1.7.1 Opioide als Analgetika	20
1.7.2 Opioide als antineoplastische Wirkstoffe	21
1.9 Akute Leukämien im Kindes- und Erwachsenenalter	22
1.9.1 Promyelozytenleukämie	23
1.9.2 Akute T-Zell-Leukämie	23
1.9.3 Therapie der akuten Leukämien	23
1.10 Fragestellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits	25
2.1.2 Geräte und Materialien	27
2.1.3 Zellkulturmedium, Puffer, Substanzen	29
2.1.3 Antikörper	32
2.2 Methoden	32
2.2.1 Zellkultur	32

2.2.2	Versuchsansätze	33
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	36
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	41
3.	Ergebnisse	46
3.1	Nachweis von oberflächlichen Opioidrezeptoren auf Leukämiezellen.....	46
3.2	Analyse der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des durch CDDP und Etoposid induzierten Zelltods	47
3.2.1	CDDP	47
3.2.2	Etoposid.....	48
3.3	Synergistische Wirkung der Zytostatika CDDP und Etoposid in Kombination mit D,L-Methadon auf Leukämiezelllinien	50
3.3.1	CDDP	50
3.3.2	Etoposid.....	56
3.4	Charakterisierung des synergistischen Effekts von CDDP und D,L-Methadon auf die Zelltodinduktion der Leukämiezellen.....	58
3.4.1	Wirkung des Zytostatikums CDDP auf die Expression der Opioidrezeptoren auf der Oberfläche der Leukämiezellen.....	58
3.4.2	Einfluss der Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon auf den Zellzyklus der Leukämiezellen.....	60
3.4.3	Caspasen-Abhängigkeit der Zelltodinduktion durch CDDP und D,L-Methadon ...	64
3.4.4	Molekulare Mechanismen des durch CDDP und D,L-Methadon induzierten Zelltods in Leukämiezellen	65
4.	Diskussion	71
4.1	D,L-Methadon sensitiviert CCRF-CEM und HL-60 für den CDDP- und Etoposid-induzierten Zelltod.....	72
4.2	CDDP und D,L-Methadon wirken sich in unterschiedlichem Maß auf den Zellzyklus der Leukämiezellen aus	74
4.3	D,L-Methadon, CDDP und ihre Auswirkungen auf die Apoptose	75
4.4	Ausblick.....	77
5.	Zusammenfassung	80
6.	Literaturverzeichnis	82
	Danksagung	89
	Lebenslauf	90

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	engl. "apoptosis-inducing factor"
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ANT	engl. "adenine nucleotide transporter"
Apaf-1	engl. "apoptosis protein activating factor-1"
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	engl. "Bcl-2 homologous antagonist/killer"
Bax	engl. "Bcl-2 associated x-protein"
Bcl-2	engl. "B-cell-lymphoma protein-2"
Bcl-2L2	engl. "Bcl-2-like protein 2"
Bcl-x _L	engl. „ B-cell-lymphoma extra long“
BH3-only-Protein	Bcl-2-homology-Domäne-3-only-Protein
BH-Domäne	Bcl-2-homology-Domäne
BID	engl. "BH3 interacting domain death agonist"
BIR-Domäne	engl. "baculovirus IAP repeat"
Bp	Basenpaar
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CAD	engl. "caspase activated DNase"
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	engl. "caspase recruitment domain"
CD8	engl. "cluster of differentiation 8"
CD95	engl. "cluster of differentiation 95"
CDDP	Cisplatin
CDK	engl. "cyclin-dependent kinase"
CDKI	engl. "cyclin-dependent-kinase-inhibitors"
CED	engl. "C. elegans cell death gene protein"
CRE	engl. "cAMP-response-element"
CREB	engl. "cAMP-response-element binding protein"
Cyc	Cyclin
dADP	Desoxyadenosindiphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DED	engl. "death effector domain"
D-	Dextro-
DIABLO	engl. "direct IAP-binding activator of caspases"

DISC	engl. "death-inducing signaling complex"
DK	Dauerkultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	engl. „deoxyribonucleic acid“
ECL	engl. „enhanced chemiluminescence“
EGL-1	engl. "elegans gene protein 1"
FADD	engl. "Fas-associated death domain"
Fas	engl. "first apoptosis signal"
FSC-/SSC	engl. "forward light scatter / side light scatter"
G	Erdbeschleunigung
G ₀ -Phase	engl. "gap-0-phase"
G ₁ -Phase	engl. "gap-1-phase"
G ₂ -Phase	engl. "gap-2-phase"
G _i -Protein	Guanin-Nukleotid bindendes Protein i
G _o -Protein	Guanin-Nukleotid bindendes Protein o
H	Stunde
HRP	engl. "horseradish peroxidase"
HTRA2	engl. "high temperature requirement protein A2"
IAP	engl. "inhibitors of apoptosis"
ICAD	engl. "inhibitor of CAD"
IgH	engl. "immunoglobulin heavy chain"
IL _{2γ}	engl. "IL-2 receptor gamma chain"
INK4	engl. "Inhibitors of CDK4"
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KRAS	engl. "Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"
L-	Levo-
LASER	engl. „light amplification by stimulated emission of radiation“
μ	mu oder mikro
m ²	Quadratmeter
Mg	Milligramm
ml	Milliliter

MOMP	engl. "mitochondrial outer membrane permeabilization"
M-Phase	engl. "mitosis-phase"
MPT	engl. "mitochondrial permeability transition"
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natrium-Chlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOD	engl. "non-obese diabetic"
NSG	NOD/SCID/IL ₂ ^{ry} ^{null} -Mäuse
OCT1	engl. "organic cation transporter 1"
OR	Opioidrezeptor
PARP	engl. "poly ADP ribose polymerase"
P-Gp	P-Glykoprotein
PML	Promyelozytenleukämie
PTPC	engl. "permeability transition pore complex"
PUMA	engl. "p53-upregulated modulator of apoptosis"
RAR- α	engl. "retinoic acid receptor- α "
RB-Protein	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	engl. "revolutions per minute"
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SCID	engl. "severe combined immunodeficiency"
SDS-PAGE	engl. "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
S-Phase	engl. "synthesis-phase"
SPI	Serin-Proteaseninhibitor
Tab.	Tabelle
tBID	engl. "truncated BID"
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
ÜK	Übernachtkultur
VDAC	engl. "voltage-dependent anion channel"
WHO	engl. "world health organization"

X-IAP

engl. "X-chromosome-linked IAP"

ZNS

zentrales Nervensystem

zVAD.fmk

Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon

1. Einleitung

Unser Verständnis der Apoptose hat in den vergangenen Jahrzehnten rapide zugenommen und zu der Erkenntnis beigetragen, dass die Dysregulation der sonst so streng regulierten apoptotischen Prozesse die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigt und Resistenzen gegen Therapieansätze bedingt (Evan und Littlewood 1998). Die Re-Induktion und Verstärkung der Apoptose in entarteten Zellen erscheint in diesem Licht als möglicher Schlüssel für eine erfolgreiche Therapie maligner Erkrankungen.

1.1 Mechanismen des Zelltods

Mit der Nekrose und der Apoptose existieren zwei prinzipielle Prozesse, die das Leben einer Zelle beenden können. Beide unterscheiden sich auf morphologischer und biochemischer Ebene grundsätzlich voneinander.

1.1.1 Nekrose

Der französische Hämatologe Marcel Bessis beschrieb die Nekrose 1958 als „akzidentiellen Zelltod“, der die betroffenen Zellen unreguliert und chaotisch zugrunde gehen lässt. Nekrose ist dabei immer Ausdruck pathologischer Prozesse, die auf die Zelle einwirken, zum Beispiel die Koagulationsnekrose des Myokards nach Verschluss einer Koronararterie (Majno und Joris 1995). Verschiedene Noxen führen zum Zusammenbruch der ATP-Produktion, überlebenswichtige Prozesse, wie die Homöostase der intrazellulären Elektrolytzusammensetzung, kommen daraufhin zum Erliegen. Die nekrotischen Zellen schwellen stark an und stellen sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zunehmend eosinophil dar. Charakteristisch ist der Integritätsverlust der Plasmamembran und der Zellorganellen. Dadurch kommt es zum Austritt lysosomaler Enzyme, die zum Selbstverdau der Zelle führen. Es kann zur Dilatation der Mitochondrien und zu intramitochondrialen Ablagerungen von Phospholipiden, den *amorphous densities*, kommen. Durch den zellulären Zerfall entstehende chemotaktische Faktoren locken Immunzellen an, die konsekutiv zu einer Entzündungsreaktion führen. Diese ist bei der Nekrose häufig, wohingegen sie bei der Apoptose fehlt. Der Kern nekrotischer Zellen kann eines von drei unterschiedlichen Mustern annehmen. Durch den Abbau des Chromatins kann der Kern schrumpfen und sich besonders basophil darstellen (*Pyknosis*) oder durch die Aktivität von DNA-zersetzenden Enzymen regelrecht fragmentiert werden (*Karyorrhexis*). Die physiologische Basophilie kann aber auch abnehmen, so dass der Kern zu verblässen scheint (*Karyolysis*), häufig ist dann nach ein bis zwei Tagen überhaupt kein Kern mehr zu erkennen (Kumar et al. 2007) (Abb.1.1).

1.1.2 Apoptose

Eine Fülle von ganz verschiedenen Umständen kann ein ausgefeiltes, genetisch fixiertes und intrazellulär ablaufendes Programm in Gang setzen, das die Zelle in den regulierten Freitod führt: die Apoptose. Aus zahlreichen Untersuchungen, vor allem an *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), weiß man, dass es sich bei der Apoptose um einen evolutionär hoch konservierten Ablauf handelt (Lodish et al. 2007a). Der deutsche Anatom Ludwig Gräper bezeichnete das programmierte Sterben von Zellen 1914 als das Gegenstück zur Mitose. Wo Epithelzellen proliferieren, müssten Mechanismen existieren, die zu einem Gleichgewicht zwischen Zellnachschub und Zelluntergang führten. Gräper benutzte noch den von Walter Flemming geprägten Begriffe der *Chromatolyse* und der physiologischen Zellelimination (Majno und Joris 1995). Der erst später von John Kerr eingeführte Begriff Apoptose ist aus dem Griechischen abgeleitet und bedeutet so viel wie „herabfallen“, da die ersten lichtmikroskopischen Bilder der in apoptotische Körperchen zerfallenden Zellen den Forscher an fallende Laubblätter erinnerten (Kerr et al. 1972). Apoptose findet unter anderem im Rahmen der embryonalen Entwicklung, während Immunantworten oder als Reaktion auf verschiedene Noxen statt. Zu den Faktoren, die den apoptotischen Prozess in Gang setzen können, gehören zum Beispiel fehlerhaft replizierte DNA, die p53-vermittelt zur Apoptose führt, oder die Apoptoseinduktion durch zytotoxische CD8-positive T-Zellen im Rahmen immunologischer Reaktionen. Die Ursache kann also innerhalb der Zelle liegen oder von außen auf die Zelle einwirken (Kumar et al. 2007).

Das mikroskopische Bild einer apoptotischen Zelle ist dadurch charakterisiert, dass ihr Zelleib schrumpft und das Zytoplasma der Zelle zunehmend kondensiert. Dabei bleibt die Plasmamembran intakt, wodurch eine begleitende inflammatorische Reaktion ausbleibt. Allerdings ändert sich die Zusammensetzung der Lipide auf der Außenseite der Plasmamembran. Phosphatidylserin wird aus dem inneren Layer der Lipiddoppelschicht nach außen transloziert, wodurch die sterbende Zelle von phagozytierenden Zellen erkannt und abgeräumt werden kann (Kumar et al. 2007). Der Kern wird pyknotisch und durch die Aktivität verschiedener Nukleasen zu 185 bp großen Fragmenten zerschnitten (*Karyorrhexis*). Das Chromatin sammelt sich randständig an der Plasmamembran. Pathognomonisch für die Apoptose ist das *budding*-Phänomen der Plasmamembran. Dabei bilden sich pseudopodienartige Zellfortsätze, die häufig Zellorganellen oder fragmentiertes Chromatin enthalten. Diese können sich als apoptotische Körperchen vom restlichen Zelleib abschnüren, um dann von Makrophagen phagozytiert und abgebaut zu werden. Auch benachbarte, nicht zum professionellen Phagozytensystem gehörende Zellen, können an der Phagozytose der apoptotischen Körperchen beteiligt sein. In der Endphase der Apoptose

gleich das Zellbild häufig dem der Nekrose (Majno und Joris 1995) (Abb. 1).

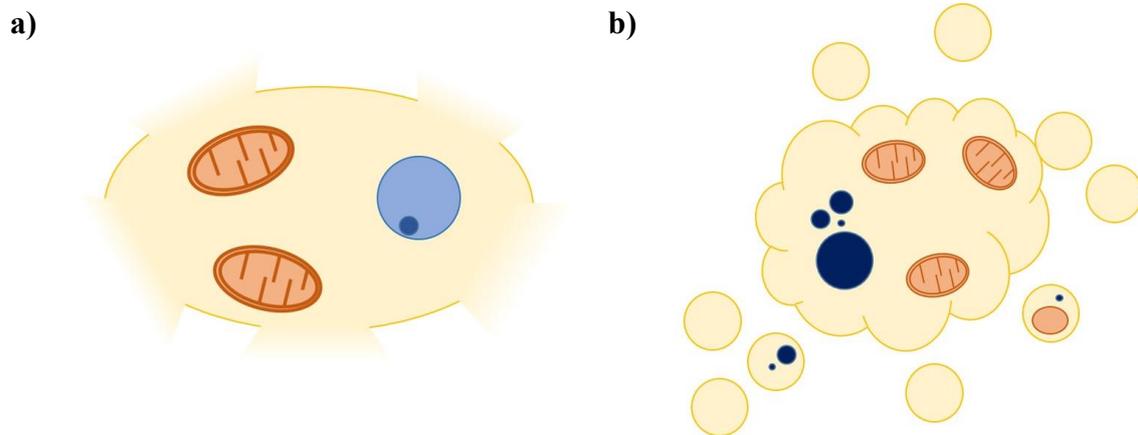


Abb. 1: Schematischer Vergleich von Nekrose und Apoptose. Während bei der nekrotischen Zelle die Mitochondrien deutlich dilatieren und die Integrität der Plasmamembran verloren geht (a), entwickelt die apoptotische Zelle zahlreiche Vorwölbungen ihrer Plasmamembran (*blebbing*). Apoptotische Körperchen lösen sich vom Zellkörper und werden phagozytiert (b).

1.2 Apoptose - zwei Wege, ein Ziel

Apoptose ist ein streng regulierter intrazellulärer Vorgang bei dem eine Vielzahl verschiedener intrazellulärer Effektorproteine zusammenwirken, um das Leben der Zelle zu beenden. Es existieren zwei Signalwege, über die die Apoptose induziert werden kann. Der extrinsische Signalweg wird von außen über Rezeptor-Ligand-Interaktion vermittelt, der intrinsische Signalweg ist abhängig von der Integrität der mitochondrialen Membran, die durch unterschiedliche Prozesse kompromittiert werden kann. Zwischen beiden Signalwegen existieren zahlreiche Schnittstellen (Walczak et al. 2000; Galluzzi et al. 2011).

1.2.1 Effektormoleküle der Apoptose

Regulatorische Faktoren: die Bcl-2-Familie

Die Bcl-2-Familie setzt sich aus mehr als 20 unterschiedlichen Proteinen zusammen, die regulatorisch in die Abläufe des intrinsischen Signalweges eingreifen (Cory und Adams 2002). Die Mitglieder der Bcl-2-Familie lassen sich grob in drei Gruppen einteilen, die sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Apoptose unterscheiden. Die Bcl-2-Gruppe ist antiapoptotisch wirksam, während die BH3-only-Gruppe und die Bax-Gruppe proapoptotisch wirken (Abb. 2) (Adams 2003). Das namensgebende Protein der Bcl-2-Familie war aus Zellen eines follikulären B-Zell-Lymphoms isoliert worden (Vaux et al. 1988). Alle Mitglieder der Bcl-2-Familie besitzen wenigstens eine der evolutionär hoch konservierten *Bcl-2-homology domains* (BH-Domain). Während die Bcl-2-Gruppe über die

Domänen BH-1 bis -4 verfügt, findet sich in der Bax-Gruppe nur noch BH-1 bis -3. Die Gruppe der BH-3-only-Proteine besitzt lediglich die BH-3-Domäne (Cory und Adams 2002). Die drei Domänen BH-1 bis BH-3 bilden eine hydrophobe α -Helix mit der die Bcl-2-Gruppe und die Bax-Gruppe mit der BH-3-only-Gruppe interagieren können (Sattler et al. 1997).

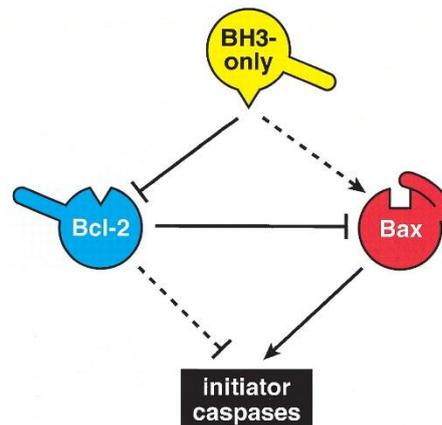


Abb. 2: Die Apoptose wird durch drei große Gruppen an Proteinen reguliert, die hier schematisch dargestellt sind. Bax ist proapoptotisch wirksam, wird in seiner Aktivität aber durch das antiapoptotische Bcl-2 gehemmt. Die BH3-only-Proteine wiederum hemmen Bcl-2 und wirken damit proapoptotisch. Hauptwirkungen sind in der Abbildung mit durchgezogenen Pfeilen dargestellt, gestrichelte Pfeile zeigen zusätzliche, aber weniger ausgeprägte Wirkungen. (BH3-only = Bcl-2-homology-Domäne-3-only, Bcl-2 = engl. „B-cell-lymphoma protein-2“, Bax = engl. „Bcl-2 associated x-protein“). Mit freundlicher Genehmigung (Adams 2003).

Die BH3-only-Proteine und die Bax-Gruppe sind im Gegensatz zur Bcl-2-Gruppe proapoptotisch wirksam. BH3-only-Proteine scheinen eine Art Wächtersystem für intrazelluläre Schäden darzustellen, auf die sie mit dem Auslösen der Apoptose über den intrinsischen Signalweg reagieren (Adams 2003). Wie die BH3-only-Proteine genau wirken ist noch nicht abschließend geklärt, es wird allerdings angenommen, dass sie an Mitglieder der antiapoptotischen Bcl-2-Gruppe binden und allosterische Veränderungen induzieren, die zum Wirkverlust des antiapoptotischen Faktors führen (Cory und Adams 2002). Das zur Gruppe der BH3-only-Proteine gehörende *BH3 interacting-domain death agonist* (BID), das im extrinsischen apoptotischen Signalweg von Caspase 8 proteolytisch zum *truncated BID* (tBID) aktiviert wird, kann zudem Bax und Bak direkt aktivieren (Nechushtan et al. 2001). Die intrazellulären Konzentrationen sämtliche Mitglieder der BH3-only-Gruppe unterliegen dabei einer strengen Kontrolle (Cory und Adams 2002).

Bax und Bak stellen eine weitere proapoptotische Untergruppe der Bcl-2-Familie dar, die die Durchlässigkeit der äußeren mitochondrialen Membran erhöhen kann. Bak ist ein integraler Bestandteil der äußeren mitochondrialen Membran, während Bax-Monomere in

der gesunden Zelle zytosolisch vorliegen (Griffiths et al. 1999). Um sich mit seinem hydrophoben C-terminalen Ende in der mitochondrialen Membran zu verankern muss Bax erst seine Konformation ändern. Geschieht dies auf einen apoptotischen Reiz hin, transloziert das Bax-Molekül zum Mitochondrium und bildet mit anderen membrangebundenen Bax-Molekülen Oligomere in der äußeren mitochondrialen Membran. Auch das primär membrangebundene Bak benötigt einen Induktionsreiz zur Konformationsänderung, um sich mit gleichartigen Bak-Molekülen zusammenzulagern. Die Bax- bzw. Bak-Oligomere wirken als Poren in der äußeren mitochondrialen Membran und induzieren deren Permeabilisierung (*mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP)). Zeitgleich treten Cytochrom C und andere proapoptotische Faktoren aus dem Zwischenmembranraum in das Zytosol über (Adams 2003).

Zu der antiapoptotischen Untergruppe der Bcl-2-Familie gehört Bcl-2, sowie Bcl-x_L und Bcl-2L2. Bcl-2 ist über den hydrophoben C-Terminus immer in der Membran der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und der Kernhülle verankert, während Bcl-x_L und Bcl-2L2, ähnlich wie Bax, durch ein entsprechendes zytotoxisches Signal in ihrer Konformation geändert werden und anschließend zur äußeren mitochondrialen Membran translozieren um sich dort zu verankern. In der mitochondrialen Membran antagonisieren die Mitglieder der Bcl-2-Familie die proapoptotischen Wirkungen von Bax und Bak (Cory und Adams 2002; Adams 2003).

Die Ausführungsorgane der Apoptose: Caspasen

Caspasen werden häufig als die zentralen Ausführungsorgane der Apoptose bezeichnet. Die Gruppe der Caspasen umfasst verschiedene Cystein-Proteasen, die ihre Substrate C-terminal nach Aspartatresten spalten (Hengartner 2000). Den Grundstein zum Verständnis der Caspasen legten Brenner und Kollegen durch die Erforschung des Nematoden *C. elegans* (Brenner 1974; Sulston und Brenner 1974). Während dessen Entwicklung gehen 131 von 947 nicht-gonadalen Zellen durch Apoptose zugrunde. Zu den proapoptotischen (EGL-1, CED-4 und CED-3) und antiapoptotischen Proteinen (CED-9) von *C. elegans* wurden bei Säugetieren entsprechende homologe Proteine gefunden, so dass heute angenommen wird, dass es sich bei den Caspasen um evolutionär hoch konservierte Proteine handelt (Lodish et al. 2007a).

Caspasen lassen sich in die Initiatorcaspasen und die Effektorcaspasen unterteilen. Sie liegen normalerweise als Zymogene, also inaktive Vorläuferproteine, in der Zelle vor und werden als Procaspasen bezeichnet. Im Rahmen der Apoptose kommt es zur proteolytischen

Aktivierung der Procaspasen, wobei zuerst die Initiatorcaspasen aktiviert werden, die dann wiederum die Effektorcaspasen aktivieren. Procaspasen verfügen über eine Proteasen-Domäne und eine N-terminale Prodomäne (Abb. 3). Während sich die Proteasen-Domänen verschiedener Procaspasen nur wenig unterscheiden, variiert die Länge der Pro-Domänen ganz erheblich. Die Proteasen-Domäne lässt sich zudem in die größere p20-Untereinheit (20 kDa) und die kleinere p10-Untereinheit (10 kDa) unterteilen. Die Prodomänen der inaktiven Initiatorcaspasen verfügen regelhaft über etwa 100 Aminosäuren, die spezifische Motive ausbilden: die Procaspasen 2 und 9 zeigen die *caspase recruitment domain* (CARD), während die Procaspasen 8 und 10 die *death effector domain* (DED) aufweisen. Die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) hingegen verfügen lediglich über Prodomänen mit einem Umfang von etwa 30 Aminosäuren (Chang und Yang 2000).

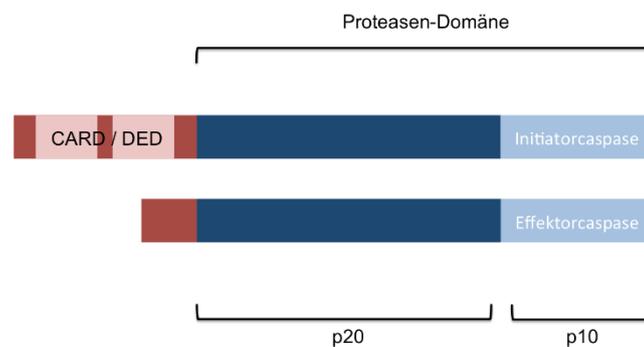


Abb. 3: Schematische Darstellung der Procaspasen. Die Prodomänen sind rot dargestellt, die Proteasen-Domänen blau. Letztere werden weiter in die größere p20-Untereinheit (dunkelblau) und die kleinere p10-Untereinheit (hellblau) unterteilt. (CARD = engl. „caspase recruitment domain“, DED = engl. „death effector domain“). Mit freundlicher Genehmigung (Chang und Yang 2000).

Im Rahmen der proteolytischen Spaltung und Aktivierung der Caspasen werden zuerst die beiden p20- und p10-Untereinheiten an ihrer Verknüpfungszone getrennt. Nach Abspaltung der Prodomäne lagern sich die p20- und p10-Spaltprodukte zu einem Heterodimer zusammen. Anschließend bilden zwei Heterodimere durch die Interaktion ihrer p10-Untereinheiten ein Tetramer, das insgesamt zwei katalytische Zentren besitzt. Dieses stellt die endgültige und voll funktionsfähige Struktur der aktivierten Caspase dar. Die aktivierten Effektorcaspasen degradieren ihre Substrate durch gezielte proteolytische Spaltung. Häufig werden durch die Aktivität der Effektorcaspasen weitere Subroutinen der Apoptose in Gang gesetzt, wie die Inaktivierung des Inhibitors der *caspase activated DNase* (CAD) (siehe Kapitel 1.2.2). Der Aktivierung der Effektorcaspasen folgt der regulierte Abbau wichtiger funktioneller Zellbestandteile (Chang und Yang 2000).

Die Caspasen können durch die *inhibitors of apoptosis* (IAPs) in ihrer Aktivität gehemmt

werden, wobei beim Menschen insgesamt sechs IAPs bekannt sind, zu denen X-IAP, c-IAP-1 und -2 gehören. Die IAPs inhibieren die Caspasen durch direkte Interaktion. Notwendig für ihre Funktion ist die unspezifische, etwa 70 Aminosäuren lange *baculovirus IAP repeat* (BIR)-Domäne sowie Zink-bindende Domänen, die auch mehrfach pro Molekül vorliegen können. Sie binden direkt an Caspasen und behindern diese in ihrer proteolytischen Aktivität. Mehrere mitochondriale Moleküle, die während des intrinsischen Signalweges freigesetzt werden, können die Aktivität der IAPs beschränken (Lodish et al. 2007a). Entscheidend für die Funktion von X-IAP, c-IAP-1 und -2 ist, dass sie die Caspasen 3 und 7 ausschließlich in ihrem aktiven Zustand inhibieren, während die Caspase 9 sowohl im inaktiven als auch aktiven Zustand gehemmt wird. Entsprechend wird der extrinsische Signalweg der Apoptose erst auf Höhe der Effektorcaspasen gehemmt, wohingegen die Hemmung beim intrinsischen Signalweg schon auf Höhe der Initiatorcaspase einsetzt, bei gleichzeitiger Hemmung der Amplifikationsschleife zwischen Caspase 3 und 9. Die IAPs müssen mit den Caspasen in einem molaren Verhältnis von etwa 1:1 bis 2:1 vorliegen, um diese effektiv zu inhibieren. Ob durch die Hemmung der IAPs die Apoptose verhindert wird, hängt von den Begleitumständen ab. Vielfach wird die Apoptose lediglich verzögert oder die Zelle geht durch Nekrose statt durch Apoptose zugrunde. Das System der IAPs kann bei neoplastischen Zellen auch die Grundlage für die Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika bilden. So konnte in neoplastischem Tumorgewebe vielfach eine erhöhte Expression von IAPs nachgewiesen werden, aus der eine signifikante Hemmung der Apoptosefähigkeit resultierte, so dass Chemotherapeutika, wie Taxol oder Etoposid, keine Apoptose mehr induzieren konnten (Deveraux und Reed 1999).

1.2.2 Der extrinsische apoptotische Signalweg

Der extrinsische oder Rezeptor-abhängige apoptotische Signalweg wird durch äußere Signale vermittelt (Abb. 4). Dazu tragen gesunde Zellen an ihrer Oberfläche Rezeptoren der TNF- α -Gen Superfamilie, wie das *cluster of differentiation 95* (CD95). Bindet an diesem Rezeptor der passende Ligand, kommt es zu einer Trimerisierung von CD95. Dies bringt die Todesdomänen (death domains) der Rezeptoren in unmittelbare Nähe zueinander, wodurch die *Fas-associated death domain* (FADD) rekrutiert werden kann (Walczak et al. 2000). Der nun vorliegende Komplex aus drei CD95-Molekülen und einer FADD kann über die homologe DED Procaspase 8 bzw. 10 in unmittelbare Nähe zueinander bringen, so dass diese dimerisieren. Durch die schwache intrinsische proteolytische Aktivität der Zymogene können sich die Procaspasen gegenseitig durch Cleavage aktivieren (Hengartner 2000; Adams 2003). Dieser proteolytische Prozess, der am *death-inducing signaling complex*

(DISC) abläuft, wird als *induced proximity* bezeichnet (Kischkel et al. 1995). Die aktivierte Caspase 8 kann nun die Procaspase 3 proteolytisch aktivieren. Durch die zusätzliche proteolytische Spaltung von BID kann der extrinsische mit dem intrinsischen Signalweg verknüpft werden (Abb. 4). Die aktivierten Effektorcaspasen degradieren in der Folge systematisch zelluläre Strukturproteine und Proteine der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Verbindungen, was zur charakteristischen Morphologie der Apoptose führt (Li et al. 1998; Hengartner 2000).

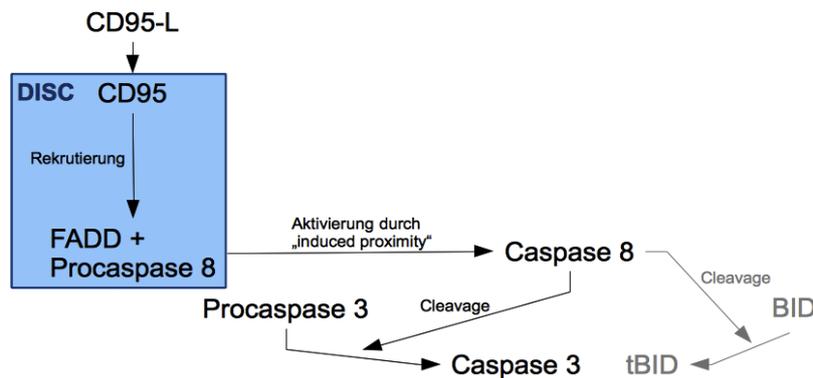


Abb. 4: Darstellung der Kaskade des extrinsischen Signalweges. Durch die Ligandenbindung (CD95-L), kommt es zur Trimerisierung von CD95. Die FADD kann rekrutiert werden und führt über die homologe DED zur Dimerisierung von Procaspase 8 bzw. 10. Die drei CD95-Moleküle, die FADD und die gebundenen Procaspasen werden als DISC bezeichnet. Durch die schwache intrinsische proteolytische Aktivität der Procaspasen kommt es zu deren gegenseitiger Aktivierung. (CD95 = cluster of differentiation 95; FADD = Fas-associated death domain; DISC = death-inducing signaling complex; (t)BID = (truncated) BH3 interacting domain death agonist)

Hervorzuheben ist auch die Aktivität der *caspase-activated deoxyribonuclease* (CAD). Diese liegt primär als inaktiver Komplex mit dem *inhibitor of CAD* (ICAD) vor. Durch die proteolytische Aktivität der Caspase 3 wird ICAD inaktiviert, woraufhin CAD die DNA fragmentieren kann (Abb. 5) (Nagata 2000). Die Caspase 3 baut auch die *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP), die in Reparaturmechanismen der DNA involviert ist und die Integrität der DNA überwacht, proteolytisch ab. Die PARP reagiert vor allem auf Umwelteinflüsse, die auf die DNA einwirken (Nicholson et al. 1995).

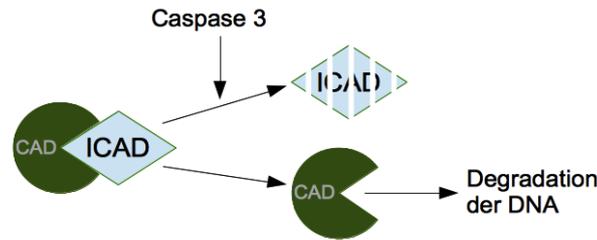


Abb. 5: Aktivierung der CAD durch die Effektorcaspase 3. Die CAD liegt als inaktiver Komplex mit dem ICAD vor. Durch Caspase 3 wird CAD von der inhibitorischen Untereinheit getrennt und kann daraufhin die DNA fragmentieren. (CAD = caspase-activated deoxyribonuclease; ICAD = inhibitor of CAD). Mit freundlicher Genehmigung (Nagata 2000).

1.2.3 Der intrinsische apoptotische Signalweg

Beim intrinsischen Signalweg stehen die Mitochondrien im Mittelpunkt. Zahlreiche intrazelluläre Prozesse, zum Beispiel die Schädigung der DNA oder ein rasanter Anstieg des intrazellulären Calciums, konvergieren auf dem intrinsischen Signalweg (Abb. 6). Der Schlüssel zu diesem Signalweg ist die Integrität der äußeren mitochondrialen Membran (Galluzzi et al. 2011). Es können in erster Linie zwei streng regulierte Systeme für die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran verantwortlich gemacht werden: die zur BCL-2-Familie gehörenden proapoptotischen Faktoren Bax und Bak (Kapitel 1.2.1) sowie die *mitochondrial permeability transition* (MPT), die von dem *permeability transition pore complex* (PTPC) abhängt (Fulda et al. 2010). Bei der MPT handelt es sich um ein Model, bei dem angenommen wird, dass verschiedene Stimuli zur Bildung des PTPC führen können. Der PTPC besteht aus dem in der inneren mitochondrialen Membran verankerten *adenine nucleotide transporter* (ANT) und dem in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisierten *voltage-dependent anion channel* (VDAC). Durch den auf die Öffnung des Komplexes folgenden Einstrom von Wasser kommt es zur Schwellung der mitochondrialen Matrix, die so ausgeprägt sein kann, dass die äußere Membran rupturiert und es zur MOMP kommt (Green und Kroemer 2004).

Auch das Produkt des zentralen Tumorsuppressorgens p53, häufig als Wächter des Genoms bezeichnet, kann über die MOMP-Induktion Apoptose induzieren. Als Reaktion auf Erbgutschädigungen arretiert es den Zellzyklus in der G1-Phase, um der Zelle Zeit zu geben, die Schäden zu beheben. Bleiben diese Versuche erfolglos, fungiert das p53-Protein als Transkriptionsfaktor und induziert die Transkription von *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA). Bezeichnenderweise ist p53 in vielen neoplastischen Entitäten mutiert (Jeffers et al. 2003; Stricker und Kumar 2007). PUMA ist ein BH3-only-Protein, das Bax und Bak von den inhibitorischen Einflüssen der antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-

Familie abschirmt (Yu und Zhang 2008).

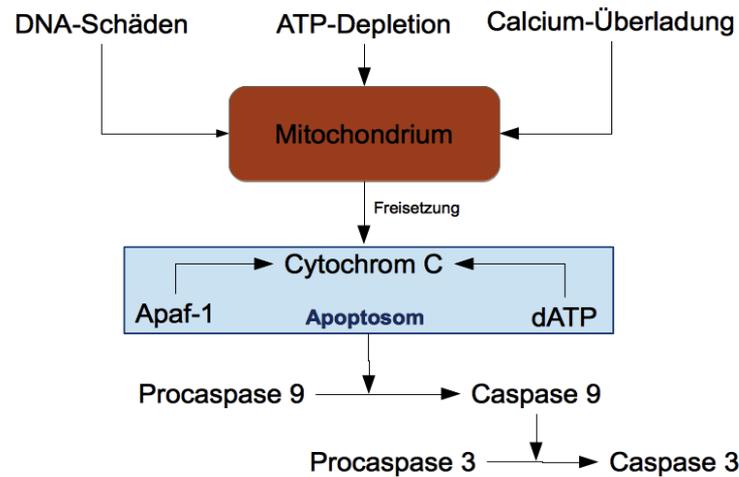


Abb. 6: Darstellung des intrinsischen Signalweges. Verschiedene Stimuli können auf das Mitochondrium einwirken und Apoptose über den intrinsischen Signalweg induzieren. Durch Verlust des transmembranären Potentials über der äußeren mitochondrialen Membran kommt es zu deren Permeabilisierung und zum Austritt proapoptotischer Faktoren, darunter Cytochrom C. Durch Zusammenlagerung von sieben Apaf-1-Molekülen, dATP und Cytochrom C entsteht das Apoptosom, das zur Aktivierung der Caspase 9 führt. (Apaf-1 = apoptosis protein activating factor-1; dATP = Desoxyadenosindiphosphat)

Die Konsequenz des MOMP ist der Verlust des mitochondrialen transmembranären Potentials, das unter physiologischen Bedingungen durch die Aktivität der Atmungskette aufrechterhalten wird. Ohne dieses transmembranäre Potential bleibt die ATP-Produktion aus und wichtige Transportvorgänge über die mitochondrialen Membranen können nicht mehr stattfinden. Zusätzlich kommt es zur Anreicherung von reaktiven Sauerstoff-Spezies. Vor allem aber treten proapoptotische Faktoren aus dem Raum zwischen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran in das Zytosol aus. Zu diesen gehören zum einen Faktoren, die einen Caspasen-abhängigen Signalweg in Gang setzen, wie Cytochrom C, *direct IAP-binding activator of caspases* (DIABLO) und *high temperature requirement protein A2* (HTRA2). Zum anderen werden Faktoren frei, die Caspasen-unabhängig zur Apoptose führen können, wie der *apoptosis-inducing factor* (AIF) oder die Endonuclease G (Galluzzi et al. 2011).

Von dieser Fülle an Faktoren nimmt Cytochrom C eine zentrale Stellung ein. Es bindet an das Adaptermolekül *apoptosis protein activating factor-1* (Apaf-1) und hebt dessen Autoinhibition durch seine C-terminale WD40-Wiederholungsdomäne auf, wodurch Apaf-1-gebundenes dATP zu dADP hydrolysiert werden kann. Dies resultiert in einer Konformationsänderung von Apaf-1 und ermöglicht die Zusammenlagerung von insgesamt sieben aktivierten Apaf-1-Molekülen zu einem Apoptosom (Cory und Adams 2002). Durch

die Interaktion der beiden CARDS wird die Procaspase 9 an einem Apaf-1-Molekül gebunden und proteolytisch zu ihrer aktiven Form gespalten. Die aktive Form der Caspase 9 aktiviert anschließend die inaktive Effektorcaspase 3 durch proteolytische Spaltung. Gleichzeitig muss die Hemmung der Initiator- und Effektorcaspasen durch die IAPs überwunden werden. Sowohl DIABLO als auch HTRA2 können durch direkte Interaktion mit den IAPs diese Inhibition überwinden (Lodish et al. 2007a). Wie beim extrinsischen Signalweg mündet die Aktivierung der Caspase 3 in eine Vielzahl von Prozessen, die zum einen mit morphologischen Charakteristika verbunden sind und zum anderen zum systematischen Abbau wesentlicher Zellbestandteile, wie Strukturproteine oder DNA, führt (Hengartner 2000; Nagata 2000).

1.3 Karzinogenese und Apoptose

Die Karzinogenese, also die Entstehung neoplastischer Zellen, beruht auf der sukzessiven Akkumulation von Mutationen, die den Phänotyp der Zellen hinsichtlich sechs zentraler Eigenschaften verändern (Abb. 7) (Lodish et al. 2007b). Diesem Prozess entgegengerichtet sind verschiedene Reparaturprogramme, die erworbene Schäden im Genom erkennen und beheben können. Zu diesen zählen die Nukleotid-Exzision-, die Basen-Exzision- und die DNA-Mismatch-Reparatur. Diese Reparatursysteme arbeiten allerdings nicht fehlerfrei, so dass mit der Zeit Mutationen im Genom akkumulieren. Häufig wird dieser Prozess zusätzlich durch die Wirkung bestimmter Karzinogene beschleunigt, zum Beispiel durch Benzol oder Radon (Herold et al. 2011). Für die Entstehung von Neoplasien sind vor allem Mutationen in drei Gengruppen relevant: den *Proto-Onkogenen*, die das Zellüberleben und die Proliferation fördern, den *Tumorsuppressorgenen*, die das Zellüberleben und die Proliferation hemmen und den *Caretaker-Genen*, die DNA-Schäden vorbeugen und reparieren (Lodish et al. 2007b).



Abb. 7: Prägende Eigenschaften von neoplastischen Zellen. Dargestellt sind die sechs zentralen Eigenschaften, die neoplastische Zellen charakterisieren.

Zellen, die bereits Mutationen in ihrem Genom aufweisen, können durch unterschiedliche Mechanismen unschädlich gemacht werden. Sie können beispielsweise aus dem Zellzyklus in den nicht-replikativen Zustand der Seneszenz übergehen oder gezielt durch Apoptose vernichtet werden, bevor sie sich zu einer Gefahr für den Organismus entwickeln können (Lodish et al. 2007b). In diesem Zusammenhang nimmt der Transkriptionsfaktor p53 eine zentrale Rolle ein. Als Reaktion auf DNA-Schädigungen kann p53 einen Zellzyklusarrest herbeiführen und gegebenenfalls Apoptose induzieren. Tatsächlich ist p53 in vielen neoplastischen Tumorzellen inaktiviert, mutiert oder fehlend (Evan und Littlewood 1998). Zusätzlich besteht in gesunden Zellen eine enge Verknüpfung zwischen Signalwegen der Zellproliferation und der Apoptose. Dadurch soll verhindert werden, dass es zu einer inadäquaten Apoptose oder Proliferation kommt. Mutationen, die dieses gegenseitige Ausschlussprinzip stören, können entsprechend in einer enthemmten Zellproliferationsrate resultieren. Als weiteres Beispiel für die Relevanz fehlregulierter apoptotischer Prozesse dient das folliculäre Lymphom. Entartete B-Lymphozyten weisen die für diese Entität charakteristische Translokation zwischen den Chromosomen 14 und 18 auf, die das Bcl-2-Gen dem Promotor des IgH-Gens unterstellt. Es resultiert eine Überflutung der Lymphomzellen mit dem antiapoptotischen Bcl-2, wodurch sich diese den natürlichen Mechanismen des programmierten Zelltodes entziehen. Ihre Lebensdauer ist dadurch deutlich verlängert und die monoklonalen Tumorzellen beginnen zu akkumulieren (Herold et al. 2011).

Auch für die Wirksamkeit antineoplastischer Therapien ist die Apoptosefähigkeit entarteter Zellen eine zentrale Voraussetzung. Während viele Tumorzellen zu Beginn noch über gut funktionierende Apoptosemechanismen verfügen, akquirieren diese im Krankheitsverlauf

häufig neue Mutationen, die ihre Fähigkeit zur Apoptose einschränken können. Durch die kompromittierte Fähigkeit der Tumorzellen durch Apoptose zugrunde zu gehen, entwickeln sich Resistenzen gegen zahlreiche Zytostatika, deren zentrales Wirkprinzip die Apoptoseinduktion darstellt (Evan und Littlewood 1998). So führt die Überexpression von Bcl-2 und Bcl-x_L in Tumorzellen beispielsweise zu Resistenzen gegen Zytostatika wie Cytarabin, Methotrexat, Vincristin oder CDDP (Thompson 1995). Dies verdeutlicht die Relevanz, die die Überwindung primärer und sekundärer Apoptotseresistenzen bei der Verbesserung bestehender Therapiemöglichkeiten einnimmt.

1.4 Der Zellzyklus

Im Zentrum der zellulären Wachstumsregulation und Proliferation steht der Zellzyklus, auf den zahlreiche Signalwege unterschiedlicher Wachstumsfaktoren konvergieren (Abb. 8). Während des Zellzyklus werden insgesamt fünf Phasen durchlaufen. Der M-Phase, in der die Mitose stattfindet, stehen die zur Interphase zusammengefassten G_{1/0}-, S- und G₂-Phasen gegenüber. Während der S-Phase findet die Replikation der DNA statt, in den G-Phasen kommt es zum Zellwachstum. Zellen können aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase übertreten und zu ruhenden Zellen werden (Stricker und Kumar 2007).

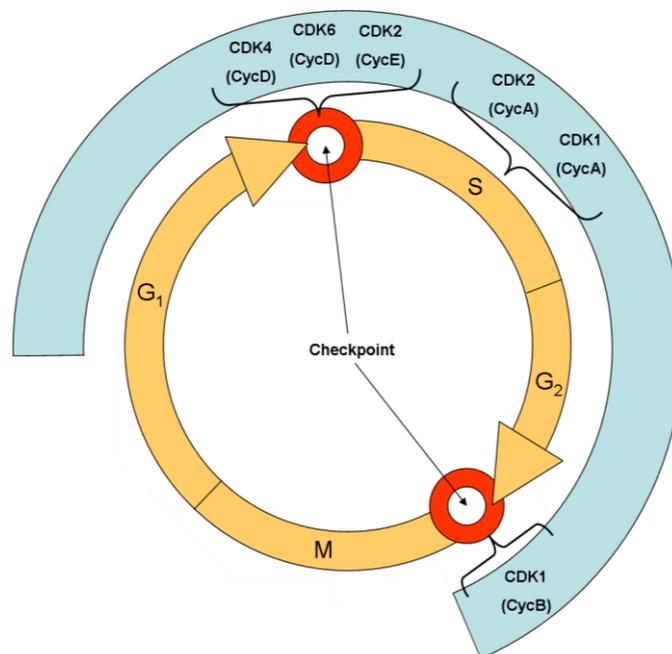


Abb. 8: Schematische Darstellung des Zellzyklus. In der Abbildung sind die 4 Phasen des Zellzyklus dargestellt. Nicht gezeigt ist die G₀-Phase, in die Zellen aus der G₁-Phase übertreten können. Die CDKs gehen Komplexe mit spezifischen Cyclinen ein, deren Transkription streng reguliert wird. CDK4/CycD, CDK6/CycD und CDK2/CycE phosphorylieren das RB-Protein („Checkpoint“ zwischen G₁-Phase und S-Phase), wodurch die Zelle aus der G₁-Phase in die S-Phase übertreten kann. Der „Checkpoint“ zwischen der G₂- und der M-Phase wird durch den CDK1/CycB-Komplex reguliert. (CDK = cyclin-dependent kinase, Cyc = Cyclin, G₁ = G₁-Phase, S = Synthese-Phase, G₂ = G₂-Phase, M = Mitose-Phase).

Der Zellzyklus muss streng reguliert werden, um eine inadäquate Zellproliferation oder eine fehlerhafte Replikation der DNA zu verhindern. Dazu existieren innerhalb des Zellzyklus Kontrollpunkte, an denen der proliferierenden Zelle die Möglichkeit gegeben wird, mögliche Fehler innerhalb ihres Genoms zu erkennen, sie zu korrigieren oder entsprechende Maßnahmen zu ergreifen, falls eine Korrektur nicht möglich ist. Die Progression durch den Zellzyklus und die Überwindung der Kontrollpunkte wird durch die Interaktion verschiedener Enzymgruppen gewährleistet. Heterodimere Proteinkinasen, die sich aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit zusammensetzen, phosphorylieren spezifische Zielproteine, wie beispielsweise das Retinoblastom-Protein, das den Übergang von der G₁- zur S-Phase kontrolliert (Abb. 8). Die regulatorischen Untereinheiten (Cycline) werden während des Zellzyklus in unterschiedlichem Ausmaß transkribiert und aktivieren die in gleichbleibender Konzentration vorliegenden Proteinkinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) durch Komplexbildung. Je nach Zellzyklusphase bilden sich charakteristische Cyclin/CDK-Komplexe aus, die jeweils unterschiedliche Zielproteine besitzen (Lodish et al. 2007c). Die Aktivität dieser heterodimeren Proteinkinasen wird durch die *cyclin-dependent-kinase-inhibitors* (CDKIs) inhibiert. Es werden zwei Systeme unterschieden, nämlich das INK4, welches sich aus den vier Enzymen p15, p16, p18 und p19 zusammensetzt und spezifisch die Aktivität der während des G₁/S-Kontrollpunktes aktiven Proteinkinasen hemmt und die drei Proteine p21, p27, p51, die unspezifisch alle Komplexe hemmen können (Stricker und Kumar 2007).

Dysregulationen des Zellzyklus finden sich sehr häufig bei Neoplasien, wobei häufig die Cyclin/CDK-Komplexe betroffen sind, die den Übertritt der Zelle aus der G₁-Phase in die S-Phase regulieren. Dabei können entweder die jeweiligen Cycline betroffen sein, wie es zum Beispiel beim Mammakarzinom vorkommen kann oder die CDKs, wie es häufig bei Glioblastomen der Fall ist. Auch das inhibitorische System der CDKIs kann im Rahmen der neoplastischen Transformation betroffen sein, so ist zum Beispiel eine somatische Deletion von p16 bei circa 75 % aller Pankreaskarzinome nachweisbar (Stricker und Kumar 2007).

1.5 Zytostatika

Während bei lokalisierten Tumorstadien vor allem chirurgische und strahlentherapeutische Maßnahmen im Vordergrund stehen, kommen Zytostatika bei disseminierten Befunden zum Einsatz. Klassische Zytostatika wirken vor allem auf die DNA, indem sie die Synthese von (Desoxy-) Ribonukleotiden hemmen, wie die Antimetabolite, oder zu Vernetzungen der DNA-Stränge führen, wie die Alkylantien oder Platinverbindungen, zu denen auch Cisplatin (CDDP) zählt. Zudem existieren Hemmstoffe der Topoisomerase I und II, wie

Anthracycline, Actinomycine und Etoposid. Auch die epigenetische Kontrolle der DNA-Transkription kann durch therapeutische Substanzen, wie Azacitidin, beeinflusst werden. Letztlich können die Versorgung der Tumorzellen mit Asparagin durch Asparaginase und die Ausbildung des Spindelapparates durch Vinca-Alkaloide oder Taxane gehemmt werden. Die klassischen Zytostatika werden in Bezug auf den Zellzyklus in die phasenspezifisch und die phasenunspezifisch wirkenden Zytostatika eingeteilt. Zu letzteren zählen vor allem Substanzen, die die DNA-Stränge vernetzen, während zu den phasenspezifischen Zytostatika solche Substanzen zählen, die die Synthese der DNA hemmen und ihre Hauptwirkung entsprechend in der S-Phase entfalten, oder Substanzen, die die Mikrotubuli hemmen und dadurch vor allem in der späten G₂- und M-Phase wirken (Aktories und Unger 2013).

1.5.1 Cisplatin

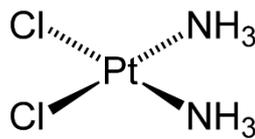


Abb. 9: Strukturformel von CDDP. Bei Vorliegen einer niedrigen Chloridkonzentration gibt CDDP seine beiden Chlor-Liganden ab. Dabei bilden sich hochreaktive nukleophile Wasserkomplexe, die mit den nukleophilen Zentren der DNA reagieren können. Wikimedia Commons, gemeinfrei

Durch Zufall wurde in den 1960er-Jahren für Platinverbindungen eine wachstumshemmende Wirkung auf Bakterienkulturen entdeckt. Durch weitere Versuche zeigte sich wenige Jahre später für CDDP eine ausgeprägte antineoplastische Aktivität (Aktories und Unger 2013). Seitdem wird CDDP vorwiegend in der Therapie solider Tumore angewandt, vor allem in der Therapie von Hodentumoren, Ovarialkarzinomen und Blasenkarzinomen. CDDP kann hierbei allein oder in Kombination mit anderen Zytostatika verwendet werden (Sweetman 2007).

CDDP liegt ungelöst als gelbes Pulver vor, kann aber auch kristalline Formen annehmen. Es ist problemlos in Wasser löslich, wandelt sich allerdings in seiner gelösten Form langsam in die trans-Konfiguration um, die keine antineoplastische Wirkung mehr zeigt. Die antineoplastische Wirksamkeit von CDDP beruht auf der Quervernetzung von DNA-Doppel- und Einzelsträngen. Es gelangt über eine Cu²⁺-ATPase und den *organic cation transporter 1* (OCT1) in die Zellen. Durch die niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration gibt CDDP seine beiden Chlor-Liganden ab (Abb. 9). Dadurch können sich hochreaktive Wasserkomplexe bilden, die mit den nukleophilen Zentren der DNA reagieren können.

Normale, nicht entartete Körperzellen verfügen im Vergleich mit Tumorzellen über besser funktionierende Reparaturmechanismen für DNA-Quervernetzungen, so dass sich für CDDP eine gewisse Tumorspezifität ergibt. Darüber hinaus wird spekuliert, ob CDDP eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen induzieren kann (Blaschek et al. 2007; Aktories und Unger 2013). CDDP wird für die antineoplastische Therapie in Aqua ad iniectabilia gelöst, wobei 0,9 %-ige NaCl-Lösung als Trägerlösung für die intravenöse Infusion dient. Bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz bleibt die CDDP-Infusionslösung für etwa 28 Tage stabil. Die Einzeldosis von CDDP kann von 50 bis 120 mg/m² reichen, wobei Plasmaspiegel zwischen 2,26 – 2,66 µg/ml (70 mg/m²) und 6,6 µg/ml (100 mg/m²) erreicht werden. CDDP ist im Plasma zu 90 % an Serumproteine gebunden, während sich lediglich die freien 10 % für den antineoplastischen Effekt verantwortlich zeichnen. Die Elimination von CDDP erfolgt renal, so dass bei niereninsuffizienten Patienten die Gefahr der Akkumulation besteht. Im Körper reichert sich CDDP vor allem in der Niere, der Leber und dem Darm an, die Penetration des zentralen Nervensystems und des Liquors ist schlecht. Die Halbwertszeit von CDDP beträgt für den nicht proteingebundenen Anteil etwa 30 bis 60 Minuten, und bis zu 24 h für den proteingebundenen Anteil. Häufige Nebenwirkungen einer CDDP-Therapie sind unter anderem Anorexie, Nausea und Emesis, Schädigungen der Nieren und des Innenohrs sowie eine periphere Neurotoxizität (Sweetman 2007, Aktories und Unger 2013).

1.5.2 Etoposid

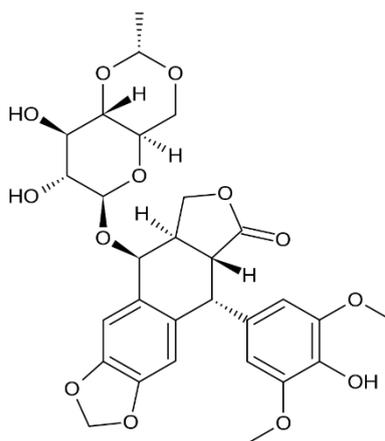


Abb. 10: Strukturformeln von Etoposid und Etoposid-Phosphat. Als R₁ ist sowohl bei Etoposid als auch bei Etoposid-Phosphat eine Methyl-Gruppe angehängt, R₂ stellt bei Etoposid eine Hydroxy-Gruppe dar, während Etoposid-Phosphat an dieser Position mit einem Phosphorsäureester substituiert ist. In niedriger Dosierung hemmt Etoposid die Topoisomerase II und induziert Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. In höheren Dosen wird die Nukleosidaufnahme in die Zellen gehemmt, der Einbau von Thymidin und Uridin in Makromoleküle gestört sowie Sauerstoffradikale und reaktive Chinone induziert. Wikimedia Commons, gemeinfrei

Etoposid (Abb. 10), das zur Gruppe der Podophyllotoxine zählt, war einer der ersten eingesetzten Topoisomerase-II-Inhibitoren und zeigte in klinischen Studien zwischen 1971 und 1974 eine ausgeprägte antineoplastische Wirkung bei zahlreichen Tumorentitäten, darunter AML, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (Hande 1998). In ungelöstem Zustand bildet Etoposid weiße Kristalle und lässt sich in Wasser nur unzureichend lösen. Erst durch den Zusatz organischer Lösungsmitteln kann es in Lösung gebracht werden. Die Infusionslösung von Etoposid ist konzentrationsabhängig nur zwischen 48 und 96 h stabil. Durch Hemmung der Topoisomerase-II-Wirkung und Verhinderung der Enzymablösung von der DNA induziert Etoposid Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. Die hieraus resultierende Zytotoxizität tritt bereits bei niedriger Dosierung auf. In höheren Dosen treten zusätzliche Wirkungen hinzu, wie die Hemmung der Nukleosidaufnahme in die Zellen, die Störung des Einbaus von Thymidin und Uridin in Makromoleküle und die Induktion von Sauerstoffradikalen sowie reaktiven Chinonen (Blaschek et al. 2007). Etoposid kann oral oder intravenös verabreicht werden, wobei enteral nur etwa 50 % des Wirkstoffs tatsächlich resorbiert werden, weshalb oral die zweifache Dosis verabreicht werden muss. Etoposidphosphat besitzt eine bessere Löslichkeit in Wasser, so dass hier auf Lösungsmittel verzichtet werden kann. Bei der intravenösen Therapie werden zwischen 60 und 150 mg/m² Etoposid gegeben. Die Gabe erstreckt sich über 3 bis 5 Tage und wird alle 3 bis 4 Wochen wiederholt. Nach etwa 0,5 bis 1,4 h werden maximale Plasmaspiegel von bis zu 15 µg/ml registriert. Die Elimination findet hauptsächlich renal statt, wobei Etoposid zu einem geringeren Anteil auch über die Faeces ausgeschieden wird. Die durchschnittliche Halbwertszeit im Plasma wird mit 11,5 h angegeben. Etoposid wird in der Behandlung zahlreicher solider, wie auch hämatologischer Neoplasien eingesetzt, wie bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Non-Hodgkin-Lymphom oder bei akuten lymphatischen Leukämien (Hande 1998; Blaschek et al. 2007). Häufige unerwünschte Wirkungen von Etoposid sind die dosislimitierende Myelosuppression sowie Übelkeit und Erbrechen. Außerdem kann es nach einer Etoposid-Therapie zu Zweitmalignomen kommen, besonders häufig ist das Auftreten der *mixed lineage leukemia* etwa ein bis drei Jahre nach Therapieende. Aufgrund der Lösungsmittelzusätze kann es unter Etoposid zusätzlich zu Hypersensitivitätsreaktionen kommen (Aktories und Unger 2013).

1.6 Opioide und deren Rezeptoren

1.6.1 Opioide

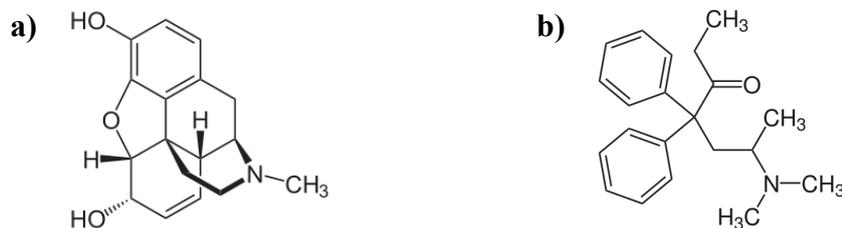


Abb. 11: Strukturformeln von Morphin (a) und Methadon (b), beide in der S(-)-Konfiguration.
Wikimedia Commons, gemeinfrei

Schon im antiken Griechenland wurde der Saft des Schlafmohns gegen Schmerzen und zur Beruhigung therapeutisch eingesetzt. Auch der Name des Opiums geht auf die Griechen zurück, *opos* ist das altgriechische Wort für Saft (Dhawan et al. 1996). Aus dem Milchsaft des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) lassen sich zahlreiche Alkaloide gewinnen, zu denen auch das Morphin zählt (Abb. 11, a). Diese natürlich vorkommenden Wirkstoffe werden zusammen mit den synthetischen Substanzen mit morphinartiger Wirkung als Opioide zusammengefasst (Graefe et al. 2011).

Die Opioide werden aufgrund ihrer Wirkung auf das absteigende antinozizeptive System häufig therapeutisch bei starken, chronischen Schmerzen eingesetzt. Entsprechend ihrer Wirkstärke werden sie in niedrig- und hochpotente Opioide eingeteilt, wobei Morphin als Referenzsubstanz dient (Graefe et al. 2011). Neben den reinen Agonisten, zu denen Morphin, Fentanyl und Methadon zählen, gibt es die partiellen Agonisten. Diese weisen, bei geringerer intrinsischer Aktivität, eine höhere Affinität zum μ -Rezeptor auf als Morphin. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist Buprenorphin. Neben den Agonisten existieren auch Opioid-Antagonisten, zum Beispiel Naloxon, die die Opioidrezeptoren (OR) kompetitiv hemmen. Naloxon zeigt dabei die höchste Affinität an μ -OR (Karow und Lang-Roth 2011).

Die Wirkung auf den Organismus ist bei allen Opioiden ähnlich. Vor allem die Analgesie und Schmerzdistanzierung stehen beim therapeutischen Einsatz im Vordergrund. Daneben kommt es häufig zu einer dosisabhängigen Atemdepression und zu Beginn der Opioideinnahme fast regelhaft zu einer ausgeprägten Nausea und Emesis. Fast regelhaft lässt sich eine Tonuszunahme der glatten Muskulatur mit Obstipation, Harnverhalt und Spasmen des Sphincter Oddi beobachten. Zentral können die Opioide zu einer Sedierung führen, häufig wirken sie darüberhinaus euphorisierend und es besteht ein relevantes Abhängigkeitspotential. Die Übergänge zwischen Wirkungen und Nebenwirkungen sind bei Opioiden fließend (Karow und Lang-Roth 2011).

Das synthetische Opioid Methadon (Abb. 11, b) liegt als Racemat aus Dextro- (D-) und Levo- (L-) Methadon vor und besitzt im Vergleich zu Morphin eine vierfach höhere analgetische Potenz. L-Methadon wiederum weist eine deutlich höhere analgetische Wirkstärke auf als D-Methadon, so dass in der Schmerztherapie nur das R(-)-Enantiomer eingesetzt wird. Methadon bindet nicht nur an die OR sondern auch an *N-Methyl-D-Aspartat-* (NMDA-) Rezeptoren für Glutamat, was seine gute Wirkung gegen neuropathische Schmerzen erklärt. Es besitzt eine deutlich längere Halbwertszeit als Morphin, allerdings mit großen interindividuellen Unterschieden. Diese beruhen auf der Streuung und Variation seiner Kinetik, da Methadon aufgrund seiner ausgeprägten Lipophilie gut in das Körpergewebe übertreten kann und im Blut zu etwa 90 % an Plasmaproteine gebunden vorliegt. Durch das Methadonreservoir im peripheren Gewebe kann der Plasmaspiegel über längere Zeit aufrecht gehalten werden. Die Titration von Methadon kann allerdings bis zu 32 Tage in Anspruch nehmen. Einsatz findet Methadon vor allem in der Therapie chronischer Schmerzen und in der Substitutionstherapie bei Heroinhängigen. Neben den oben genannten Opioid-spezifischen Nebenwirkungen, kann es unter Anwendung von Methadon zu einer relevanten Verlängerung der frequenzkorrigierten QT-Zeit kommen mit der Gefahr von *Torsade-de-Points*-Tachykardien (Soares, Luiz Guilherme L. 2005).

1.6.2 Opioidrezeptoren

Opioide entfalten ihre Wirkungen auf den Organismus über Rezeptoren mit sieben transmembranäre Domänen. Insgesamt werden heute vier verschiedene OR unterschieden, die ihre Wirkung alle über ein *Guanin-Nukleotid bindendes* (G-) Protein vermitteln. Nach Empfehlung der *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* werden diese als MOR (μ -Rezeptor), DOR (δ -Rezeptor), KOR (κ -Rezeptor) und NOR (ORL-1) bezeichnet. Durch posttranslationale Modifikationen, alternatives mRNA-Splicing und Homo- bzw. Heterodimerisation ergeben sich viele weitere Varianten der OR (Dhawan et al. 1996; Waldhoer et al. 2004). OR lassen sich vor allem an spinalen und supraspinalen Synapsen finden, an denen afferente nozizeptive Reize verarbeitet werden. Das Vorkommen der OR ist aber nicht auf das zentrale und periphere Nervensystem beschränkt, sie lassen sich auch auf Lymphozyten und Makrophagen nachweisen, wobei ihre physiologische Funktion hier bisher nicht abschließend geklärt werden konnte (Graefe et al. 2011).

OR sind meistens mit Pertussis-Toxin-sensitiven G_i - und G_o -Rezeptoren gekoppelt. Sowohl die α - als auch die β -/ γ -Untereinheiten interagieren mit intrazellulären Second-Messenger-Systemen. In der Konsequenz werden Kalium-Kanäle geöffnet, wodurch die betroffenen

Zellen hyperpolarisiert und spannungsabhängige Calcium-Kanäle blockiert werden. Bei Neuronen wird so beispielsweise die Erregungsschwelle erhöht und die Transmitterausschüttung gehemmt. Ein weiterer wichtiger Effekt, der über die OR induziert wird, ist die Inhibition der Adenylatcyclase durch die α -Untereinheit, wodurch die intrazelluläre Konzentration des *cyclischen Adenosinmonophosphats* (cAMP) gesenkt wird (Waldhoer et al. 2004). Es kommt zu einer Inaktivierung diverser Proteinkinasen, die an spezifischen Phosphorylierungskaskaden beteiligt sind, wie beispielsweise der Phosphorylierung zentraler Stoffwechsellzyme im Zytosol oder des *cAMP-response-element binding protein* (CREB) im Zellkern. In der Promotorregion von cAMP-abhängigen Genen kann das phosphorylierte CREB an das *cAMP-response-element* (CRE) binden und so die Transkription des entsprechenden Gens stimulieren. Ein Absinken der intrazellulären Konzentration des cAMPs führt entsprechend zu einer erniedrigten Transkription spezifischer Gene (Heinrich et al. 2014a).

1.7 Opioide in der Schmerz- und Tumortherapie

1.7.1 Opioide als Analgetika

Opioide sind als hochpotente Schmerztherapeutika wichtiger Bestandteil analgetischer Therapiekonzepte. Bis zu 90% aller Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen leiden an chronischen Schmerzen. Dabei werden zwei generelle Schmerzqualitäten unterschieden: der *Nozizeptorschmerz*, der durch Stimulation der Nozizeptoren auf den freien Nervenendigungen ausgelöst wird, und der *neuropathische Schmerz*, der durch direkte Schädigung von Nerven ausgelöst wird. Eine suffiziente und möglichst nebenwirkungsarme Schmerztherapie ist ein wichtiger Baustein bei der Behandlung von Tumorpatienten, vor allem in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien. Das WHO-Stufenschema für die Therapie chronischer Schmerzen ist dafür eine gute Orientierungshilfe (Abb. 12). Es sieht ein dreistufiges Modell vor, das primär die Applikation von Nicht-Opioide-Analgetika, wie Paracetamol, Metamizol oder Ibuprofen vorsieht. Auf der zweiten Stufe werden bereits niedrigpotente Opioide, wie Tramadol oder Tilidin, verabreicht. Bei unzureichender Wirksamkeit werden auf der dritten Stufe zusätzlich hochpotente Opioide eingesetzt, zum Beispiel Morphin, Buprenorphin oder Fentanyl. Vor allem bei den Opioiden wird häufig zusätzlich eine Komedikation benötigt, um Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Obstipation, zu behandeln. In bestimmten Situationen kann es zudem notwendig sein, Ko-Analgetika zu verabreichen. Zu diesen werden Antidepressiva und Antikonvulsiva bei neuropathischen Schmerzen, Bisphosphonate bei Knochenschmerzen und Steroide bei peritumorösen Ödemen, Kapselspannungsschmerzen und Hirnödem gezählt. Wichtig ist die

zeitlich fest geregelte Gabe der Dauermedikation, wobei der orale Applikationsweg bevorzugt wird, da er den Patienten im täglichen Leben am wenigsten beeinträchtigt (Hallek 2009).

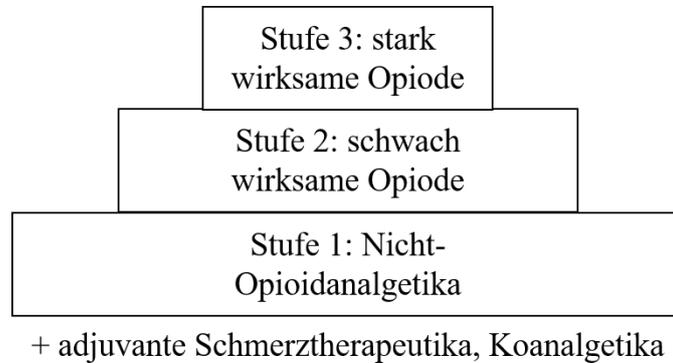


Abb. 12: WHO-Stufenschema für die Therapie chronischer Schmerzen aus dem Jahre 1996. Auf der ersten Stufe werden Nicht-Opioide-Analgetika wie Paracetamol oder Ibuprofen eingesetzt. Ab der zweiten Stufe kommen Opioide zum Einsatz, wobei zuerst niedrigpotente, dann hochpotente Opioide verabreicht werden. Auf allen Stufen können adjuvante Schmerztherapeutika eingesetzt werden, zum Beispiel das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin bei neuropathischen Schmerzen. Ebenfalls stufenunabhängig werden Komedikamente angewendet, zum Beispiel Laxanzien bei obstipativen Beschwerden unter der Opioide Therapie.

1.7.2 Opioide als antineoplastische Wirkstoffe

Neben den oben geschilderten Anwendungen in der Schmerztherapie könnten Opioiden in Zukunft auch als antineoplastische Wirkstoffe Anwendung finden. So wurden in der Vergangenheit bereits wiederholt die Effekte von Opioiden auf Tumorzellen untersucht. In mehreren *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass D,L-Methadon die Proliferation von Bronchialkarzinomzellen inhibieren kann und in Leukämiezellen von pädiatrischen Patienten Apoptose induzieren kann (Maneckjee und Minna 1994; Singh et al. 2011). Auch in Leukämiezelllinien von Erwachsenen und in Glioblastomzelllinien konnte durch die Inkubation mit D,L-Methadon *in vitro* die Proliferation gehemmt und die Apoptose induziert werden. Darüber hinaus konnten Zytostatikaresistenzen in Tumorzellen durch den Einsatz von D,L-Methadon überwunden werden. Um den Effekt auch *in vivo* nachweisen zu können, wurden humane T-ALL-Zellen in ein NOD/SCID/IL₂^{ry}^{null} Mausmodell xenotransplantiert und eine orale Therapie mit D,L-Methadon begonnen. In der mit D,L-Methadon behandelten Mäusepopulation konnte das Tumorwachstum gegenüber der Vehikel-Kontrolle gehemmt werden. Die beschriebenen Effekte konnten auf die Aktivierung von Caspase 9, Caspase 3 und PARP sowie einer verminderten Aktivität von Bcl-x_L sowie einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration zurückgeführt werden (Friesen et al. 2008; Friesen et al. 2013; Friesen et al. 2014).

1.9 Akute Leukämien im Kindes- und Erwachsenenalter

Akute Leukämien sind durch die klonale Expansion einer unreifen hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark charakterisiert. Durch den malignen Klon kann es zu einer Verdrängung der regelhaften Hämatopoese im Knochenmark kommen. Je nach Ausprägung und betroffenen Zelllinien kann es zu einer Anämie, Thrombozytopenie oder Granulozytopenie kommen. Das Beschwerdebild kann daher von Müdigkeit und Blässe über Blutungsneigung bis hin zu häufigen bakteriellen Infekten reichen. Durch die massive Expansion der malignen Zellen im Knochenmark klagen Patienten zudem häufig über Knochenschmerzen. Die unreifen Blasten können ins Blut ausgeschwemmt werden und verschiedene Organe befallen, zum Beispiel Lymphknoten oder die Milz. Unbehandelt verlaufen akute Leukämien fast immer foudroyant und führen innerhalb weniger Wochen bis Monaten zum Tod (Dörner et al. 2013a). Abhängig davon, welche Zellreihe von der klonalen Expansion betroffen ist, unterscheidet man die akute lymphatische Leukämie (ALL) und die akute myeloische Leukämie (AML). Während im Kindesalter akute Leukämien in erster Linie von lymphatischen Zellen ausgehen, lassen sich in erwachsenen Populationen vor allem AML-Erkrankungen beobachten. Die akuten Leukämien lassen sich anhand einer seit 2008 existierenden Klassifikation der WHO unterteilen (Tab. 1).

Tab. 1: WHO-Klassifikation der akuten Leukämien (2008). Bei der Einteilung der verschiedenen Entitäten werden die Herkunft der entarteten Leukozytenpopulation, häufige zytogenetische Aberrationen und ätiologische Aspekte berücksichtigt. Nach (Vardiman et al. 2009).

Acute myeloid leukemia and related neoplasms
<ul style="list-style-type: none"> • Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities (e.g. t(8;21), inv(16), t(15;17), t(9;11)) • Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes • Therapy-related myeloid neoplasms • Acute myeloid leukemia, <i>not otherwise specified</i> • Myeloid sarcoma • Myeloid proliferations related to Down syndrome • Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
B lymphoblastic leukemia/lymphoma
<ul style="list-style-type: none"> • B lymphoblastic leukemia/lymphoma, <i>not otherwise specified</i> • B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities (e.g. t(9;22), t(v;11q23))
T lymphoblastic leukemia/lymphoma

1.9.1 Promyelozytenleukämie

Die akute promyelozytäre Leukämie wird in der WHO-Klassifikation unter „acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities“ geführt. In bis zu 90 % der Fälle ist die reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17, wodurch das Fusionsprotein PML/RAR- α entsteht, ursächlich für die maligne Entartung der Promyelozyten. Auch in den verbliebenen Fällen mit einem normalen Karyotyp scheinen submikroskopische Translokationen der PML- und RAR- α -Gene für die Pathogenese verantwortlich zu sein. Das Fusionsprotein PML/RAR- α hemmt die Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen und blockiert die Apoptosefähigkeit der promyelozytären Leukämiezellen. Durch hohe Konzentrationen der all-trans-Retinoidsäure kann die Ausdifferenzierung der Leukämiezellen reinduziert werden und in den meisten Fällen eine Remission erreicht werden (Grignani et al. 1994).

1.9.2 Akute T-Zell-Leukämie

Vor allem männliche Jugendliche sind von der akuten T-Zell-Leukämie betroffen. Häufig beginnt die Erkrankung als T-Zell-Lymphom des Thymus, das dann in eine leukämische Manifestation übergehen kann. Ähnlich wie die B-Zell-Leukämien nehmen die T-Zell-Leukämien einen stürmischen Verlauf. Häufig lassen sich in den Tumorzellen chromosomale Aberrationen nachweisen, in bis zu 70 % der Fälle ist das Notch1-Gen betroffen (Mitchell et al. 2011). Durch Bindung eines Liganden an den Notch-Rezeptor wird eine Ektodomäne des Rezeptors abgespalten, die in den Zellkern transloziert und dort die Transkription Notch-abhängiger Proteine beeinflusst. Diese Prozesse sind mit der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose vergesellschaftet. Störungen des Notch-Signalweges sind häufig mit der Entstehung von Neoplasien assoziiert (Harper et al. 2003).

1.9.3 Therapie der akuten Leukämien

Die Therapie der akuten Leukämien besteht in der Regel aus vier aufeinanderfolgenden Therapieschritten, mit dem Ziel, eine komplette Remission, also eine Normalisierung der Befunde im peripheren Blut und im Knochenmark, zu erreichen. Zu Beginn steht die Induktionstherapie, mit dem Ziel, die Anzahl maligner Zellen erheblich zu reduzieren. Durch die Konsolidierungstherapie und Reinduktionstherapie sollen im Anschluss daran noch verbliebene Leukämiezellen vernichtet werden. Zuletzt erfolgt eine remissionserhaltende Therapie, die im Rahmen von Studien stattfindet. Trotz Vorliegen einer kompletten Remission können vielfach noch Leukämie-Zellen im Sinne einer *minimal residual disease* nachgewiesen werden. Die Therapie erfolgt bei den akuten Leukämieformen im Rahmen klinischer Studien, wobei sich die eingesetzten Zytostatika je nach entarteter Zelllinie

unterscheiden. Liegen bei der akuten lymphatischen Leukämie sehr hohe Leukämiezahlen vor ($\geq 25.000 /\mu\text{l}$) wird zur Vermeidung des Tumorlyse-Syndroms noch vor der Induktionstherapie eine Vorphasentherapie mit Prednison und Vincristin durchgeführt. Entscheidend für die Prognose der akuten B- und T-Zell-Leukämie ist die Prophylaxe von Leukämieresiduen im zentralen Nervensystem. Durch die intrathekale Chemotherapie mit Methotrexat wird das Risiko eines ZNS-Befalls reduziert (Herold et al. 2011).

Die Prognose akuter Leukämien bei erwachsenen Patienten ist bis heute unbefriedigend, da nur wenige Patienten dauerhaft in Remission gehalten werden können. Zwar kann bei Kindern, die an einer akuten Leukämie leiden, mit Heilungschancen zwischen etwa 60 % für die AML und 81 % für die ALL gerechnet werden (Muntau 2011), bei Erwachsenen liegen die Heilungsaussichten für die ALL im Rahmen der GMALL-Studie aber nur bei etwa 40 % und im Gesamtkollektiv der AML-Erkrankten bei etwa 30 % (Held et al. 2012). Entsprechend wichtig ist neben der Erforschung und systematischen Aufdeckung der molekularen Pathomechanismen die kontinuierliche Entwicklung neuer Strategien zur Optimierung der Therapie akuter Leukämien.

1.10 Fragestellung

Krebserkrankungen sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache (Becker und Wahrendorf 1998). Sie stellen trotz zahlreicher Fortschritte in der Prävention und Therapie weiterhin ein großes Problemfeld der modernen Medizin dar. In der Vergangenheit waren bereits Studien zur synergistischen Verstärkung der Zelltodinduktion in Leukämiezellen durch D,L-Methadon und dem Anthrazyklin Doxorubicin durchgeführt worden (Friesen et al. 2013).

Da dies ein vielversprechender neuer Therapieansatz sein könnte, sollte mit der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob auch Zytostatika anderer Wirkklassen in Kombination mit D,L-Methadon *in vitro* zu einer erhöhten Zelltodrate bei leukämischen Zellen führen können. Dazu sollten das Platinderivat CDDP, das hauptsächlich über eine Quervernetzung der DNA-Stränge wirkt, und Etoposid, das ähnlich wie Doxorubicin die Topoisomerase-II hemmt, als Kombinationspartner von D,L-Methadon eingesetzt werden. Als Leukämiezelllinien waren analog zu den Arbeiten von Friesen und Kollegen aus dem Jahr 2008 CCRF-CEM und HL-60 gewählt worden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits

Tab. 2: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits. Angabe der Bezeichnung, der Bestellnummer, des Herstellers und der Bezugsquelle.

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 FACSFlow™ (342003)	BD Biosciences, Ontario
BSA, Albuminstandard (23209)	Pierce, Rockford
Chymostatin (C-7268)	Sigma, St. Louis, Steinheim
<i>cis</i> -Diamineplatinum(II) dichloride (479306-1G)	Sigma, St. Louis, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO) (99,5 %) (D-4540)	Sigma, St. Louis, Steinheim
D, L-Dithiothreitol, (D,L-DTT) (D-0632)	Sigma, St. Louis, Steinheim
DMEM 21969	Gibco, Auckland
ECL™ Western Blotting Detection Reagents (RPN 2106)	GE Healthcare, Buckinghamshire
Etoposid	Bristol-Myers Squibb Co., Syracuse, NY
FACS Clean (340345)	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse (340346)	BD Biosciences, Heidelberg
Fetales bovines Serum (FBS)	Lonza, Verviers
Charge 5SB0010 (DE14-801F)	
Glycerol ≥ 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, reagent ISO reagent Ph. Eur., $\geq 99.8\%$ (GC) (32213)	Sigma-Aldrich, Seelze
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
Phenylmethansulfonylfluorid (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
Tween 20 (8.22184.0500)	Merck, Hohenbrunn

Wasser für Infusionszwecke (100 ml)	GlaxoSmithKline, München
Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (zVAD.fmk) (N-1510)	Bachem AG, Bubendorf

2.1.2 Geräte und Materialien

Tab. 3: Verwendete Geräte und Materialien. Angabe der Bezeichnung, der Bestellnummer, des Herstellers und der Bezugsquelle.

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 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

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen und Puffer bei *Raumtemperatur* (RT) angesetzt und 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))

Nicoletti-Puffer (10 ml):

- 0,05 % Triton X-100 (5 ml aus 0,1 % Stocklösung)
- 0,05 % Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (5 ml aus 0,1 % Stocklösung)
- 50 µg/ml Propidiumjodid (500 µl aus 1 mg/ml Stocklösung, 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)

Serin-Proteaseninhibitor- (SPI-) 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

D, L-Methadon-HCl-Lösung:

Das in Pulverform bezogene D,L-Methadon wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn 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.

CDDP-Lösung

Das CDDP-Pulver 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.

Etoposid-Pulver

Das Etoposid-Pulver wurde mit Aqua ad iniectabilia +5 % DMSO zu einer Stocklösung mit einer Konzentration von 0,5 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

2.1.3 Antikörper**Tab. 4: Zur Immunodetektion verwendete Primärantikörper.** Angabe des Serumptyps (m = Maus; r = Kaninchen), der Verdünnung, der Bestellnummer sowie des Herstellers.

Primärantikörper (Serumtyp)	Verdünnung	Bestell- nummer	Hersteller
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-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-XIAP (hILP) (m)	1:1000 WP	610-716 Clone 28	BD Transduction Laboratories

Tab. 5: Zur Immunodetektion verwendete Sekundärantikörper. Angabe des Serumptyps (g = Ziege), der Verdünnung, der Bestellnummer sowie des Herstellers. HRP: Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*)

Sekundärantikörper (Serumtyp)	Verdünnung	Bestell- nummer	Hersteller
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****Zelllinien**

Die Versuche wurden mit den beiden humanen Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 durchgeführt. CCRF-CEM wurde 1964 aus dem Blut eines dreijährigen Mädchens isoliert, das an einer akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie erkrankt war. Die Leukämie-Zellen besitzen einen runden Zellkörper und bilden in Kultur einen epitheloiden Monolayer. Ihre

Verdopplungszeit beträgt 24 bis 30 Stunden (Foley et al. 1965). HL-60 stammt aus dem Blut einer 36-jährigen Patientin mit einer akuten promyelozytären Leukämie und wurde 1979 isoliert. Die Zellen sind rund und liegen einzeln in Suspension vor. Sie benötigen etwa 40 Stunden um sich zu verdoppeln (Gallagher et al. 1979).

Kultivierung der Zelllinien

Tab. 6: Umsetzungsplan für die Dauerkultur der Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60. Die vordere Zahl gibt den Anteil der Zellsuspension, die hintere den Anteil des frischen RPMI 1640 +10 % FCS am Gesamtvolumen an. Entsprechend der jeweiligen Verhältnisse wurden die Zellen in frischem RPMI 1640 +10 % FCS aufgenommen.

	1 Tag	3 Tage	4 Tage
CCRF-CEM	1:3	1:10	1:15
HL-60	1:5	1:15	1:30

Die Leukämiezelllinien wurden bei 37° C, gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5% CO₂ in supplementiertem RPMI 1640 Zellkulturmedium (+10% FCS) kultiviert. Die Zellkulturen wurden zweimal wöchentlich in einer neuen Zellkulturflasche in frischem Medium aufgenommen, um so die Zellzahl konstant bei einer optimalen Dichte von etwa 5x10⁵ Zellen/ml zu halten (Tab. 6). Die Arbeiten mit den Zellkulturen wurden steril an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt um Kontaminationen zu vermeiden. Die Leukämiezelllinien wurden in einer *Dauerkultur* (DK) kultiviert, aus der die Versuchszellen entnommen wurden.

2.2.2 Versuchsansätze

Die hier beschriebenen Versuche wurden wiederholt durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren. Nach der Zellernte wurden alle weiteren Arbeitsschritte, sofern nicht anders beschrieben, auf Eiswasser durchgeführt. Dadurch soll der zelluläre Stoffwechsel möglichst gering gehalten werden, um keinen zusätzlichen Zelltod zu induzieren.

Präparation der Versuchszellen

Ein Tag vor dem jeweiligen Versuchsansatz wurden die Versuchszellen entsprechend Tabelle 6 in einer *Übernachtkultur* (ÜK) in frischem Kulturmedium aufgenommen, um eine Zelldichte von etwa 5 x 10⁵ Zellen/ml zu gewährleisten.

Apoptosedetektion: Zellernte, Ermittlung der Zellzahl und Zellaussaat

Am Versuchstag wurden die Zellen der ÜK lichtmikroskopisch auf ihre Dichte, Güte und Kontaminationen überprüft und anschließend durch Zentrifugation mit 1200 rpm für 5 min bei RT in der Multifuge von Heraeus geerntet. Das Pellet wurde dann in 20 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und mittels der Neubauerzählkammer die Zellzahl in der Suspension pro Milliliter bestimmt. Dafür wurden die vitalen Zellen in vier Großquadraten gezählt und der Mittelwert errechnet. Dieser wurde anschließend mit dem Faktor der Neubauerzählkammer multipliziert (1×10^4). Die Proben für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden in 96er- (FSC/SSC-Analysen) bzw. 24er-Wellplatten (Zellzyklusanalysen nach Nicoletti) auf Endvolumina von 100 μ l bzw. 1 ml ausplattiert. Für die Versuche bis zu einer Inkubationsdauer von 72 h wurde für beide Zelllinien jeweils eine Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingesetzt, für Versuche über 72 h eine Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/ml. Um die gewünschte Zellzahl pro Milliliter zu erzielen, wurde der Zellsuspension nach der Berechnung der Zellzahl/ml die entsprechende Menge an frischem Kulturmedium zugegeben. Die so verdünnte Zellsuspension wurde anschließend auf die Wellplatten aufgetragen.

Proteinisolation: Zellernte, Ermittlung der Zellzahl und Zellaussaat

Am Versuchstag wurden die Zellen der ÜK lichtmikroskopisch auf ihre Dichte, Güte und Kontaminationen überprüft und anschließend durch Zentrifugation mit 1200 rpm für 5 min bei RT in der Multifuge von Heraeus geerntet und das Zellpellet in 20 ml frischem Versuchsmedium aufgenommen. Für die Proteinisolierung wurden die Versuche in Zellkulturflaschen (175cm^2) angesetzt, wobei das hierbei eingesetzte Endvolumen 100 ml und die angestrebte Zelldichte 1×10^4 Zellen/ml betrug. Die Zellkonzentration in der Zellsuspension wurde mittels der Neubauerzählkammer bestimmt und die gewünschte Zellkonzentration durch Zugabe von frischem Versuchsmedium eingestellt. Um die Versuchsansätze in den Wellplatten mit denen der Zellkulturflaschen vergleichen zu können wurde zum Zeitpunkt der Proteinisolierung zeitnah FSC/SSC- und Nicoletti-Analysen der Versuchszellen aus den Zellkulturflaschen durchgeführt.

Behandlung der Versuchszellen mit CDDP bzw. Etoposid allein oder in Kombination mit D,L-Methadon

Nachdem die Zellen ausplattiert worden waren, wurde zuerst das Versuchsmedium hinzugegeben. Hierbei wurden verschiedene Volumina des Versuchsmediums eingesetzt: zu

den unbehandelten Zellen wurde so viel Versuchsmedium gegeben, bis das Endvolumen erreicht war, während in den Wells, in die später noch die Wirkstoffe gegeben werden sollten, entsprechend weniger Versuchsmedium eingesetzt wurde (Tab. 7). Im Anschluss daran wurden die Wirkstoffe in die Wells gegeben, wobei zuerst D,L-Methadon und dann das Zytostatikum eingesetzt wurde. Das in die Wells gegebene Volumen der Wirkstoffe wurde so gewählt, dass die Substanz in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt wurde.

Tab. 7: Volumen der eingesetzten Lösungen und Suspensionen in Abhängigkeit vom angestrebten Endvolumen. Das Volumen der Zellsuspension und des verwendeten Wirkstoffs bleibt immer gleich. Die Menge des Versuchsmediums richtet sich nach der Anzahl der eingesetzten Wirkstoffe.

	Zellsuspension (jeweils)	Versuchsmedium (bei 0 / 1 / 2 Wirkstoffen)	Wirkstoff (jeweils)
100 µl	40 µl	60, 50, 40 µl	10 µl
1000 µl	400 µl	600, 500, 400 µl	100 µl
1000 ml	400 ml	600, 500, 400 ml	100 ml

Die Wirkstofflösungen aus D,L-Methadon, CDDP oder Etoposid wurden am gleichen Versuchstag immer kurz vor ihrer Zugabe auf die Wellplatten gelöst, um stets gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Aus den Stocklösungen wurden mittels Verdünnungsreihen die benötigten Konzentrationen der Substanz hergestellt, wobei die Verdünnung bei der Zugabe der Substanz in das Well bzw. die Zellkulturflasche berücksichtigt wurde. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 37 °C, gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5% CO₂.

zVAD.fmk-abhängiger Nachweis der Caspasenaktivierung

Um zu zeigen, dass der durch die Behandlung der Versuchszellen mit CDDP allein oder in Kombination mit D,L-Methadon induzierte Zelltod Caspasen-abhängig ist, wurden die Versuchszellen mit dem Pancaspasen-Inhibitor zVAD.fmk behandelt, der in einer 50 mM Stocklösung vorlag. Diese wurde mit Versuchsmedium so weit verdünnt, bis zVAD.fmk in einer Konzentration von 50 µmol/l vorlag. Nachdem die Versuchszellen wie oben beschrieben in die Wellplatten ausplattiert worden waren, erfolgte die Zugabe von 10 µl des verdünnten zVAD.fmk. Die so behandelten Versuchszellen wurden 1 h bei 37 °C, gesättigter

Wasserdampfatosphäre und 5% CO₂ inkubiert, bevor die weitere Wirkstoffe (D,L-Methadon, CPPD oder D,L-Methadon und CDDP) zugegeben wurden. Die Auswertung fand nach 96 und 120 h durchflusszytometrisch mittels FSC/SSC-Analyse am statt.

Nachweis der OR durch Naloxon-Färbung

Um die Expression oberflächlicher OR auf den Leukämiezelllinien nachzuweisen wurde der Fluoreszein-gekoppelte unspezifische OR-Antagonist Naloxon verwendet. Naloxon zeigt dabei gegenüber den μ -OR die höchste Affinität. Fluoreszein emittiert nach Anregung mit blauem Licht Lichtwellen mit einer Wellenlänge von 520 bis 530 nm, die durchflusszytometrisch gemessen werden können.

Zuerst wurden 5×10^5 unbehandelte Zellen ausgezählt und in 1 ml Kulturmedium gegeben. Diese Zellsuspension wurde bei 1200 rpm zentrifugiert und mit 1 ml PBS / 1 % FCS gewaschen. Anschließend wurden die Proben unter Lichtausschluss 30 min mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluoreszin in 100 μ l PBS / 1 % FCS / 10 % EtOH behandelt. Zur Kontrolle wurden Leukämiezellen nur mit 100 μ l PBS / 1 % FCS / 10 % EtOH inkubiert. Dadurch sollten Änderungen der Autofluoreszenz der Zellen durch das Lösungsmittel EtOH ausgeschlossen werden. Es folgte die Zugabe von 1,5 ml PBS / 1 % FCS (4° C) und 2 weitere Waschschrte mit jeweils 2 ml PBS / 1 % FCS. Abschließend wurde das Zellpellet in 300 μ l PBS / 1% FCS (4° C) resuspendiert. Die Messung der Versuchszellen erfolgte anschließend am Durchflusszytometer.

Nachweis der Änderungen der OR-Expression durch die Zytostatika-Inkubation

Zur Untersuchung des Effekts von CPPD und Etoposid auf die Dichte der OR-Expression auf der Oberfläche der Leukämiezellen, wurden die Leukämiezellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen für 24 h bei 37 °C, gesättigter Wasserdampfatosphäre und 5% CO₂ inkubiert. Dabei wurde jeweils eine Zellkulturflasche ohne Zytostatikum und eine mit 0,3 bzw. 0,25 μ g/ml CPPD oder 0,1 μ g/ml Etoposid angesetzt wurde. Für die Versuche mit Etoposid wurde zusätzlich noch eine Flasche mit 0,5% DMSO angesetzt. Die Anfärbung der Proben erfolgte analog zum μ -OR-Nachweis durch Naloxon-Färbung. Naloxon zeigt dabei gegenüber den μ -OR die höchste Affinität.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Prinzipieller Aufbau des FACSCalibur™

Mit dem FACSCalibur™ von Becton Dickinson wurden die durchflusszytometrische *forward light scatter- / side light scatter-Analyse* (FSC-/SSC-Analyse), die

Zellzyklusanalysen nach Nicoletti durchgeführt und der Nachweis der Opioidrezeptoren auf der Zelloberfläche der eingesetzten Leukämiezellen durchgeführt. (Abb. 13)

Das FACSCalibur™ verfügt über einen luftgekühlten Argon-*light amplification by stimulated emission of radiation* (LASER), der monochromatisches Licht von 488 nm Wellenlänge erzeugt, welches durch ein Linsensystem gebündelt und zur *flow cell* geleitet wird. In der *flow cell* laufen die durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt Versuchszellen in dem Hüllflüssigkeitsstrom (*sheath fluid*). Trifft der LASER-Strahl auf die Zellen können je nach Fragestellung unterschiedliche Werte bestimmt werden. Zum einen wird das monochromatische Licht durch die Zellen, in Abhängigkeit von deren Größe und Granularität, unterschiedlich stark abgelenkt, was bei der FSC-/SSC-Analyse als Streuung zur Seite und nach vorne detektiert werden kann. Außerdem können mit dem FACSCalibur™ bis zu vier Fluoreszenzsignale mit unterschiedlichem Emissionsspektrum gemessen werden. Nachdem die Detektoren die jeweiligen Signale über ein Linsen- und Spiegelsystem zugeleitet bekommen haben, werden sie von ihnen digitalisiert und so die computergestützte Auswertung ermöglicht. Die mit dem FACSCalibur™ generierten Daten wurden anschließend am Computer mit CellQuest™ ausgewertet. Durch das Setzen von *gates* können dabei bestimmte Zellpopulationen, die von besonderem Interesse sind, einzeln ausgewählt und analysiert werden (Marti et al. 2001).

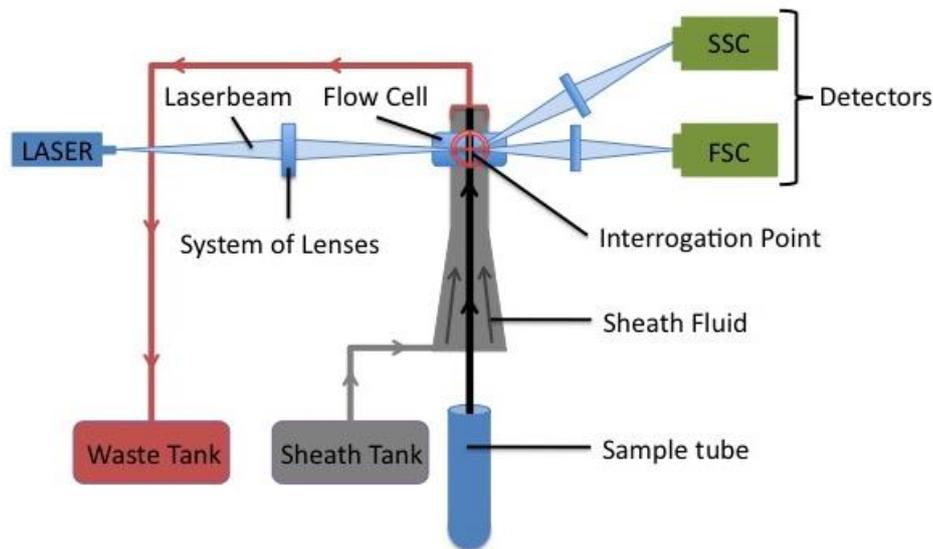


Abb. 13: Schematischer Aufbau des FACSCalibur™ von Becton Dickinson. Der Argon-LASER erzeugt monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488nm, das über ein Linsensystem zur *flow cell* geleitet wird. Am *interrogation point* trifft das Licht auf die durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt Zellen. Gezeigt ist die Detektion des seit- (SSC) und vorwärts (FSC) gestreuten Lichts. (LASER = engl. „light amplification by stimulated emission of radiation“, FSC = engl. “forward light scatter”, SSC = engl. “side light scatter”)

FSC-/SSC-Analyse

Bei der FSC-/SSC-Analyse wird das von den Zellen abgelenkte Licht detektiert, um Rückschlüsse auf die Morphologie ziehen zu können. Je größer eine Zelle ist, die in den Strahl aus monochromatischem Licht tritt, desto mehr wird das Licht an ihrer Oberfläche gebrochen und desto weiter streut sie es nach vorne (*forward light scatter*). Erhöht sich die Granularität der Zellen, wird das Licht vermehrt zur Seite gestreut und von einem im 90° Grad Winkel zum LASER-Strahl angebrachten Detektor registriert (*side light scatter*).

Apoptotische Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe und Granularität von vitalen Zellen. Ihre Zellmembran ist blasenförmig aufgeworfen, apoptotische Körperchen schnüren sich von ihrem Zelleib ab, es kommt zu einer Volumenreduktion der Zellen und einer Zunahme der Granularität. Entsprechend können durch die FSC-/SSC-Analyse die apoptotischen Zellen von den vitalen Zellen abgegrenzt werden sowie qualitative und quantitative Aussagen über die Vitalität und das Ausmaß der Apoptose in der gemessenen Probe getroffen werden. (Abb. 14, a). Die Darstellung der Messungen erfolgte in Form von *dot blots*, wobei der FSC auf der Abszisse und der SSC auf der Ordinate aufgetragen ist. Große Zellen mit geringer Granularität bilden sich im Diagramm somit eher rechts unten ab, kleine Zellen mit hoher innerer Komplexität kommen eher links oben zur Darstellung (Abb. 14, b).

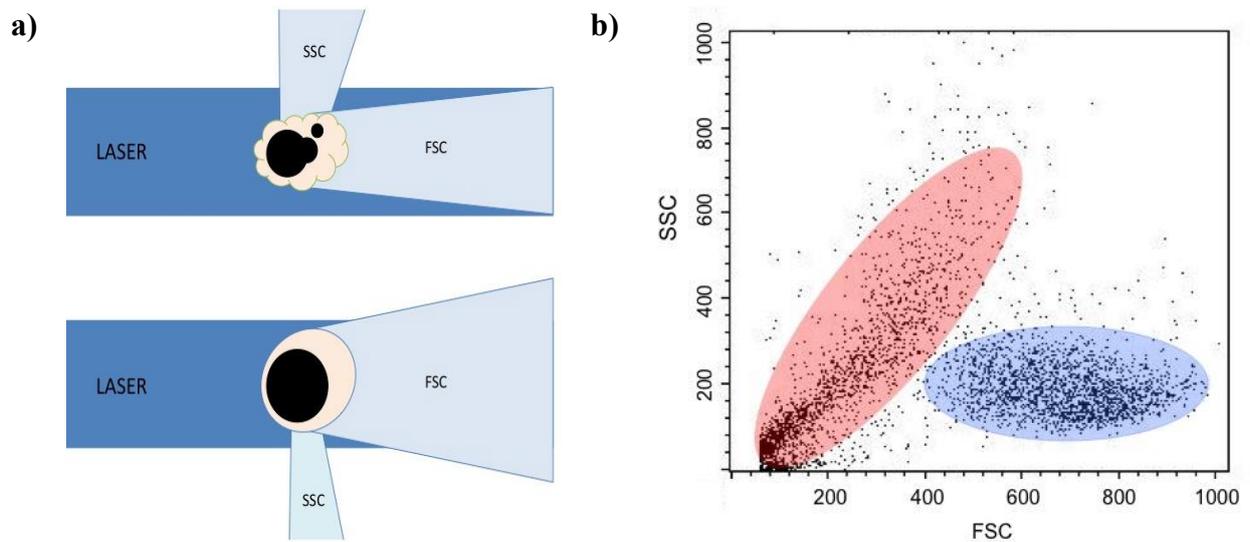


Abb. 14: FSC-/SSC-Analyse mit dem FACSCalibur™. (a) Die obere apoptotische Zelle ist kleiner und weist eine höhere Granularität auf als die untere vitale Zelle. Der LASER-Strahl wird von der apoptotischen Zelle verstärkt zur Seite (SSC), aber weniger stark nach vorne (FSC) gestreut. (b) FSC-/SSC-Analyse der Leukämiezelllinie CCRF-CEM, die für 72h mit 0,3 µg/ml CDDP inkubiert wurde. Die vitalen Zellen sind blau hervorgehoben und weisen einen großen Zelleib bei geringer Granularität auf, während die rot markierten Zellen über kleinere Zelldurchmesser und eine Zunahme der Granularität verfügen. (LASER= engl. „light amplification by stimulated emission of radiation“, FSC = engl. „forward light scatter“; SSC = engl. „side light scatter“).

Mit dem Analyseprogramm CellQuest™ konnten die vitalen von den apoptotischen Zellpopulationen voneinander abgegrenzt und deren Anteil an der Gesamtheit der gemessenen Zellen prozentual errechnet werden. Um den Effekt der eingesetzten Therapeutika auf die Zelltodinduktion darzustellen, wurde die spezifische Apoptose ermittelt (Formel 1). Ergänzend wurden die Standardabweichungen errechnet und die Ergebnisse in Graphen dargestellt.

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

Formel 1: Formel für die Berechnung der spezifischen Apoptose.

Zellzyklusanalyse nach Nicoletti

In Anhängigkeit vom Zellzyklus ändert sich der DNA-Gehalt von Zellen. In der G₂-Phase verfügen die Zellen über einen in der S-Phase verdoppelten Chromosomensatz, der in der M-Phase auf die beiden Tochterzellen verteilt wird. In der G₀- und der G₁-Phase liegt ein

einfacher Chromosomensatz vor (Heinrich et al. 2014b). Der DNA-Gehalt unterscheidet sich auch zwischen gesunden und apoptotischen Zellen. Letztere zeigen eine Fragmentierung ihrer DNA und in der Folge einen subdiploiden Chromosomensatz (Darzynkiewicz et al. 1997). Das Prinzip der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti ist die Quantifizierung des DNA-Gehalts der Versuchszellen durch Propidiumiodid, einem Fluorophor, welches an Nukleotidpaare aus Guanin und Cytosin bindet und aufgrund seiner Fluoreszenz bei 493 nm durchflusszytometrisch erfasst werden kann (Nicoletti et al. 1991). So kann gezielt und sicher zwischen vitalen Zellen mit diploidem Chromosomensatz und hoher Fluoreszenzintensität und apoptotischen Zellen mit subdiploider DNA und niedriger Fluoreszenzaktivität unterschieden werden. Zudem erlaubt die Zellzyklusanalyse Rückschlüsse auf den Zellzyklus der untersuchten Versuchszellen. Im Histogramm bildet sich der Zellzyklus bzw. die subdiploide DNA folgendermaßen ab: die vitalen Zellen stellen sich mit einem G₁-, G₂-Peak und dazwischenliegender S-Phase dar, während die apoptotischen Zellen als sub-G₁-Peak niedrigerer Fluoreszenz imponieren (Abb. 15) (Darzynkiewicz et al. 1997).

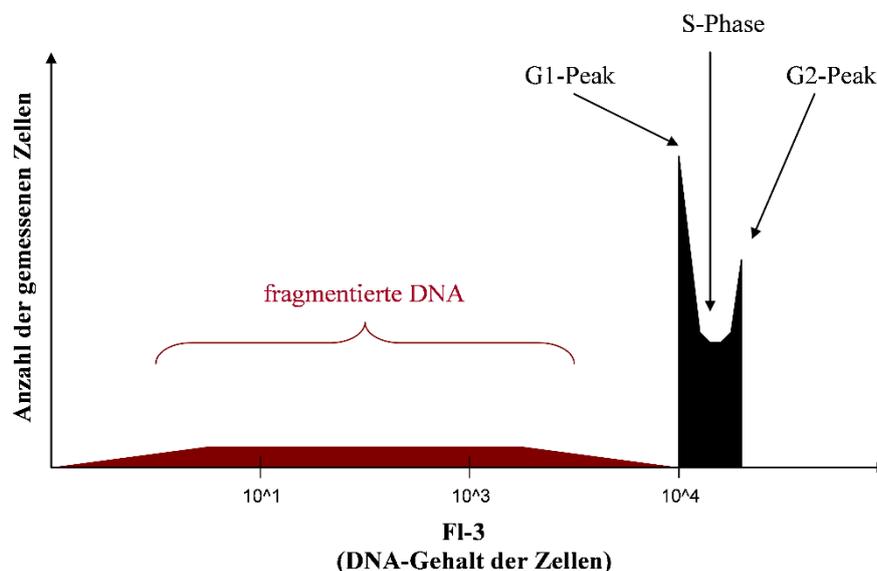


Abb. 15: Histogramm der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti. Der G₁-Peak liegt bei 10⁴, die subdiploide DNA der apoptotischen Zellen ist rot hervorgehoben und liegt unterhalb des G₁-Peaks. Als Tal zwischen dem G₁- und G₂-Peak liegt die S-Phase. (DNA = engl. „Desoxyribonucleic acid“, G = gap)

Um die Proben für die Zellzyklusanalyse nach Nicoletti herzustellen, wurden die Versuchszellen nach Erreichen der angestrebten Inkubationszeit in Polystyrenröhrchen überführt und bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert, abschließend mit 3ml 1xPBS (4°C) gewaschen und dann ein weiteres Mal bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert. Je nach Größe

des dabei entstandenen Pellets wurde zwischen 100 μ l und 500 μ l Nicoletti-Puffer hinzugegeben. Durch die Lyse der Versuchszellen kann das im Nicoletti-Puffer enthaltene Propidiumiodid, das die intakte Kernhülle, nicht jedoch die Plasmamembran passieren kann, ungehindert zur DNA vordringen. Um die Zelllyse zu initiieren und mechanisch zu unterstützen, wurden die Proben ausgiebig resuspendiert und jeweils für 10 s gevortext. Um dem Propidiumiodid ausreichend Zeit zu geben, in die DNA zu interkalieren, wurden die Proben mindestens 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend am FACSCalibur™ hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest™, die spezifische Apoptose wurde analog zu der FSC-/SSC-Analyse berechnet.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Apoptose wird durch zahlreiche Proteine reguliert und prozessiert, die untereinander interagieren und so den apoptotischen Prozess hemmen, aktivieren oder verstärken können. Viele dieser Proteine liegen als inaktive Zymogene vor, die erst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden müssen, während andere regulatorische Proteine primär aktiv vorliegen, um durch Spaltung inaktiviert zu werden. Ziel der Immunodetektion ist der Nachweis von Proteinspaltungen und der Zu- beziehungsweise Abnahme des spezifischen Proteingehalts.

Proteinisolierung

Die Proteine für die immunologischen Analyseverfahren wurden aus Ganzzelllysaten gewonnen. Die Versuchszellen für die Proteinisolierung wurden nach Erreichen der gewünschten Inkubationszeit in 50 ml Falcons bei 1500 rpm in der Multifuge von Heraeus für 10 min bei 4° C zentrifugiert, anschließend dekantiert und das Pellet jeweils in 35 ml 1xPBS (4°C) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 800 μ l 1xPBS (4°C) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit der Tischzentrifuge Biofuge fresco von Heraeus bei 2300 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgenommen, um anschließend den Lysepuffer im Verhältnis 1:1 hinzugeben. Davor wurden jedoch für jeden Milliliter Lysepuffer, der eingesetzt werden sollte jeweils 2 μ l D,L-DTT, 5 μ l PMSF und 10 μ l der SPI-Mischung hinzugegeben. PMSF und SPI, beides Serin-Proteaseninhibitoren, sollen den enzymatischen Abbau der Proteinlysate verhindern (Turini et al. 1969). D,L-DTT schützt die SH-Gruppen der Proteine vor Oxidation und erhält somit deren funktionelle Form (Zahler; Cleland 1968).

Die Proben wurden anschließend resuspendiert und gevortext. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis und anschließend eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge Biofuge fresco (4°C). Bei dem Überstand handelte es sich um das Zellysate, das in ein weiteres 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wurde. Sowohl das Zellpellet, als auch das Zellysate, wurden bei -20° C gelagert.

BCA Protein Assay

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Zellysaten erfolgte mittels *BCA™ Protein Assay Kit* von Pierce, mit dem ein Bicinchoninsäure-Assay durchgeführt wurde. Der Assay beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} durch mindestens drei Aminosäuren große Peptide und Proteine zu Cu^+ reduziert wird. Diese Reaktion verläuft proportional zur Anzahl beteiligter Proteinbindungen. In einem zweiten Schritt bilden dann zwei Moleküle der Bicinchoninsäure einen Komplex mit den reduzierten Kupferionen. Dieses wasserlösliche und lilafarbene Reaktionsprodukt besitzt ein Extinktionsmaximum von 562 nm, das mittels Mikrotiterplattenlesegerät detektiert werden kann. Über eine Standardkurve kann auf die Proteinkonzentration geschlossen werden (Fischer 2012).

Zu Beginn wurde eine Standardreihe, bestehend aus 8 Proben bovinem Serumalbumin in absteigenden Konzentrationen von 2000 $\mu\text{g/ml}$ bis 25 $\mu\text{g/ml}$, auf eine 96er-Wellplatte aufgetragen. Das Zellysate wurde 1:25 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt und dann als Dreifachwerte zu je 10 μl auf die Wellplatte pipettiert. Jeder Probe wurden 200 μl frisch angesetztes Pierce Kit Reagenz (Bicinchoninsäure, Kupfersulfat (4%); Mischungsverhältnis 50:1) zugegeben. Die Wellplatte wurde dann bei RT für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert und in der Folge mit einem Mikrotiterplattenlesegerät von ASYS Hitech GmbH analysiert. Über die Standardreihe konnte dann der Proteingehalt in den Zellysaten berechnet werden. Aus diesen Werten wiederum ergab sich dann das für die Elektrophorese einzusetzende Volumen der Zellysate (Formel 2). So konnte sichergestellt werden, dass immer die gleiche Proteinmenge auf das Gel aufgetragen wurde.

$$\text{einzusetzendes Volumen } [\mu\text{l}] = \frac{\text{gewünschte Proteinkonzentration} * 1000 \text{ (Umrechnungsfaktor } \mu\text{l)}}{\text{Mittelwert der 3-fach Werte} * \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Formel 2: Formel zur Berechnung des Volumens, das zum Zellysate hinzugegeben werden muss, damit auf das Gel immer gleich viel Protein aufgetragen wird.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine aus den Zellysaten nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde das

Verfahren der *Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese* (SDS-PAGE) angewendet. Dabei werden die Proteine durch D,L-DTT im Ladepuffer und Hitze denaturiert und verlieren durch das im Lade- und Laufpuffer enthaltene anionische Detergenz SDS ihre proteinspezifische Ladung. Somit bestimmt nur die Molekülmasse die Migration des Proteins im Gel (Westermeier und Görg 2012).

Die Zellysate für die SDS-PAGE wurden auf Eis aufgetaut und je 50 µg Protein 11,25 µl Aqua ad injectabilia hinzugegeben. Anschließend wurden 3,75 µl Ladepuffer (NuPage LDS Sample Buffer (4x)) in die Zellysate gegeben, wodurch der Ladepuffer 1:4 verdünnt wurde. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf 70° C erhitzt und danach eine weitere Minute auf Eis gelagert. Nach kurzer Zentrifugation der Proteine erfolgte das Auftragen auf das Polyacrylamidgel (NuPAGE®Novex® 4-12% Bis Tris Midi Gel), das vorher in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer (Criterion Cell, BioRad, München) eingehängt worden war. Um eine Störung des Stromflusses durch Luftblasen zu vermeiden, waren diese sorgfältig aus den Geltaschen und vom Rand des Gels entfernt worden. Zusätzlich zu den Proteinen wurden zwei Standardmarker (Novex® Sharp Protein Standard, ProSieve® Color Protein Marker) mit bekannten molekularen Massen auf das Gradientengel aufgetragen, die der späteren Ermittlung der Molekulargewichte der Proteine dienen sollten. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer (NuPAGE MES SDS Running Buffer, Invitrogen) durch das Anlegen einer Spannung von 100 V für 10 min gefolgt von 200 V für 45 min. Nach abgeschlossener Gel-Elektrophorese wurde das Gradientengel vorsichtig geborgen.

Western Blotting

Um die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine für die Immunodetektion zugänglich zu machen, wurden diese mittels *Semidry-Elektroblotting* auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen und dort immobilisiert.

Die Nitrocellulosemembran (Hybond™ ECL™ Nitrocellulose Membrane) wurde kurz in Aqua ad injectabilia aktiviert und dann für 10 min in Blottingpuffer gegeben. Das Filterpapier (Gel Blotting Paper) wurde ebenfalls mit Blottingpuffer befeuchtet. Anschließend wurden vier Lagen Filterpapier auf der Anodenfläche der Blotting-Apparatur (Trans-Blot® SD Cell) geschichtet. Darauf wurde die Nitrocellulosemembran mit aufliegendem Polyacrylamidgel gelegt und beides mit vier weiteren Lagen feuchtem Filterpapier bedeckt, ehe die Kathodenfläche aufgesetzt wurde. Bei jedem Schritt wurde sorgfältig darauf geachtet, keine Luftblasen zwischen den Schichten einzuschließen. Der Blotting-Vorgang wurde durch Anlegen einer Stromstärke von 120 mA für 100 min gestartet.

Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in Blocking-Puffer gegeben, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Immunodetektion

Die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine wurden durch spezifisch bindende Primärantikörper markiert, an welchen wiederum ein Meerrettichperoxidase- (HRP-) gekoppelter Sekundärantikörper binden kann. Nach dem Verfahren der *enhanced chemiluminescence* (ECL) wird das im ECL-Kit (ECL™ Western Blotting Detection Reagents) enthaltene Luminol durch die HRP oxidiert. Die dabei entstehenden Lichtemissionen werden durch das p-Iodophenol im ECL-Kit verstärkt (Abb. 16) (Osborn 2000).

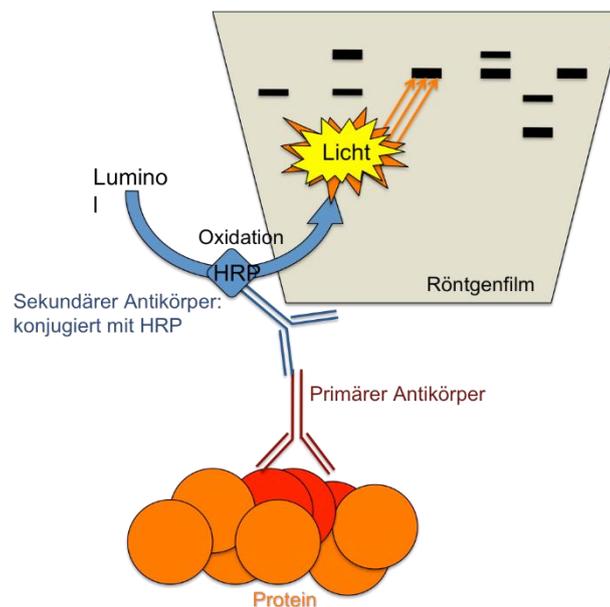


Abb. 16: Schematische Darstellung der Immunodetektion. Das im ECL-Kit enthaltene Luminol wird durch die Antikörper-gebundene HRP oxidiert. Die dabei entstehenden Lichtemissionen, die durch Zusätze im ECL-Kit verstärkt werden, schwärzen den aufgelegten Röntgenfilm punktuell. (ECL = engl. „enhanced chemiluminescence“, HRP = engl. „horseradish peroxidase“)

Die Inkubation der geblockten Nitrocellulosemembran mit 20 ml des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4° C. Nach drei 10-minütigen Waschgängen mit Waschpuffer, um überschüssige und nicht spezifisch gebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde die Nitrocellulosemembran mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose-Membran wieder drei Mal für jeweils 10 min mit Waschpuffer behandelt. Sämtliche Waschschrte und Inkubationen wurden auf einem Schüttelgerät (Heidolph Instruments) durchgeführt. Dadurch soll gewährleistet werden, dass die Nitrocellulosemembran an allen Stellen gleichmäßig mit den eingesetzten Substanzen

behandelt wird. Auf die so präparierte Nitrocellulosemembran wurden 6 ml des frisch angesetzten ECL-Reagenz gegeben und für 1 min inkubiert. Durch die emittierten Lichtquanten konnte ein aufgelegter Röntgenfilm (Amersham Hyerfilm™ ECL™) punktuell dort geschwärzt werden, wo sich Banden des Antikörper-markierten Proteins befanden. Die jeweilige Belichtungszeit wurde in Abhängigkeit des Proteingehaltes und der proportionalen Menge an gebundener HRP zwischen einigen Sekunden bis mehreren Minuten gewählt.

Nach der Detektion wurden die Nitrocellulose-Membranen dreimal für 10 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 15 min mit Stripping-Puffer bei RT inkubiert, um die Antikörper abzulösen. Es folgte ein Waschgang mit Aqua ad injectabilia, um vom Stripping-Puffer zurückgebliebene Salze zu verdünnen und auszuwaschen, und drei Waschgänge zu je 10 min in Waschpuffer. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen 1 h mit Blocking-Puffer geblockt. Die Membran konnte nun erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden. Zuletzt wurde die Membran mit einem primären Antikörper gegen das in allen Zellen konstitutiv exprimierte β -Aktin inkubiert, um nachzuweisen, dass in den Geltaschen jeweils gleich viel Protein geladen war.

3. Ergebnisse

Schon 2008 wurde von Friesen et al. der proapoptotische Effekt des D,L-Methadons auf Leukämiezellen *in vitro* nachgewiesen und beschrieben (Friesen et al. 2008). Für die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 konnte gezeigt werden, dass das Opioid D,L-Methadon zu einer Sensitivierung der Leukämiezellen für die Zelltodinduktion durch Doxorubicin führt. In Analogie zu diesen Erkenntnissen, sollte durch diese Arbeit der therapeutische Nutzen einer Therapie aus D,L-Methadon in Kombination mit den Zytostatika CDDP, einer alkylierenden, Platin-freisetzenden Verbindung, und dem Topoisomerase II-Hemmstoff Etoposid *in vitro* untersucht werden, um damit das Spektrum an möglichen Kombinationstherapien mit D,L-Methadon zu erweitern.

3.1 Nachweis von oberflächlichen Opioidrezeptoren auf Leukämiezellen

Friesen et al. konnten zeigen, dass der synergistische Effekt von D,L-Methadon mit einem Zytostatikum von der Expression von Opioidrezeptoren auf der Oberfläche der Krebszellen abhängt. Die Expressionsdichte variiert dabei je nach Gewebe- und Tumorart (Friesen et al. 2013). Entsprechend analysierten wir die Zelllinien CCRF-CEM und HL-60 zu Beginn unserer Versuchsreihe auf ihre oberflächliche Expression von OR mittels Naloxon-Fluoreszein-Färbung.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am FACS und ergab für die Proben der Zelllinie CCRF-CEM, die mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluoreszein inkubiert worden waren, eine Zunahme der Fluoreszenz auf durchschnittliche Werte von 302 während die Fluoreszenz der ungefärbten Kontrollen im Mittelwert bei 6 lag. Für HL-60 ergab sich für die mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluorescein inkubierten Proben im Durchschnitt eine mittlere Fluoreszenzverschiebung von 4 auf 239 (Tab. 8).

Tab. 8: Für die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 konnte jeweils eine oberflächliche OR-Expression nachgewiesen werden. Die Versuchszellen wurden mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluoreszein angefärbt und die relative Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer gemessen. $\Delta_{(\text{Naloxon-Kontrolle})}$ gibt die Naloxon-Fluoreszenz abzüglich der Autofluoreszenz der Zellen an.

	Kontrolle	Naloxon	$\Delta_{(\text{Naloxon-Kontrolle})}$
CCRF-CEM	6	302	296
HL-60	4	239	235

Aus diesen Beobachtungen ließ sich schlussfolgern, dass beide Zelllinien OR auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und demnach von D,L-Methadon adressiert werden können. Bei CCRF-CEM konnte eine höhere OR-Konzentration nachgewiesen werden.

3.2 Analyse der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des durch CDDP und Etoposid induzierten Zelltods

Um die zytotoxische Wirkung von CDDP und Etoposid auf die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 zu untersuchen, wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika in Kurzzeit- (24, 48, 72 h) und Langzeitversuchen (96, 120, 144 h) inkubiert. Die Messung der Proben hinsichtlich der apoptotischen Zelltodrate erfolgte am Durchflusszytometer. Diese Versuche bildeten die Grundlage für die Wahl der geeigneten Zytostatika-Konzentrationen für die späteren Kombinationsversuche mit D,L-Methadon.

3.2.1 CDDP

Die Versuchszellen der Leukämiezelllinie CCRF-CEM wurden mit CDDP-Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 0,1 µg/ml inkubiert. In den Kurzzeitversuchen zeigte sich vor allem für hohe CDDP-Konzentrationen (10 µg/ml bis 1 µg/ml) eine deutliche Zunahme des Zelltodes gegenüber den unbehandelten Kontrollen, nach 48 und 72 h auf jeweils über 90 % für 10 µg/ml CDDP und jeweils über 40 % für 1 µg/ml CDDP. Der apoptotische Zelltod bei 0,3 µg/ml und 0,1 µg/ml CDDP lag dagegen nur geringfügig über dem der unbehandelten Kontrollen (Abb. 17, a). In den Langzeitversuchen lag der apoptotische Zelltod für CDDP-Konzentrationen über 1 µg/ml immer höher als 89 %, während für niedrigere CDDP-Konzentrationen vergleichbare Werte wie in den unbehandelten Kontrollen erzielt wurden (Abb. 17, b). Die Leukämiezelllinie HL-60 wurde mit CDDP-Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 0,1 µg/ml inkubiert. Dabei konnte in den Kurzzeitversuchen für die CDDP-Konzentrationen zwischen 10 und 1 µg/ml nach 48 h ein apoptotischer Zelltod von mindestens 80 % festgestellt werden. In den niedrigeren CDDP-Konzentrationen (0,3 und 0,1 µg/ml) stieg der apoptotische Zelltod für 0,3 µg/ml CDDP auf maximal 22,8 % nach 48 h und auf 34,2 % nach 72 h. Sonst lag der apoptotische Zelltod etwa im Bereich der unbehandelten Kontrollen (Abb. 17, c). In den Langzeitversuchen konnte für 10, 3 und 1 µg/ml CDDP durchgehend ein apoptotischer Zelltod von wenigstens 95 % gemessen werden. Für 0,3 µg/ml lagen die Werte für die spontane Apoptose zwischen 29,8 % und 38,6 %, während für 0,1 µg/ml CDDP der apoptotische Zelltod vergleichbar mit dem der unbehandelten Kontrollen war (Abb. 17, d).

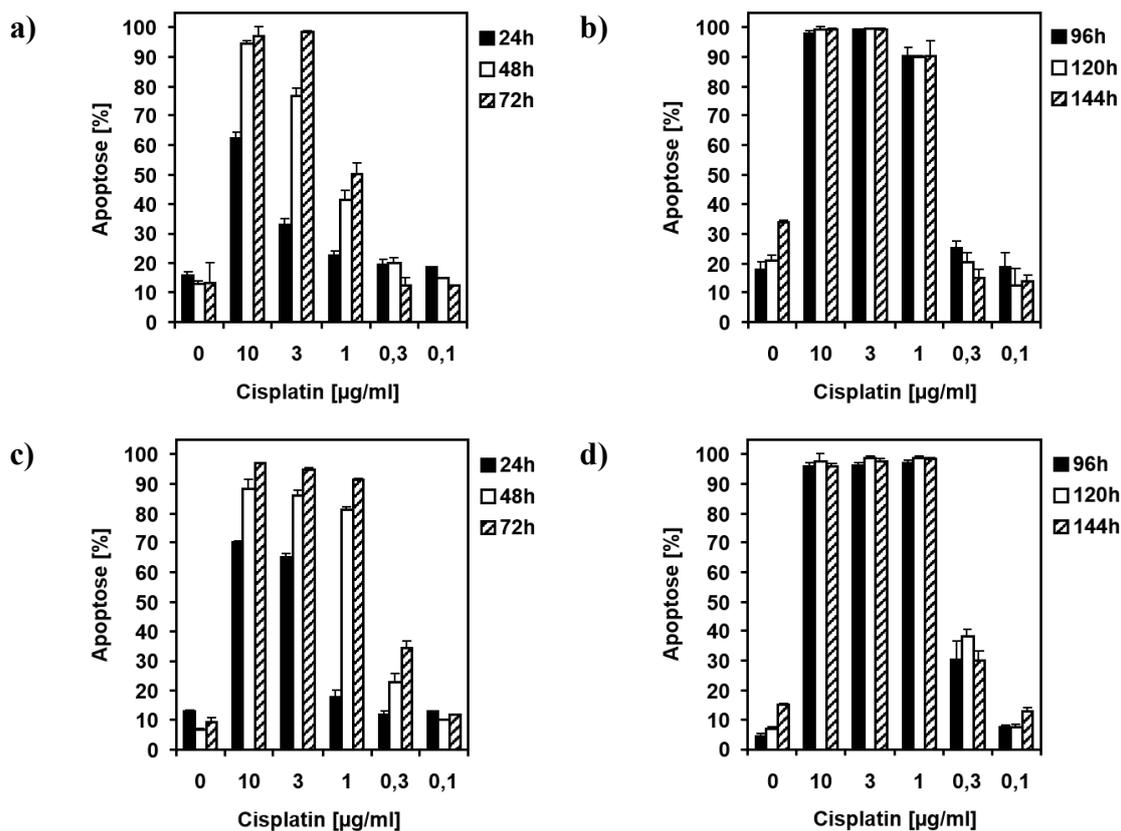


Abb. 17: Zelltodrate (in %) von CCRF-CEM (a, b) und HL-60 (c, d), die für 24, 48, 72h bzw. 96, 120, 144h mit CDDP inkubiert worden waren. Nach entsprechend langen Inkubationszeiten waren die Proben am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC hinsichtlich ihrer Morphologie analysiert worden. Gezeigt ist jeweils die Apoptoserate in Prozent. (FSC = engl. „foreward light scatter“, SSC = engl. „side light scatter“)

Für die Versuche zur Untersuchung der synergistischen Wirkung zwischen CDDP und D,L-Methadon wurden die CDDP-Konzentrationen 10, 3 und 1 µg/ml ausgeschlossen, da der gemessene apoptotische Zelltod für den Nachweis eines Synergismus zwischen CDDP und D,L-Methadon, vor allem bei den Inkubationszeiten der Langzeitversuche, zu hoch waren.

3.2.2 Etoposid

Die Leukämiezellen der Zellreihe CCRF-CEM wurden mit Etoposid-Konzentrationen zwischen 0,3 µg/ml und 0,01 µg/ml behandelt. In den Proben der Kurzzeitversuche ließ sich lediglich für 0,3 µg/ml Etoposid durchflusszytometrisch eine deutliche Zunahme des apoptotischen Zelltodes gegenüber der unbehandelten Kontrollen nachweisen, während bei allen niedrigeren Konzentrationen die gemessenen apoptotischen Zelltodraten etwa im Bereich der unbehandelten Kontrollen lagen (Abb. 18, a). In den Langzeitversuchen konnte für 0,3 µg/ml Etoposid ein apoptotischer Zelltod gemessen werden, der zu allen Zeitpunkten über 85 % lag. Für 0,1 µg/ml Etoposid war der apoptotische Zelltod im Vergleich zu 0,3 µg/ml Etoposid um mehr als die Hälfte zurückgegangen und lag bei höchstens 39,5 % nach 96 h. Bei Etoposid-Konzentrationen kleiner als 0,3 µg/ml kam es meist nur zu einer

unwesentlichen Steigerung des apoptotischen Zelltods gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abb. 18, b).

Die Versuchszellen der Leukämiezellreihe HL-60 waren ebenfalls mit Etoposid-Konzentrationen zwischen 0,3 $\mu\text{g/ml}$ und 0,01 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert worden. Schon in den Kurzzeitversuchen ließ sich für Etoposid-Konzentration von 0,3, 0,1 und 0,03 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Zunahme des apoptotischen Zelltodes messen. Für 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid lag der gemessene apoptotische Zelltod zu allen Zeitpunkten etwa im Bereich der unbehandelten Kontrollen (Abb. 18, c). Während der Langzeitversuche lag der apoptotische Zelltod bei 0,3 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid durchgehend bei über 90 % und sank erst bei den niedrigeren Etoposid-Konzentrationen auf Werte zwischen 76,2 % und 66,1 % für 0,03 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid bzw. 36,4 % und 46,5 % für 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid (Abb. 18, d).

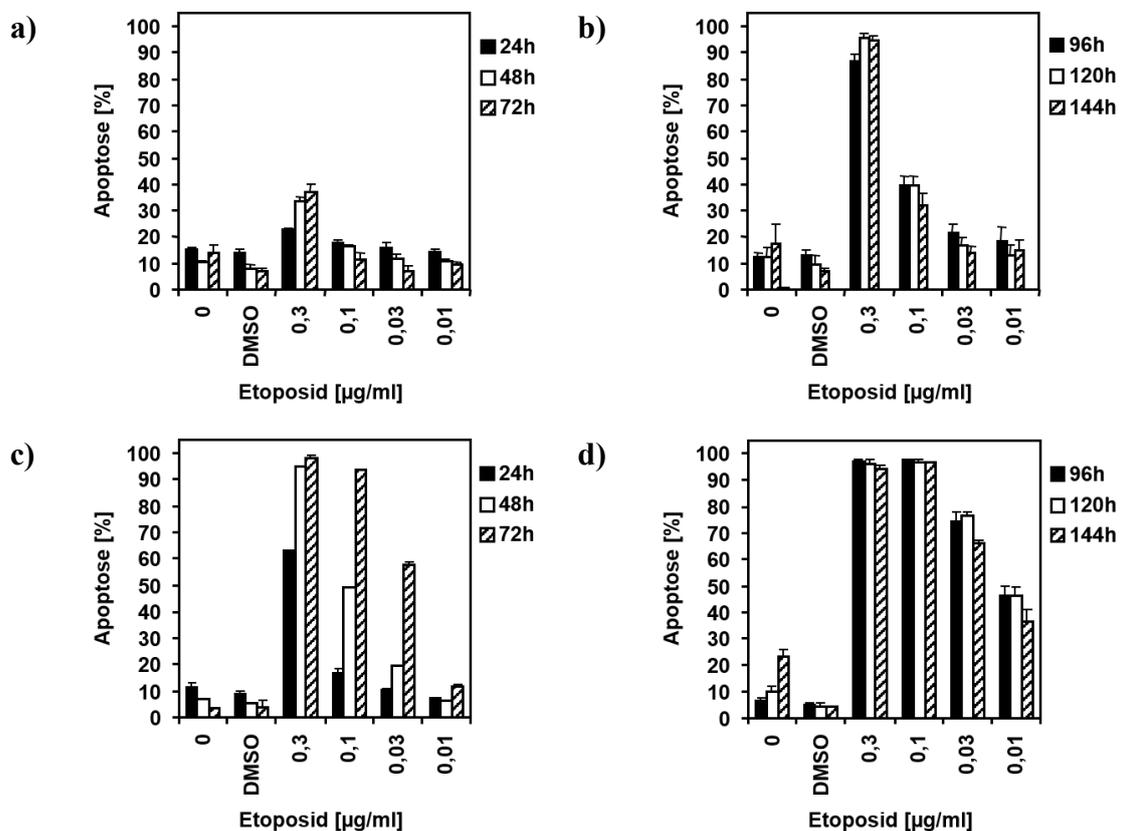


Abb. 18: Zelltodrate (in %) von CCRF-CEM (a, b) und HL-60 (c, d), die für 24, 48, 72h bzw. 96, 120, 144h mit Etoposid inkubiert worden waren. Nach entsprechend langen Inkubationszeiten waren die Proben am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC hinsichtlich ihrer Morphologie analysiert worden. Gezeigt ist die Apoptoserate in Prozent. (DMSO = Dimethylsulfoxid, FSC = engl. „forward light scatter“, SSC = engl. „side light scatter“)

Für die Kombinationsversuche mit Etoposid und D,L-Methadon zur Untersuchung eines möglichen Synergismus zwischen den beiden Substanzen wurden Etoposid-

Konzentrationen über 0,1 µg/ml als ungeeignet ausgeschlossen, da der apoptotische Zelltod in diesem Konzentrationsbereich zum Nachweis einer synergistischen Wirkung zwischen beiden Substanzen, vor allem bei längeren Inkubationszeiten, zu hoch waren.

3.3 Synergistische Wirkung der Zytostatika CDDP und Etoposid in Kombination mit D,L-Methadon auf Leukämiezelllinien

Um die synergistische Wirkung der Kombinationsbehandlung auf die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 nachzuweisen, wurden Versuchszellen mit D,L-Methadon und CDDP bzw. Etoposid allein oder in Kombination behandelt. D,L-Methadon wurde dabei in therapeutischen (3 µg/ml, 1 µg/ml) und supratherapeutischen (10 µg/ml) Konzentrationen eingesetzt, da sich D,L-Methadon womöglich in lymphatischem Gewebe und dem Knochenmark anreichert (Singh et al. 2011). Am Durchflusszytometer wurden die Proben mittels FSC-/SSC-Analyse hinsichtlich ihrer Morphologie, die sich bei apoptotischen Zellen in charakteristischer Weise darstellt, analysiert.

3.3.1 CDDP

In den vorherigen Versuchen waren CDDP-Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,3 µg/ml für die Überprüfung der synergistischen Wirkung mit D,L-Methadon ausgewählt worden. Die Inkubationszeiträume unterschieden sich für die beiden Leukämiezelllinien: Sie betrug für CCRF-CEM in den Kurzzeitversuchen 24, 48 und 72 h, in den Langzeitversuchen 96 und 120 h, während die Versuchszellen von HL-60 in den Kurzzeitversuchen für 24 und 48 h und in den Langzeitversuchen für 72 und 96 h inkubiert wurden.

CCRF-CEM

Für die Untersuchung der Zelltodinduktion durch CDDP und D,L-Methadon wurden für die akute T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM die CDDP-Konzentrationen 0,1 und 0,3 µg/ml gewählt.

In den Kurzzeitversuchen konnte durch die Behandlung der Versuchszellen mit D,L-Methadon ein Zelltod von bis zu 4,4 % erreicht werden. Durch die Inkubation der Versuchszellen mit CDDP konnte nach 72 h ein maximaler Zelltod von 5,1 % für 0,3 µg/ml gemessen werden. Durch die Kombination von D,L-Methadon und CDDP stieg der ermittelte Zelltod auf Werte zwischen 6,8 % und 11,6 % für 0,3 µg/ml CDDP in Kombination mit 10 µg/ml D,L-Methadon und lag damit zu allen Zeitwerten höher als in den Versuchszellen, die mit den Einzelsubstanzen inkubiert worden waren. Ab 48 h konnte auch für die therapeutischen Konzentrationen von D,L-Methadon ein höherer Zelltod in den mit

0,3 µg/ml CDDP ko-inkubierten Versuchszellen festgestellt werden. Für 0,1 µg/ml CDDP konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden, allerdings fiel der ermittelte Zelltod geringer aus. Insgesamt zeigte sich für den durch die Kombinationstherapie induzierten Zelltod eine Konzentrationsabhängigkeit von D,L-Methadon (Abb. 19).

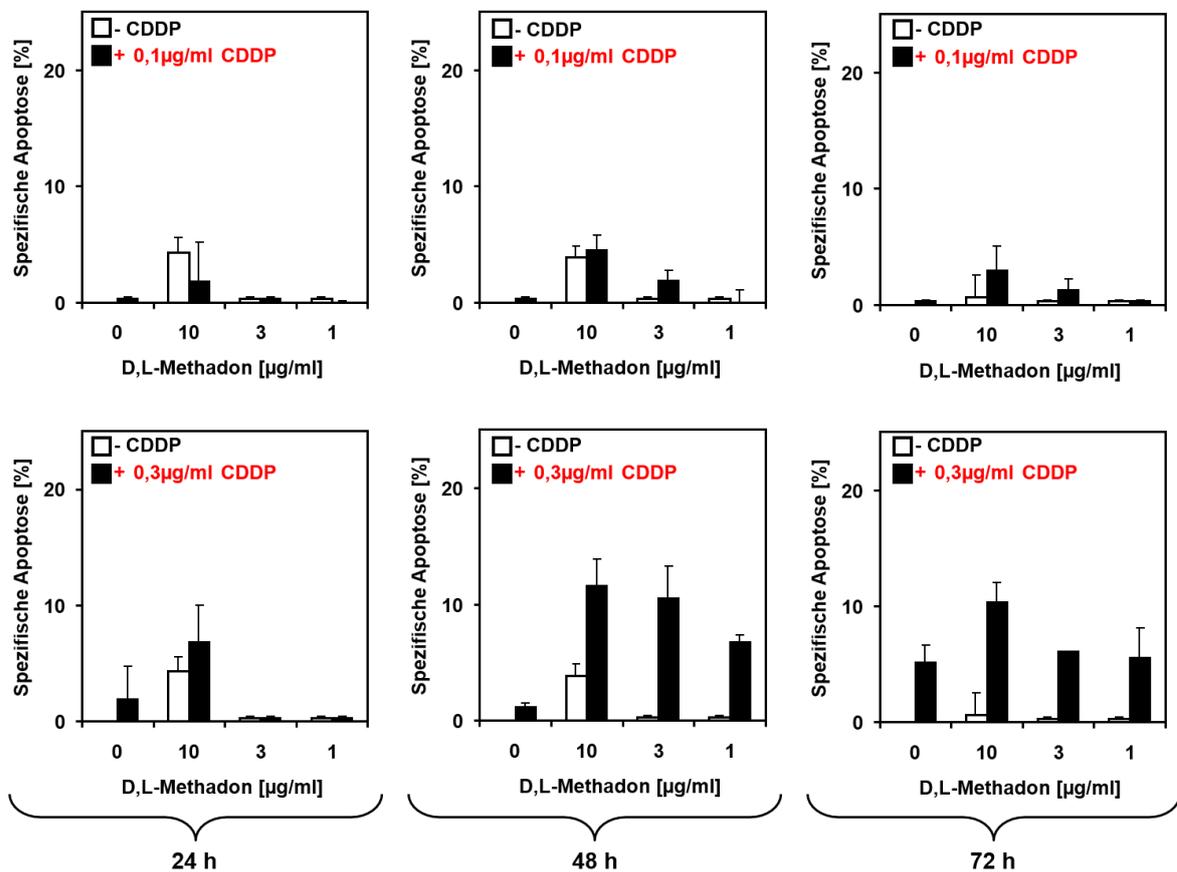


Abb. 19: Kombinationsbehandlung von CCRF-CEM-Leukämiezellen mit CDDP und D,L-Methadon bis zu einer Inkubationszeit von 72 h. Die Versuchszellen waren mit verschiedenen D,L-Methadon-Konzentrationen entweder in Kombination mit 0,1 bzw. 0,3 µg/ml CDDP (+ 0,1 bzw. 0,3 µg/ml CDDP) oder ohne CDDP (- CDDP) inkubiert worden. Anschließend waren die Versuchszellen am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC-Analyse analysiert worden. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, deren Berechnung nach Formel 1 erfolgte. Grundlage der dargestellten Werte sind jeweils Dreifachmessungen. (CDDP = Cisplatin, FSC = engl. „forward light scatter“; SSC = engl. „side light scatter“)

Während der Langezeitversuche zeigte sich für die nur mit D,L-Methadon behandelten Zellen ein maximaler Zelltod von 3,2 %, während durch CDDP allein ein Zelltod von maximal 33,7 % erreicht werden konnte. Nach 96 h wurde durch die Kombination von CDDP mit D,L-Methadon ein konzentrationsabhängiger Zelltod zwischen 79,5 % und 64,4 % für 0,3 µg/ml CDDP bzw. 37,9 % und 16,7 % für 0,1 µg/ml CDDP gemessen. Auch nach 120 h konnte durch die Ko-Inkubation von CDDP und D,L-Methadon eine deutliche Steigerung des Zelltodes erzielt werden. Durch die Behandlung der Versuchszellen mit 0,3 µg/ml CDDP und D,L-Methadon wurden für den Zelltod Werte zwischen 79,2 % und 54,8

% erzielt. In den Versuchszellen, die mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ CDDP und D,L-Methadon inkubiert worden waren, lag der Zelltod zwischen 27,2 % und 7,2 % (Abb. 20).

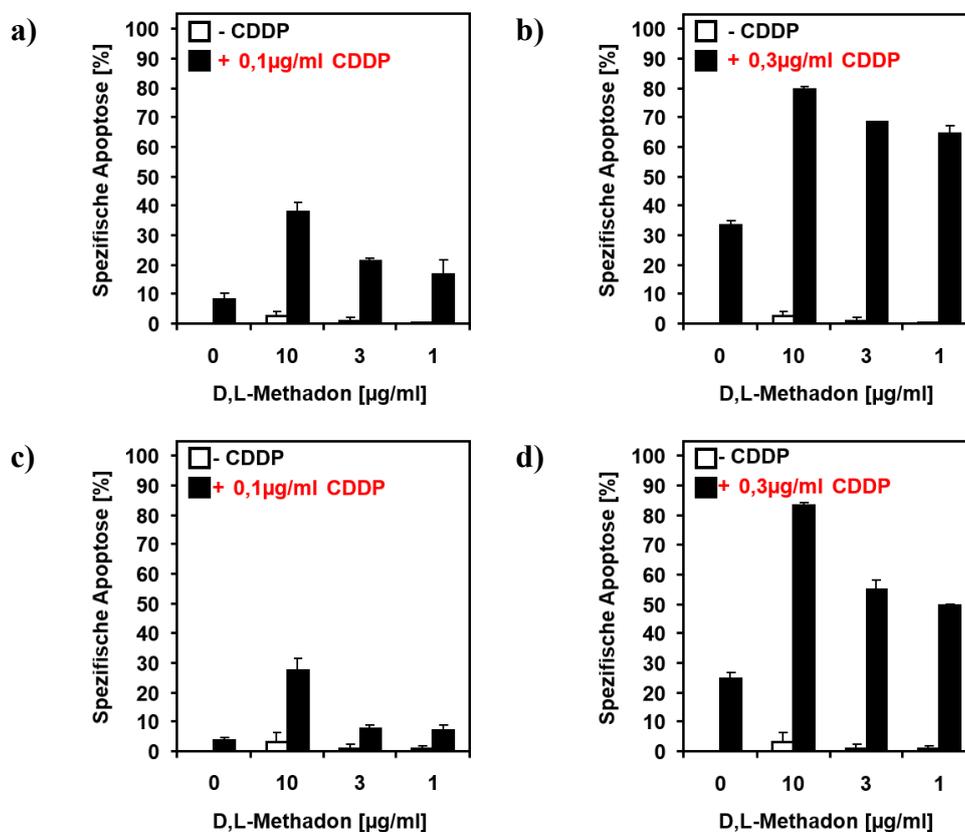


Abb. 20: Kombinationsbehandlung von CCRF-CEM-Leukämiezellen mit CDDP und D,L-Methadon bis zu einer Inkubationszeit von 96 h (a, b) bzw. 120 h (c, d). Die Versuchszellen waren mit verschiedenen D,L-Methadon-Konzentrationen entweder in Kombination mit 0,1 bzw. 0,3 $\mu\text{g/ml}$ CDDP (+ 0,1 bzw. 0,3 $\mu\text{g/ml}$ CDDP) oder ohne CDDP (-CDDP) inkubiert worden. Anschließend waren die Versuchszellen am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC-Analyse analysiert worden. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, deren Berechnung nach Formel 1 erfolgte. Grundlage der dargestellten Werte sind jeweils Dreifachmessungen. (CDDP = Cisplatin, FSC = engl. „forward light scatter“; SSC = engl. „side light scatter“)

Die synergistische Wirkung zwischen CDDP und D,L-Methadon konnte auch in den Dotplots der FSC/SSC-Analyse nach 96 und 120 h gezeigt werden. In den mit CDDP und D,L-Methadon ko-inkubierten Proben konnte zu beiden Zeitpunkten eine Abnahme der vitalen Zellpopulation zugunsten der apoptotischen Zellfraktion gegenüber der nur mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ CDDP behandelten Proben gezeigt werden (Abb. 21).

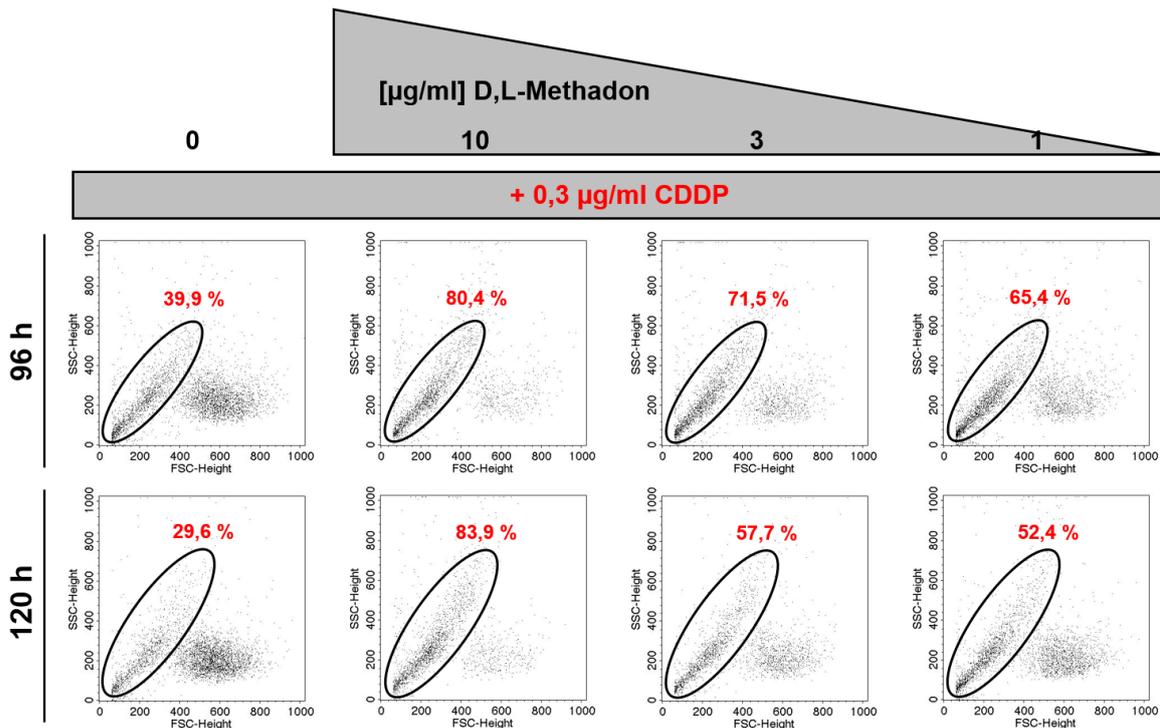


Abb. 21: Kombinationsbehandlung von CCRF-CEM-Leukämiezellen mit CDDP und D,L-Methadon nach 96 und 120 h. Die Versuchszellen waren mit verschiedenen D,L-Methadon-Konzentrationen in Kombination mit 0,3 µg/ml CDDP inkubiert worden. Anschließend wurden die Versuchszellen am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC-Analyse analysiert. Gezeigt sind repräsentative Dotplots der FSC/SSC-Analyse, in denen der Anteil der toten Zellen umkreist ist und als rote Zahl angegeben ist. (CDDP = Cisplatin, FSC = engl. „forward light scatter“, SSC = engl. „side light scatter“)

Zusammenfassend konnte durch die Ko-Inkubation mit CDDP und D,L-Methadon schon nach kurzen Inkubationszeiten eine Steigerung des Zelltodes in der Leukämiezelllinie CCRF-CEM festgestellt werden. Während sich nach 120 h bei weniger Zellen der Zelltod nachweisen ließ als nach 96 h, fiel die prozentuale Zunahme des Zelltodes durch die Kombinationsbehandlung nach 120 h meist sogar deutlicher aus. In den Langzeitversuchen war der synergistische Effekt bei 0,1 µg/ml CDDP deutlicher ausgeprägt als bei 0,3 µg/ml.

HL-60

Für die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 wurden für die Kurzzeitversuche 0,1 und 0,3 µg/ml CDDP, für die Langzeitversuche 0,25 und 0,3 µg/ml CDDP als geeignete Konzentrationen zur Untersuchung der Zelltodinduktion gewählt.

Für HL-60 ließ sich in den Kurzzeitversuchen durch die alleinige und kombinierte Behandlung der Versuchszellen mit D,L-Methadon und CDDP nach 24 h nur in unwesentlichem Ausmaß Zelltod induzieren. Erst nach 48 h ließ sich für 0,3 µg/ml CDDP ein deutlicher Zelltod von 28,1 % nachweisen, während D,L-Methadon allein weiterhin zu

keinem wesentlichen Anstieg des Zelltodes führte. Unter der Kombinationsbehandlung aus CDDP und D,L-Methadon kam es zu einem weiteren Anstieg des Zelltodes auf Werte von durchgehend über 45 %. Unter 0,25 µg/ml CDDP war auch nach 48 h keine Zunahme des Zelltodes durch die Kombinationsbehandlung nachweisbar (Abb. 22).

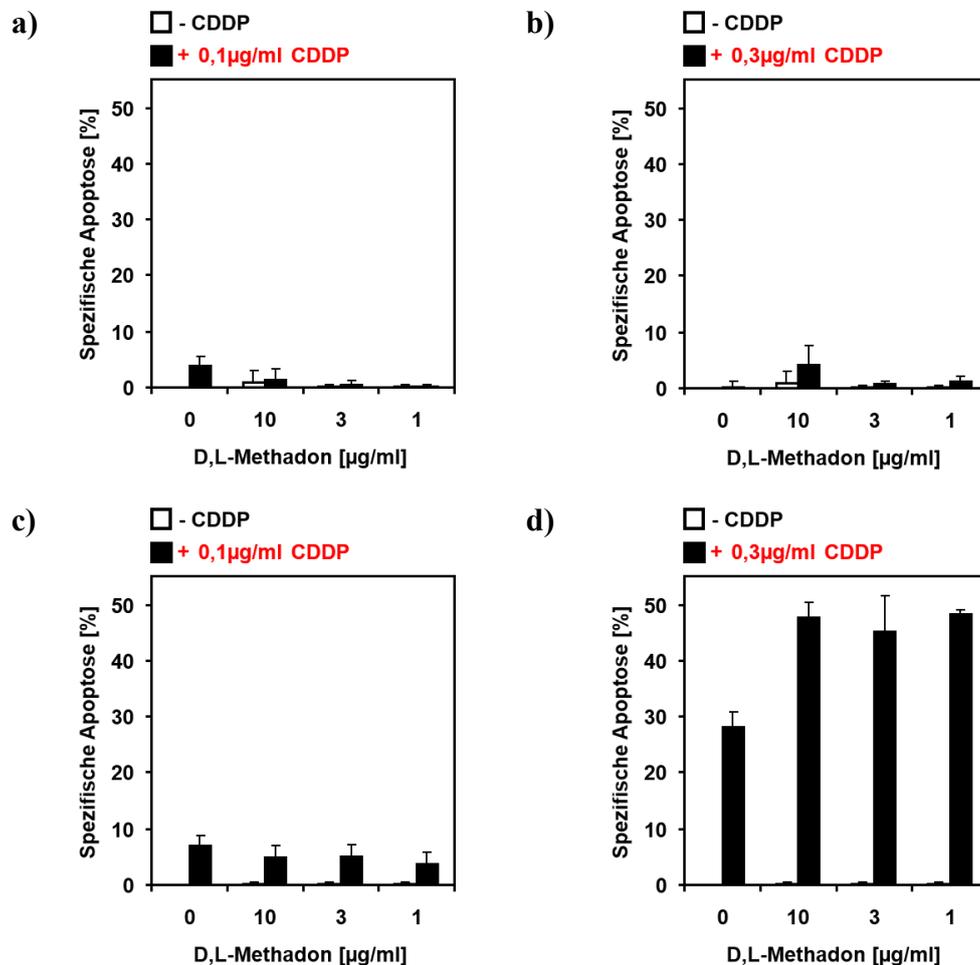


Abb. 22: Kombinationsbehandlung von HL-60-Leukämiezellen mit CDDP und D,L-Methadon bis zu einer Inkubationszeit von 24 h (a, b) bzw. 48 h (c, d). Die Versuchszellen waren mit verschiedenen D,L-Methadon-Konzentrationen entweder in Kombination mit 0,1 bzw. 0,3 µg/ml CDDP (+ 0,1 bzw. 0,3 µg/ml CDDP) oder ohne CDDP (- CDDP) inkubiert worden. Anschließend waren die Versuchszellen am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC-Analyse analysiert worden. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, deren Berechnung nach Formel 1 erfolgte. Grundlage der dargestellten Werte sind jeweils Dreifachmessungen. (CDDP = Cisplatin, FSC = engl. „forward light scatter“; SSC = engl. „side light scatter“)

In den Langzeitversuchen konnte durch D,L-Methadon allein kein wesentlicher Zelltod induziert werden, für CDDP lag der ermittelte Zelltod zwischen 11,4 % für 0,25 µg/ml nach 72 h und 25,7 % für 0,3 µg/ml nach 96 h. Unter der kombinierten Behandlung der Versuchszellen mit CDDP und D,L-Methadon kam es zu allen Zeitwerten zu einem 1,6- bis 2,4-fachen Anstieg des Zelltodes gegenüber den nur mit einer Substanz behandelten Versuchszellen, sowohl für die supra- als auch für die therapeutischen D,L-

Methadonspiegel. Nach 72 h konnten in der Kombination mit D,L-Methadon für den Zelltod Werte zwischen 26,9 % und 24,5 % für 0,25 µg/ml CDDP und zwischen 42,4 % und 39,3 % für 0,3 µg/ml CDDP nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurde für die mit 0,25 µg/ml CDDP behandelten Versuchszellen ein Zelltod zwischen 43,3 % und 35,0 % gemessen und für die mit 0,3 µg/ml CDDP inkubierten Zellen ein Zelltod zwischen 43,5 % und 42,4 % (Abb. 23).

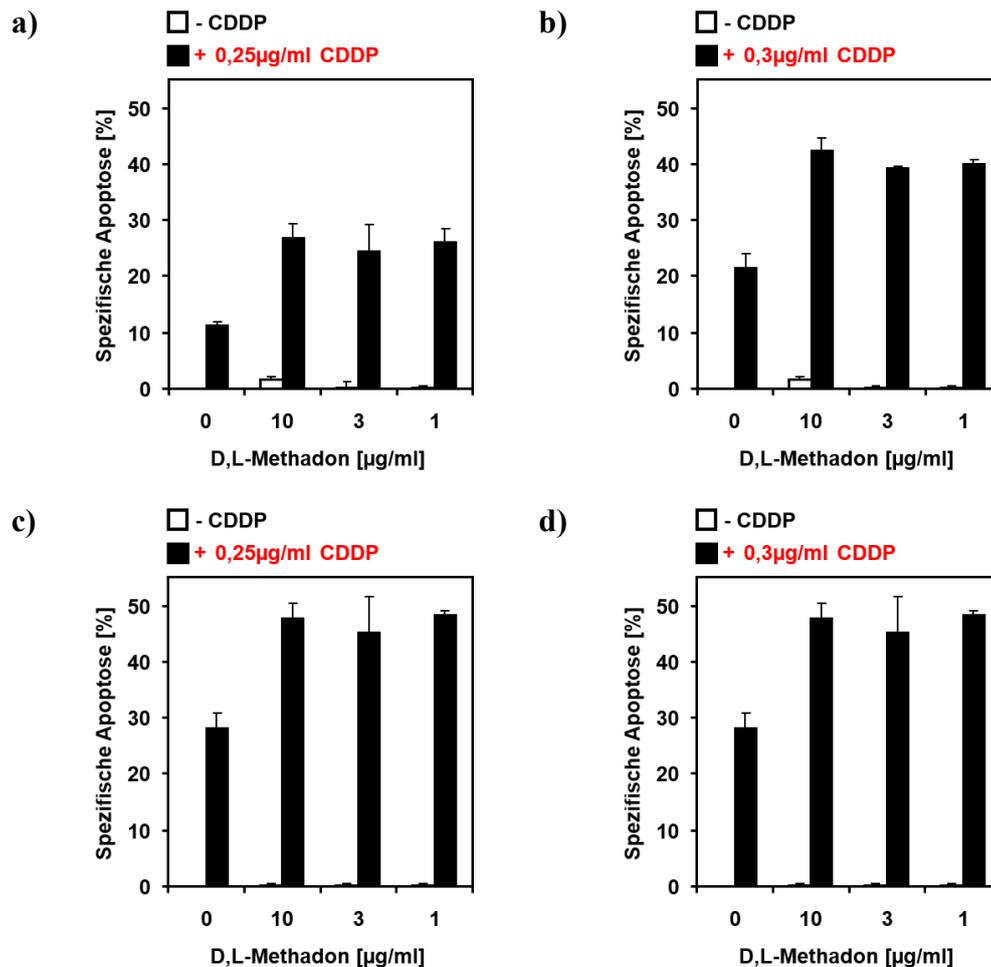


Abb. 23: Kombinationsbehandlung von HL-60-Leukämiezellen mit CDDP und D,L-Methadon bis zu einer Inkubationszeit von 72 h (a, b) bzw. 96 h (c, d). Die Versuchszellen waren mit verschiedenen D,L-Methadon-Konzentrationen entweder in Kombination mit 0,25 bzw. 0,3 µg/ml CDDP (+ 0,25 bzw. 0,3 µg/ml CDDP) oder ohne CDDP (- CDDP) inkubiert worden. Anschließend waren die Versuchszellen am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC-Analyse analysiert worden. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, deren Berechnung nach Formel 1 erfolgte. Grundlage der dargestellten Werte sind jeweils Dreifachmessungen. (CDDP = Cisplatin, FSC = engl. „forward light scatter“, SSC = engl. „side light scatter“)

Damit zeigte sich für die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 erst ab 48 h Inkubationszeit ein Anstieg des Zelltodes für 0,3 µg/ml CDDP, während für 0,25 µg/ml erst ab einer Inkubationsdauer von 72 h ein verstärkter Zelltod nachweisbar war. Im Vergleich mit CCRF-CEM traten die Wirkungsverstärkung zwischen D,L-Methadon und CDDP erst

zu späteren Zeitpunkten auf, während die erzielten Werte für den Zelltod niedriger lagen. Ansatzweise konnte auch bei HL-60 eine Abhängigkeit der Zelltodinduktion von der eingesetzten D,L-Methadon-Konzentration beobachtet werden, wobei es unter den therapeutischen D,L-Methadon-Konzentrationen zu einer Plateau-artigen Stagnation des Zelltodes kam.

3.3.2 Etoposid

Aufgrund der Vorversuche mit Etoposid wurden für die Kombinationsversuche nur Etoposid-Konzentrationen unterhalb von 0,3 µg/ml eingesetzt. Die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 wurden in den Kurzzeitversuchen für 24, 48 und 72 h, in den Langzeitversuchen für 96 und 120 h inkubiert.

CCRF-CEM

Die Analyse der Zelltodinduktion durch Etoposid und D,L-Methadon wurde für die Leukämiezelllinie CCRF-CEM mit 0,03 und 0,1 µg/ml Etoposid durchgeführt.

Während der Kurzzeitversuche kam es durch die Inkubation der Versuchszellen mit Etoposid und D,L-Methadon allein oder kombiniert nur zu einer unwesentlichen Zelltodinduktion (Daten nicht gezeigt). Erst im Rahmen der Langzeitversuche kam es nach 96 h zu einem deutlichen Anstieg des Zelltodes. Während D,L-Methadon allein nur in unzureichendem Ausmaß Zelltod induzieren konnte, lag der Etoposid-induzierte Zelltod in der Einzelbehandlung der Versuchszellen zwischen 2,4 % und 31,5 %. Die stärkste Zunahme des Zelltodes zeigte sich vor allem für die mit 10 µg/ml D,L-Methadon ko-inkubierten Versuchszellen, während sich der Zelltod bei den therapeutischen Konzentrationen von D,L-Methadon nicht oder nur unwesentlich erhöhte. So stieg der Zelltod nach 96 h von 31,5 % in den nur mit 0,1 µg/ml Etoposid behandelten Versuchszellen auf 38,6 % in der Kombination mit 10 µg/ml D,L-Methadon, nach 120 h von 20,4 % auf 30,3 %. Auch für 0,03 µg/ml Etoposid zeigte sich durch die gleichzeitige Inkubation der Versuchszellen ein verstärkter Zelltod, wobei insgesamt niedrigere Werte für den Zelltod erzielt wurden (Abb 24).

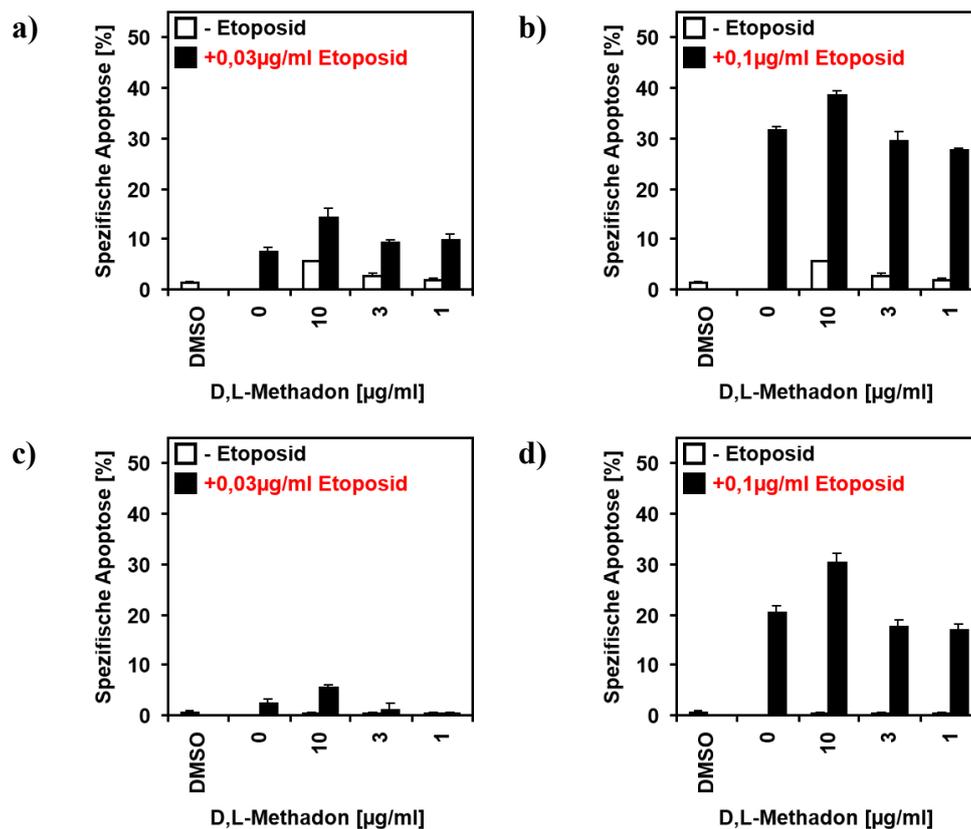


Abb. 24: Kombinationsbehandlung von CCRF-CEM-Leukämiezellen mit Etoposid und D,L-Methadon bis zu einer Inkubationszeit von 96 h (a, b) bzw. 120 h (c, d). Die Versuchszellen waren mit verschiedenen D,L-Methadon-Konzentrationen entweder in Kombination mit 0,03 bzw. 0,1 µg/ml Etoposid (+ 0,03 bzw. 0,1 µg/ml Etoposid) oder ohne Etoposid (-Etoposid) inkubiert worden. Anschließend waren die Versuchszellen am Durchflusszytometer mittels FSC/SSC-Analyse analysiert worden. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, die Berechnung erfolgte nach Formel 1. Grundlage der dargestellten Werte sind Dreifachmessungen. (DMSO = Dimethylsulfoxid, FSC = engl. „forward light scatter“; SSC = engl. „side light scatter“)

Insgesamt konnte für die therapeutischen Konzentrationen von D,L-Methadon in Kombination mit Etoposid nach 96 und 120 h ein wirkungsverstärkender Effekt auf die Zelltodinduktion nachgewiesen werden, der bei 0,1 µg/ml Etoposid deutlich ausgeprägter war als bei 0,03 µg/ml. Die Zelltodinduktion war dabei abhängig von der eingesetzten D,L-Methadon-Konzentration. Auffällig war der zu späteren Zeitwerten niedrigere Zelltod, der sich sowohl bei 0,03 als auch bei 0,1 µg/ml Etoposid zeigte.

HL-60

Die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 wurde während der Kurzzeitversuche mit 0,03 und 0,1 µg/ml Etoposid inkubiert, in den Langzeitversuchen mit 0,01 und 0,03 µg/ml Etoposid.

Sowohl in den Kurzzeit- wie auch in den Langzeitversuchen konnte unter der Kombinationsbehandlung mit Etoposid und D,L-Methadon zu den untersuchten Zeitpunkten

und bei den gewählten Konzentrationen kein Synergismus gezeigt werden.

3.4 Charakterisierung des synergistischen Effekts von CDDP und D,L-Methadon auf die Zelltodinduktion der Leukämiezellen

Aufgrund der unter CDDP und D,L-Methadon zu den gewählten Zeitpunkten stärker ausgeprägten Zunahme des Zelltodes gegenüber Etoposid und D,L-Methadon, wurden die Versuche zur Charakterisierung des synergistischen Effekts ausschließlich für das Zytostatikum CDDP durchgeführt. Dabei wurde zuerst durchflusszytometrisch mittels Naloxon-Fluoreszein die Auswirkung der CDDP-Behandlung auf die OR-Expression der Versuchszellen überprüft. Mit Hilfe der Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti wurde anschließend untersucht, wie sich die Kombination aus CDDP und D,L-Methadon auf den Zellzyklus der Versuchszellen auswirkt (Nicoletti et al. 1991). Im Anschluss wurde die Caspasenabhängigkeit des Zelltodes durch den Pancaspaseninhibitor zVAD.fmk überprüft und zuletzt die molekularen Mechanismen der Zelltodinduktion durch Western-Blotting analysiert. Bei allen Versuchsansätzen kam dieselbe CDDP-Konzentration (0,3 µg/ml) zum Einsatz.

3.4.1 Wirkung des Zytostatikums CDDP auf die Expression der Opioidrezeptoren auf der Oberfläche der Leukämiezellen

Dass es durch Doxorubicin zu einer Zunahme der OR-Expression auf der Oberfläche von Leukämiezelllinien kommt, konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden (Friesen et al. 2013). Das Ziel der folgenden Versuche war es, zu überprüfen, ob diese Beobachtungen auch für das Zytostatikum CDDP gelten. Die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 wurden dafür für 24h mit 0,3 µg/ml CDDP inkubiert und dann mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluoreszein gefärbt, wobei als Kontrolle Zellen angefärbt wurden, die nicht mit CDDP behandelt worden waren. Die Analyse der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer.

Für CCRF-CEM konnte eine Zunahme der mittleren Fluoreszenz bei den mit 0,3 µg/ml CDDP inkubierten Proben von 305 auf 590 gegenüber den nicht mit CDDP behandelten Proben beobachtet werden. Bei HL-60 kam es nach 24h ebenfalls zu einer mittleren Fluoreszenzverschiebung von 274 zu 416.

Somit konnte nachweisen werde, dass es auch durch das Zytostatikum CDDP zu einer vermehrten Expression von OR auf der Oberfläche der Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 kommt (Abb. 25, Tab. 9).

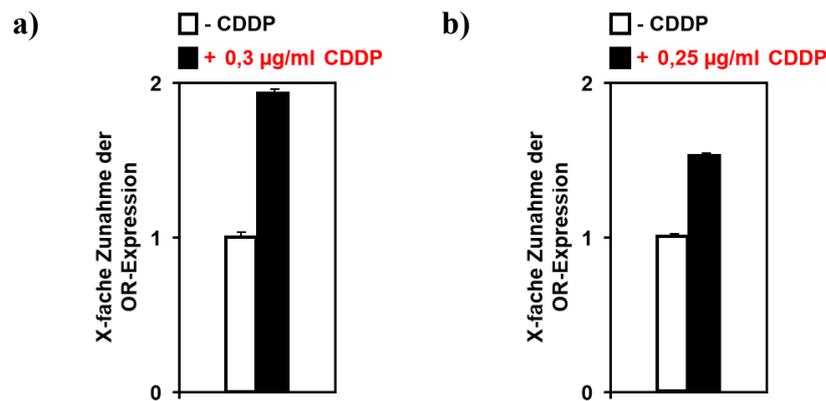


Abb. 25: Zunahme der OR-Expression auf der Leukämiezelllinie CCRF-CEM (a) und HL-60 (b) nach Inkubation mit CDDP über 24h. Die Versuchszellen waren entweder mit CDDP (+ 0,25 bzw. 0,3 µg/ml CDDP) oder ohne CDDP (- CDDP) inkubiert worden. Anschließend wurden sie mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluoreszein angefärbt und die relative Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist die Fluoreszenzzunahme nach Inkubation der Proben mit CDDP und Färbung mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluoreszein, das spezifisch an die OR bindet. (CDDP = Cisplatin, OR = Opioidrezeptor)

Tab. 9: Durch die Inkubation von CCRF-CEM (a) und HL-60 (b) mit CDDP kommt es zu einer Erhöhung der relativen Expression der OR auf der Oberfläche der Leukämiezellen. Die Versuchszellen waren für 24 h mit 0,3 µg/ml (a) bzw. 0,25 µg/ml (b) CDDP inkubiert worden oder blieben unter gleichen Bedingungen unbehandelt. Anschließend wurden sie mit $1 \times 10^{-4,5}$ M Naloxon-Fluoreszein angefärbt und die relative Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer gemessen. $\Delta_{(\text{Naloxon-Kontrolle})}$ gibt die Naloxon-Fluoreszenz abzüglich der Autofluoreszenz der Zellen an. (CDDP = Cisplatin, OR = Opioidrezeptor)

a)

CCRF-CEM	Kontrolle	Naloxon	$\Delta_{(\text{Naloxon-Kontrolle})}$
unbehandelt	6	302	296
0,3 µg/ml CDDP	4	590	586

b)

HL-60	Kontrolle	Naloxon	$\Delta_{(\text{Naloxon-Kontrolle})}$
unbehandelt	4	239	235
0,25 µg/ml CDDP	5	416	411

3.4.2 Einfluss der Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon auf den Zellzyklus der Leukämiezellen

Die beiden Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 wurden für 96 h mit je 0,3 µg/ml CDDP und D,L-Methadon (10, 3 und 1 µg/ml) allein oder in Kombination behandelt. Zu jedem Versuchsansatz wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle angesetzt. Für die apoptotischen Zellen ergibt sich durch die DNA-Fragmentierung ein charakteristischer Sub-G₁-Peak, der mittels der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti am Durchflusszytometer erfasst werden kann. Zusätzlich zur Detektion subdiploider Zellkerne ist es durch die Zellzyklusanalyse möglich, den Einfluss der Kombinationsbehandlung aus CDDP und D,L-Methadon auf den Zellzyklus der Leukämiezelllinien zu untersuchen.

CCRF-CEM

Aufschlüsse über die Auswirkungen der Behandlung der Leukämiezelllinie CCRF-CEM mit CDDP und D,L-Methadon auf den Zellzyklus lieferte die Analyse des DNA-Gehalt der Zellkerne. Abhängig von der Fluoreszenzintensität können die Zellkerne jeweils einer spezifischen Phase des Zellzyklus zugeordnet oder als apoptotisch klassifiziert werden. Durch die Zugabe von D,L-Methadon kam es nach 96 und 120 h zu einer Abnahme der G₂-Zellfraktion bei etwa gleichbleibender G₁-Zellfraktion. Durch die Behandlung der Zellen mit 0,3 µg/ml CDDP kam es zu beiden Zeitwerten zu einem Rückgang von Versuchszellen in der G₁-Phase. Zudem konnten subdiploide Zellkerne nachgewiesen werden, die im Diagramm als sub-G₁-Peak abgebildet wurden und auf apoptotisch zugrunde gegangene Zellen hinwiesen. Durch die Kombination von CDDP mit 10 µg/ml D,L-Methadon verkleinerte sich nach 96 und 120 h die Anzahl der diploiden Kerne, während der sub-G₁-Peak, der die apoptotische Zellfraktion repräsentiert, weiter zunahm. Gleichzeitig kam es zu einer weiteren Reduktion der G₁-Zellfraktion, bis sich der G₁- und G₂-Peak fast vollständig angeglichen hatten (Abb. 26).

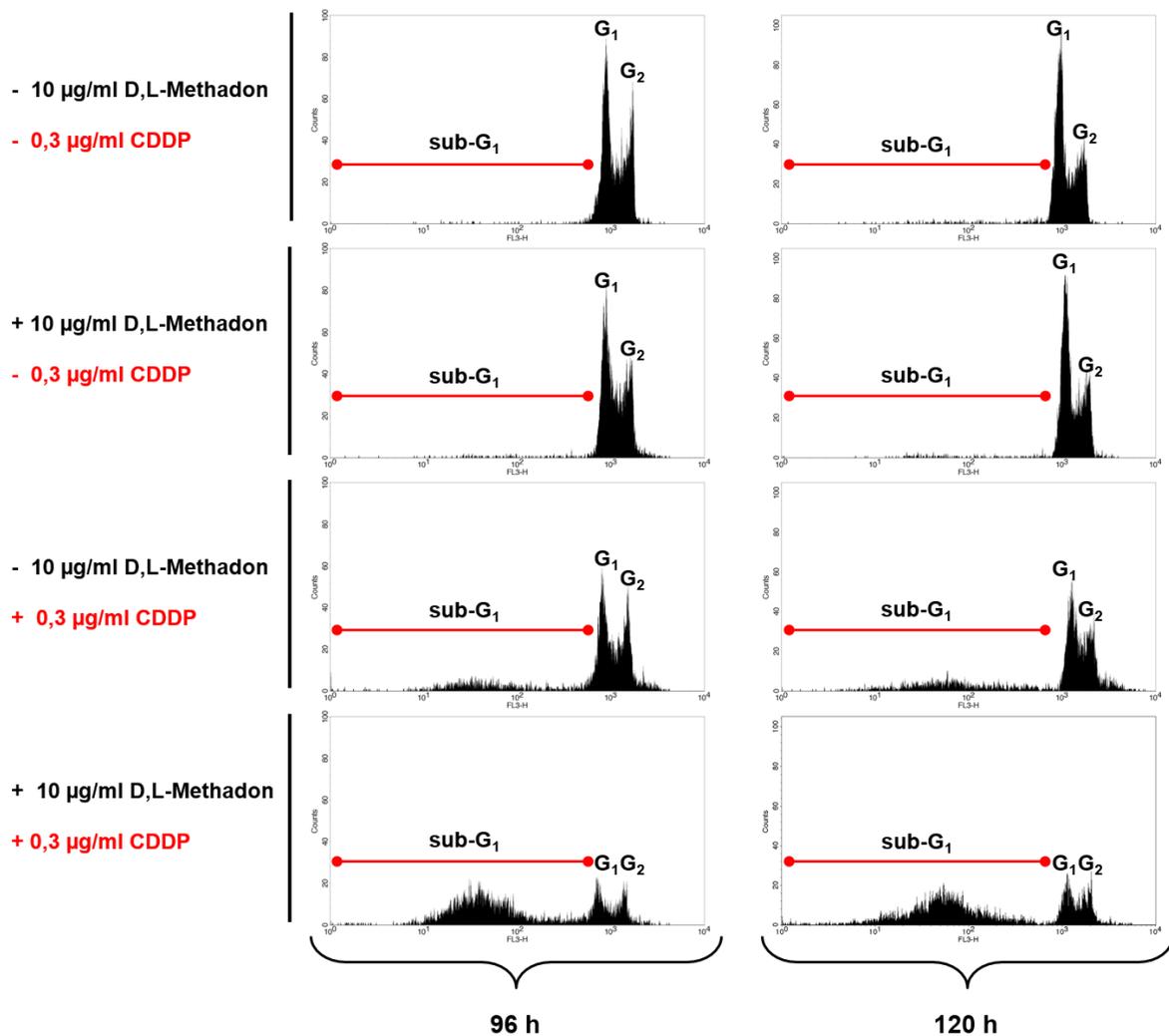


Abb. 26: Mittels Zellzyklusanalyse nach Nicoletti et al. (1991) ermittelter DNA-Gehalt der CCRF-CEM-Leukämiezellen nach 96-stündiger und 120-stündiger Inkubation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der untersuchten Zellkerne, durch die sich der jeweilige DNA-Gehalt ausdrückt. Bei den Darstellungen handelt es sich um repräsentative, durchflusszytometrisch ermittelte Messungen. (CDDP = Cisplatin, G = engl. „gap“)

Zusätzlich konnte durch die Zellzyklusanalyse nach Nicoletti der in den FSC-/SSC-Analysen nachgewiesene apoptotische Zelltod bestätigt werden. Unter der Kombinationsbehandlung aus 0,3 µg/ml CDDP und D,L-Methadon kam es zu einer Steigerung des Zelltodes von 18,7 % für die nur mit 0,3 µg/ml CDDP behandelten Zellen auf Werte zwischen 68,3 % und 45,9 % für die mit CDDP und D,L-Methadon ko-inkubierten Zellen. Die in der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti gemessenen Werte für die spezifische Apoptose lagen im Schnitt um 14,5 Prozentpunkte unter denen der FSC-/SSC-Analyse. Nach 120 h lag der Zelltod in den nur mit 0,3 µg/ml CDDP behandelten Zellen bei 25,8 %, während er in der Kombination mit D,L-Methadon auf zwischen 66,5 % und 50,0 % stieg. Die Werte der spezifischen Apoptose wichen nach 120 h weniger stark von denen der Vorversuche ab. Die prozentuale Zunahme des Zelltodes blieb zu beiden Zeitwerten aber mit

der FSC-/SSC-Analyse vergleichbar. Für die mit D,L-Methadon allein inkubierten Versuchszellen konnte zu beiden Zeitwerten keine wesentliche Zelltodinduktion festgestellt werden (Abb. 27).

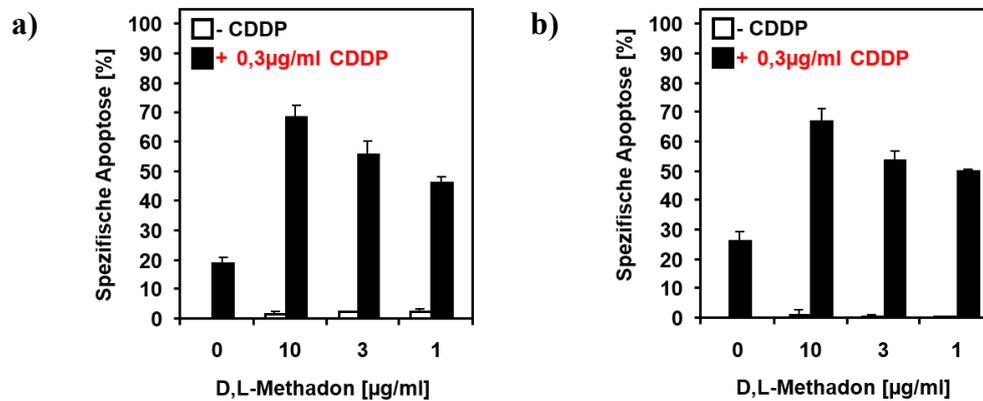


Abb. 27: Zellzyklusanalyse der Leukämiezelllinie CCRF-CEM nach Nicoletti et al. (1991). Die Versuchszellen waren entweder nur mit D,L-Methadon (- CDDP) oder mit D,L-Methadon und CDDP behandelt worden (+ 0,3 µg/ml CDDP). Die Inkubation der Versuchszellen erfolgte für 96 h (a) bzw. 120 h (b). Die mit Propidiumiodid gefärbten Zellkerne wurden durchflusszytometrisch auf ihren Gehalt an subdiploider DNA untersucht. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, deren Berechnung nach Formel 1 erfolgte. Sie entspricht hier dem prozentualen Anteil an Kernen mit subdiploider DNA. Grundlage der dargestellten Werte sind jeweils Dreifachmessungen. (CDDP = Cisplatin, DNA = engl. „Desoxyribonucleic acid“)

HL-60

Um die Wirkung von CDDP und D,L-Methadon einzeln und in Kombination auf den Zellzyklus der promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zu untersuchen, wurden die Zellen nach 96 und 120 h mit 0,3 µg/ml CDDP oder 10 µg/ml D,L-Methadon allein oder kombiniert inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle angesetzt. Die Messung der Zellkerne erfolgte am Durchflusszytometer. Während sich durch die Behandlung der Zellen für 96 und 120 h mit 10 µg/ml D,L-Methadon der DNA-Gehalt insgesamt kaum gegenüber der unbehandelten Zellen veränderte, kam es durch die Inkubation der Zellen mit dem Zytostatikum CDDP zu einer deutlichen Abnahme der G₁-Zellfraktion und zusätzlich zu einer Zunahme der G₂-Zellfraktion nach 96 h. Außerdem ließ sich subdiploide DNA von apoptotisch zugrunde gegangene Zellen nachweisen. Unter der Kombinationsbehandlung mit 0,3 µg/ml CDDP und 10 µg/ml D,L-Methadon kam es zu einem vollständigen Rückgang des G₁-Peaks bei weiterhin prominentem G₂-Peak und einer weiteren Zunahme des sub-G₁-Peaks (Abb. 28).

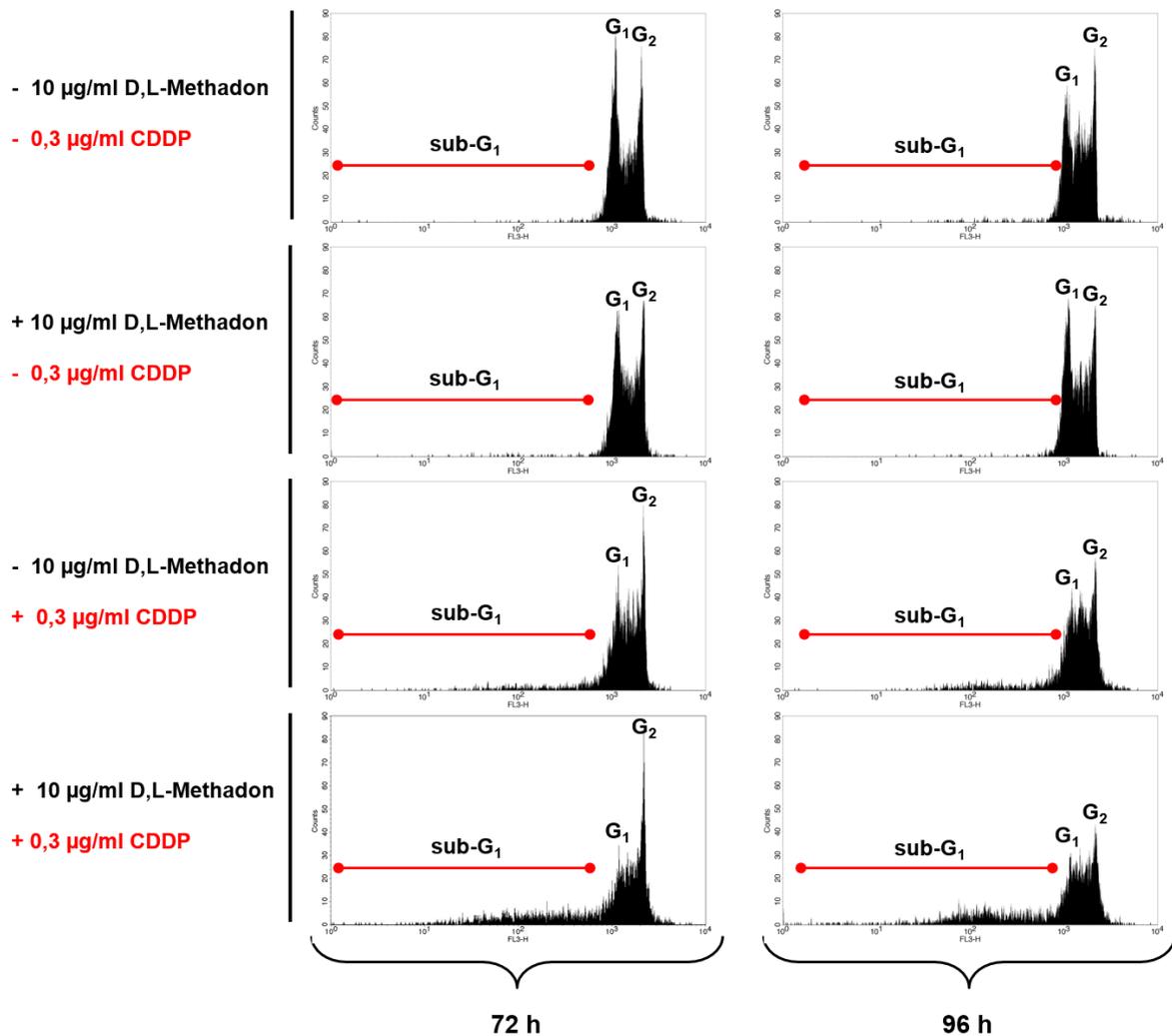


Abb. 28: Mittels Zellzyklusanalyse nach Nicoletti et al. (1991) ermittelter DNA-Gehalt der HL-60-Leukämiezellen nach 72-stündiger (a) und 96-stündiger Inkubation (b). Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der untersuchten Zellkerne, durch die sich der jeweilige DNA-Gehalt ausdrückt. Bei den Darstellungen handelt es sich um repräsentative, durchflusszytometrisch ermittelte Messungen. (CDDP = Cisplatin, G = engl. „gap“)

Auch für die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 konnte durch die Zellzyklusanalyse nach Nicoletti der in den FSC-/SSC-Analysen nachgewiesene Zelltod verifiziert werden. Während nach 72 h die nur mit 0,3 µg/ml CDDP behandelten Zellen eine spezifische Apoptose von 14,6 % aufwiesen, kam es bei den Zellen, die zusätzlich mit D,L-Methadon inkubiert worden waren, zu einem Anstieg der spezifischen Apoptose auf Werte zwischen 34,4 % und 25,8 %. Nach 96 h lag die spezifische Apoptose der lediglich mit CDDP inkubierten Zellen bei 14,4 % und stieg für die mit CDDP und D,L-Methadon ko-inkubierten Zellen auf Werte zwischen 32,4 % und 21,9 %. Damit lagen die durch die Zellzyklusanalyse nach Nicoletti erhobenen Werte für die spezifische Apoptose niedriger als in der FSC-/SSC-Analyse, nach 72 h im Mittel um 10,5 Prozentpunkte und nach 96 h um 15,8 Prozentpunkte. Die prozentuale Steigerung der spezifischen Apoptose fiel jedoch nicht geringer aus als in

der FSC-/SSC-Analyse. Unter D,L-Methadon allein konnte keine Zelltodinduktion beobachtet werden (Abb. 29).

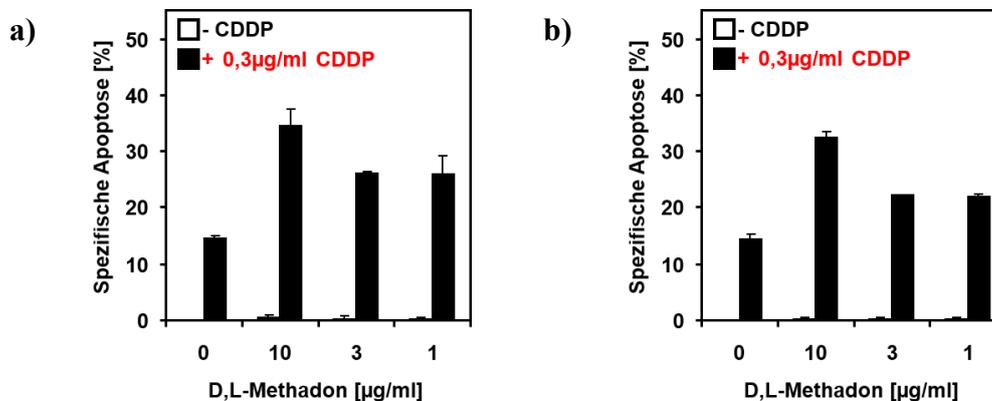


Abb. 29: Zellzyklusanalyse der Leukämiezelllinie HL-60 nach Nicoletti et al. (1991). Die Versuchszellen waren entweder nur mit D,L-Methadon (- CDDP) oder mit D,L-Methadon und Etoposid behandelt worden (+ 0,3 µg/ml CDDP). Die Inkubation der Versuchszellen erfolgte für 72 h (a) bzw. 96 h (b). Die mit Propidiumiodid gefärbten Zellkerne wurden durchflusszytometrisch auf ihren Gehalt an subdiploider DNA untersucht. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, deren Berechnung nach Formel 1 erfolgte. Sie entspricht hier dem prozentualen Anteil an Kernen mit subdiploider DNA. Grundlage der dargestellten Werte sind jeweils Dreifachmessungen. (CDDP = Cisplatin, DNA = engl. „Desoxyribonucleic acid“)

3.4.3 Caspasen-Abhängigkeit der Zelltodinduktion durch CDDP und D,L-Methadon

Die Ergebnisse der FSC-/SSC-Analyse und der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti legten nahe, dass es durch die Behandlung der Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 mit Zytostatika und D,L-Methadon zu einem apoptotischen Zelluntergang kommt. Caspasen spielen bei der Apoptoseinduktion durch Opioide eine zentrale Rolle (Friesen et al. 2008). Daher sollte im folgenden Teil der Arbeit untersucht werden, wie sich die Inhibition der Caspasen auf die Zelltodinduktion durch CDDP und D,L-Methadon auswirkt. CCRF-CEM und HL-60 wurden dazu zuerst mit jeweils 50 µM des unspezifischen Pancaspasen-Inhibitors zVAD.fmk behandelt und anschließend mit 0,3 µg/ml CDDP allein oder in Kombination mit 10 µg/ml D,L-Methadon für 96 h (HL-60) bzw. 120 h (CEM) inkubiert. Als Referenz dienten Proben, die ohne zVAD.fmk inkubiert worden waren.

Für CCRF-CEM zeigte sich nach 120 h in den Proben, die gleichzeitig mit CDDP und D,L-Methadon inkubiert worden waren ein Zelltod von 82,8 % gegenüber 36,3 % in den nur mit CDDP behandelten Versuchszellen. Nach Zugabe von 50 µM zVAD.fmk wurde die Induktion des Zelltodes sowohl in den nur mit CDDP behandelten, als auch in den mit CDDP und D,L-Methadon behandelten Proben, fast komplett aufgehoben (Abb. 30, a). Bei HL-60 konnte nach einer Inkubationszeit von 96 h für die ausschließlich mit CDDP inkubierten Versuchszellen ein Zelltod von 27,6 % gemessen werden, der unter der

Kombinationsbehandlung auf 41,5 % anstieg. In den zusätzlich mit 50 μ M vorbehandelten Versuchszellen konnte der Zelltod unter CDDP um 12,5 Prozentpunkte und unter der Kombinationsbehandlung um 16,5 Prozentpunkte gesenkt werden (Abb. 30, b).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es unter der Ko-Inkubation der Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 mit CDDP und D,L-Methadon zu einem Caspasen-abhängigen Zelltod kommt.

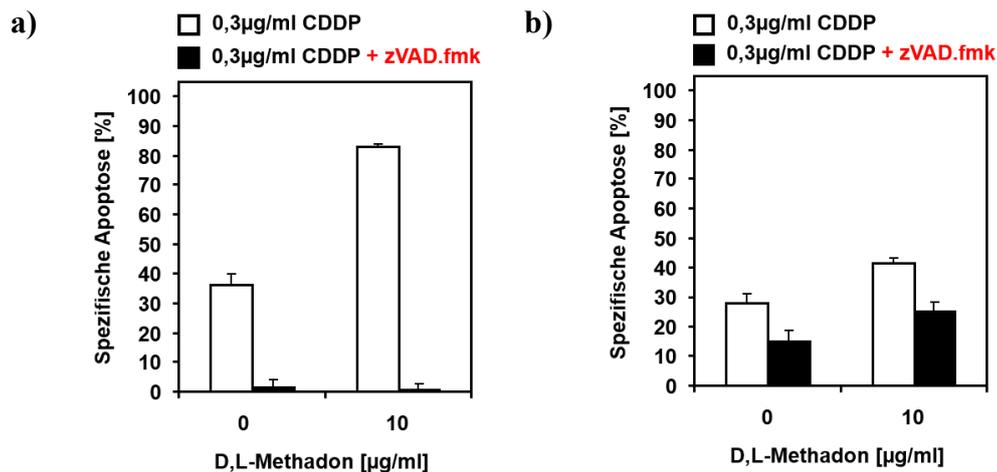


Abb. 30: Inkubation der Leukämiezelllinien CCRF-CEM (a) für 120 h und HL-60 (b) für 96 h mit dem Pancaspasen-Inhibitor zVAD.fmk. Die Leukämiezelllinien wurden mit 0,3 μ g/ml CDDP allein oder in Kombination mit 10 μ g/ml D,L-Methadons inkubiert, jeweils ohne (schwarze Balken) bzw. mit (weiße Balken) einstündiger Vorbehandlung mit 50 μ M des Pancaspase-Inhibitors zVAD.fmk. Nach 120 h (CCRF-CEM) bzw. 96 h (HL-60) wurden die Proben mittels FSC/SSC-Analyse analysiert. Gezeigt ist die spezifische Apoptose, deren Berechnung nach Formel 1 erfolgte. Grundlage der dargestellten Werte sind jeweils Dreifachmessungen. (CDDP = Cisplatin, FSC = engl. „forward light scatter“; SSC = engl. „side light scatter“, zVAD.fmk = Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon)

3.4.4 Molekulare Mechanismen des durch CDDP und D,L-Methadon induzierten Zelltods in Leukämiezellen

Nachdem im vorherigen Versuch durch die Caspaseninhibition die Caspasen-Abhängigkeit des durch CDDP und D,L-Methadon ausgelösten Zelltodes nachgewiesen worden war, sollte im Folgenden untersucht werden, welche Caspasen durch CDDP und D,L-Methadon aktiviert werden und wie die regulatorischen Proteine der Apoptose beeinflusst werden. Dass durch das Opioid D,L-Methadon der intrinsische apoptotische Signalweg in Leukämiezellen aktiviert wird und es zu einem verstärkten Abbau antiapoptotischer Faktoren kommt war aus früheren Arbeiten bereits bekannt (Friesen et al. 2008). Wie genau die Kombination aus CDDP und D,L-Methadon die apoptotische Kaskade beeinflusst war aber noch unbekannt. Die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 waren für die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die der Zelltodinduktion durch CDDP und D,L-Methadon zugrunde liegen, mit 0,3 μ g/ml CDDP und verschiedenen D,L-Methadon-Konzentrationen

(10 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml) für 96 h entweder allein oder in Kombination inkubiert worden. Anschließend wurden aus den Versuchszellen Ganzzelllysate isoliert, um die relevanten Proteine dann mittels Western-Blot-Analyse zu untersuchen. Die Beteiligung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges bei der Zelltodinduktion sollte durch die Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 9 analysiert werden. Da beide Initiatorcaspasen die Effektorcaspase 3 aktivieren können, wurde in einem zweiten Schritt auch die aktivierende Spaltung der Procaspase 3 untersucht. Die PARP wird von der aktiven Caspase 3 abgebaut, so dass deren Abbauprodukte als Nachweis für die proteolytische Aktivität der Caspase 3 dienen können. Zur Untersuchung des Einflusses der Kombinationsbehandlung auf die regulatorischen Proteine wurden die antiapoptotischen Faktoren Bcl-x_L und X-IAP sowie das proapoptotische Protein Bax untersucht. Die Darstellung der Caspasen und regulatorischen Proteine erfolgte dabei durch spezifische Antikörper. Der zur Untersuchung der Caspase 9 eingesetzte Antikörper bindet sowohl an die inaktive Procaspase 9 mit einer Molekülmasse von 46 kDa, als auch an deren aktives Spaltprodukt mit einer Molekülmasse von 37 kDa. Um die Caspase 8 darzustellen, wurde ein Antikörper verwendet, der an die inaktive Procaspase 8 (55 kDa) und deren aktives Spaltprodukt (43 kDa) bindet. Die Darstellung der Caspase 3 erfolgte mit einem Antikörper, der an das inaktive Zymogen (32 kDa) und die aktiven Spaltprodukte (17 bzw. 19 kDa) bindet. Mit dem eingesetzten Anti-PARP-Antikörper kann sowohl die intakte PARP (116kDa), als auch deren Abbauprodukte (85 kDa) dargestellt werden. Das 30 kDa große Bcl-x_L wurde selektiv vom entsprechenden Antikörper markiert, während der Antikörper für X-IAP sowohl an dessen aktiven Form (57 kDa) als auch an das Abbauprodukt (30 kDa) bindet. Der Anti-Bax-Antikörper reagiert ausschließlich mit den 21 kDa großen proapoptotischen Bax-Molekülen.

CCRF-CEM

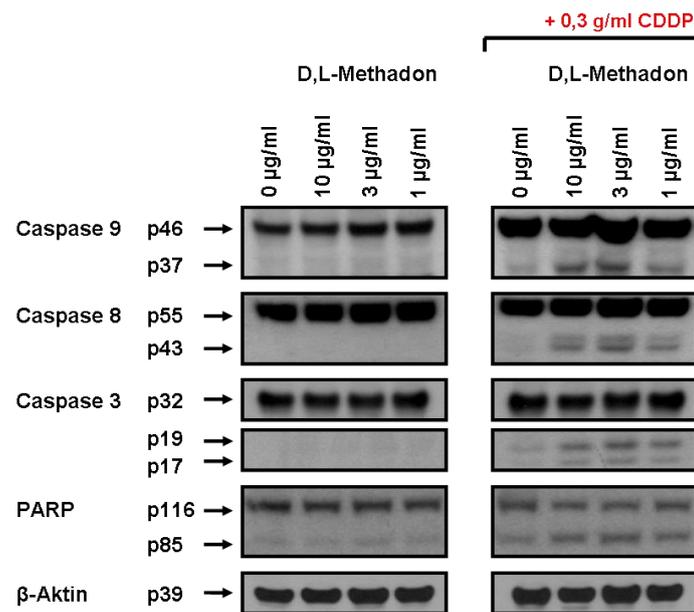


Abb. 31: Durch die Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon kommt es nach 96 h zu einer Caspasen-Aktivierung. Die Leukämiezelllinie CCRF-CEM wurde mit D,L-Methadon-Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 1 µg/ml allein oder in Kombination mit 0,3 µg/ml CDDP behandelt. Nach 96 h wurden mittels Immunodetektion die Caspasen 9, 8 und 3 sowie PARP analysiert. Als Ladekontrolle diente das ubiquitär und konstitutiv exprimierte Protein β-Aktin. (CDDP = Cisplatin, PARP = engl. „poly-ADP-ribose-polymerase“)

Für Caspase 9 kam es in den Versuchszellen unter 0,3 µg/ml CDDP zu einer diskreten Zunahme der aktiven Cleavage-Produkte, während unter D,L-Methadon keine Spaltprodukte nachweisbar waren. Erst unter der Kombination aus CDDP und D,L-Methadon nahmen die Spaltprodukte deutlich zu. Dies deutet darauf hin, dass es nach 96 h bei dem gewählten Konzentrationsniveau erst durch die Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon zu einer Aktivierung der Procaspase 9 kommt. In den Versuchszellen, die mit einer Kombination aus CDDP und D,L-Methadon behandelt worden waren, konnte das Spaltprodukt der Caspase 8 in deutlich höheren Mengen nachgewiesen werden als in den nur mit CDDP oder D,L-Methadon behandelten Versuchszellen. Während die Aktivierung der Caspase 8 unter der Inkubation mit den Einzelsubstanzen ausbleibt, scheint diese nach 96 h durch die Kombinationsbehandlung aus CDDP und D,L-Methadon aktiviert zu werden. Die Menge des aktiven Cleavage-Produktes der Caspase 3 nahm unter der Kombinationsbehandlung aus CDDP und D,L-Methadon gegenüber den nur mit CDDP behandelten Versuchszellen stark zu, während in den nur mit D,L-Methadon behandelten Versuchszellen keine Spaltprodukte der Caspase 3 nachweisbar waren. Eine proteolytische Aktivierung der Effektorcaspase 3 konnte nach 96 h entsprechend für die Kombinationstherapie angenommen werden. In den Proben, die einen erhöhten Anteil an

aktiven Spaltprodukten der Caspase 3 aufwiesen, zeigte sich eine Zunahme der PARP-Abbauprodukte, die sich in einer wesentlich stärker ausgeprägten Bandenzeichnung gegenüber der nur mit CDDP bzw. D,L-Methadon behandelten Proben auszeichnete. Über den extrinsischen und intrinsischen Signalweg scheint es nach 96 h unter der Kombinationsbehandlung aus CDDP und D,L-Methadon zu einer Aktivierung von Caspase 3 mit nachfolgender Degradierung von PARP zu kommen (Abb. 31).

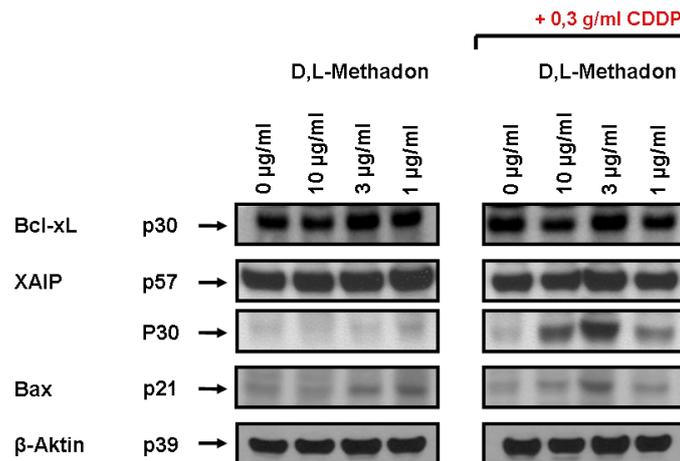


Abb. 32: Durch die Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon kommt es nach 96 h zu einer Konzentrationsänderung der regulatorischen Proteine des intrinsischen Signalweges. Die Leukämiezelllinie CCRF-CEM wurde mit D,L-Methadon-Konzentrationen zwischen 10µg/ml und 1µg/ml allein oder in Kombination mit 0,3 µg/ml CDDP behandelt. Nach 96 h wurden mittels Immunodetektion die regulatorischen Proteine Bcl-x_L, X-IAP und Bax analysiert. Als Ladekontrolle diente das ubiquitär und konstitutiv exprimierte Protein β-Aktin. (CDDP = Cisplatin, Bax = engl. „Bcl-2 associated x-protein“, Bcl-x_L = engl. „B-cell-lymphoma extra long“, XIAP = engl. „X-chromosome-linked IAP“)

Durch die Ko-Inkubation aus CDDP und der höchsten D,L-Methadon-Konzentration kam es zu einer deutlichen Abnahme des antiapoptotischen Bcl-x_L. Gleichzeitig wurde X-IAP in den Versuchszellen, die mit CDDP und D,L-Methadon ko-inkubiert worden waren, verstärkt abgebaut. Für das proapoptotische Bax konnte keine Änderung der zwischen den ko-inkubierten und den einfach behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 32).

Insgesamt konnte für die Leukämiezelllinie CCRF-CEM nachgewiesen werden, dass es unter der Kombination von D,L-Methadon und CDDP zu einer Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Signalweges kommt, der unter der Inkubation mit den Einzelsubstanzen deutlich geringer ausfällt bzw. fehlt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es durch die Kombination von CDDP und D,L-Methadon zu einer Reduktion der beiden antiapoptotisch wirkenden Faktoren Bcl-x_L und X-IAP kommt, während das proapoptotische Bax nicht beeinflusst wird.

HL-60

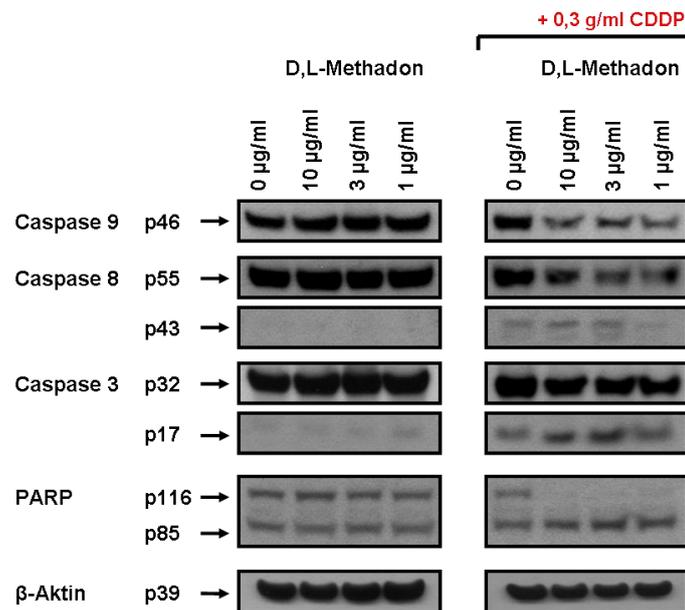


Abb. 33: Durch die Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon kommt es nach 96 h zu einer Caspasen-Aktivierung. Die Leukämiezelllinie HL-60 wurde mit D,L-Methadon-Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 1 µg/ml allein oder in Kombination mit 0,3 µg/ml CDDP behandelt. Nach 96 h wurden mittels Immunodetektion die Caspasen 9, 8 und 3 sowie PARP analysiert. Als Ladekontrolle diente das ubiquitär und konstitutiv exprimierte Protein β-Aktin. (CDDP = Cisplatin, PARP = engl. „poly-ADP-ribose-polymerase“)

Für die Caspase 9 konnte eine deutliche Abnahme des inaktiven Zymogens in den Versuchszellen der Kombinationstherapie festgestellt werden, der bei den Versuchszellen, die nur mit den Einzelsubstanzen behandelt worden waren, ausblieb. Das aktive Spaltprodukt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies spricht für eine proteolytische Aktivierung und damit den Verbrauch der Procaspase 9 nach 96 h in den Zellen der Kombinationsbehandlung. Die Untersuchung der Caspase 8 zeigte für die mit CDDP und D,L-Methadon ko-inkubierten Zellen eine Abnahme des inaktiven Vorläufers und eine Zunahme der aktiven Cleavage-Produkte. In den Versuchszellen, die nur mit CDDP oder D,L-Methadon behandelt worden waren ließ sich keine Änderung der Procaspase 8 oder deren Spaltprodukte detektieren. Eine Aktivierung der Caspase 8 nach 96 h unter der Kombinationstherapie konnte also angenommen werden. Die folgende Analyse der Caspase 3 zeigte, dass es unter der Kombinationsbehandlung zu einer leichten Abnahme der Procaspase 3 und einem verstärkten Anfall des aktiven Spaltproduktes kam. In den Versuchszellen, die nur mit CDDP behandelt worden waren, war dieser Effekt sehr viel geringer ausgeprägt, während sich für die nur mit D,L-Methadon inkubierten Versuchszellen zeigte weder eine Abnahme der Procaspase 3 noch der Spaltprodukte zeigte. Die Ergebnisse

legen eine proteolytische Aktivierung der Procaspase 3 nach 96 h durch die Initiatorcaspasen 9 und 8 nahe. Im nächsten Schritt wurde die PARP, ein Substrat der Caspase 3, analysiert. Es zeigte sich für die mit CDDP und D,L-Methadon-Konzentrationen ko-inkubierten Zellen ein fast vollständiger Verbrauch der PARP bei gleichzeitiger Zunahme der Abbauprodukte. Auch in den Versuchszellen, die mit den Einzelsubstanzen inkubiert worden waren, konnten in geringerem Ausmaß Abbauprodukte nachgewiesen werden, wobei es zu keiner wesentlichen Veränderung des intakten Proteins kam (Abb. 33).

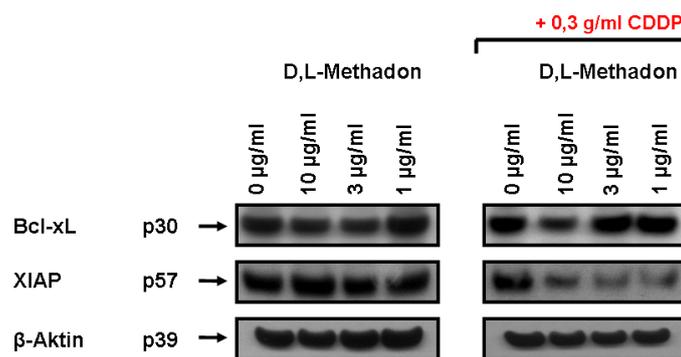


Abb. 34: Durch die Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon kommt es nach 96 h zu einer Konzentrationsänderung der regulatorischen Proteine des intrinsischen Signalwegs. Die Leukämiezelllinie HL-60 wurde mit D,L-Methadon-Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 1 µg/ml allein oder in Kombination mit 0,3 µg/ml CDDP behandelt. Nach 96 h wurden mittels Immunodetektion die regulatorischen Proteine Bcl-x_L und X-IAP analysiert. Als Ladekontrolle diente das ubiquitär und konstitutiv exprimierte Protein β-Aktin. (CDDP = Cisplatin, Bcl-x_L = engl. „B-cell-lymphoma extra long“, XIAP = engl. „X-chromosome-linked IAP“)

Zusätzlich wurden für HL-60 die beiden antiapoptotischen Regulationsfaktoren des intrinsischen Signalweges, Bcl-x_L und X-IAP, untersucht. Unter der Kombinationsbehandlung kam es vor allem für die höchste D,L-Methadon-Konzentration zu einer Abnahme der Bandenintensität von Bcl-x_L. Auch für X-IAP wurde eine Abnahme in den Versuchszellen nachgewiesen, die mit CDDP und D,L-Methadon ko-inkubiert worden waren. Für die nur mit D,L-Methadon behandelten Versuchszellen konnte weder für Bcl-x_L noch für X-IAP eine Änderung der Proteinmenge detektiert werden (Abb. 33).

Zusammenfassend konnte für die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 gezeigt werden, dass es unter der die Kombinationsbehandlung aus CDDP und D,L-Methadon zu einer Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges kommt, die die Aktivierung der Caspase 3 und den Abbau der PARP bewirkte. Die antiapoptotischen Proteine des intrinsischen Signalweges zeigten unter der Kombination aus CDDP und D,L-Methadon einen deutlichen Rückgang.

4. Diskussion

Laut dem *World Cancer Report*, den die WHO zuletzt 2014 veröffentlichte, waren im Jahr 2012 weltweit 14 Millionen neue Krebserkrankungen diagnostiziert und insgesamt 8 Millionen Todesfälle verzeichnet worden, die mit einem Krebsleiden in Verbindung gebracht werden konnten. Gleichzeitig lebten etwa 63,3 Millionen Menschen älter als 15 Jahre, bei denen in den vergangenen 5 Jahren Krebs diagnostiziert worden war (Stewart und Wild 2014). In Deutschland erkrankten derzeit etwa jeder zweite Mann und 43 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Krebsleiden. Für Patienten, die in den Jahren 2009 und 2010 in Deutschland an einem Krebsleiden erkrankten, wurde vom Robert-Koch-Institut eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 61 % für Männer und 67 % für Frauen geschätzt. Damit sind Krebserkrankungen hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Becker und Wahrendorf 1998). Krebserkrankungen stellen trotz zahlreicher Fortschritte in der Prävention und Therapie weiterhin eines der größten Problemfelder der modernen Medizin dar. Resistenzen gegenüber konventionellen Therapien sind bei der Behandlung von Krebsleiden eine große Herausforderung und führen zu einem erheblichen Bedarf an neuen Therapieansätzen (Milas et al. 2005). Ursächlich für die Entstehung von Neoplasien sind häufig Dysregulationen in zellulären Signalwegen, wie der Zellproliferation, der zellulären Ausdifferenzierung oder der Apoptose (Stricker und Kumar 2007), die darüber hinaus zur Entwicklung von Resistenzen in entarteten Zellen gegen Chemo- und Radiotherapien beitragen können (Debatin et al. 2003; Fulda 2009).

In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 9 von 100.000 Einwohnern an einer Leukämie, im Kindesalter stellen Leukämien sogar die häufigste maligne Erkrankung dar. Dabei kommt bei Kindern vor allem die ALL vor, während im Erwachsenenalter die CLL am häufigsten auftritt (Herold et al. 2011). Die umfang- aber auch nebenwirkungsreiche Therapie der akuten Leukämien hat vor allem im Kindesalter zu insgesamt guten Prognosen geführt. Bei Kindern liegt die Gesamtheilungsrate der ALL bei etwa 81 % und bei der AML bei etwa 60 % (Muntau 2011). Die Heilungschancen für Erwachsene sind dagegen deutlich niedriger. So wird bei der ALL in etwa 40 % der Fälle von einer anhaltenden Remission nach 5 Jahren ausgegangen, bei der AML in etwa 30 % der Fälle (Held et al. 2012).

Das Opioid D,L-Methadon findet in der Klinik bisher hauptsächlich zwei Verwendungen: zur Substitutionstherapie bei Heroinabhängigkeit und zur Analgesie bei chronischen Schmerzen, wie zum Beispiel Tumorschmerzen (Mutschler et al. 2012). In den letzten Jahren hat sich ein mögliches weiteres Einsatzgebiet eröffnet, nachdem mehrfach beobachtet werden konnten, dass D,L-Methadon einerseits die Proliferation von

Bronchialkarzinomzellen und Leukämiezellen hemmen und zum anderen in Leukämiezellen einen apoptotischen Zelltod induzieren kann (Maneckjee und Minna 1990; Friesen et al. 2008). In einer aktuellen Studie konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass D,L-Methadon Leukämiezellen im Sinne eines Synergismus für den Doxorubicin-induzierten Zelltod sensitiviert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass D,L-Methadon allein und in Kombination mit Doxorubicin in einem NOD/SCID/IL₂^{ry}^{null} Mausmodell zu einer verstärkten Proliferationshemmung humaner xenotransplantierte T-ALL-Zellen gegenüber der Vehikel-Kontrolle führt. Auf der Suche nach möglichen Erklärungsansätzen für die antineoplastische Wirkung von D,L-Methadon konnten von Friesen und Kollegen 2013 weitere Mechanismen benannt werden. Zum einen kam es durch die gleichzeitige Inkubation von Leukämiezellen mit Doxorubicin und D,L-Methadon zu einem verstärkten Influx und einem verminderten Efflux von Doxorubicin durch die Inhibition des *P-Glykoproteins* (P-Gp), während durch die Blockade des D,L-Methadon-induzierten Abfalls des zytosolischen cAMP die Apoptoseinduktion und Caspasenaktivierung gehemmt werden konnte. Die eingesetzten Konzentrationen von D,L-Methadon lagen dabei im therapeutischen Bereich ($\leq 3 \mu\text{g/ml}$) (Callaghan und Riordan 1993; Friesen et al. 2013).

Durch die Kombinationsbehandlung von Neoplasien lassen sich die Effektivität konventioneller Chemotherapien steigern und Resistenzen gegen Zytostatika überwinden (Martelli et al. 2012; Posthuma DeBoer et al. 2012). D,L-Methadon könnte einen geeigneten Kombinationspartner für konventionelle Chemotherapeutika darstellen. Ziel dieser Arbeit war es, analog zu den bereits vorhandenen Arbeiten über D,L-Methadon (Friesen et al. 2008; Friesen et al. 2013), die mögliche Kombination aus D,L-Methadon und den beiden Zytostatika CDDP und Etoposid auf die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 zu untersuchen.

4.1 D,L-Methadon sensitiviert CCRF-CEM und HL-60 für den CDDP- und Etoposid-induzierten Zelltod

Das Vorkommen von OR ist nicht nur auf spinale und supraspinale Neurone beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf Lymphozyten und Zellen des mononukleären-phagozytären Systems; sogar neoplastische Zellen verschiedener Tumorentitäten können OR an ihrer Zelloberfläche exprimieren (Fichna und Janecka 2004; Graefe et al. 2011). OR sind zudem an der Induktion der apoptotischen Kaskade beteiligt (Friesen et al. 2008; Friesen et al. 2013).

Daher wurde zuerst untersucht, ob die beiden Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 auf ihrer Zelloberfläche OR exprimieren und damit durch D,L-Methadon adressiert werden

können. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl für die akute promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 als auch für die akute T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM die Expression von OR auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Aus früheren *in vitro*-Versuchen ist bekannt, dass das Opioid D,L-Methadon in Leukämiezellen Apoptose induzieren und Chemoresistenzen überwinden kann und darüber hinaus ALL-Zellen für den Doxorubicin-induzierten Zelltod sensitivieren kann (Friesen et al. 2008; Friesen et al. 2013).

In der FSC-/SSC-Analyse und der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti zeigte sich für beide Zelllinien eine Zunahme des Zelltodes unter der Kombinationstherapie aus CDDP und D,L-Methadon, die sich bei der Leukämiezelllinie CCRF-CEM bereits nach 24 h und bei HL-60 erst nach 48 h einstellte. Die in dieser Arbeit beobachtete Wirkungsverstärkung von D,L-Methadon und CDDP entsprach der Definition eines klassischen Synergismus. Dieser zeichnet sich durch eine „gegenseitige Beeinflussung mehrerer Wirkstoffe im Sinne einer additiven oder potenzierten Wirkung“ aus (Dörner et al. 2013b). Der Synergismus fiel bei der akuten T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM deutlicher aus als bei der promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60.

Analog zu den Versuchen mit CDDP waren Untersuchungen mit Etoposid durchgeführt worden. Während es bei der Leukämiezelllinie CCRF-CEM zu einem geringen Anstieg des Zelltodes unter der Kombinationstherapie aus Etoposid und D,L-Methadon kam, konnte bei HL-60 zu den gewählten Zeitpunkten und Konzentrationen kein synergistischer Effekt der Kombinationsbehandlung nachgewiesen werden. Damit scheint Etoposid in der Kombination mit D,L-Methadon weniger geeignet für die Therapie von T-Zell-Leukämien und akuten promyeloischen Leukämien als CDDP.

Diese hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse sind vor allem in therapeutischer Hinsicht interessant, da sich durch die Kombinationsbehandlung mit D,L-Methadon die Konzentration des eingesetzten Zytostatikums reduzieren lässt. In den hier vorgestellten Versuchen lag der Zelltod bei der Zelllinie CCRF-CEM unter der Kombination aus D,L-Methadon und 0,1 µg/ml CDDP nach 96 h höher als bei den nur mit 0,3 µg/ml CDDP behandelten Versuchszellen. Gerade im Hinblick auf die teilweise sehr schwerwiegenden Behandlungskomplikationen, die unter einer Chemotherapie dosisabhängig vorkommen können (Aktories und Unger 2013), wäre die Möglichkeit einer Dosisreduktion bei gleichbleibender Wirksamkeit sehr vorteilhaft.

Die Expression von OR unter dem Zytostatikum Doxorubicin war in früheren Versuchen untersucht worden. Dabei kam es durch die Inkubation der prä-B-ALL-Zelllinie Tanoue mit Doxorubicin zu einer verstärkten OR-Oberflächenexpression (Friesen et al. 2013).

Auch das in dieser Arbeit eingesetzte Zytostatikum CDDP konnte die oberflächliche Expression der OR auf den Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 steigern. Hierbei fiel jedoch auf, dass die OR-Expressionssteigerung bei CCRF-CEM größer ausfiel als bei HL-60.

Dieses Ergebnis könnte wiederum eine Erklärung dafür liefern, dass die synergistische Wirkung von D,L-Methadon und CDDP auf die Zelltodinduktion bei CCRF-CEM deutlicher ausfiel als bei HL-60. Denn ähnliche Beobachtungen waren auch schon bei der Behandlung von humanen T-ALL- und non-T-ALL-Zellen aus Xenotransplantaten mit D,L-Methadon gemacht worden. Diese trugen wesentlich höhere OR-Konzentrationen auf ihrer Zelloberfläche als humane prä-B-ALL-Zellen und die Leukämiezelllinien Tanoue, NALM-6 und REH. Während die Zellen aus den Xenotransplantaten schon durch geringe Konzentrationen von D,L-Methadon getötet werden konnten, blieb die Zelltodinduktion bei den Zellen, die weniger OR exprimierten, unter gleichen Versuchsbedingungen, aus (Friesen et al. 2013). Die Wirkung von D,L-Methadon scheint also vom Ausmaß der oberflächlichen OR-Expression an den Zielzellen abhängig zu sein.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sowohl die akute T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM als auch die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 an ihrer Oberfläche OR exprimieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung der Leukämiezelllinien mit D,L-Methadon zu einer Sensitivierung für den durch CDDP und Etoposid induzierten Zelltod kam. Die Sensitivierung scheint dabei abhängig von der Hochregulation der OR auf den Leukämiezelllinien zu sein, die je nach Zelllinie variieren kann.

4.2 CDDP und D,L-Methadon wirken sich in unterschiedlichem Maß auf den Zellzyklus der Leukämiezellen aus

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Opioide Zellen daran hindern können, von der G₁-Phase in die S-Phase überzutreten, was zu einer Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase führt. So konnten bei humanen Mammakarzinom- und Kolonkarzinom-Zelllinien, die mit Morphin behandelt worden waren, ein G₁-Block induziert werden (Tegeeder et al. 2003). Auch bei Leukämiezellen, die mit D,L-Methadon behandelt worden waren, kam es zu einem G₁-Block (Friesen et al. 2008). Für CDDP ist bekannt, dass es in Zellen einen G₂-Block

induzieren kann (Wang und Lippard 2005). Um den von D,L-Methadon und CDDP induzierten Zelltod weiter zu charakterisieren, wurde nun mittels Zellzyklusanalyse nach Nicoletti (Nicoletti et al. 1991) untersucht, wie sich die Kombinationstherapie auf den Zellzyklus der Leukämiezelllinien auswirkt.

Durch die Behandlung mit D,L-Methadon konnte bei den Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 Veränderungen des Zellzyklus beobachtet werden. So konnte in der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti für beide Zelllinien Änderungen in der Zusammensetzung der Zellfraktionen beobachtet werden, die bei CCRF-CEM auf einen G₁-Block und bei HL-60 auf einen G₂-Block hinweisen könnten. Um genauere Aussagen bezüglich der Zellzyklusänderungen treffen zu können wären weitere Untersuchungen nötig.

Somit konnte für die akute T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM und die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 gezeigt werden, dass es durch D,L-Methadon zu Änderungen des Zellzyklus kommt.

4.3 D,L-Methadon, CDDP und ihre Auswirkungen auf die Apoptose

Bereits mehrfach konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass der durch Opioide induzierte Zelltod Caspasen-abhängig ist (Tegeeder et al. 2003; Hatsukari et al. 2007; Friesen et al. 2008; Roscher 2012). Auch für die Kombination des Opioids D,L-Methadon und des Zytostatikums Doxorubicin war eine Caspasen-Abhängigkeit des induzierten Zelltodes gezeigt worden (Friesen et al. 2013).

Durch den Einsatz des Pancaspaseninhibitors zVAD.fmk zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit sowohl bei CCRF-CEM als auch bei HL-60 eine Caspasen-Abhängigkeit des durch die Kombination aus D,L-Methadon und CDDP induzierten Zelltodes. Während es bei CCRF-CEM fast zu einem kompletten Sistieren des Zelltodes kam, zeigte sich bei HL-60 ein deutlicher Rückgang des Zelltodes. Es ist daher anzunehmen, dass bei der Zelllinie HL-60 Caspasen-unabhängige Mechanismen an der Zelltodinduktion beteiligt sind.

Durch die Behandlung von Leukämiezellen mit D,L-Methadon und Fentanyl war es in früheren Arbeiten zu einer verstärkten Aktivierung der Caspasen des intrinsischen Signalweges gekommen (Friesen et al. 2008; Hagemeyer 2009; Mähler 2011; Mähler 2011). Eine Aktivierung der Apoptose über den extrinsischen Signalweg konnte unter dem Einsatz von Opioide bisher nicht gezeigt werden (Micheau et al. 1999; Kaufmann und Earnshaw 2000; Friesen et al. 2008). Zytostatika hingegen können sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Signalweg den apoptotischen Zelluntergang induzieren (Friesen et

al. 1996; Micheau et al. 1999; Kaufmann und Earnshaw 2000). Der intrinsische Signalweg wird durch die Caspase 9 initiiert, die am Apoptosom aktiviert wird, nachdem proapoptotische Faktoren aus den Mitochondrien ausgetreten sind (Adams 2003). Caspase 8, die Initiatorcaspase des extrinsischen Signalweges, kann als Reaktion auf die Bindung eines Liganden an CD95 am DISC aktiviert werden (Chang und Yang 2000). Es ist aber auch bekannt, dass Caspase 8 im Rahmen des intrinsischen Signalweges aktiviert werden kann (Slee et al. 1999). Die Procaspase 3 kann über den intrinsischen und extrinsischen Signalweg aktiviert werden (Lodish et al. 2007a).

In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen ließ sich für die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 in den mit D,L-Methadon und CDDP ko-inkubierten Zellen eine verstärkte Aktivierung der Caspase 9 nachweisen. Auch konnte für CCRF-CEM und HL-60 eine gesteigerte Aktivierung der Caspase 8 in den Zellen beobachtet werden, die mit D,L-Methadon und CDDP gleichzeitig behandelt worden waren. Die Procaspase 3 und deren Substrat, das DNA-Reparaturenzym PARP, waren ebenfalls unter der Kombinationstherapie aus D,L-Methadon und CDDP in beiden Leukämiezelllinien verstärkt gespalten worden, was für eine proteolytische Aktivierung der inaktiven Procaspase 3 und den proteolytischen Abbau von PARP durch die aktive Caspase 3 spricht.

Durch die Kombinationstherapie kann in den Leukämiezelllinien der intrinsische apoptotische Signalweg aktiviert werden. Inwiefern hierbei auch der extrinsische Signalweg an der Apoptoseinduktion beteiligt ist, bleibt unklar, da die Caspase 8, klassischerweise als Initiatorcaspase des extrinsischen Signalweges bezeichnet, auch im Rahmen des intrinsischen Signalweges aktiviert werden kann (Slee et al. 1999). Bei Untersuchungen in der Vergangenheit konnte zudem gezeigt werden, dass es durch die *in vitro*-Behandlung von Leukämiezelllinien zu keiner Hochregulation von CD95 und dessen Liganden kam, so dass von einer Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signalweges auszugehen ist (Friesen et al. 2008).

In früheren Versuchen mit D,L-Methadon und Fentanyl war es zu einer Abnahme der antiapoptotischer Faktoren, wie Bcl-x_L und dem Caspaseninhibitor X-IAP gekommen, während sich die Expression des proapoptotischen Bax nicht änderte (Friesen et al. 2008; Hagemeyer 2009). Bei X-IAP handelt es sich um einen Inhibitor der Caspasen 3, 7 und 9, der im Rahmen des intrinsischen Signalweges durch mitochondriale Moleküle inhibiert wird (Lodish et al. 2007a). X-IAP kann einerseits proteosomal abgebaut werden, andererseits kann es durch die Caspasen 3 und 7 degradiert werden kann, wobei ein 30 kDa großes

Fragment entsteht (Deveraux und Reed 1999; Song et al. 2003). Bcl-x_L und Bax gehören zur Bcl-2-Familie, die zahlreiche weitere regulatorische Proteine umfasst. Diese interagieren wechselseitig miteinander und beeinflussen die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran. Kommt es zum Austritt von Cytochrom C in das Zytosol, wird der intrinsische Signalweg ausgelöst (Hengartner 2000).

Für die akute T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Abnahme von Bcl-x_L unter D,L-Methadon und CDPP sowie ein verstärkter Abbau von X-IAP, wobei bei CCRF-CEM das p30 kDa große Fragment nachgewiesen werden konnte, das für den Abbau über die Caspasen 3 und 7 spricht. Die Expression des proapoptotischen Bax änderte sich durch die Therapie mit D,L-Methadon und CDDP nicht. Bei der promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zeigte sich für Bcl-x_L und X-IAP eine konzentrationsabhängige Abnahme für die mit D,L-Methadon und CDDP ko-inkubierten Zellen gegenüber den nur mit D,L-Methadon oder CDDP behandelten Zellen.

Eine Überexpression von IAPs in neoplastischen Zellen kann mit einer Resistenz gegen Zytostatika-induzierte Apoptose vergesellschaftet sein (Deveraux und Reed 1999). Zudem stellt die IAP-Überexpression einen wesentlichen negativen Prädiktor für das Ansprechen von Non-Hodgkin Lymphomen auf Prednisolon dar (Hundsdoerfer et al. 2010). Für Bcl-x_L konnten Addeo und Kollegen zeigen, dass dessen verstärkte Expression mit einer verkürzten ereignisfreien Überlebenszeit bei der ALL im Kindesalter korreliert (Addeo et al. 2005). Um Resistenzen gegen Zytostatika, die auf einer Überexpression von IAPs beruhen, zu überwinden, könnte der verstärkte Abbau von IAPs durch die Kombinationstherapie aus D,L-Methadon und CDDP einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen. Auch die mögliche prognoseverbessernde Wirkung bei kindlichen ALL-Erkrankungen durch die vermehrte Degradation von Bcl-x_L stellt einen interessanten therapeutischen Aspekt dar.

4.4 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob außer Doxorubicin auch andere Zytostatika durch D,L-Methadon bei Leukämiezelllinien in ihrer Wirkung verstärkt werden können. Um dies aufzuklären, sollte die Wirkung der Kombinationsbehandlung aus dem Opioid D,L-Methadon mit den beiden Zytostatika CDDP und Etoposid auf die Leukämiezelllinien CCRF-CEM und HL-60 untersucht werden. Dabei konnte durch D,L-Methadon eine Sensitivierung der Leukämiezelllinien für den Zytostatika-induzierten Zelltod erreicht werden, die für CDDP deutlicher ausfiel, als für Etoposid. Bei der akuten T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM war der Synergismus zwischen D,L-Methadon und den eingesetzten Zytostatika ausgeprägter als bei der promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60.

Damit konnten frühere Ergebnisse, die eine Sensitivierung für den Doxorubicin-induzierten Zelltod durch D,L-Methadon bei Leukämiezelllinien zeigten (Roscher 2012), auch für die Zytostatika CDDP und Etoposid nachgewiesen werden. Aus den nun vorliegenden Erkenntnissen ergeben sich für die Zukunft weitere Fragestellungen.

Es ist mittlerweile bekannt, dass D,L-Methadon den Influx von Doxorubicin verstärkt und dessen Efflux vermindert, so dass mehr Zytostatikum intrazellulär verbleibt (Friesen et al. 2013). Entsprechend interessant wäre es, die in dieser Arbeit eingesetzten Zytostatika dahingehend zu analysieren, inwieweit der Influx und der Efflux von CDDP und Etoposid durch D,L-Methadon verändert werden. Sowohl CDDP als auch Etoposid sind Substrate der *multidrug resistance-associated protein-* (MRP-) Familie. Zur MRP-Familie werden sieben transmembranäre Glykoproteine gezählt, die ATP-abhängig organische Anionen in und aus Zellen transportieren können. Zu ihren Substraten zählen viele anionische Medikamente, aber auch neutral geladene Substanzen wie CDDP können von den MRP-Transportern umgesetzt werden. Ihre Expression lässt sich sowohl in gesunden Körperzellen als auch in entarteten Tumorzellen nachweisen, wo sie zu Resistenzen gegen Zytostatika führen können (Borst et al. 2000). Es wird angenommen, dass D,L-Methadon die MRP-Transporter in ihrer Funktion hemmen kann (Callaghan und Riordan 1993; Bouër et al. 1999; Crettol et al. 2007). Da weder für CDDP noch für Etoposid eine Autofluoreszenz beschrieben wurde, wie dies bei Doxorubicin der Fall ist (Karukstis et al. 1998), müssten diese Zytostatika mit Fluoreszenzmarkern gekoppelt werden, um ihren intrazellulären Gehalt durchflusszytometrisch analysieren zu können (Katano et al. 2004; Lazo et al. 1997).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass D,L-Methadon alleine und in Kombination mit CDDP den Zellzyklus der behandelten Leukämiezellen beeinflusst. Hier wären weitergehende Untersuchungen sinnvoll, um die Änderungen im Detail erfassen zu können.

Neben der *in vitro*-Induktion eines G₁-Blocks in Zelllinien humaner Mammakarzinomzellen und Kolonkarzinomzellen konnten Tegeder und Kollegen nachweisen, dass es durch die Behandlung der Karzinomzelllinien mit Morphin zu einer verstärkten Phosphorylierung von p53 kommt (Tegeder et al. 2003). Morphin konnte allerdings in Leukämie- und Glioblastomzelllinien keinen Zelltod induzieren und führte nicht zu einer Wirkungsverstärkung gleichzeitig eingesetzter Zytostatika (Mähler 2011; Friesen et al. 2011). Phosphoryliertes und damit stabilisiertes p53 induziert als Transkriptionsfaktor die

Expression von p21, einem unspezifischen CDKI. Dadurch kann der Zellzyklus betroffener Zellen sowohl in der G₁- als auch in der G₂-Phase arretiert werden (Lodish et al. 2007c). Ein ähnlicher Effekt könnte auch für D,L-Methadon angenommen werden. Wie das natürliche Opiat Morphin bindet D,L-Methadon als reiner Agonist mit hoher Affinität an den μ -OR (Karow und Lang-Roth 2011). Die Auswirkungen von D,L-Methadon auf das zentrale Tumorsuppressorgen p53 wäre in diesem Zusammenhang ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Forschungsbemühungen.

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Überprüfung der Wirksamkeit von D,L-Methadon als mögliches Additivum bei der Therapie von Neoplasien wäre die Initiierung von klinischen Studien an Patienten. D,L-Methadon ist pharmakologisch bestens bekannt und wird schon heute zur Analgesie bei Tumorpatienten eingesetzt (Allgaier und Höllt 2013). Derzeit sind klinische Studien in Planung, um die Wirksamkeit von D,L-Methadon als Kombinationspräparat mit Zytostatika bei Patienten mit Malignomen zu prüfen.

5. Zusammenfassung

Trotz erheblicher Fortschritte bei der Therapie maligner Erkrankungen stellen die Entwicklung von Resistenzen gegen Zytostatika sowie die mitunter schweren Nebenwirkungen einer Chemotherapie nach wie vor ein erhebliches Problem dar. Für das Opioid D,L-Methadon konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass es bei Leukämiezelllinien *in vitro* Zytostatikaresistenzen überwinden kann und selbst einen antineoplastischen Effekt auf Zellen verschiedener Malignome ausübt. Zudem zeigte sich unter D,L-Methadon eine Zunahme des durch Doxorubicin induzierten Zelltodes. Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob auch Zytostatika anderer Wirkklassen in Kombination mit D,L-Methadon *in vitro* zu einer erhöhten Zelltodrate bei leukämischen Zellen führen können. Dazu wurden die Wechselwirkung zwischen D,L-Methadon und den Zytostatika Cisplatin und Etoposid zu untersucht, um eine mögliche synergistische Wirkung zwischen diesen Substanzen nachzuweisen.

Die Untersuchungen wurden an der akuten T-Zell-Leukämiezelllinie CCRF-CEM und der promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60 durchgeführt. Zur Messung des apoptotischen Zelltodes wurden durchflusszytometrisch eine Forward Light Scatter- / Side Light Scatter-Analysen sowie Zellzyklusanalysen nach Nicoletti durchgeführt. Mittels Fluoreszeingekoppeltem Naloxon wurde die oberflächliche Opioidrezeptorexpression der Versuchszellen überprüft und zudem analysiert, ob sich diese unter einer Zytostatikabehandlung ändert. Anschließend wurde für D,L-Methadon und Cisplatin die Caspasen-Abhängigkeit der apoptotischen Zelltodinduktion durch Vorinkubation mit dem Pancaspaseninhibitor Z-Val-Ala-DL-Asp-Fluoromethylketon überprüft. Durch Western-Blot-Analysen wurde die Auswirkung der Ko-Inkubation aus D,L-Methadon und Cisplatin auf die Aktivierung der Caspasen sowie die Konzentration der regulatorischen Proteine des intrinsischen apoptotischen Signalweges ermittelt.

Auf der Zelloberfläche beider Leukämiezelllinien konnten Opioidrezeptoren nachgewiesen werden. Darüber hinaus kam es unter der Inkubation mit den Zytostatika zu einer Hochregulation der Opioidrezeptorexpression, die unter Cisplatin und bei CCRF-CEM deutlicher ausfiel. Unter der Kombination aus D,L-Methadon und Cisplatin beziehungsweise Etoposid wurde ein wesentlich höherer Zelltod gemessen als unter den jeweiligen Einzelsubstanzen. Dabei kam es unter der dualen Inkubation mit D,L-Methadon

und Cisplatin zu einer früheren und stärker ausgeprägten Sensitivierung für den Zytostatikum-induzierten Zelltod als unter D,L-Methadon und Etoposid. Zudem konnten bei CCRF-CEM höhere Zelltodraten erzielt werden als bei HL-60. In der Zellzyklusanalyse nach Nicoletti konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung von CCRF-CEM und HL-60 mit D,L-Methadon zu Änderungen des Zellzyklus kam. Durch die Vorinkubation der Versuchszellen mit Z-Val-Ala-DL-Asp-Fluoromethylketon konnte die Caspasen-Abhängigkeit der Zelltodinduktion durch D,L-Methadon und Cisplatin nachgewiesen werden. In der Western-Blot-Analyse zeigte sich unter der Kombinationstherapie aus D,L-Methadon und Cisplatin die Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signalweges. Zudem kam es bei beiden Zelllinien zu einem Abbau der antiapoptotischen Faktoren Bcl-x_L und X-IAP.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass D,L-Methadon mit Cisplatin und Etoposid synergistisch zusammenwirkt. Die Zelltodinduktion durch D,L-Methadon und CDDP war abhängig von der apoptotischen Caspasenkaskade. Ein möglicher Erklärungsansatz für den Synergismus zwischen D,L-Methadon und Cisplatin stellt die verstärkte Aktivierung des intrinsischen Signalweges und der erhöhte Abbau antiapoptotischer Faktoren dar. Zusätzlich induzierten die Zytostatika eine Hochregulation der Opioidrezeptorexpression auf den Leukämiezelllinien, wodurch diese besser durch D,L-Methadon adressiert werden konnten. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint D,L-Methadon als vielversprechendes Kombinationstherapeutikum bei der Therapie von Krebserkrankungen, da gezeigt werden konnte, dass es Tumorzellen für eine Vielzahl von Zytostatika sensitivieren kann. Die durch D,L-Methadon verbesserte Zytostatikawirkung könnte den Einsatz niedrigerer Zytostatikadosen ermöglichen und so zu einer besseren Verträglichkeit von Chemotherapien führen. Zusätzlich mit den bereits bekannten Eigenschaften des D,L-Methadons, wie der Überwindung von Zytostatikaresistenzen in Tumorzellen *in vitro* sowie der Proliferationshemmung xenotransplanteder humaner T-ALL-Zellen *in vivo*, ergibt sich das Bild eines wirkungsvollen antineoplastischen Wirkstoffs, der die Therapie maligner Erkrankungen verbessern kann.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Adams, J. M.: Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & development*, 17: 2481–2495 (2003)
- 2 Addeo, R.; Caraglia, M.; Baldi, A.; D'Angelo, V.; Casale, F.; Crisci, S.; Abbruzzese, A.; Vincenze, B.; Campioni, M.; Di Tullio, Maria Teresa und Indolfi, P.: Prognostic role of bcl-xL and p53 in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Biology & Therapy*, 4: 32–38 (2005)
- 3 Aktories, K. und Unger, C.: Mittel zur Behandlung von Tumoren - Tumorchemotherapie. In: Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, B.; Starke, K. (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 11. Aufl., Elsevier, München: 883–965 (2013)
- 4 Allgaier, Clemens und Höllt, V.: Analgetika. In: Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, B.; Starke, K. (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 11. Aufl., Elsevier, München: 207–232 (2013)
- 5 Becker, N.; Wahrendorf, J.: Vergleich mit anderen Todesursachen. In: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981 - 1990*. Springer. Berlin, Heidelberg, New York (1998) Und: Fortschreibung im Internet: http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_2.html (15.10.2014)
- 6 Blaschek, W.; Ebel, S.; Hackenthal, E.; Holzgrabe, U.; Keller, K.; Reichling, J.; Schulz, V. In: Blaschek, W. (Hrsg.) *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*. 6. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Bd. 7, 28 - 31 (2007)
- 7 Borst, P.; Evers, R.; Kool, M. und Wijnholds, J.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 1295–1302 (2000)
- 8 Bouër, R.; Barthe, L.; Philibert, C.; Tournaire, C.; Woodley, J. und Houin, G.: The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. *Fundamental & clinical pharmacology*, 13: 494–500 (1999)
- 9 Brenner, S.: The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77: 71–94 (1974)
- 10 Callaghan, R. und Riordan, J. R.: Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *The Journal of biological chemistry*, 268: 16059–16064 (1993)
- 11 Chang, H. Y. und Yang, X.: Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 821–846 (2000)
- 12 Cory, S. und Adams, J. M.: The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2: 647–656 (2002)
- 13 Crettol, S.; Digon, P.; Golay, K. P.; Brawand, M. und Eap, C. B.: In vitro P-glycoprotein-mediated transport of (R)-, (S)-, (R,S)-methadone, LAAM and their main metabolites. *Pharmacology*, 80: 304–311 (2007)
- 14 Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Li, X.; Gorczyca, W.; Murakami, T. und Traganos, F.: Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27: 1–20 (1997)
- 15 Debatin, K. M.; Stahnke, K. und Fulda, S.: Apoptosis in hematological disorders. *Seminars in Cancer Biology*, 13: 149–158 (2003)

- 16 Deveraux, Q. L. und Reed, J. C.: IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & development*, 13: 239–252 (1999)
- 17 Dhawan, B. N.; Cesselin, F.; Raghbir, R.; Reisine, T.; Bradley, P. B.; Portoghese, P. S. und Hamon, M.: International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacological reviews*, 48: 567–592 (1996)
- 18 Dörner, T.; Feldkamp, J.; Kunze, J.; Pfitzmann, R.; Radke, M.; Schönberger, B.; Springer, G.; Straube, E.; Straube, W.: AML. In: Witzel, S. (Hrsg.) *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 265. Aufl., De Gruyter, Berlin: 72 - 73 (2013a)
- 19 Dörner, T.; Feldkamp, J.; Kunze, J.; Pfitzmann, R.; Radke, M.; Schönberger, B.; Springer, G.; Straube, E.; Straube, W.: Synergismus. In: Witzel, S. (Hrsg.) *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 265. Aufl., De Gruyter, Berlin: 2020 (2013b)
- 20 Evan, G. und Littlewood, T.: A matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317–1322 (1998)
- 21 Fichna, J. und Janecka, A.: Opioid peptides in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23: 351–366 (2004)
- 22 Fischer, L.: Proteinbestimmungen. In: Lottspeich, F.; Engels, J. W. (Hrsg.) *Bioanalytik*, 3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Berlin: 35–46 (2012)
- 23 Foley, G. E.; Lazarus, H.; Farber, S.; Uzman, B. G.; Boone, B. A. und McCarthy, R. E.: Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*, 18: 522–529 (1965)
- 24 Friesen, C.; Bacher, S.; Hormann, I.; Roscher, M. und Miltner, E.: Cytotoxic effects of opioids on cancer cell lines. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 49: 2–60 (2011)
- 25 Friesen, C.; Herr, I.; Krammer, P. H. und Debatin, K. M.: Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Medicine*, 2: 574–577 (1996)
- 26 Friesen, C.; Hormann, I.; Roscher, M.; Fichtner, I.; Alt, A.; Hilger, R.; Debatin, K.-M. und Miltner, E.: Opioid receptor activation triggering downregulation of cAMP improves effectiveness of anti-cancer drugs in treatment of glioblastoma. *Cell Cycle*, 13: 1560–1570 (2014)
- 27 Friesen, C.; Roscher, M.; Alt, A. und Miltner, E.: Methadone, commonly used as maintenance medication for outpatient treatment of opioid dependence, kills leukemia cells and overcomes chemoresistance. *Cancer Research*, 68: 6059–6064 (2008)
- 28 Friesen, C.; Roscher, M.; Hormann, I.; Fichtner, I.; Alt, A.; Hilger, R.; Debatin, K.-M. und Miltner, E.: Cell death sensitization of leukemia cells by opioid receptor activation. *Oncotarget*, 4: 677–690 (2013)
- 29 Fulda, S.: Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, 124: 511–515 (2009)
- 30 Fulda, S.; Galluzzi, L. und Kroemer, G.: Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 9: 447–464 (2010)
- 31 Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tsai, S.; Metzgar, R.; Aulakh, G.; Ting, R.; Ruscetti, F. und Gallo, R.: Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54: 713–733 (1979)
- 32 Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J. M.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; El-Deiry, W. S.; Fulda, S.;

- Gottlieb, E.; Green, D. R.; Hengartner, M. O.; Kepp, O.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lipton, S. A.; Lu, X.; Madeo, F.; Malorni, W.; Mehlen, P.; Nuñez, G.; Peter, M. E.; Piacentini, M.; Rubinsztein, D. C.; Shi, Y.; Simon, H.-U.; Vandenabeele, P.; White, E.; Yuan, J.; Zhivotovsky, B.; Melino, G. und Kroemer, G.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19: 107–120 (2011)
- 33 Graefe, K. H.; Lutz, W.; Bönisch, H.; Hahn, J.-M.: Nozizeptives System. In: *Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme Verlag, Stuttgart: S.215 - 253 (2011)
- 34 Green, D. R. und Kroemer, G.: The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 305: 626–629 (2004)
- 35 Griffiths, G. J.; Dubrez, L.; Morgan, C. P.; Jones, N. A.; Whitehouse, J.; Corfe, B. M.; Dive, C.; Hickman, J. A. und Griffiths, G. J.: Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 144: 903–914 (1999)
- 36 Grignani, F.; Fagioli, M.; Alcalay, M.; Longo, L.; Pandolfi, P. P.; Donti, E.; Biondi, A.; Lo Coco, F. und Pelicci, P. G.: Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood*, 83: 10–25 (1994)
- 37 Hagemeyer, K.: Analysis of the molecular mechanisms of cell death in leukemia cells Induced by the Treatment with Fentanyl. Universität Ulm (2009)
- 38 Hallek, M.: Internistische Tumorthherapie. In: Böhm, M.; Hallek, M.; Schmiegel, W. (Hrsg.) *Innere Medizin*, 6. Aufl., Elsevier, München: 458–460 (2009)
- 39 Hande, K. R.: Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*, 34: 1514–1521 (1998)
- 40 Harper, J. A.; Yuan, J. S.; Tan, J. B.; Visan, I. und Guidos, C. J.: Notch signaling in development and disease. *Clinical Genetics*, 64: 461–472 (2003)
- 41 Hatsukari, I.; Hitosugi, N.; Ohno, R.; Hashimoto, K.; Nakamura, S.; Satoh, K.; Nagasaka, H.; Matsumoto, I. und Sakagami, H.: Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer Research*, 27: 857–864 (2007)
- 42 Heinrich, P. C.; Haan, S.; Hermanns, H. M.; Müller-Newen, G. und Schaper, F.: Rezeptoren und ihre Signaltransduktion. In: Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L. (Hrsg.) *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg: 411–441 (2014a)
- 43 Heinrich, P. C.; Koch, H.-G. und Brix, J.: Zellzyklus - Koordination der Zellteilung. In: Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L. (Hrsg.) *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg: 535–544 (2014b)
- 44 Held, G.; Link, H. und Pfreundschuh, M.: Akute Leukämien. In: Preiß, J.; Dornoff, W.; Hagmann, F.-G.; Schmieder, A. (Hrsg.) *Taschenbuch Onkologie 2012/13*, 16. Aufl., W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Germering/München: 391 (2012)
- 45 Hengartner, M. O.: The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770–776 (2000)
- 46 Herold, G.; Fetscher, S.; Germing, U.; Höchsmann, B. und Röth, A.: Hämatologie. In: Herold, G. (Hrsg.) *Innere Medizin*, . Aufl., Arzt + Information, Köln: 20–139 (2011)
- 47 Hundsdorfer, P.; Dietrich, I.; Schmelz, K.; Eckert, C. und Henze, G.: XIAP expression is post-transcriptionally upregulated in childhood ALL and is

- associated with glucocorticoid response in T-cell ALL. *Pediatric Blood & Cancer*, 55: 260–266 (2010)
- 48 Jeffers, J. R.; Parganas, E.; Lee, Y.; Yang, C.; Wang, J.; Brennan, J.; MacLean, K. H.; Han, J.; Chittenden, T.; Ihle, J. N.; McKinnon, P. J.; Cleveland, J. L. und Zambetti, G. P.: Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, 4: 321–328 (2003)
- 49 Karow, T. und Lang-Roth, R.: Analgetika. In: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 19. Aufl., Selbstverl. des Verf. Pulheim: 1266 (2011)
- 50 Karukstis, K. K.; Thompson, E. H.; Whiles, J. A. und Rosenfeld, R. J.: Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophysical Chemistry*, 73: 249–263 (1998)
- 51 Katano, K.; Safaei, R.; Samimi, G.; Holzer, A.; Tomioka, M.; Goodman, M. und Howell, S. B.: Confocal Microscopic Analysis of the Interaction between Cisplatin and the Copper Transporter ATP7B in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research*, 10: 4578–4588 (2004)
- 52 Kaufmann, S. H. und Earnshaw, W. C.: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 256: 42–49 (2000)
- 53 Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239–257 (1972)
- 54 Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H. und Peter, M. E.: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14: 5579–5588 (1995)
- 55 Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. und Mitchell, R. N.: Cell Injury, Cell Death, and Adaptations. In: Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Mitchell, R. N. (Hrsg.) *Robbins Basic Pathology*, 8. Aufl., Saunders, Philadelphia: 1–30 (2007)
- 56 Lazo, J. S.; Li, T.; Woo, E. S.; Settineri, C. E.; Allan, W. P. und Yalowich, J. C.: Chemical synthesis and biological activity of a novel fluorescent etoposide derivative. *Biochemical Pharmacology*, 53: 715–722 (1997)
- 57 Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J. und Yuan, J.: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94: 491–501 (1998)
- 58 Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H. und Matsudaira, P.: Cell Birth, Lineage, and Death. In: Tenney, S. (Hrsg.) *Molecular Cell Biology*, . Aufl., W.H.Freeman & Co Ltd (2007a)
- 59 Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H. und Matsudaira, P.: Cancer. In: Tenney, S. (Hrsg.) *Molecular Cell Biology*, . Aufl., W.H.Freeman & Co Ltd (2007b)
- 60 Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H. und Matsudaira, P.: Regulating the Eukaryotic Cell Cycle. In: Tenney, S. (Hrsg.) *Molecular Cell Biology*, . Aufl., W.H.Freeman & Co Ltd: 847–904 (2007c)
- 61 Mähler, A.: Untersuchung der Wirkung von Morphin auf Krebszelllinien und Möglichkeiten der Therapieoptimierung. Universität Ulm (2011)
- 62 Majno, G. und Joris, I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146: 3–15 (1995)

- 63 Maneckjee, R. und Minna, J. D.: Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 3294–3298 (1990)
- 64 Maneckjee, R. und Minna, J. D.: Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth & Differentiation*, 5: 1033–1040 (1994)
- 65 Martelli, A. M.; Chiarini, F.; Evangelisti, C.; Cappellini, A.; Buontempo, F.; Bressanin, D.; Fini, M. und McCubrey, J. A.: Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment. *Oncotarget*, 3: 371–394 (2012)
- 66 Marti, G. E.; Stetler-Stevenson, M.; Bleesing, J. J. und Fleisher, T. A.: Introduction to flow cytometry. *Seminars in Hematology*, 38: 93–99 (2001)
- 67 Micheau, O.; Hammann, A.; Solary, E. und Dimanche-Boitrel, M. T.: STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256: 603–607 (1999)
- 68 Milas, L.; Raju, U.; Liao, Z. und Ajani, J.: Targeting molecular determinants of tumor chemo-radioresistance. *Seminars in Oncology*, 32: 78–81 (2005)
- 69 Mitchell, Richard; Kumar, Vinay; Fausto, Nelson; Abbas, Abul K.; Aster, Jon. In: Eddy, J. (Hrsg.) *Pocket Companion to Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8. Aufl., Saunders, Philadelphia (2011)
- 70 Muntau, A. C.: Onkologie. In: *Intensivkurs Pädiatrie*, 6. Aufl., Elsevier, München: 574 (2011)
- 71 Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P. und Schäfer-Korting, M.: Analgetika. In: Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Menzel, S.; Ruth, P. (Hrsg.) *Arzneimittelwirkungen*, 10. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 211–278 (2012)
- 72 Nagata, S.: Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*, 256: 12–18 (2000)
- 73 Nechushtan, A.; Smith, C. L.; Lamensdorf, I.; Yoon, S. H. und Youle, R. J.: Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 11: 1265–1276 (2001)
- 74 Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P. R.; Labelle, M. und Lazebnik, Y. A.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376: 37–43 (1995)
- 75 Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M. C.; Grignani, F. und Riccardi, C.: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 139: 271–279 (1991)
- 76 Osborn, J.: A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science applications. *Life Science News*: 22–25 (2000)
- 77 Posthuma DeBoer, J.; van Egmond, Pim W; Helder, M. N.; de Menezes, Renée X; Cleton-Jansen, A.-M.; Beliën, Jeroen A M; Verheul, Henk M W; van Royen, Barend J; Kaspers, Gert-Jan J L und van Beusechem, Victor W: Targeting JNK-interacting-protein-1 (JIP1) sensitises osteosarcoma to doxorubicin. *Oncotarget*, 3: 1169–1181 (2012)

- 78 Roscher, M.: Studien zur Optimierung von Leukämie- und non-Hodgkin-Lymphom-Therapien durch den Einsatz von Opioiden, Chemotherapeutika und Radioimmuntherapien. Universität Ulm (2012)
- 79 Sattler, M.; Liang, H.; Nettekheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B. und Fesik, S. W.: Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275: 983–986 (1997)
- 80 Singh, A.; Jayanthan, A.; Farran, A.; Elwi, A. N.; Kim, S.-W.; Farran, P. und Narendran, A.: Induction of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells by the therapeutic opioid methadone and effective synergy with Bcl-2 inhibition. *Leukemia research*, 35: 1649–1657 (2011)
- 81 Slee, E. A.; Harte, M. T.; Kluck, R. M.; Wolf, B. B.; Casiano, C. A.; Newmeyer, D. D.; Wang, H. G.; Reed, J. C.; Nicholson, D. W.; Alnemri, E. S.; Green, D. R. und Martin, S. J.: Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of Cell Biology*, 144: 281–292 (1999)
- 82 Soares, Luiz Guilherme L.: Methadone for cancer pain: what have we learned from clinical studies? *The American Journal of Hospice & Palliative Care*, 22: 223–227 (2005)
- 83 Song, J. H.; Song, D. K.; Pyrzynska, B.; Petruk, K. C.; Van Meir, Erwin G und Hao, C.: TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 13: 539–553 (2003)
- 84 Stewart, Bernard S.; Wild, Christopher P. In: : *World Cancer Report 2014* (2014)
- 85 Stricker, T. P. und Kumar, V.: Neoplasia. In: Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Mitchell, R. N. (Hrsg.) *Robbins Basic Pathology*, 8. Aufl., Saunders, Philadelphia: 173–223 (2007)
- 86 Sulston, J. E. und Brenner, S.: The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77: 95–104 (1974)
- 87 Sweetman, Sean C.: Cisplatin In: *The Complete Drug Reference*. Vol. A, 35. Aufl., Pharmaceutical Press, London: 766–769 (2007)
- 88 Tegeder, I.; Grosch, S.; Schmidtko, A.; Haussler, A.; Schmidt, H.; Niederberger, E.; Scholich, K.; Geisslinger, G.; Grösch, S. und Häussler, A.: G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer research*, 63: 1846–1852 (2003)
- 89 Thompson, C. B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, N.Y.)*, 267: 1456–1462 (1995)
- 90 Vardiman, J. W.; Thiele, J.; Arber, D. a.; Brunning, R. D.; Borowitz, M. J.; Porwit, A.; Harris, N. L.; Le Beau, Michelle M; Hellström-Lindberg, E.; Tefferi, A. und Bloomfield, C. D.: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114: 937–951 (2009)
- 91 Vaux, D. L.; Cory, S. und Adams, J. M.: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335: 440–442 (1988)
- 92 Walczak, H.; Bouchon, A.; Stahl, H.; Cells, C.-r. T. und Krammer, P. H.: Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Retains Its Apoptosis-

- inducing Capacity on Bcl-2- or Bcl-x L -overexpressing Chemotherapy-resistant Tumor Cells Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Retains Its Apoptosis-inducing. *Cancer Research*, 60: 3051–3057 (2000)
- 93 Waldhoer, M.; Bartlett, S. E. und Whistler, J. L.: OPIOID RECEPTORS. *Annual Review of Biochemistry*, 73: 953–990 (2004)
- 94 Wang, D. und Lippard, S. J.: Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug Discovery*, 4: 307–320 (2005)
- 95 Westermeier, R. und Görg, A.: Elektrophoretische Verfahren. In: Lottspeich, F.; Engels, J. W. (Hrsg.) *Bioanalytik*, 3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag: 269–302 (2012)
- 96 Yu, J. und Zhang, L.: PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Supplement 1: S71-83 (2008)

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Miltner und Frau Doktor Friesen für die interessante Fragestellung meiner Dissertation bedanken. Insbesondere Frau Doktor Friesen gilt mein Dank für die tolle Betreuung und die freundliche und offene Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe.

Frau Professor Brunner danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank auch an Gabriele Aggeler, Beatrice Strauss, Inis Hormann, Mareike Roscher Kathrin Bieringer und Romy Schmidt für eine abwechslungsreiche und schöne Zeit im Labor und Freundschaften, die darüber hinaus Bestand hatten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau Melissa und meinen Eltern für Ihre Unterstützung, Geduld und ihre vielen guten Ratschläge bedanken.

Bei Herrn Professor Richard Salm und Frau Privatdozentin Corina Schmidt möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass sie mir beratend und als gute Freunde zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tilman Christian Fischer
Geburtsdatum: 11.09.1987
Geburtsort: Freiburg i. Br.
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Ausbildung

1998 – 2003 Berthold-Gymnasium, Freiburg i. Br.

2003 – 2007 Hebel-Gymnasium, Lörrach
Abschluss: Abitur

2007 – 2008 Zivildienst, Seidel-Klinik, Bad Bellingen

seit 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

09/2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/2011 Promotions-Freisemester

10/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2014 - 2015 Praktisches Jahr, Universitätsklinikum Ulm

11/2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation als Arzt

Seit 01/2016 Weiterbildungsassistent, Klinik für Innere Medizin III, Uniklinik Ulm