

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Kombination von LiCl mit Hedgehog-Inhibitoren als
neuer Ansatz für die Rhabdomyosarkom Therapie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Zaborski, Julian Joachim Otto Ernst

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Professor A. Weber, PhD

Tag der Disputation: 22.05.2019

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	13
1.1 Sarkome und Rhabdomyosarkome.....	13
1.1.1 Embryonale Rhabdomyosarkome.....	13
1.1.2 Spindelzellförmige/ Sklerosierende Rhabdomyosarkome.....	14
1.1.3 Alveoläre Rhabdomyosarkome.....	14
1.1.4 Therapie und Prognose.....	15
1.2 Die Rolle der Glykogensynthase-Kinase 3 in der Signaltransduktion.....	16
1.3 Lithium als GSK-3 Inhibitor.....	18
1.4 Der Hedgehog-Signalweg.....	20
1.4.1 Inhibition des Hedgehog-Signalwegs.....	22
1.4.2 Einfluss des Hedgehog-Signalwegs auf den Zellzyklus.....	22
1.4.3 Apoptoseinduktion in Hedgehog-inhibierten Zellen.....	24
1.4.4 Itraconazol.....	24
1.4.5 GANT61.....	25
1.4.6 Arsentrioxid.....	26
1.5 Ziel der Arbeit.....	27
2 Materialien.....	29
2.1 Verwendete Zelllinien.....	29
2.1.1 Embryonale Rhabdomyosarkom Zelllinie RD.....	29
2.1.2 Spindelzellförmige/ Sklerosierende Rhabdomyosarkom Zelllinie SRH.....	29
2.1.3 Alveoläre Rhabdomyosarkom Zelllinien.....	30
2.1.4 Skelettmuskelzellen (SKMC).....	32
2.2 Zellkulturmedium und Zusätze.....	32
2.3 Inhibitoren und Stocklösungen.....	33
2.4 Chemikalien und Kits.....	33
2.5 Oligonukleotide.....	35
2.6 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.7 Geräte.....	38
2.8 Software.....	40

3	Methoden	41
3.1	Zellkulturmethoden	41
3.1.1	Zellkultur	41
3.1.2	Zellzahlbestimmung	41
3.1.3	Einfrieren von Zellen.....	42
3.1.4	Auftauen von Zellen	42
3.2	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	42
3.2.1	Lyse der Zellen	42
3.2.2	Isolierung der RNA aus dem Zelllysat.....	42
3.2.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	43
3.2.4	DNase-Verdauung.....	43
3.2.5	Reverse Transkription.....	43
3.2.6	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	44
3.3	Untersuchung der Zellvitalität.....	45
3.3.1	Vitalitätstest (MTS-Assay)	45
3.3.2	Koloniebildungstest („Clonogenic Assay“)......	46
3.3.3	3D Koloniebildungstest (3D “Sphäroid Assay“)......	47
3.4	Untersuchung der Apoptose.....	48
3.4.1	Darstellung der Kernfragmentierung mittels Fluoreszenzmikroskopie	48
3.4.2	Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS).....	49
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Einfluss von LiCl und Hh-Inhibitoren auf die Vitalität von RMS Zelllinien... 51	
4.1.1	Dosis-abhängiger Einfluss von LiCl auf die Vitalität von RMS Zelllinien	51
4.1.2	Einfluss der Kombination von LiCl und Hedgehog-Inhibitoren auf die Vitalität von RMS Zelllinien	54
4.2	Inhibition der Koloniebildung in RMS Zelllinien durch LiCl	63
4.3	Einfluss von LiCl auf das Wachstum von RMS Zelllinien in 3D-Sphäroidkulturen.....	65
4.3.1	Sphäroide der RD Zellen	65
4.3.2	Sphäroide der RH-30 Zellen	66
4.3.3	Sphäroide der ZF Zellen	66
4.4	Einfluss von LiCl auf die GLI1 und GSK-3β mRNA Expression in RMS Zelllinien	67
4.4.1	GLI1-mRNA Expression nach Behandlung mit LiCl, ATO und GANT61	67

4.4.2	GSK-3 β -mRNA Expression nach Behandlung mit LiCl, ATO und GANT61.....	69
4.5	Zelltod-Induktion in LiCl-behandelten RMS Zelllinien.....	71
4.5.1	Darstellung der Apoptose-Induktion mittels Fluoreszenzmikroskopie	71
4.5.2	Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	76
4.5.3	Zusammenfassung der Zelltodanalyse	82
5	Diskussion.....	83
5.1	Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs in RMS	84
5.2	GSK-3-Inhibitor LiCl als therapeutischer Ansatz für RMS	84
5.3	Wirksamkeit von Inhibitor kombinationen.....	88
5.3.1	Kombination von LiCl und ATO	89
5.3.2	Kombination von LiCl und GANT61.....	91
5.3.3	Kombination von LiCl, ATO und Itraconazol.....	93
5.4	Fazit und Ausblick.....	95
6	Zusammenfassung	98
7	Abstract.....	100
8	Anhang	102
9	Abbildungsverzeichnis	104
10	Tabellenverzeichnis.....	106
11	Quellen	107
12	Erklärung zum Eigenanteil.....	129
13	Veröffentlichungen.....	130
14	Danksagungen.....	131

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Absorption
Akt/ PKB	Proteinkinase B
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AQP9	Aquaporin 9
aRMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
ATO (A)	Arsentrioxid
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene
c	Konzentration
$C_6H_5O_7^{3-}$	Citrat
CBF1	Centromere Binding Factor 1
CCND	Cyclin D
CDC25B	Cell Division Cycle 25 Homolog B
CDK	Cyclin Dependent Kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	Complementary DNA
CDT1	Chromatin Licensing And DNA Replication Factor 1
Ci	Cubitus interruptus
CK	Casein Kinase
Cl ⁻	Chlorid
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein-Diacetat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COO ⁻	Carbonat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DHH	Desert Hedgehog
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSH	Dishevelled
E	Expression
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2B	Eukaryotic Initiation Factor 2B
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eRMS	Embryonales RMS
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetal Calf Serum
FKHR	Forkhead in Rhabdomyosarcoma
for	Forward Primer (5'-3' Orientierung)
FOXO1	Forkhead Box Protein O1 (=FKHR)
FSC	Vorwärtsstreulicht
FZD	Frizzled
g	Erdbeschleunigung
G0-Phase	Gap Phase 0/ Ruhephase
G1-Phase	Erste Gap Phase
G2-Phase	Zweite Gap Phase
GANT61	Gli-ANTagonist 61
GLI	Glioma-Associated Oncogene Homolog
GS	Glykogen Synthase
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HDAC1	Histone Deacetylase 1
Hh	Hedgehog
I	Itraconazol
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
IHH	Indian Hedgehog
IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1

kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LiCl (L)	Lithiumchlorid
M-Phase	Mitosephase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian Target of Rampamycin
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazoliumsalz
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NICD	NOTCH Intracellular Domain
nm	Nanometer
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
O ₂	Sauerstoff
ORC	Origin Recognition Complex
p38-MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
PAX	Paired Box
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Plate-Count-Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKD1	Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PGP	P-Glycoprotein
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5,-triphosphat

PKA	Proteinkinase A
PKB/ Akt	Proteinkinase B
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PTCH1 (Ptc)	Patched 1
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
RAS	Rat Sarcoma
rev	Reverse Primer (3' -5' Orientierung)
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S-Phase	Synthesephase
scRMS	Sklerosierendes Rhabdomyosarkom
Ser	Serin
SHH	Sonic Hedgehog
SKMC	Skelettmuskelzellen
SMO	Smoothened
sRMS	Spindelzellförmiges Rhabdomyosarkom
SSC	Seitwärtsstreulicht
SuFu	Supressor of Fused
TBP	TATA-Box Binding Protein
TCF	T-Zell Faktor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TP53	Gen des „p53“
Tyr	Tyrosin
VDAC1	Voltage-Dependent Anion-selective Channel 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Δ Ct	Differenz der Ct-Werte des Zielgens und des Referenzgens
$\Delta\Delta$ Ct	Differenz der Δ CT-Werte von unbehandelten und Inhibitor-behandelten Zellen

μl	Mikroliter
μM	Mikromol
NF κ B	Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

1 Einleitung

1.1 Sarkome und Rhabdomyosarkome

Als Sarkome werden maligne solide Tumoren bezeichnet, die aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervorgehen (Yang *et al.* 2014). Man unterscheidet nach Lokalisation zwischen bösartigen Knochen- und Weichteilsarkomen, worunter auch die Rhabdomyosarkome (RMS) fallen (Cavazzana *et al.* 1992; Fletcher *et al.* 2002). RMS entstehen aus Vorläuferzellen der quergestreiften Muskulatur und machen ca. 50% der Weichteilsarkome im Kindesalter und 7% aller pädiatrischen Krebsarten aus (Belyea *et al.* 2012; Arndt *et al.* 2012; Radzikowska *et al.* 2015). Auch wenn der Gesamtanteil der Sarkome an allen bösartigen Tumorerkrankungen bei Erwachsenen bei nur 1% liegt, so beträgt gerade bei Kindern der Anteil über 20% (Burningham *et al.* 2012). Statistisch erkrankt eines von etwa 12.000 Kindern an einem RMS, wobei Jungen etwas häufiger als Mädchen betroffen sind (1,3:1) (Lentze 2007).

Für eine RMS Diagnose werden immunhistochemisch unter anderem Desmin, Myogenin und MyoD1 als Marker untersucht (Fletcher, Unni, and Mertens 2002; Lentze 2007). Außerdem werden verschiedene Subtypen unterschieden, auf die im Folgenden eingegangen wird.

1.1.1 Embryonale Rhabdomyosarkome

Ein Großteil der RMS (> 60%) lässt sich histologisch nach einer H&E Färbung dem embryonalen Subtyp (eRMS) zuordnen und betrifft *meist* Kinder unter 15 Jahren (Fletcher, Unni, and Mertens 2002; Belyea *et al.* 2012). Lokalisiert sind eRMS zu 9 % an den Extremitäten, zu 28 % im Urogenitaltrakt und mit 47% am häufigsten im Kopf und Halsbereich, vor allem in der Orbita (Fletcher, Unni, and Mertens 2002). Nach jetzigem Forschungsstand ist eine genetische Ursache meist ein Verlust der Heterozygotität in der Region 11p15, welche die Gene *IGF2*, *H19* und *CDKN1C* beinhaltet (Fletcher, Unni, and Mertens 2002; Anderson *et al.* 1999). Die Überexpression von *IGF2* ist an der Entstehung, Progression und Metastasierung des Tumors beteiligt (Martins *et al.* 2011). Ebenfalls scheinen Duplikationen in den Chromosomen 2, 8 und 13 eine Rolle zu spielen (Wang-Wuu *et al.* 1988; Gordon *et al.*

2001) , sowie ein Genverlust in Chromosom 16 (Bridge *et al.* 2000; Weber-Hall *et al.* 1996). Eine Mutation auf Chromosom 8 aktiviert das Onkogen RAS (Stratton *et al.* 1989).

Zu den eRMS wurden oftmals ebenfalls spindelzellförmige, botryoide und anaplastische Varianten gezählt. Mittlerweile tendiert man aber dazu, Spindelzell-RMS als eigene Sub-Entität zu betrachten (Zhao *et al.* 2015).

1.1.2 Spindelzellförmige/ Sklerosierende Rhabdomyosarkome

Das spindelzellförmige RMS (sRMS) fand erstmals 1992 in der Literatur Erwähnung und wurde dort als RMS mit einem hohen Differenzierungsgrad und einer niedrigen Malignität beschrieben. Männer zeigten eine höhere Prävalenz, wobei der Tumor häufig paratestikulär oder in der Kopf- und Halsregion lokalisiert war (Cavazzana *et al.* 1992). Später wurde festgestellt, dass vor allem bei Kindern sRMS mit einer niedrigen Malignität zu finden sind, wohingegen Erwachsene hauptsächlich eine sehr aggressive Form entwickeln (Agaram *et al.* 2014). Neben dem sRMS wurde auch eine sklerosierende Form (scRMS) mit einem pseudovaskulären Wachstumsmuster beschrieben (Mentzel and Katenkamp 2000). Aufgrund ähnlicher Morphologie und Klinik werden beide Entitäten in der WHO-Klassifikation als sRMS bzw. scRMS zusammengefasst. Immunhistochemisch sowie zytogenetisch ähnelt das sRMS eher dem eRMS als dem alveolären RMS (aRMS) (Cavazzana *et al.* 1992; Zhao *et al.* 2015). Charakteristisch für sRMS bei Erwachsenen sind Mutationen im MYOD1 Gen (Agaram *et al.* 2014).

1.1.3 Alveoläre Rhabdomyosarkome

Das aRMS zeichnet sich durch kleine, runde Zellen aus, die in ihrer Anordnung histologisch an Lungenbläschen erinnern und lässt sich bei ca. 20% der RMS Patienten diagnostizieren (Fletcher, Unni, and Mertens 2002; Belyea *et al.* 2012). Meist entwickelt sich dieser Tumor in den Extremitäten oder am Torso, ist deutlich aggressiver und metastasiert schneller als das eRMS (Marshall and Grosveld 2012). Die

Mehrheit der Erkrankten sind Jugendliche und junge Erwachsene, doch können Menschen aller Altersklassen ein aRMS entwickeln (Fletcher, Unni, and Mertens 2002). Vor allem chromosomale Translokationen werden für die Entwicklung eines aRMS verantwortlich gemacht, die häufigste findet dabei zwischen den langen Armen der Chromosomen 2 und 13 statt: t(2;13)(q35;q14). Hierbei entsteht ein onkogenes Fusionsprotein, das einerseits aus der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors „Paired Box 3“ (PAX3) und andererseits aus der Transaktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors „Forkhead Box O1“ (FOXO1), auch „Forkhead in Rhabdomyosarcoma“ (FKHR) genannt, besteht. Eine weitere Möglichkeit ist die Fusion der Transaktivierungsdomäne des FOXO1-Gens mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors „Paired Box 7“ (PAX7), welcher auf Chromosom 1 lokalisiert ist (Marshall and Grosveld 2012; Fredericks *et al.* 1995; Sorensen *et al.* 2002). Die so entstehenden Fusionsproteine sind sehr aktive Transkriptionsfaktoren und führen durch die Aktivierung einer Vielzahl von Zielgenen zum Verlust der Proliferations-, Apoptose- und Differenzierungskontrolle (Fletcher, Unni, and Mertens 2002).

1.1.4 Therapie und Prognose

RMS lassen sich je nach Schweregrad in unterschiedliche Stadien einteilen. Zusammenfassend sind die Stadien I und II lokal begrenzt und unterscheiden sich überwiegend in der Tumorgroße, Stadium III ist regional ausgedehnt und bei Stadium IV disseminiert der Tumor bereits (Lentze 2007). Je nach Stadium unterscheiden sich auch die therapeutischen Ansätze. Primär wird auf eine chirurgische Entfernung des Tumors gesetzt. Bei den Stadien II und III können zusätzlich adjuvante, teilweise neoadjuvante Strahlen- und Chemotherapien eingesetzt werden. Die derzeit erfolgsversprechenden Chemotherapeutika sind hierbei Doxorubicin und Ifosfamid. Im letzten Stadium, welches in der Regel mit Metastasen in Lunge, Knochenmark oder Lymphknoten verbunden ist, bleibt meist nur eine palliative Behandlung (Riedel 2012; Eriksson 2010; Oberlin *et al.* 2008).

Auch nach einer operativen Entfernung und Strahlentherapie treten bei etwa 40% der Patienten Rezidive auf, die zu einer Mortalität von 90% führen (Penel *et al.* 2011). Allgemein erwartet man bei eRMS eine günstigere Prognose als bei aRMS (Fletcher,

Unni, and Mertens 2002). Allerdings spielen weitere Faktoren wie Anzahl der Metastasen, Lokalisation des Primärtumors, Größe des Tumors und Grad der Resektion eine Rolle. Zusätzlich ist ein junges Alter des Patienten zum Diagnosezeitpunkt ein positives prognostisches Kriterium (Raney *et al.* 2001).

1.2 Die Rolle der Glykogensynthase-Kinase 3 in der Signaltransduktion

Die Serin/Threonin Kinase Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) wurde als ein Enzym in Skelettmuskeln von Kaninchen entdeckt, das die „Glykogensynthase“ GS phosphoryliert und damit inaktiviert (Embi 1980). Eine stetig steigende Anzahl an Studien zeigt, dass GSK-3 als multifunktionelles Protein in viele zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, neuronales Überleben, Onkogenese und Embryogenese involviert ist (Doble and Woodgett 2003). So ist GSK-3 an mehreren für die Proliferation und Differenzierung wichtigen Signalwegen beteiligt, wie z.B. dem PI3K/Akt-Signalweg, dem Wnt-Signalweg, dem NOTCH-Signalweg und dem Hh-Signalweg (Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011; Kalderon 2002). Dabei phosphoryliert GSK-3 mehr als 40 Proteine, worunter zahlreiche Transkriptionsfaktoren sind (McCubrey *et al.* 2014).

Es existieren zwei Isoformen des GSK-3 Proteins, GSK-3 α und GSK-3 β , die eine zu 85% homologe Sequenz besitzen und in der Kinasedomäne sogar zu 98% übereinstimmen. GSK-3 α besitzt ein Glycin-reiches Ende am N-Terminus, was sich in einem leicht erhöhten Molekulargewicht von 51 kDa, im Vergleich zu 47 kDa bei GSK-3 β , widerspiegelt (Woodgett 1990). Zusätzlich wurden zwei GSK-3 β Varianten entdeckt, die durch alternatives Spleißen entstehen (Schaffer *et al.* 2003; Mukai *et al.* 2002). GSK-3 α und - β werden durch eine konstitutive Tyrosin-Phosphorylierung positiv reguliert (GSK-3 α an Tyr279 und GSK-3 β an Tyr216) und am N-terminalen Ende durch Phosphorylierung eines Serin-Restes (GSK-3 α an Ser21 und GSK-3 β an Ser9) inhibiert (Jope 2003; Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011). Außerdem inaktiviert die p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) GSK-3 ebenfalls durch Phosphorylierung am C-terminalen Ende (Ser389 bzw. Thr390; (Thornton 2008)). Neben dem Einfluss einiger anderer Kinasen gibt es darüber hinaus Hinweise, dass eine Autophosphorylierung an Tyr216 stattfinden kann (Cole *et al.* 2004).

Lithium, das mit Magnesium kompetitiv um die Bindung an Enzymen konkurriert und dadurch auch GSK-3 inhibiert, wird bereits seit über 60 Jahren als Phasenprophylaktikum klinisch eingesetzt (Curran and Ravindran 2014). Neuere GSK-3 Inhibitoren sind kompetitive Hemmstoffe, wie z.B. Alsterpaullone, die mit ATP konkurrieren (Doble and Woodgett 2003) oder ATP unabhängig und somit noch spezifischer wirken (Phukan *et al.* 2010).

Im Wnt-Signalweg bildet GSK-3 β einen Komplex mit dem „Adenomatous-Polyposis-Coli-Protein“ (APC), Axin, der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und „Dishevelled“ (DSH), um das ebenfalls gebundene β -Catenin zu phosphorylieren. Dies leitet die Ubiquitinierung und damit den Abbau von β -Catenin durch Proteasomen ein. Wird GSK-3 nach Bindung von Liganden der Wnt-Familie an einen Transmembranrezeptor der „Frizzled“ (FZD) Familie inhibiert, reichert sich β -Catenin im Zellkern an und veranlasst zusammen mit den Transkriptionsfaktoren „T-cell Factor“ (TCF) und „Lymphoid Enhancer Factor“ (LEF) die Expression bestimmter Gene (Phiel and Klein 2001; Doble and Woodgett 2003).

Der PI3K/PKB-Signalweg wird durch die Bindung von Insulin an den Insulin Rezeptor sowie die Bindung anderer Wachstumsfaktoren an verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) aktiviert. Daraufhin wird durch die „Phosphoinositid-3-Kinase“ (PI3K) der „second messenger“ Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) produziert, an den sowohl die Proteinkinase B (PKB), auch als Akt bezeichnet, als auch die „Phosphoinositide Dependent Kinase 1“ PDK1 binden. PKB wird daraufhin durch Phosphorylierung aktiviert und inhibiert durch Phosphorylierung die konstitutiv aktive GSK-3. Die Folge ist im Insulin-Signalweg eine Aktivierung der Glykogensynthese und des „eukaryotic Initiation Factor 2B“ (eIF2B) sowie eine Hemmung des „Insulin Receptor Substrate-1“ (IRS-1), einem Inhibitor des Insulinrezeptors (Gould and Manji 2005; Mackenzie and Elliott 2014).

Der NOTCH-Signalweg wird zumeist durch Zell-Zell-Kontakte aktiviert, wobei membranständige Liganden der Delta-like oder Jagged Familie einer Nachbarzelle eine Spaltung von Mitgliedern der Transmembranrezeptor-Familie „NOTCH“ einleiten. Die intrazelluläre Domäne (NICD) transloziert in den Zellkern und beeinflusst dort, unter Bindung von Transkriptionsfaktoren wie dem „Centromere Binding Factor“ (CBF1), die Genexpression. GSK-3 erhöht die NICD-abhängige Genexpression, indem es NICD

phosphoryliert und so die Degradierung verhindert. Im Gegensatz dazu kann Akt die NICD Aktivität negativ regulieren (McCubrey *et al.* 2014; Song *et al.* 2008).

Im Hh-Signalweg leitet eine Phosphorylierung durch GSK-3, Proteinkinase A (PKA) oder „Casein Kinase 1“ (CK1) den Abbau der GLI-Proteine in Proteasomen ein (Jia *et al.* 2002; Price and Kalderon 2002) (siehe Abb. 1).

1.3 Lithium als GSK-3 Inhibitor

Lithium ist ein Alkali-Metall mit der Ordnungszahl 3, einer atomaren Masse von 6,94 Da und der Elektronenkonfiguration $[\text{He}]2s^1$. Den Einzug in die Medizin erlebte es vor über 60 Jahren, als John Cade Lithium als Mittel gegen psychische Erkrankungen beschrieb (Cade 1949) und es daraufhin vor allem gegen bipolare Störungen eingesetzt wurde (Ronchi *et al.* 2010; Freland and Beaulieu 2012). Verabreicht wird das Kation mit Carbonat (COO^-), Citrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$) oder Chlorid (Cl^-) als Salz (Freland and Beaulieu 2012; Kaufmann *et al.* 2011). Seine therapeutische Dosis im Plasma liegt zwischen 0,5 – 1,5 mM (Phiel and Klein 2001). Dabei hat Lithium nachweislich die Selbstmordrate und manische Episoden bei Menschen mit Depressionen, bipolaren und schizoaffektiven Störungen verringert (Bowden 2000; Cipriani *et al.* 2005; Muller-Oerlinghausen *et al.* 2005; Tondo and Baldessarini 2009). Bei Langzeitbehandlungen konnten als unerwünschte Nebenwirkungen ein Tremor, das Absterben von Purkinje-Zellen (Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011) und eine schädliche Wirkung für die Nieren (Karaosmanoglu *et al.* 2013) festgestellt werden. Eine weitere Folge kann ein Hyperparathyreoidismus sein, wobei unklar ist, ob die Langzeittherapie einen unterstützenden oder auslösenden Effekt hat (Szalat *et al.* 2009).

Lithium inhibiert eine ganze Reihe Enzyme, darunter die Inositolmonophosphatase, Phosphoglucomutase (Quiroz *et al.* 2004), Bisphosphat-3'-Nucleotidase (Spiegelberg *et al.* 2005), Cyclooxygenase (Rapoport and Bosetti 2002), Proteinkinase B (Mora *et al.* 2002) und GSK-3 (Cohen and Goedert 2004; Klein and Melton 1996; Mora *et al.* 2002). Der Cofaktor Magnesium wird bei steigender Lithiumkonzentration durch das monovalente Kation Lithium ersetzt wodurch die Kinaseaktivität von GSK-3 inhibiert wird (Freland and Beaulieu 2012; Ryves and Harwood 2001). Zusätzlich steigt die Phosphorylierungsrate von GSK-3 β am inhibitorischen Ser9, was wahrscheinlich durch

die Hemmung einer Phosphatase verursacht wird (Jope 2003). Somit wirkt Lithium auf GSK-3 β als direkter Inhibitor durch kompetitive Hemmung und als indirekter Inhibitor durch Verhinderung der hydrolytischen Phosphatabspaltung (siehe Abb. 1) (Klein and Melton 1996).

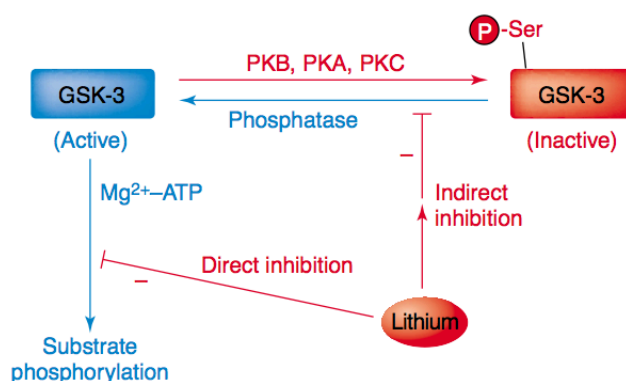


Abbildung 1: Inhibitorische Wirkung von Lithium auf GSK-3 Die direkte Inhibition von GSK-3 löst Lithium über kompetitive Hemmung aus, indem es den Cofaktor Magnesium aus seiner Bindungsstelle verdrängt. Die indirekte Inhibition von GSK-3 wird durch die Hemmung einer Phosphatase verursacht. Dadurch steigt die Phosphorylierungsrate am inhibitorischen Ser9 und GSK-3 ist inaktiv; Abbildung aus Jope 2003, Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes

Da Lithium viele Enzyme beeinflusst, greift es auch in eine Vielzahl von Signalwegen ein und wirkt damit nicht nur auf die Psyche des Menschen. Im Laufe der Zeit wurde festgestellt, dass Patienten mit neurologischen Erkrankungen, die mit Lithiumchlorid (LiCl) behandelt wurden, seltener einen malignen Tumor entwickeln (Cohen *et al.* 1998). Seitdem haben einige Studien eine Beteiligung von GSK-3 β an der Tumorentstehung und Progression gezeigt, wodurch GSK-3 zu einem möglichen therapeutischen Ziel bei Krebsarten wie Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom, Leberkarzinom, kolorektalem Karzinom und Hautkrebs wird (Huang *et al.* 2011; McCubrey *et al.* 2014). Allerdings gibt es auch kontroverse Veröffentlichungen, die eine Hemmung von GSK-3 β als krebsfördernd beschreiben, da GSK-3 auch eine Tumor-Suppressor Funktion hat (Cohen and Goedert 2004; Chen *et al.* 2014) und durch GSK-3-Inaktivierung die Onkogen-Expression gefördert wird (Doble and Woodgett 2003). Die Rolle von GSK-3, und damit auch die Wirkung spezifischer Inhibitoren, ist

bei jeder Tumorart individuell. Positive Ergebnisse mit GSK-3-Inhibitoren in ersten klinischen Studien zeigen die Möglichkeiten einer therapeutischen Anwendung (McCubrey *et al.* 2014; Lubner *et al.* 2011; Gray *et al.* 2015).

1.4 Der Hedgehog-Signalweg

Nüsslein-Volhard und Wieschaus entdeckten 1980 den Hedgehog-Signalweg in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, wo er eine wesentliche Rolle in der Embryonalentwicklung spielt. Auch beim Menschen steuert der Signalweg während der Embryogenese Zellteilung und -differenzierung (Choudhry *et al.* 2014; Ingham and McMahon 2001). Im adulten Körper ist der Hh Signalweg an der Geweberegeneration und an der Erhaltung der Stammzellen beteiligt (Roma *et al.* 2012).

Der Hh-Signalweg umfasst in *Drosophila melanogaster* drei Schlüsselproteine: den Liganden „Hedgehog“ (Hh), den ohne Ligandenbindung inhibierenden Rezeptor „Patched“ (Ptch) und das G-Protein gekoppelte Signalprotein „Smoothed“ (Smo) (Li *et al.* 2012). Beim Menschen gibt es drei verschiedene Hedgehog-Liganden: „Sonic Hedgehog“ (SHH), „Desert Hedgehog“ (DHH) und „Indian Hedgehog“ (IHH). In Abwesenheit der Liganden ist PTCH1 aktiv und inhibiert den Transmembranrezeptor SMO. Binden allerdings autokrin oder parakrin sekretierte Hh-Liganden an PTCH1, wird die hemmende Wirkung aufgehoben und SMO akkumuliert in den Cilien der Zelle (Peng *et al.* 2013; Choudhry *et al.* 2014). Dies stabilisiert die eigentlichen Effektoren, die Transkriptionsfaktoren „Glioma-associated Oncogen Homolog 1, 2, 3“ (GLI1, GLI2, GLI3). Sie gehören zur Gruppe der Zinkfingerproteine und können an das Protein „Suppressor of Fused“ (SuFu) binden. Im Komplex reguliert SuFu die Funktion der GLI-Proteine, indem es beispielsweise über Aktivator- oder Repressorfunktion entscheidet (Cherry *et al.* 2013; Peng *et al.* 2013; Roma *et al.* 2012). Nach Eintritt in den Zellkern binden die GLI-Proteine an spezifische Promotorregionen und wirken so auf die Genexpression. Da *GLI1* und *PTCH1* selber Zielgene des Hh-Signalwegs sind, kann es durch erhöhte GLI1-Expression zu einer positiven Rückkopplung, oder durch erhöhte PTCH1-Expression zu einer negativen Rückkopplung kommen (Katoh and Katoh 2009; Roma *et al.* 2012). Einige Protoonkogene sind ebenfalls Zielgene des Hh-Signalwegs, unter anderem der „Insulin-like Growth Factor 2“ (*IGF2*) und „Cyclin D1“ (*CCND1*) sowie „Cyclin D2“ (*CCND2*) (Hahn *et al.* 2000; Katoh and Katoh 2009).

Bei einigen Tumorerkrankungen liegen Mutationen vor, die den Hh-Signalweg betreffen. So können SMO-Mutationen (Xie 1998), PTCH1-Mutationen (Johnson *et al.* 1996), Hh-Liganden-Überexpression (Berman 2003), GLI1-Überexpression (Kerl *et al.* 2014) sowie besondere GLI1-Splicevarianten (Rimkus *et al.* 2016) durch Veränderung der Signalwegaktivität die Proliferation, die Migration, Invasion und die Angiogenese von Krebszellen fördern.

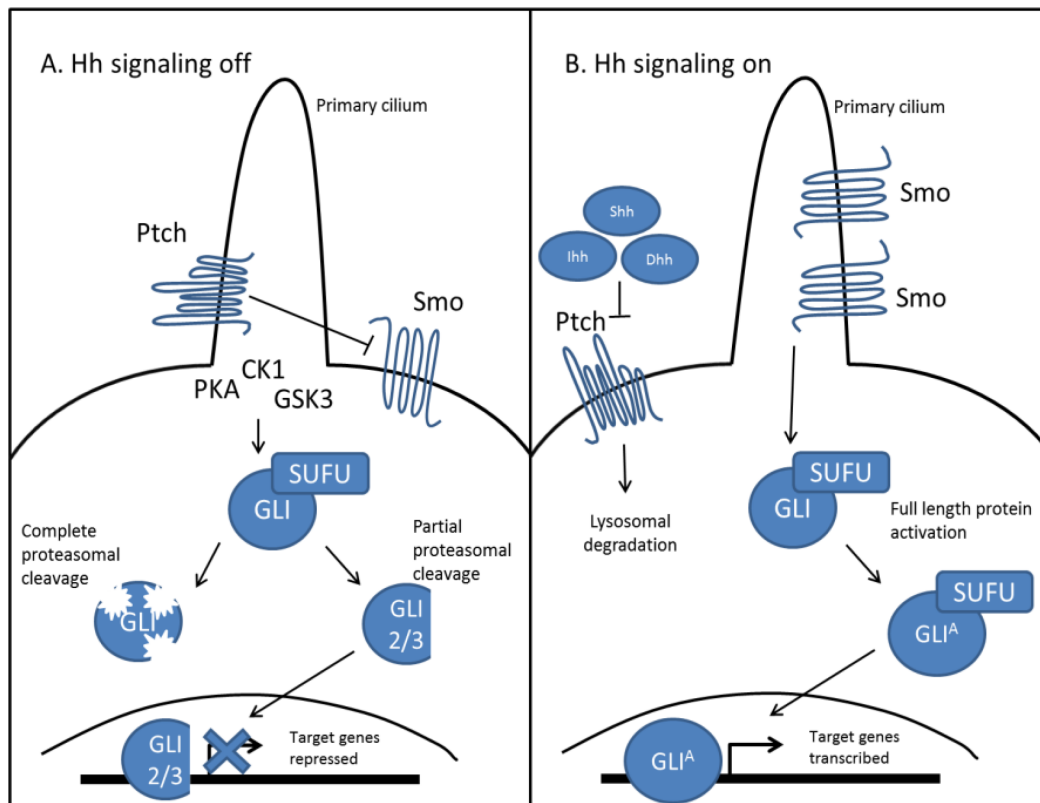


Abbildung 2: Der Hedgehog-Signalweg. A. Im inaktiven Zustand ohne Liganden: PTCH hemmt SMO und die GLI-Proteine werden unter Beteiligung der GSK-3 abgebaut. Die Transkription wird dadurch unterdrückt. B. Im aktiven Zustand mit Liganden: Die Hh-Liganden hemmen PTCH wodurch SMO in den Cilien akkumuliert und die GLI-Proteine stabilisiert werden. Als Folge kommt es zur Transkription der Zielgene. Abbildung aus Cannonier and Sterling 2010, The Role of Hedgehog Signalin in Tumor induced Bone Disease.

Der Einfluss des Hh-Signalwegs auf die Entstehung von RMS wurde zuerst bei Ptch-heterozygoten Mäusen beschrieben, welche zahlreiche Symptome des Gorlin-Syndroms aufweisen. Ursache dieser Krankheit beim Menschen ist eine Mutation im PTCH1-Gen, die autosomal dominant vererbt wird und verschiedene Symptome wie

Skelettanomalien, Zysten sowie die Neigung zur Ausbildung diverser Tumore auslöst (Hahn *et al.* 1998). PCR-Ergebnisse unterstützen diese Entdeckung und zeigen eine Überexpression der Gene *SHH*, *IHH*, *DHH*, *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* und *GLI2* in humanen RMS Zelllinien (Kawabata 2011). Auch über immunhistochemische Färbungen konnte die erhöhte Expression dieser Proteine bestätigt werden (Kawabata 2011; Ouo 2010).

Die Hemmung des Hh-Signalweges stellt somit eine potentielle Behandlungsmöglichkeit für RMS Patienten dar. In verschiedenen experimentellen Studien wurden bereits Erfolge mit Hh-Inhibitoren erzielt, darunter GANT61 und Cyclopamin (Tostar *et al.* 2010; Kawabata *et al.* 2011), Arsen-Trioxid (Ding *et al.* 2014; Boehme *et al.* 2016) und Betulinsäure (Eichenmuller *et al.* 2010). Auch zeigten Hemmstoffe, die primär in andere Signalwege eingreifen, inhibitorische Wirkung auf den Hh-Signalweg, wie beispielsweise der PKA-Inhibitor Forskolin (Yamanaka *et al.* 2011).

1.4.1 Inhibition des Hedgehog-Signalwegs

Da der Hh-Signalweg Einfluss auf die Tumorentstehung und Progression nimmt, ist seine Inhibition ein vielversprechender Ansatz für die Tumorthherapie. Im Folgenden werden die Verbindungen zwischen dem Hh-Signalweg und dem Zellzyklus sowie der Apoptoseinduktion betrachtet. Im Anschluss werden die drei Inhibitoren, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, vorgestellt.

1.4.2 Einfluss des Hedgehog-Signalwegs auf den Zellzyklus

Im Zellzyklus wird die Erbinformation verdoppelt, um sie danach auf zwei identische Tochterzellen zu verteilen. Man unterscheidet G0-, G1-, S- und G2-Phase, die als Interphase zusammengefasst werden, sowie die Mitose, welche in der M-Phase stattfindet (Harper and Brooks 2005).

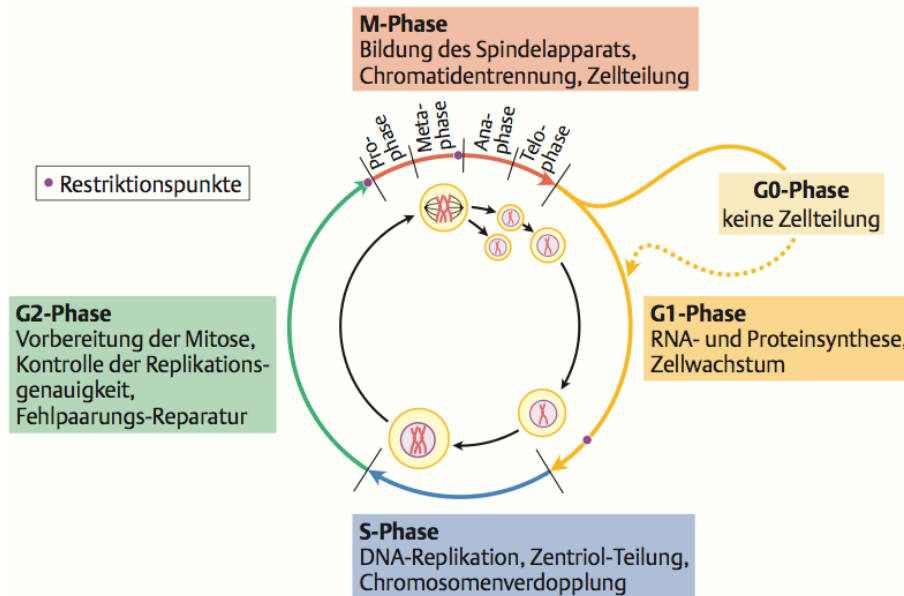


Abbildung 3: Der Zellzyklus. In der G1-Phase werden die benötigten Proteine für die Verdopplung der DNA synthetisiert und die Zelle wächst. Darauf folgt die S-Phase mit der DNA-Replikation. In der G2-Phase wird die DNA auf Fehlpaarungen kontrolliert und weitere Proteine werden synthetisiert. Aus der M-Phase gehen zwei Tochterzellen mit gleichen genetischen Informationen hervor. Sind Wachstumssignale vorhanden, tritt die Zelle erneut in die G1-Phase ein, beim Fehlen dieser Signale wird sie in den Ruhezustand, die G0-Phase, versetzt. Abbildung aus Rassow, Hauser *et al.* 2012, Duale Reihe Biochemie.

Der Ablauf des Zellzyklus wird an verschiedenen Kontrollpunkten kontrolliert (Bucher and Britten 2008). Für diesen Prozess sind die drei wichtigsten Protein-Familien: die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die Cycline und die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CKIs). CDKs werden bei Erreichen einer bestimmten Cyclin-Konzentration aktiviert und phosphorylieren daraufhin andere Proteine, die in den Ablauf des Zellzyklus involviert sind (Gillett and Barnes 1998). Da die fehlerhafte Regulation des Zellzyklus bei der Entstehung von Tumoren eine große Rolle spielt, ist das Anhalten des Zyklus ein therapeutisches Ziel. Auch der Hh-Signalweg treibt den Zellzyklus durch erhöhte GLI1-abhängige Gen-Expression an (Wang *et al.* 2017; Stecca and Ruiz 2010). In Chondrosarkom-Zellen stoppte die Herunterregulierung der GLI-Aktivität die Zellproliferation und es kam zum Zyklusarrest im Übergang von der G2- in die M-Phase (Sun *et al.* 2014). In Aderhautmelanom-Zellen führte die Hh-Inhibition wiederum zu einem Zyklusarrest in der G1-Phase (Duan *et al.* 2014). Zielgene des Hh-Signalwegs codieren unter anderem für die Cycline D1 und D2. Auch die Expression

von Cyclin E, Cyclin B1 und CDC25B wird indirekt über den Hh-Signalweg beeinflusst (Katoh and Katoh 2009). Die Cycline des D-Typs bilden mit CDK4 und CDK6 Komplexe, die für eine Fortführung des Zellzyklus in der G1-Phase sorgen, CDC25B ist hingegen entscheidend für den Übergang von der G2-Phase in die M-Phase (Sherr and Roberts 1999).

1.4.3 Apoptoseinduktion in Hedgehog-inhibierten Zellen

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist zusammen mit der Zellteilung unverzichtbar für die Embryogenese, aber auch für die spätere Aufrechterhaltung der Organ- und Gewebefunktion. Überflüssige und geschädigte Zellen werden durch Apoptose gezielt entfernt (Norbury and Hickson 2001). Man unterscheidet zwei wesentliche Aktivierungswege der Apoptose: den extrinsischen und den intrinsischen Weg (Igney and Krammer 2002).

Als antiapoptotisches Protein ist Bcl-2 ein potenzielles Ziel bei Krebsbehandlungen. Bcl-2 inhibiert den Abbau von Procaspasen und verhindert die Freisetzung von proapoptischen Faktoren, wie Cytochrom C und Apoptose-induzierender Faktor, aus dem Mitochondrium (Tsujiimoto 1998; Chao and Korsmeyer 1998). In einigen Studien wurden schon positive Ergebnisse durch die Inhibition des Hh-Signalwegs und die darauf folgende Herunterregulierung von Bcl-2 beschrieben (Katoh and Katoh 2009). So konnte in Pankreastumoren (Mo *et al.* 2011), Prostata Tumoren (Farooqi *et al.* 2011), Medulloblastomen (McCall *et al.* 2007), Basalzellkarzinomen (Kurita *et al.* 2011) und Chondrosarkomen (Sun *et al.* 2014) die Einleitung der Apoptose festgestellt werden.

1.4.4 Itraconazol

Die Abbildung 4 zeigt die Strukturformel von Itraconazol, einem lipophilen Triazol, welches nur schwer im Blut löslich ist (Grant and Clissold 1989). In der Medizin wird es meist oral verabreicht, um Pilzinfektionen zu bekämpfen. Angriffsziel ist die Häm-Gruppe von Cytochrom P-450 abhängigen Enzymen, wodurch es die Ergosterol-Synthese, einem Zellmembranbestandteil bei Pilzen, inhibiert (Pandya *et al.* 2003; Kim *et al.* 2010). Neuer ist die Erkenntnis, dass Itraconazol neben der antimykotischen

Wirkung als SMO-Antagonist auch in den Hh-Signalweg eingreift, indem es die Akkumulation von SMO in den Cilien verhindert, wodurch eine Liganden-abhängige Aktivierung des Hh-Signalwegs unterbunden wird (Kim *et al.* 2010). Des Weiteren werden andere Einflüsse auf den Zellstoffwechsel beschrieben, die ebenfalls das Tumorwachstum hemmen können, wie zum Beispiel die Veränderungen in Glykolysierung und Phosphorylierung des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (VEGFR2) (Kasper and Toftgard 2013) oder die Verringerung der „Mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR)-Aktivität (Xu *et al.* 2010).

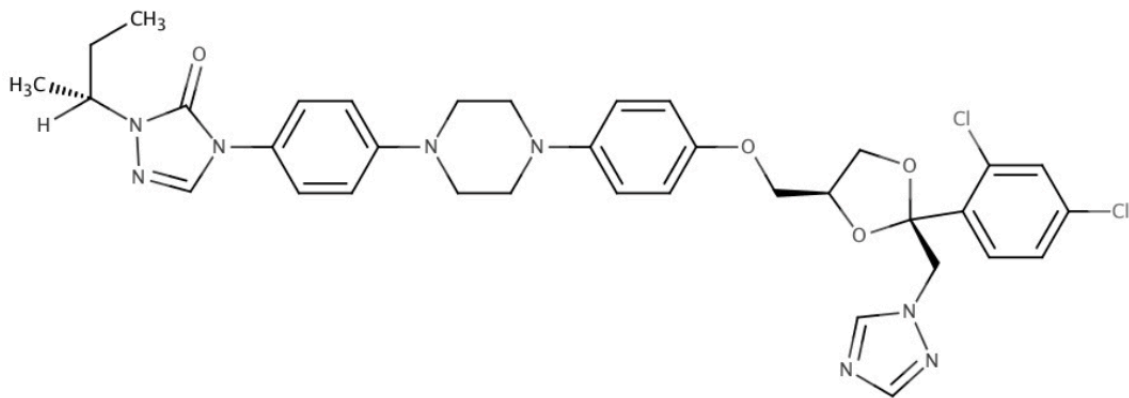


Abbildung 4: Enantiomer von Itraconazol.

1.4.5 GANT61

Die Hh-Signalkaskade kann auch auf Ebene der GLI Transkriptionsfaktoren SMO-unabhängig aktiviert werden (Tostar *et al.* 2010). So können Genamplifikationen die Überexpression der GLI Transkriptionsfaktoren zur Folge haben (Roberts *et al.* 1989; Sasai *et al.* 2006) und andere Signalwege können mit dem Hh-Signalweg interagieren (Roma *et al.* 2012), was ebenfalls zu einem Anstieg der GLI Proteine führen kann. Bei verschiedenen Tumorarten wurde zudem das Fehlen der primären Cilien beschrieben, dem Startpunkt der SMO-abhängigen Hh-Signalkaskade (Hassounah *et al.* 2012). Auch direkt durch Mutation im SMO Protein können spezifische SMO Inhibitoren wirkungslos werden, da sie SMO nicht mehr binden können (Yauch *et al.* 2009).

Da früh eingreifende Hh-Inhibitoren wie Cyclopamin bei manchen Tumoren wirkungslos sind und sie eine schlechte Bioverfügbarkeit und Stabilität besitzen, wurde ein neuer Inhibitor auf GLI-Ebene entwickelt (Lauth *et al.* 2007): Der in Abbildung 5

dargestellte Gli-ANTagonist 61 bindet direkt an die GLI Proteine und verringert die GLI1 und GLI2 abhängige Transkription durch Hemmung der DNA-Bindung im Zellkern (Tostar *et al.* 2010). Im Falle von GLI1 dockt GANT61, unter Bildung zweier Aminbindungen, an die Aminosäuren E119 und E167 an (Agyeman *et al.* 2014). Vorher wird GANT61 durch spontane hydrolytische Abspaltung zu der aktiven Form GANT61-Diamin (Wickstrom *et al.* 2013). Die Bindung an die GLI-Proteine erfolgt dabei auch nachdem diese bereits im Komplex mit der DNA vorliegen (Agyeman *et al.* 2014).

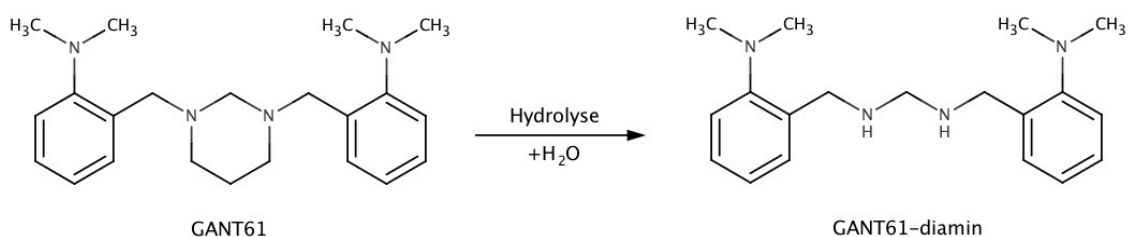


Abbildung 5: Reaktion von GANT61 zu GANT61-diamin mit Strukturformeln.

1.4.6 Arsentrioxid

Arsen findet seit über 2000 Jahren für die Behandlung von Syphilis, Schuppenflechte und Geschwüren Verwendung (Efferth *et al.* 2007; Miller *et al.* 2002). Es wurden allerdings auch Giftmorde mit Arsen verübt, da es geruch- und geschmacklos ist und lange nicht nachgewiesen werden konnte (Bentley and Chasteen 2002). Heutzutage wird es, wie in Abbildung 6 dargestellt, in Form von Arsentrioxid (ATO) erfolgreich zur Behandlung der Promyelozytenleukämie eingesetzt (Antman 2001). Die Nebenwirkungen sind in der intravenös verabreichten Dosis von 10 mg/ Tag sehr gering und betreffen meist den Gastrointestinaltrakt oder die Haut (Shen *et al.* 1997).

Einige Studien zeigen auch die Wirksamkeit von Arsen bei soliden Tumoren, da es die Tumorentstehung und Progression hemmt (Beauchamp *et al.* 2011; Plataniias 2009) sowie Apoptose induziert (Plataniias 2009; Jung *et al.* 2006). Dies passiert zum einen durch die Beeinflussung des Hh-Signalwegs, wo ATO durch die Bindung an GLI1 und GLI2 die Expression ihrer Zielgene verhindert (Beauchamp *et al.* 2011; Kim *et al.* 2009). Auch die Angiogenese wird durch die ATO-abhängige Hemmung der „Vascular

Endothelial Growth Factor“ (VEGF) Expression unterbunden (Roboz *et al.* 2000). Zusätzlich erzeugt ATO reaktive Sauerstoffspezies, die ebenfalls zur Apoptose führen können (Sertel *et al.* 2012).

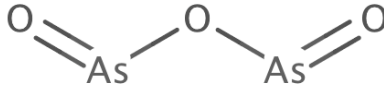


Abbildung 6: Strukturformel von Arsentrioxid.

1.5 Ziel der Arbeit

Das RMS tritt als häufigstes Weichteilsarkom bei Kindern auf. Dennoch ist die Anzahl der jährlich diagnostizierten RMS insgesamt sehr gering, wodurch diese Tumorentität nur unzureichend erforscht ist. Nach wie vor werden unspezifische chemotherapeutische Kombinationstherapien genutzt, die allerdings, oft aufgrund von Resistenzen, nicht die gewünschten Effekte bringen (Kashi *et al.* 2015). Einige Studien zeigen, dass der Hh-Signalweg in diesen Tumoren übermäßig aktiv ist und damit ein potientes Angriffziel bietet (Zibat *et al.* 2010; Yamanaka *et al.* 2011; Tostar *et al.* 2010; Oue 2013; Kawabata *et al.* 2011; Boehme *et al.* 2016).

Daneben wurden auch Erfolge durch die Inhibition der GSK-3 beschrieben, welche in einer Vielzahl von Signalwegen involviert ist (McCubrey *et al.* 2014). In RMS Zellen konnte durch GSK-3-Inhibitoren eine Verringerung der Zellproliferation und eine Apoptoseinduktion erreicht werden (Zeng *et al.* 2010; Chen *et al.* 2014).

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von LiCl, das unter anderem GSK-3 inhibiert, auf die Vitalität, Koloniebildung und Apoptoseinduktion von vier RMS Zelllinien untersucht. Von den vier untersuchten Zelllinien sind RD (eRMS) und RH-30 (aRMS) kommerziell erhältliche Linien, die schon in zahlreichen anderen Forschungsprojekten untersucht wurden, wohingegen die Zelllinien ZF (aRMS) sowie SRH (sRMS) am Universitätsklinikum Tübingen neu etabliert wurden. Mit zwei alveolären und einem embryonalen sowie einem spindelzelligen, sklerosierenden RMS erhält man somit Ergebnisse, die das ganze Spektrum der RMS berücksichtigen.

Um Wechselwirkungen des Hh-Signalwegs mit der GSK-3 Aktivität zu untersuchen, wird außerdem die Kombination von Lithium mit den GLI-Inhibitoren ATO und

GANT61 in Vitalitäts- und Apoptose-Assays getestet. Ebenso wird die Wirkung einer dreifachen Kombination aus Lithium, ATO und dem SMO-Antagonisten Itraconazol auf die Zellvitalität untersucht. Die Analyse der Expression der *GSK-3 β* und *GLII* Gene nach Behandlung mit den einzelnen oder kombinierten Inhibitoren gibt Aufschluss über die Aktivität der Signalwege.

Dabei werden ebenfalls Versuche mit gesunden Skelettmuskelzellen durchgeführt, um die selektive Wirkung der verwendeten Inhibitorkonzentrationen auf Tumorzellen sicherzustellen.

Zusammenfassend sollen die Ergebnisse dieser Arbeit Aufschluss über die mögliche Eignung der GSK-3-Hemmung durch Lithium in Verbindung mit Hh-Inhibitoren für eine zukünftige Therapie von RMS geben. Da alle Hemmstoffe, bis auf GANT61, bereits als Arzneimittel zugelassen sind (Phiel and Klein 2001; Kim *et al.* 2010; Miller *et al.* 2002), könnte dies eine schnell anwendbare Alternative oder Unterstützung zu herkömmlichen Therapien bieten.

2 Materialien

2.1 Verwendete Zelllinien

2.1.1 Embryonale Rhabdomyosarkom Zelllinie RD

Die RD Zelllinie wurde von ATCC[®] bezogen (Katalognummer: CCL-136TM) und ist eine der am häufigsten verwendeten RMS Zelllinien (Hinson *et al.* 2013). Die Zellen stammen von der Beckenbiopsie einer 7-jährigen Spenderin, die bereits mit dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid und Bestrahlung behandelt wurde (McAllister *et al.* 1969). RD Zellen lassen sich nach ihrer Histologie und durch ihren hyperdiploiden Chromosomensatz mit 51 Chromosomen zu den eRMS zuordnen. Bekannte genetische Besonderheiten sind eine Amplifikation des *MYC* Onkogens, eine Q61H Mutation von *NRAS* und eine homozygote Mutation von *TP53* (Hinson *et al.* 2013). Abb. 7 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie RD.

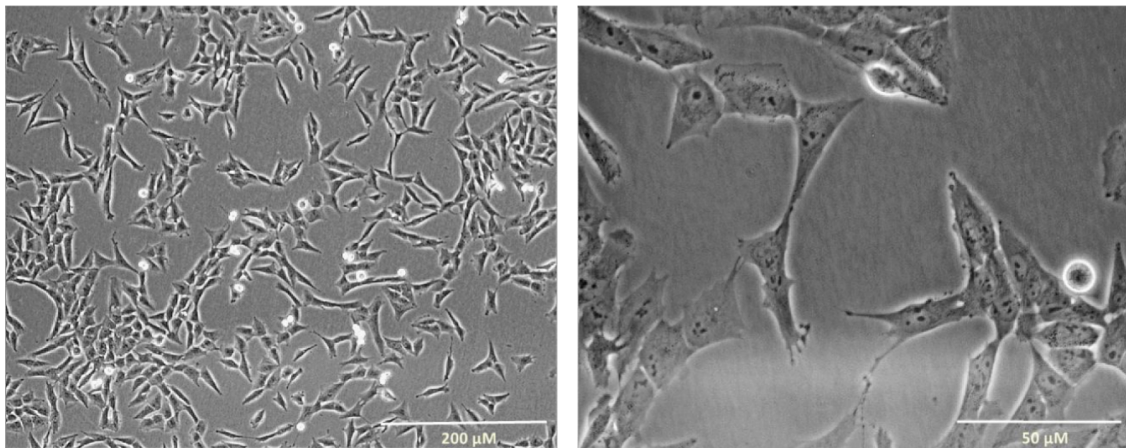


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme von RD Zellen (DM IRBE, Leica, Wetzlar).

2.1.2 Spindelzellförmige/ Sklerosierende Rhabdomyosarkom Zelllinie SRH

Die SRH Zelllinie wurde von Dr. rer. nat. Sabine Schleicher an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen etabliert. Die Zellen stammen aus dem Unterschenkel einer 25-jährigen Patientin, die im Januar 2009 im Stadium IV der Erkrankung diagnostiziert wurde und zu diesem Zeitpunkt schon Metastasen in der Schädelkalotte aufwies. Es folgte eine neoadjuvante Chemotherapie mit Vincristin, Actinomycin D, Ifosfamid, Doxorubicin, Carboplatin und Etoposid. Im Juni 2009 wurde

der Unterschenkel amputiert und das Tumorstadium pT2b festgestellt. Im Dezember des Jahres verstarb die Patientin. Abb. 8 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie SRH.

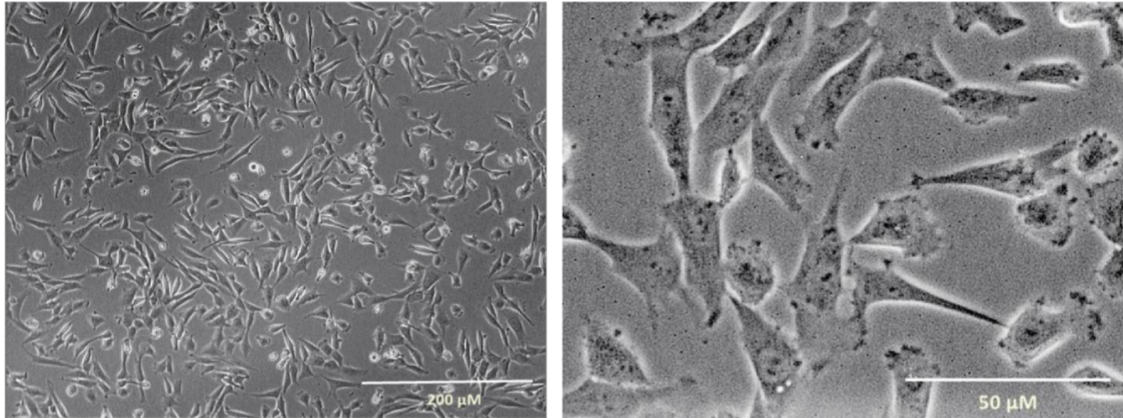


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme von SRH Zellen (DM IRBE, Leica, Wetzlar).

2.1.3 Alveoläre Rhabdomyosarkom Zelllinien

2.1.3.1 RH-30

Die Zelllinie RH-30 wird von ATCC[®] unter dem Namen SJCRH30 [RC13, RMS 13, SJRH30] geführt (Katalognummer: CRL-2061TM). Die Zellen stammen aus einer Knochenmetastase eines 16-jährigen, der zum Zeitpunkt der Entnahme noch keine Behandlung bekommen hatte (Hinson *et al.* 2013). Es findet sich eine t(2;13)(q35;q14) Chromosomentranslokation, welche ebenfalls bei anderen RMS entdeckt wurde (Douglass *et al.* 1987). Außerdem enthalten die Zellen zwischen 51-87 Chromosomen und damit einen nahezu triploiden Satz. Die Zelllinie hat eine heterozygote *p53*-Mutation und eine Amplifikation der 12q13-q15 Region, in der auch *CDK4* codiert ist (Hinson *et al.* 2013). Abb. 9 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie RH-30.

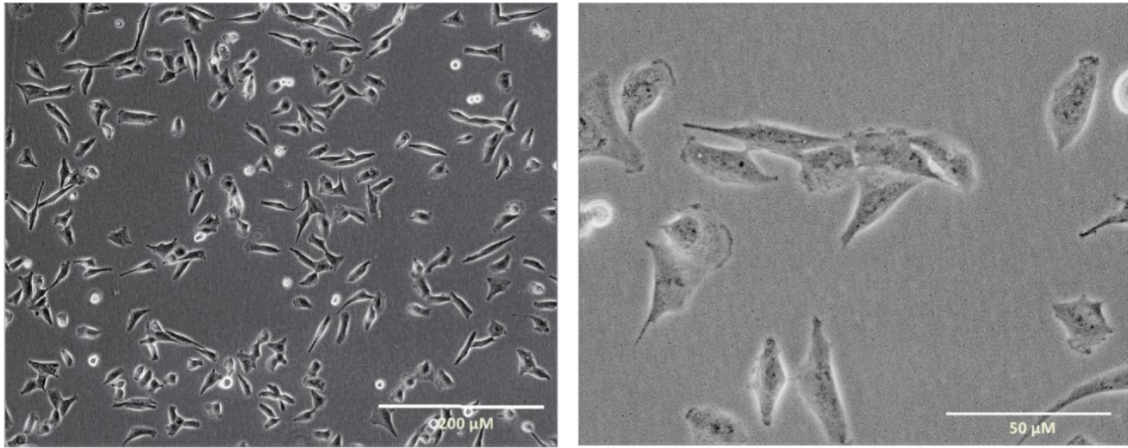


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahme von RH-30 Zellen (DM IRBE, Leica, Wetzlar).

2.1.3.2 ZF

Die ZF Zelllinie wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen von Dr. rer. nat. Sabine Schleicher etabliert. Die Zellen stammen von einer 7-jährigen Patientin und wurden bei Resektion des Primärtumors aus der Wade gewonnen. Bereits im Vorfeld fand eine neoadjuvante Chemotherapie mit den Kombinationen Docetaxel und Cyclophosphamid, Ifosfamid, Vincristin und Actinomycin sowie Ifosfamid, Vincristin und Adriamycin statt. Die Patientin hatte zum Diagnosezeitpunkt bereits Metastasen in Lunge, Knochen, Muskeln und Lymphknoten. Es konnte eine t(1;13) Chromosomentranslokation und die Expression des Fusionsproteins PAX7/FOXO1 festgestellt werden. Die Zellen wachsen in Kultur in mehreren Schichten übereinander. Abb. 10 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie ZF.

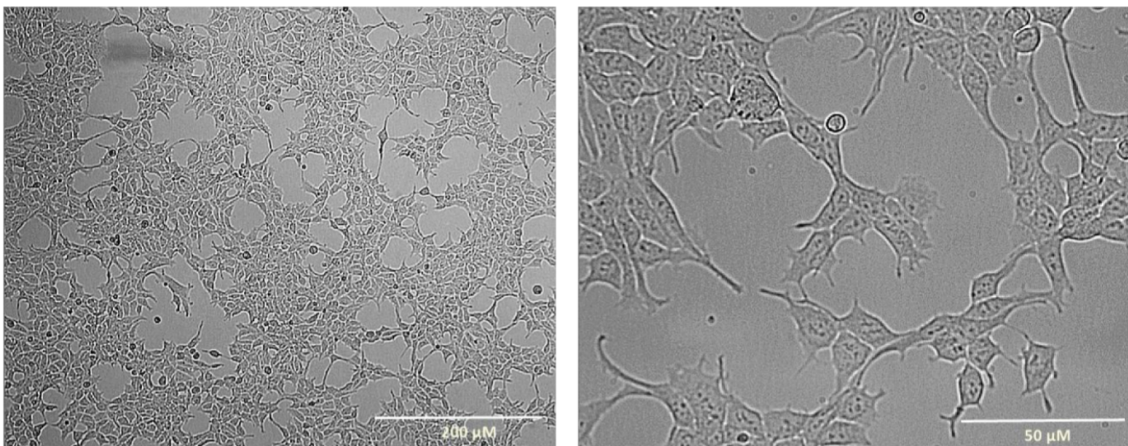


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme von ZF Zellen (DM IRBE, Leica, Wetzlar).

2.1.4 Skelettmuskelzellen (SKMC)

Die primären Skelettmuskelzellen wurden bei PromoCell (Katalognummer: C-12530) gekauft. Die Zellen werden aus Skelettmuskeln adulter Spender isoliert. Abb. 11 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der SKMC.

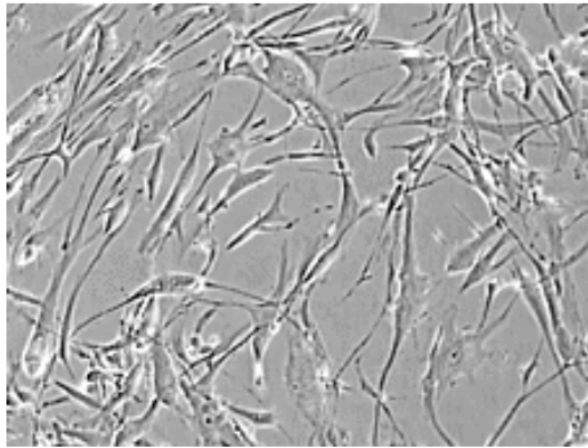


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von SKMC (DM IRBE, Leica, Wetzlar).

2.2 Zellkulturmedium und Zusätze

Tabelle 1: Zellkulturmedium und Zusätze

Name	Artikelnummer	Hersteller
Zellkulturmedium DMEM high Glucose (4.5 g/l) + GlutaMax-I	31966-021	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dulbeccos's PBS, pH 7,2	14190-094	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fetal Calf Serum FCS Superior	S0615	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	P4333	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin-EDTA	T4174m	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Accutase	A6964	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.3 Inhibitoren und Stocklösungen

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren

Name	Produktnummer/ Name	Hersteller
LiCl	L9650	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ATO	Trisenox	Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen
GANT61	ab120904	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Itraconazol	I6657	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 3: Verwendete Inhibitor-Stocklösungen

Inhibitor	Verwendetes Lösungsmittel	Stockkonzentration in mM
LiCl	H ₂ O (reinst, autoklaviert)	1000
ATO	H ₂ O (reinst, autoklaviert)	0,1
GANT61	DMSO	5
Itraconazol	DMSO	2,5

2.4 Chemikalien und Kits

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Name	Artikelnummer	Hersteller
Acryl Aqua Clean	0330111	WAK Chemie Medical GmbH Steinbach, Deutschland
MTS-Assay Reagenz CellTiter96 AQueous one Solution	G3580	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
CellTracker [®] Green CMFDA	C7025	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
DAPI	A 1001.0010	Applichem, St. Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	1.09678.0100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO) für Zellkultur	C6295-50ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri USA

Name	Artikelnummer	Hersteller
dNTP-Mix	20-2010	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
EDTA	8040.3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium Fluorescence Mounting Medium	S3023	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ethanol absolute für Analysen	1.00983.2511	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fixable Viability Dye eFluor® 450	65-0863	eBioscience, San Diego, Californien, USA
Flächendesinfektion Descosept AF	00-311-010	Dr. Schuhmacher, Malsfeld, Deutschland
Formaldehyd	4235.2	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA free (100x)	88785	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kristallviolett	T123.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol AnalaR Normapur	20847.307	VWR, Fontenay-Sous-Bois, Frankreich
Natriumchlorid	1.06404.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	71690	Fluka, Buchs, Schweiz
Natronlauge	1.09137.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Staurosporin	S4400-.1MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triton X-100	T9284	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris ultrapure	A1086	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Typanblau	T8154	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 5: Verwendete Kits und Enzyme

Name	Artikelnummer	Hersteller
Random Primer Mix	S 1330 S	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
RNeasy Mini-Kit	74104	Qiagen, Venlo, Niederlande
RQ1 RNase-free DNase	M6101	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
RT-PCR-Kit (10x RT-Puffer, 100mM DTT, Reverse Transkriptase)	845-RT-5000	Analytik Jena, Jena, Deutschland
SYBR® Select Master Mix for CFX	4472937	Life Technologies, Austin Texas, USA

2.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins mwg operon, Ebersberg, Deutschland synthetisiert. Sie kamen in einer Konzentration von 100 pmol/µl zum Einsatz und fungierten als Primer.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m in °C
TBP forward	TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA	59,8
TBP reverse	CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA	61,4
GLI1 forward	CCA ACT CCA CAG GCA TAC AGG AT	62,4
GLI1 reverse	CAC AFA TTC AGG CTC ACG CCT C	62,1
GSK-3β forward	GAC ATT TCA CCT CAG GAG TGC	59,8
GSK-3β reverse	GTT AGT CGG GCA GTT GGT GT	59,4

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Artikelnummer	Hersteller
6-Loch-Zellkulturplatten	657160	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch-Zellkulturplatten (Flachboden)	655180	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch-Zellkulturplatten (Rundboden)	650101	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch-Zellkulturplatten (Rundboden), nicht-bindend	650901	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kryo-Röhrchen 1,5 ml	72379004	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorffgefäße 0,5 ml 1,5 ml 2 ml	0030124537 0030120086 0030120094	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kammerobjektträger (PCA Oberfläche)	94.6140.402	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kanülen	Microlance 3 Nr. 18/ 72379004	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Nitril-Handschuhe	Reha soft Nitrile- 942206	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Pasteurpipetten	n.a.	WU, Mainz, Deutschland
PCR-Platten (96-Loch)	Multiplate PCR Plates/ ML 9651	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA

Name	Artikelnummer	Hersteller
Pipettenspitzen mit Filter 0,5-10 µl	81-1010	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter 10-100 µl 20-200 µl 100-1000 µl	692066 692069 790058	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml 10 ml 25 ml	357543 357551 357525	Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Spritzen	B-D Discardit II Spritze (100 x 2 ml)	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen (T 75)	3290	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen (T 75)	658175	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen 15 ml 50 ml	188261 210261	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
FACS-Röhrchen	352052	Corning, New York, USA

2.7 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Name	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	CB 150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Durchflusszytometer	LSR II	Becton Dickinson and company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot	Zeiss, Jena, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	n.a.	Liebherr, Bulle, Schweiz
Horizontalschüttler	MTS 4	IKA, Staufen, Deutschland
Kolbenhubpipette	Research Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	30 GT/N1201V	Haier, Qingdao, China
Magnetrührer	MAG RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskop	Fluovert FS	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	DM IRBE	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer	EL 800	Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA
Multidispenser	Handy Step	Brand, Wertheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	T = 0,1 mm; 0,0025 mm ²	Assistent, Sondheim, Deutschland
PCR-Gerät	UNO II	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Five easy FE 20	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Photometer	NanoDrop 3300	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Name	Bezeichnung	Hersteller
Power Pack P25	846-040-800	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
qRT-PCR Gerät	CFX96 Real-Time System, C1000 Thermal Cycler	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA
Rotilabo [®] - Mikroliterzentrifuge Gusto [™]	XP51.1	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Sicherheitswerkbank	n.a.	BDK, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer	REAXtop	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage (0,5 -4100 g)	6J4100-2M	Kern, Balingen, Deutschland
Waage (10 mg -220 g)	ABJ220_4M	Kern, Balingen, Deutschland
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.8 Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Name	Verwendung	Entwickler
AxioVision	Aufnahme Fluoreszenzbilder	Zeiss, Jena, Deutschland
CFX-Manager™	Auswertung der PCR-Daten	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA
FACSDiva	Aufnahme der Durchflusszytometrie-Daten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FlowJo 4.6.2	Analyse der Durchflusszytometrie- Daten	Tree Star, Ashland, Oregon, USA
Gen Vac	Messung der Adsorption des Mikrotiterplatten-Photometers	BioTek, Winooski, Vermont, USA
Microsoft Office Paket	Datenauswertung, Diagramme	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MarvinSketch	Strukturformeln	ChemAxon, Budapest, Ungarn
2.8.1 Stata 12.0	Statistische Auswertungen	Stata Corp. , Texas, USA

3 Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

3.1.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in T75 Flaschen bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle RMS Zelllinien erhielten DMEM + GlutaMax-I als Nährmedium mit zusätzlich 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin. SKMCs wurden in DMEM + GlutaMax-I ebenfalls mit 1% Penicillin/ Streptomycin, allerdings mit 20% FCS, kultiviert. Bei ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1 x Trypsin-EDTA in PBS (RMS Zelllinien) bzw. Accutase (SKMCs) enzymatisch abgelöst. Durch Zugabe des FCS-haltigen Nährmediums wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen wurden im Verhältnis 1:15 (RD, ZF), 1:10 (RH-30) bzw. 1:1 (SRH, SKMC) verdünnt. Für einen Mediumwechsel wurden 50% des alten Mediums entfernt und mit neuem Medium aufgefüllt.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA in PBS oder Accutase von der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend für 7 min bei 4 °C und 405 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in neuem Medium aufgenommen. Nun wurde eine 1:10 Verdünnung mit Trypanblau hergestellt, die zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer pipettiert wurde. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop in den vier Großquadranten gezählt und ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Kammerfaktor 1×10^4 und der Verdünnung der Zellsuspension (1x10) multipliziert. Das so erhaltene Ergebnis ist die Zellzahl pro ml.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Nach Bestimmen der Zellzahl (siehe 3.1.2), wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und für 4-5 h bei -20 °C gelagert. Über Nacht wurde das Kryoröhrchen bei -70 °C weiter heruntergekühlt, um dann bei -196 °C in Flüssigstickstoff gelagert zu werden.

3.1.4 Auftauen von Zellen

Das aus dem Flüssigstickstoff entnommene Röhrchen wurde bei Raumtemperatur angetaut, bis nur noch ein kleiner Anteil gefroren war. Der Inhalt wurde mit 5 ml Medium in ein 15 ml Zentrifugalröhrchen überführt und für 7 min bei 4 °C und 405 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in eine T75 Zellkulturflasche überführt und mit Medium auf 15 ml aufgefüllt.

3.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

3.2.1 Lyse der Zellen

Nach Bestimmen der Zellzahl (siehe 3.1.2) wurden 1×10^6 Zellen in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 350 μl RLT Lysepuffer wurden hinzupipettiert. Das Resuspendieren erfolgte durch mehrmaliges Mischen mit einer Insulinspritze. Die mechanische Krafteinwirkung durch die schmale Kanüle der Spritze und die Detergenzien des Puffers führten zur Lyse der Zellen. Das Lysat wurde entweder weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

3.2.2 Isolierung der RNA aus dem Zellysat

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen, Venlo, Niederlande nach dem Protokoll des Herstellers. Die in dH_2O gelöste RNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -70 °C eingefroren.

3.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um die Konzentration der im dH₂O gelösten RNA zu bestimmen, wurde sie photometrisch gemessen. Dafür wurde zuerst bei 230 nm, 260 nm und 280 nm mit Hilfe des NanoDrops (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) ein Leerwert mit dH₂O bestimmt. Anschließend wurde bei gleichen Wellenlängen die optische Dichte des RNA-Eluats gemessen. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm entspricht dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren und ist somit ein Maß für die Verunreinigung der Probe. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Der Quotient aus den Messungen bei 260 nm und 280 nm sollte für reine RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Ein weiterer Quotient wurde aus den Messungen bei 260 nm und 230 nm errechnet und liegt üblicherweise im Bereich 2 - 2,2. Werte unter 1,7 detektieren ebenfalls eine Verunreinigung der Probe.

Die RNA-Konzentration errechnet sich aus dem Wert der Absorptionsmessung bei 260 nm (A_{260}) und dem nukleinsäurespezifischen Koeffizienten für RNA von 0,04 µg/µl (C).

$$c(\text{RNA}) = A_{260} * C$$

3.2.4 DNase-Verdauung

Unter Verwendung der RQ1 RNase freien DNase von Promega (Promega, Madison, Wisconsin, USA) wurde nach Herstellerprotokoll ein DNase-Verdau des RNA-Eluats durchgeführt. Damit konnte eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden. Das DNase-verdaute RNA-Eluat wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -70 °C gelagert.

3.2.5 Reverse Transkription

Um 1 µg RNA in cDNA umzuschreiben, wurde mit Hilfe der RNA-Konzentration ($c(\text{RNA})$) das benötigte Volumen berechnet. Zu diesem Volumen wurde 2 µl eines 60 µM „Random Primer“ Mixes (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)

gegeben und mit RNase-freiem dH₂O auf 14,2 µl aufgefüllt. Zur weiteren Herstellung der cDNA wurde nach Herstellerprotokoll des RT-PCR-Kits (Analytik Jena, Jena, Deutschland) vorgegangen.

3.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde mit dem CFX96 Real-Time System (Biorad, Hercules, Kalifornien, USA) durchgeführt. 1 µl jeder cDNA-Probe wurde hierfür in eine 96-Loch PCR-Platte gegeben und ein Reaktionsansatz (siehe Tab. 9), bestehend aus dem SYBR Select Master Mix for CFX (Life Technologies, Austin, Texas, USA), RNase-freiem dH₂O und den jeweiligen „forward“ und „reverse“ Primern der Gene, wurde hinzupipettiert.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für eine Probe

SYBR Select Master Mix for CFX	5 µl
Forward Primer (100 pmol)	1 µl
Reverse Primer (100 pmol)	1 µl
RNase-freies dH ₂ O	2 µl

Die verschiedenen cDNA-Proben wurden auf die Expression der Gene *GLII*, *GSK-3β* und „TATA-Box Binding Protein“ (*TBP*) hin untersucht. Neben den Proben wurde für jedes Gen eine entsprechende Negativkontrolle mit 1 µl H₂O anstelle von 1 µl cDNA auf die 96-Loch PCR-Platte pipettiert. Außerdem wurde jede Probe in vier unabhängigen Experimenten getestet und bei jedem Experiment wurden Duplikate angesetzt.

Bei der PCR-Reaktion amplifiziert die thermostabile „Taq-Polymerase“ cDNA Abschnitte. Allerdings kann die Taq-Polymerase nur über spezifische Primer an die cDNA binden und somit bestimmt die Sequenz der Primer welche Gene amplifiziert werden.

Bei der Amplifikation interkaliert fluoreszierendes SYBR-Green in die neu gebildete DNA. Dadurch steigt, proportional zur neu synthetisierten DNA-Menge, die messbare Fluoreszenz der Probe. Der Zyklus, bei dem erstmals eine signifikante Fluoreszenzsteigerung detektierbar ist, markiert dabei den Schwellenwert („cycle threshold“ Ct). Um die Expression der Gene *GLII* und *GSK-3β* zu untersuchen, wurden

diese ins Verhältnis zu *TBP* gesetzt (ΔCt -Wert). *TBP*, ein sogenanntes „Housekeeping“ Gen, zeichnet sich durch eine konstante Expression aus und wurde daher als Referenzgen verwendet.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$$

In einem weiteren Schritt wurde die Basalexpression der verschiedenen Tumorzellen ins Verhältnis zur Expression nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren gestellt.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Tumorzellen unbehandelt)} - \Delta\text{Ct (Tumorzellen mit Inhibitor)}$$

Abschließend wurde daraus die quantitative Expression berechnet.

$$E = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.3 Untersuchung der Zellvitalität

3.3.1 Vitalitätstest (MTS-Assay)

Um die Vitalität der Zelllinien nach Inhibitorbehandlung in unterschiedlichen Konzentrationen festzustellen, wurden MTS-Assays durchgeführt. Das Verfahren beruht auf photometrischer Messung eines Indikatorfarbstoffes: Das anfänglich gelbe 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazoliumsalz (MTS) wird durch NADH und NADPH zu violetter Formazan reduziert. NADH und NADPH sind als Reduktionsäquivalente ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen und geben damit Aufschluss über deren Vitalität. Der somit von der Zellvitalität abhängige Farbumschlag wird im Photometer bei 490 nm gemessen (Mosmann 1983).

Für den Vitalitätsassay wurden die Zellen gezählt (siehe 3.1.2), um dann $0,5 \times 10^4$ (RD, RH-30, ZF, SKMC) bzw. $1,5 \times 10^4$ (SRH) Zellen in jeweils 100 μl Medium pro Loch einer 96-Loch-Platte mit Flachboden auszusäen. Darauf folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank. Nach Ablauf der Zeit hafteten die Zellen an der Oberfläche der 96-Loch-Platte und das Medium konnte abgenommen werden. Nun wurden 100 μl Medium mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen in die jeweilig vorgesehene Kavität pipettiert. Zusätzlich enthielt jede 96-Loch-Platte eine Negativkontrolle mit ausschließlich Medium und eine Lösungsmittelkontrolle mit dem Lösungsmittel entsprechend der höchsten Konzentration des jeweiligen Inhibitors.

Hiermit wurde überprüft, dass nur der Inhibitor Einfluss auf die Zellvitalität hat. Nach 96 h Inkubation im Brutschrank wurden 20 µl des MTS Reagenzes (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) in jedes Loch pipettiert und die Platte für weitere 90 min in den Brutschrank gestellt. Mit Hilfe des Mikroplatten-Photometers (BioTek, Winooski, Vermont, USA) konnte nun die Absorption bei 490 nm gemessen werden.

In anfänglichen Testexperimenten wurden die geeigneten Konzentrationen aller Inhibitoren ermittelt. Daraufhin wurde die Vitalität der Zelllinien in vier unabhängigen Experimenten, jeweils als Triplikate, bestimmt.

3.3.2 Koloniebildungstest („Clonogenic Assay“)

Der Koloniebildungstest ist ein *in vitro* Test für Einzelzellen, der ihre Proliferationsfähigkeit (Munshi *et al.* 2005) und somit die Fähigkeit eine Kolonie zu bilden (Franken *et al.* 2006) untersucht.

Nachdem für den Test die Zellzahl bestimmt wurde (siehe 3.1.2), wurden 5×10^2 Zellen in je 50 µl Medium gelöst und in die Mitte der Vertiefungen einer 6-Loch-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden jeweils 2 ml Medium in die Mitte der Vertiefung pipettiert, was eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleisten sollte. Nach 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank wurde das Medium aus den Kavitäten abgenommen und durch Medien mit verschiedenen LiCl-Konzentrationen ersetzt. Als Kontrolle erhielt eine Kavität 2 ml Medium mit einem Anteil des Lösungsmittels dH₂O entsprechend der maximal verwendeten Inhibitorkonzentration. Nach 3 Tagen wurde das Medium durch normales Kulturmedium ersetzt und abhängig vom Wachstum der Zelllinie wurde die Platte weitere 10-12 Tage im Brutschrank inkubiert, wobei alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Den Zeitpunkt des Färbens bestimmte die Zelldichte der Kontrolle. Waren deutlich Kolonien erkennbar, wurden alle Medien der 6-Loch-Platte entfernt, die Kavitäten einmal mit PBS gewaschen und die Zellen 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Danach folgte die Färbung mit jeweils 500 µl Kristallviolett-Arbeitslösung. Um eine gleichmäßige Färbung zu garantieren, wurde die Platte während des 30-minütigen Vorgangs auf einen Horizontalschüttler gestellt. Im Anschluss wurden die Vertiefungen mit ausreichend dH₂O gewaschen und die Platte

über Nacht kopfüber auf Zellstoff getrocknet. Die Platten wurden fotografiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

Kristallviolett-Stammlösung:	1% Kristallviolett in 20% Ethanol
Kristallviolett-Arbeitslösung:	Stammlösung 1:10 in 20% Ethanol

3.3.3 3D Koloniebildungstest (3D “Sphäroid Assay”)

Eine 3D Kultur bietet die Möglichkeit das Wachstumsverhalten und die Substanzwirkung bei einem Tumor *in vitro* zu simulieren. Dabei unterscheiden sich Zellen in Sphäroiden und Zellen in zwei-dimensionalen, einschichtigen Verbänden in der Genexpression, Signalwegsaktivität und in der Arzneimittelempfindlichkeit (Vinci *et al.* 2012; Vinci *et al.* 2015).

Für den 3D Sphäroid-Test mit RMS Zellen wurden, nach der Bestimmung der Zellzahl (siehe 3.1.2), in 100 µl Medium jeweils 5×10^3 Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Platte mit nicht-adhärentem Rundboden ausgesät. Um die Zellen am Boden der Kavitäten zu sammeln und somit ein Wachstum als Sphäroid sicherzustellen, wurde die Platte 10 min bei 405 g zentrifugiert. Nach 4 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank konnte im Mikroskop die Sphäroidbildung überprüft werden. Dann folgte die Zugabe von unterschiedlichen LiCl Konzentrationen. Dafür wurde der Inhibitor in je 100 µl Medium verdünnt und vorsichtig in die Kavitäten mit den Sphäroiden pipettiert. Bei der Inhibitorzugabe war zu beachten, dass sich bereits je 100 µl Medium in den Kavitäten befunden haben und sich die gewünschte Endkonzentration somit auf 200 µl bezog. Bei jeder Zelllinie wurde eine Kontrolle ohne LiCl, nur mit dem Lösungsmittel dH₂O, mitgeführt. Die Lösungsmittelkonzentration entsprach dabei der höchsten Inhibitorkonzentration des Tests. Die Sphäroide wurden weitere 4 Tage im Brutschrank inkubiert und anschließend mit dem Mikroskop fotografiert.

3.4 Untersuchung der Apoptose

3.4.1 Darstellung der Kernfragmentierung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Ein qualitativer Nachweis der Apoptose erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Dafür wurden nach der Zellzählung (siehe 3.1.2) 1×10^4 Zellen in jede Kammer eines 8-Loch-Kammerobjektträgers mit PCA Oberfläche (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät. Die Kammern wurden auf je 500 μl mit Medium aufgefüllt und der Objektträger für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Medien abgenommen und durch Medien mit verschiedenen LiCl-Konzentrationen ersetzt. Dabei dienten die MTS-Assays als Orientierung für die Konzentrationen. Für eine Negativ- und eine Positivkontrolle wurden zwei Kammern nur mit Medium befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen im Brutschrank wurde der Positivkontrolle Staurosporin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 beigelegt. Dieser unspezifische Proteinkinaseinhibitor wird aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* gewonnen und leitet *in vitro* auch in Chemotherapie-resistenten Tumorzellen die Apoptose ein (Stepczynska *et al.* 2001). 6 h inkubierte der Kammerobjektträger nun abermals im Brutschrank. Dann begannen die Wasch- und Färbeschritte, die vorsichtig durchgeführt werden mussten, um die Zellen nicht vom Objektträger zu lösen. Als erstes wurde aus den Kammern das Medium entfernt und sie wurden einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die Färbung des Zytoplasmas mit CellTracker® (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornien, USA). Ab diesem Zeitpunkt sollte möglichst im Dunkeln gearbeitet werden, um die Signale der Fluoreszenzfarbstoffe nicht zu schwächen. Für die Färbung wurden 2,5 μl CellTracker® in 200 μl PBS verdünnt und in jede Kammer des Objektträgers gegeben. Nach 45 min Inkubation im Brutschrank wurde der Farbstoff durch je 500 μl PBS pro Kammer ersetzt und der Objektträger wurde weitere 30 min in den Brutschrank gestellt. Nun folgten zwei Waschschrte mit PBS und die Fixierung der Zellen mit 200 μl eiskaltem Methanol pro Kammer. Der Objektträger wurde dafür 10 min bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Nach einem weiteren Waschschrte begann die Färbung der Zellen mit DAPI (Appllichem, St. Louis, Missouri, USA), einem Farbstoff der in die DNA interkaliert und so die Zellkernfragmentierung sichtbar macht. Dafür wurde aus einer 0,5 ng/ml

DAPI-Verdünnung mit PBS in jede Kammer 200 µl pipettiert. Die Zellen inkubierten für 10 min bei 4 °C und wurden dann zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurde der Kammeraufsatz vom Objektträger gelöst und der Objektträger für einige Minuten lichtgeschützt an der Luft getrocknet. Schließlich wurde an eine Seite des Objektträgers ein Tropfen Eindeckmedium (DAKO, Glostrup, Dänemark) gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Das Deckglas wurde dabei in einem schrägen Winkel an die Seite mit dem Eindeckmedium angelegt, was beim Absenken eine homogene Verteilung des Eindeckmediums sicherstellte. Nun konnte das Präparat bis zu 3 Tage bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden oder es wurde direkt mikroskopiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop schienen die Zellkerne durch die DAPI-Färbung blau und das Zytoplasma durch die CellTracker®-Färbung grün.

3.4.2 Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS)

Zum quantitativen Nachweis des Zelltods wurden die Zellen mit einem Farbstoff, welcher nur Zellen ohne intakte Zellmembran (Apoptose, Nekrose) anfärbt, behandelt und am Durchflusszytometer anschließend deren Anteil an der Gesamtzellzahl bestimmt. Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die Detektion der Lichtstreuung, die ein Laserstrahl beim Auftreffen auf eine Zelle verursacht. Grundsätzlich werden die Zellen durch die Lichtstreuung des Laserstrahls nach Größe (Vorwärtsstreuung, FSC) und Granularität (Seitwärtsstreuung, SSC) sortiert (Bendall *et al.* 2012). Für diese Arbeit wurden tote Zellen durch vorheriges Färben mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff „Fixable viability dye eFluor® 450“ (eBioscience, San Diego, Californien, USA) sichtbar gemacht. Mit dem Durchflusszytometer LSR II (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) wurde der Anteil der angefärbten Zellen bei 450 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software von Tree Star Inc., Ashland, USA.

Zu Beginn wurden die Zellen gezählt (siehe 3.1.2) und $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte mit 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank wurden die Medien abgenommen und durch Inhibitorverdünnungen im Kulturmedium ersetzt. Dabei wurde sich bei der Wahl der Konzentrationen an den Ergebnissen der MTS-Assays orientiert. Zusätzlich wurde eine

Kontrolle ohne Inhibitor, nur mit dem Volumen des entsprechenden Lösungsmittels der höchsten Inhibitorkonzentration, mitgeführt. Nachdem die 6-Loch-Platte für 72 h im Brutschrank inkubiert wurde, wurde das Medium der jeweiligen Vertiefung in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 5000 g zentrifugiert. So konnten auch die toten Zellen, die sich bereits abgelöst hatten, gesichert werden. In der Zwischenzeit wurden die adhärenen Zellen mit 500 µl 1%igem Trypsin-ETDA abgelöst. Um sicherzustellen, dass keine Zellen mehr am Boden der Vertiefung hafteten, wurden diese mit dem Überstand der zentrifugierten Eppendorfgefäße mehrfach gewaschen. Die Suspension wurde zurück in die Eppendorfgefäße pipettiert und für 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Nun waren alle Zellen als Pellet am Boden des Gefäßes und der Überstand konnte abgenommen werden. Als Nächstes wurden die Zellen mit 210 µl PBS resuspendiert und davon wurden 200 µl in eine 96-Loch-Platte überführt. Die restlichen 10 µl pro Eppendorfgefäß wurden zusammen in eine zusätzliche Kavität der Platte gegeben und dienten später als ungefärbte Probe der Kalibrierung des Durchflusszytometers. Dann wurde die Platte für 7 min bei 7 °C und 405 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 200 µl PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstands folgte die Färbung mit 1:1000 in PBS verdünntem „Fixable viability dye eFluor® 450“. In jeder Kavität wurden die Zellen dafür mit 100 µl der Färbelösung gemischt und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugation, einem Waschschrift mit PBS und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen entweder direkt in FACS-Puffer aufgenommen oder für eine spätere Messung fixiert. Für die Fixierung wurden die Zellen mit 500 µl 0,5%igen Formaldehyd 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Jetzt folgte auch hier die Zugabe von jeweils 200 µl FACS-Puffer. Die Suspensionen in der 96-Loch-Platte konnten lichtgeschützt bei 4 °C bis zu einer Woche gelagert werden. In diesem Fall wurde der FACS-Puffer allerdings vor der Messung durch frischen ersetzt. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Proben in 5 ml FACS-Röhrchen überführt.

FACS-Puffer:

PBS, 2% FCS, 2mM EDTA

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von LiCl und Hh-Inhibitoren auf die Vitalität von RMS Zelllinien

Es gibt Hinweise, dass die Wahrscheinlichkeit, einen malignen Tumor zu entwickeln, bei Lithium-behandelten Patienten sinkt (Cohen *et al.* 1998). Aktuelle Studien untersuchen die Rolle von GSK-3 bei der Tumorentstehung und Progression (Huang, Liu, and Cheng 2011; McCubrey *et al.* 2014). Auch in RMS zeigte sich, dass GSK-3 in diverse wachstumsfördernde Signalwege involviert ist und die Inhibition eine Therapieoption darstellt (Zeng *et al.* 2010; Chen *et al.* 2014).

Über MTS-Assays wurde die Wirkung von LiCl als GSK-3-Inhibitor auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, RH-30, SRH und ZF untersucht und durch Vergleich mit gesunden Skelettmuskelzellen die spezifische antitumorale Wirkung überprüft. Da eine Interaktion von GSK-3 mit dem Hh-Signalweg bekannt ist und sowohl GSK-3- als auch Hh-Signalweg-Inhibitoren das Wachstum von Tumorzellen unterdrücken (Peng *et al.*, 2013, Huang, Liu *et al.* 2011, Huang, Liu *et al.* 2011, McCubrey, Steelman *et al.* 2014), wurden außerdem potenzielle additive Effekte vom LiCl mit Hh-Signalweg Inhibitoren untersucht.

4.1.1 Dosis-abhängiger Einfluss von LiCl auf die Vitalität von RMS Zelllinien

In Abbildung 12 ist die Vitalität der RMS Zelllinien RD, RH-30, ZF und SRH im Vergleich zu SKMC unter Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von LiCl dargestellt. Es fällt auf, dass die Vitalität aller Tumorzelllinien nach Inkubation mit 25 mM und 50 mM LiCl deutlich stärker beeinträchtigt wurde, als die der Skelettmuskelzellen. Bei Zugabe von 100 mM LiCl wiesen allerdings alle Zellen nur noch wenig ihrer ursprünglichen Vitalität auf, RD 15% ($\pm 1\%$), SRH 14% ($\pm 1\%$), RH-30 17% ($\pm 1\%$), ZF 15% ($\pm 3\%$) und SKMC ebenfalls 15% ($\pm 1\%$). Die aRMS Zelllinie ZF zeigte bereits bei 10 mM LiCl eine auf 63% ($\pm 14\%$) verringerte Vitalität, wohingegen die anderen Zelllinien bei dieser Konzentration noch keine signifikante Änderung der Vitalität aufwiesen. Bei 25 mM LiCl ging die Vitalität der aRMS Zelllinie RH-30 auf 47% ($\pm 5\%$) zurück, während die Vitalität der ZF Zellen auf 32% ($\pm 8\%$) sank. Auch die eRMS Zelllinie RD zeigte bei 25 mM LiCl einen Rückgang der

Vitalität auf 57% (\pm 5%), die SRH Zellen auf 66% (\pm 5%). Somit reagierten die Tumorzelllinien signifikant sensitiver als SKMC mit 75% (\pm 2%) verbleibender Vitalität unter 25 mM LiCl. Bei 50 mM LiCl zeigte sich der Unterschied zwischen den RMS Zelllinien und den SKMC am deutlichsten. Während die Vitalität der SKMCs noch bei 66% (\pm 4%) lag, sank die Vitalität der aRMS Zelllinien RH-30 und ZF auf 23% (\pm 1%) bzw. 18% (\pm 3%). Auch bei der eRMS Zelllinie RD ging die Vitalität auf 21% (\pm 1%) zurück. Zwar sank die Vitalität der Zelllinie SRH mit 39% (\pm 4%) Restvitalität weniger deutlich, es konnte aber dennoch ein signifikanter Unterschied zu den SKMC festgestellt werden.

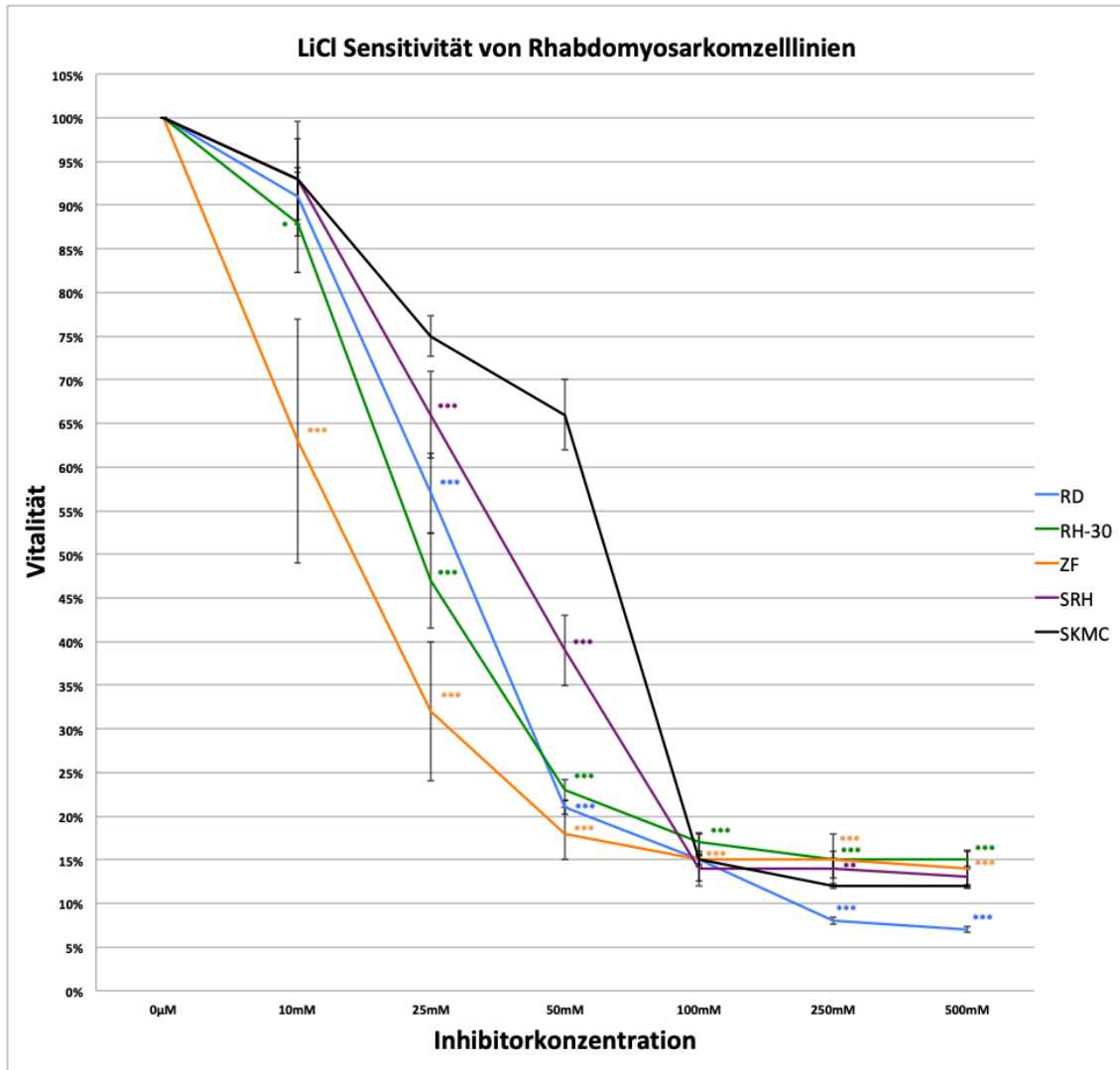


Abbildung 12: Einfluss des GSK-3-Inhibitors LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich zu primären Skelettmuskelzellen (SKMC). In 96-Loch-Platten wurden je Kavität $0,5 \cdot 10^4$ Zellen (RD, RH-30, ZF und SKMC) bzw. $1 \cdot 10^4$ Zellen (SRH) ausgesät und 24 h im Brutschrank bei 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert. Danach folgte eine 96 stündige Inkubation mit verschiedenen LiCl-Konzentrationen, bevor das MTS-Substrat zugegeben wurde. Nach 90 min erfolgte die Messung der Absorption 490 nm. Nach Abzug der Grundabsorption wurden die Werte in einem Liniendiagramm in Relation zu unbehandelten Zellen (100%) dargestellt. Die unbehandelten Kontrollzellen wurden nur mit dem Lösungsmittel des Inhibitors (H₂O) im Kulturmedium inkubiert. Die Abbildung präsentiert die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Einzelwerte der jeweiligen RMS-Zelllinien wurden außerdem für jede Konzentration mit Hilfe des Wilcoxon-Rangssummentests gegen die Werte der SKMC getestet. p-Wert (RMS vs. SKMC) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Siehe Kapitel 8 „Anhang“

4.1.2 Einfluss der Kombination von LiCl und Hedgehog-Inhibitoren auf die Vitalität von RMS Zelllinien

Durch die Kombination von Wirkstoffen soll in der Therapie eine niedrigere Dosierung der einzelnen Therapeutika ermöglicht werden, wodurch auftretende Nebenwirkungen reduziert werden können. Ein Therapieerfolg bei geringer Belastung des Patienten wird wahrscheinlicher.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass LiCl spezifisch die Vitalität der vier untersuchten RMS Zelllinien einschränkt (siehe Kapitel 4.1.1), sollte daher die Wirksamkeit in Kombination mit den Gli-Inhibitoren GANT61 und ATO getestet werden. Hierfür wurden folgende Inhibitorkombinationen betrachtet:

- **LiCl (L) + ATO (A)**
- **LiCl (L) + GANT61 (G)**

Im Weiteren wurde eine Dreifachkombination aus LiCl, ATO und dem SMO-Antagonisten Itraconazol untersucht, welcher wie die Gli-Inhibitoren den Hh-Signalweg hemmt, jedoch an anderer Stelle in den Signalweg eingreift:

- **LiCl (L) + ATO (A) + Itraconazol (I)**

Auf Grundlage der Experimente in Kapitel 4.1.1 wurden 25 mM LiCl für die Kombination mit den Hh-Inhibitoren ausgewählt. Die geeigneten ATO-, GANT61- und Itraconazol-Konzentrationen wurden bereits zuvor im Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen ermittelt.

4.1.2.1 Kombination von LiCl mit ATO

In Abbildung 13 ist zu sehen, dass 0,5 μ M ATO bei ZF Zellen zu einer Zunahme der Vitalität führte, während die Vitalität bei RH-30 und RD Zellen weitgehend unverändert blieb (RH-30: $105 \pm 12\%$; ZF: $129 \pm 15\%$; RD: $103 \pm 3\%$) und nur die SRH Linie leicht beeinträchtigt wurde (SRH: $92 \pm 9\%$). Dagegen konnte eine Einzeldosis von 25 mM LiCl die Vitalität aller RMS Zelllinien bereits eindeutig senken (RD: $66 \pm 6\%$; SRH: $53 \pm 7\%$; RH-30: $61 \pm 5\%$; ZF: $36 \pm 6\%$ Vitalität). Die Kombination von 0,5 μ M ATO und 25 mM LiCl führte in zwei der vier RMS Zelllinien zu einem signifikant stärkerem Rückgang der Vitalität (RD: $55 \pm 10\%$; RH-30: $39 \pm 4\%$ Vitalität). Am wenigsten nahm

die Vitalität der SRH Zellen ($72 \pm 4\%$) nach Zugabe der Kombination von $0,5 \mu\text{M}$ ATO und 25 mM LiCl ab. Tatsächlich lag die Vitalität hier deutlich höher als nach der Einzeldosis LiCl ($53 \pm 7\%$). $95\% \pm 7\%$ der SKMC waren nach Zugabe der Inhibitor Kombination vital.

Bei Erhöhung der ATO-Konzentration auf $1 \mu\text{M}$ zeigte sich bereits eine erste Einschränkung der Vitalität in zwei der vier RMS Zelllinien (RD: $79 \pm 3\%$; SRH: $93 \pm 12\%$; RH-30: $73 \pm 2\%$; ZF: $107 \pm 12\%$ Vitalität). In Kombination mit 25 mM LiCl verstärkte sich der Vitalitätsrückgang in RD und RH-30 Zellen signifikant (RD: $42 \pm 10\%$; RH30: $24 \pm 2\%$). Auch in SRH Zellen trat bei dieser Inhibitor Kombination erstmals ein verstärkter Vitalitätsrückgang auf ($42 \pm 4\%$). Allerdings war noch keine deutliche Verbesserung im Vergleich zur Einzelwirkung von LiCl ($53 \pm 7\%$) sichtbar. Auch in ZF Zellen wirkte die Kombination von $1 \mu\text{M}$ ATO und 25 mM LiCl minimal stärker ($30 \pm 2\%$) als LiCl alleine ($36 \pm 6\%$). Allerdings konnte hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die SKMC Kontrollzellen behielten auch bei dieser Inhibitor Kombination weiterhin $85\% \pm 5\%$ ihrer Ausgangsvitalität.

Die Kombination von $2 \mu\text{M}$ ATO und 25 mM LiCl wirkte in RD mit $35\% (\pm 8\%)$ und in RH-30 Zellen mit $20\% (\pm 1\%)$ verbleibender Vitalität noch einmal leicht stärker. Allerdings reduzierte auch $2 \mu\text{M}$ ATO alleine die Vitalität der RH-30 Zellen bereits auf $34\% (\pm 2\%)$. Daneben sank die Vitalität der anderen Zelllinien deutlich geringer (RD: $59 \pm 2\%$; SRH: $71 \pm 5\%$; ZF: $50 \pm 3\%$). $47 \pm 3\%$ der SRH und $33 \pm 5\%$ der ZF Zellen waren nach Kombination von $2 \mu\text{M}$ ATO und 25 mM LiCl weiterhin vital. Die SKMC behielten auch bei dieser Inhibitor Kombination noch $75\% (\pm 5\%)$ ihrer Ausgangsvitalität, während $2 \mu\text{M}$ ATO alleine weiterhin keine Reduktion der Vitalität unter 100% zeigte.

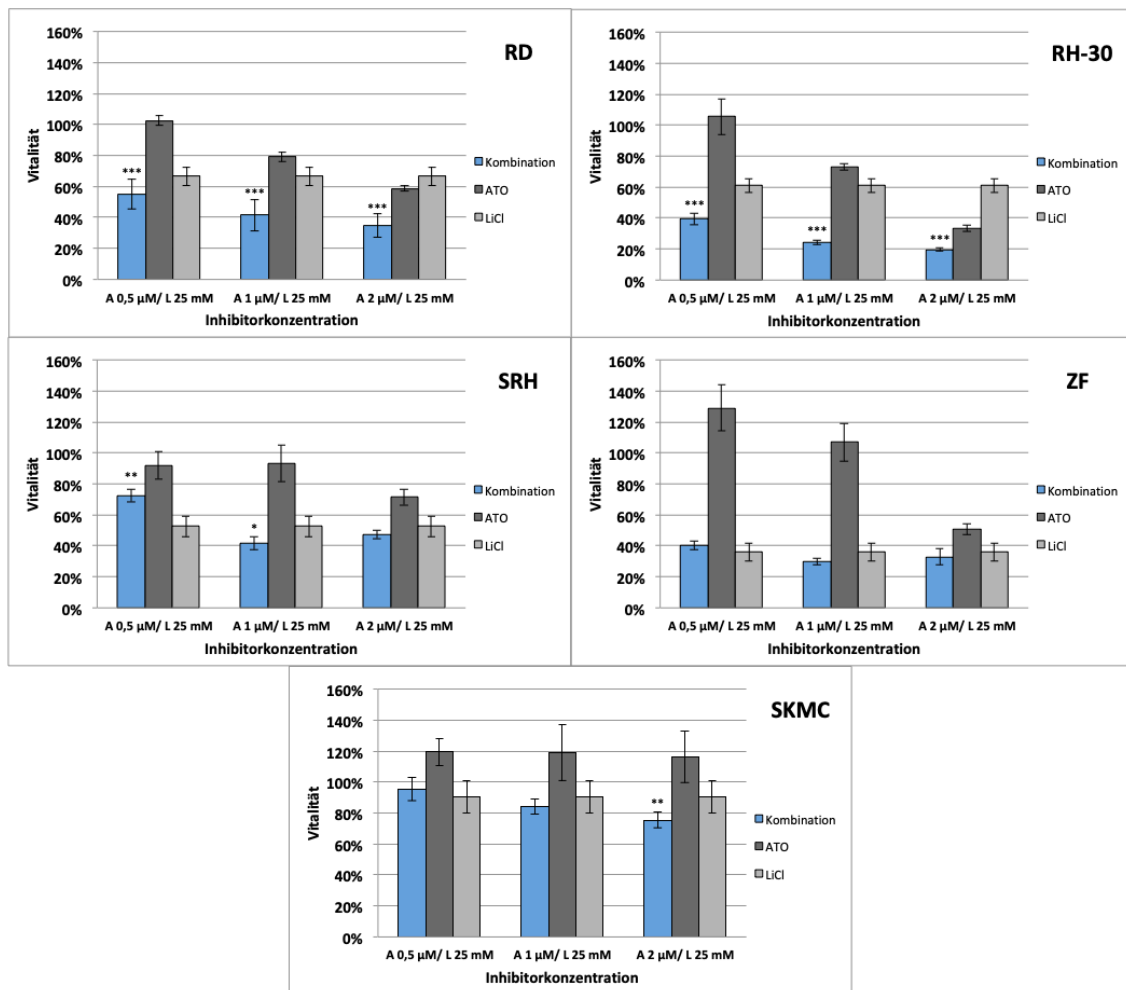


Abbildung 13: Einfluss der Kombination von ATO und LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit primären Skelettmuskelzellen (SKMC). Die Durchführung entspricht der Beschreibung in **Abbildung 12**. Untersucht wurde die Kombination von 25 mM LiCl mit 0,5, 1 oder 2 μ M ATO. Die unbehandelten Kontrollzellen wurden nur mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren (H_2O) im Kulturmedium inkubiert. In den Säulendiagrammen wurde die Wirkung der Kombination aus ATO (A) und LiCl (L) (blauer Balken) mit der Wirkung der einzelnen Inhibitoren (dunkelgrau ATO, hellgrau LiCl) verglichen. Die Abbildung repräsentiert die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Für jede Zellreihe wurden mit Hilfe des t-Tests die Werte der Kombinationen gegen die Werte der einzelnen Inhibitoren getestet. Der für die Kombinationen jeweils angegebene p-Wert entspricht der Einzelinhibitor Testung mit dem geringsten statistischen Unterschied. p-Wert (Kombination vs. Einzelinhibitor) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Siehe Kapitel 8 „Anhang“

4.1.2.2 Kombination von LiCl mit GANT61

Abbildung 14 zeigt, dass die Kombination von 5 μM GANT61 und 25 mM LiCl lediglich bei SRH Zellen einen leicht verstärkten Vitalitätsrückgang im Vergleich zur Einzelbehandlung mit LiCl verursachte (SRH: G+L: $43 \pm 4\%$, L: $54 \pm 5\%$). Die Zellen wurden durch alleinige GANT61-Gabe kaum beeinflusst ($94 \pm 12\%$). Auch die anderen drei Zelllinien zeigten bei dieser niedrigen GANT61-Konzentration nur wenig Veränderungen (RD: $95 \pm 2\%$; RH-30: $105 \pm 8\%$; ZF: $90 \pm 5\%$). Durch die Kombination von 5 μM GANT61 und 25 mM LiCl büßten die RD Zellen sogar weniger Vitalität ein als durch LiCl alleine (G+L: $71 \pm 4\%$, L: $67 \pm 8\%$). Hier verzeichneten die beiden aRMS jeweils die gleiche Restvitalität (RH-30: G+L: $54 \pm 6\%$, L: $54 \pm 5\%$; ZF: G+L: $36 \pm 4\%$, L: $36 \pm 6\%$). Auch die Skelettmuskelzellen hatten nach der Behandlung mit 5 μM GANT61 und 25 mM LiCl einen ähnlichen Vitalitätsverlust, wie durch alleinige LiCl-Behandlung (G+L: $86 \pm 3\%$, L: $84 \pm 14\%$). 5 μM GANT61 ohne LiCl zeigte dagegen bei SKMC keine Veränderung ($103 \pm 10\%$).

Durch Erhöhung der GANT61 Konzentration auf 10 μM wurde eine stärkere Wirkung erzielt. Bereits die Einzeldosis senkte die Vitalität in RD ($62 \pm 6\%$), RH-30 ($49 \pm 3\%$) und ZF Zellen ($63 \pm 5\%$) deutlich, während SRH Zellen und SKMC ihre Ausgangsvitalität behielten (SRH: $102 \pm 5\%$; SKMC: $98 \pm 9\%$). Verglichen mit den Einzelinhibitoren, führte die Kombination von 10 μM GANT61 und 25 mM LiCl zu einem signifikant höherem Vitalitätsverlust in allen vier RMS Zelllinien (RD: $49 \pm 4\%$; RH-30: $27 \pm 7\%$; SRH: $36\% \pm 3\%$; ZF: $23 \pm 2\%$), während in SKMC nur ein geringerer Effekt vorlag ($74 \pm 13\%$).

Eine weitere Erhöhung der GANT61-Konzentration auf 15 μM verstärkte in Kombination mit 25 mM LiCl bei RD und RH-30 Zellen den Vitalitätsrückgang noch einmal (RD: $14 \pm 0\%$; RH-30: $18 \pm 2\%$). Auch wenn sich die Kombination signifikant von der Einzelbehandlung mit 15 μM GANT61 unterschied, war der weitere Vitalitätsverlust sehr gering (RD: $22 \pm 1\%$; RH-30: $19 \pm 1\%$). Die Vitalitätsabnahme der SRH und ZF Zellen stagnierte bei $34 \pm 3\%$ bzw. $20 \pm 1\%$, während 15 μM GANT61 alleine die Vitalität auf $74 \pm 10\%$ bzw. $32 \pm 4\%$ senkte. Die

Skelettmuskelzellen waren nach Zugabe von 15 μM GANT61 zu $50 \pm 3\%$ vital und die Kombination mit 25 μM LiCl senkte die Vitalität nicht weiter ($50 \pm 13\%$).

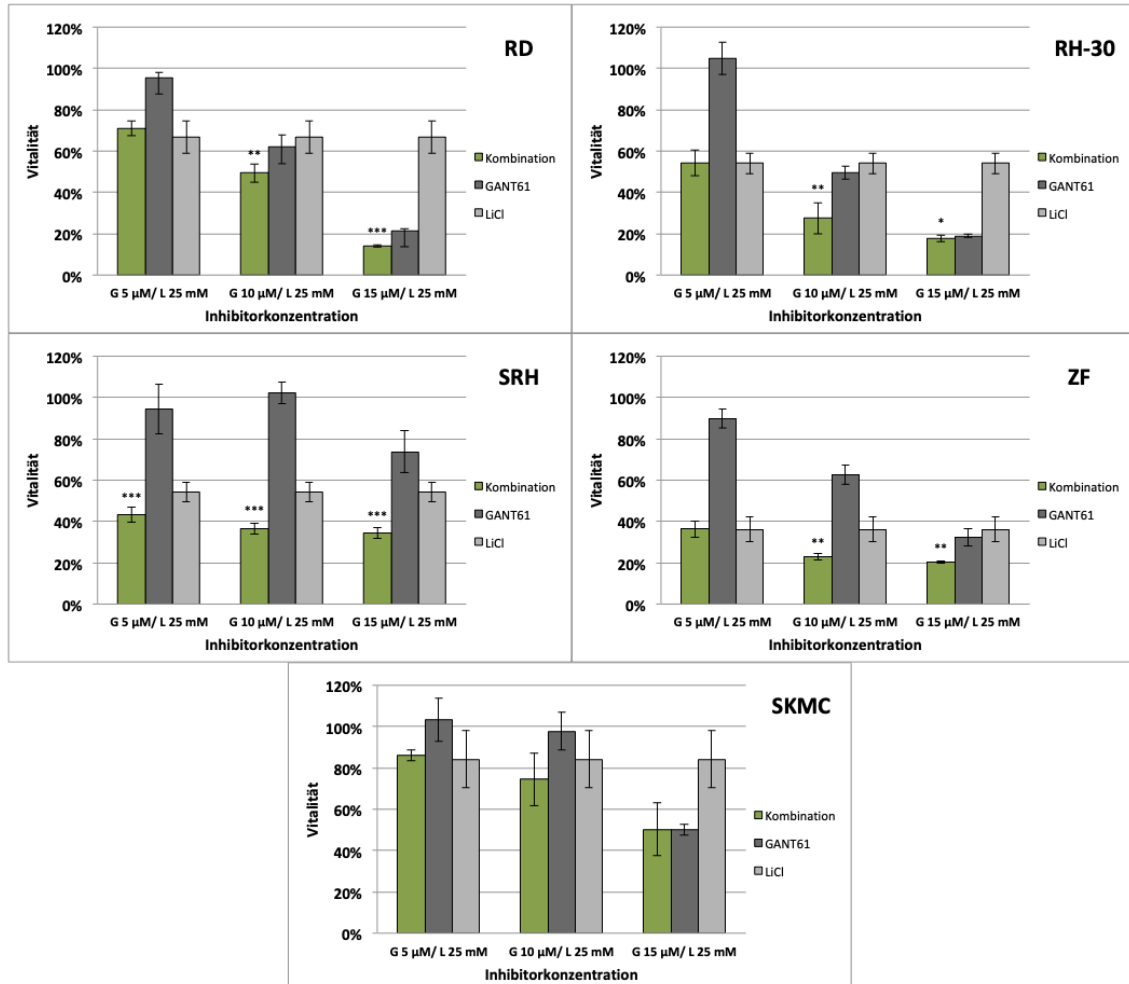


Abbildung 14: Einfluss der Kombination von GANT61 und LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit primären Skelettmuskelzellen (SKMC). Die Durchführung entspricht der Beschreibung in **Abbildung 12**. Untersucht wurde die Kombination von 25 mM LiCl, mit 5, 10 oder 15 μM GANT61. Die unbehandelten Kontrollzellen wurden nur mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren (LiCl: H_2O ; GANT61: DMSO) im Kulturmedium inkubiert. In den Säulendiagrammen wird die Wirkung der Kombination aus GANT61 (G) und LiCl (L) (grüner Balken) mit der Wirkung der einzelnen Inhibitoren (dunkelgrau GANT61, hellgrau LiCl) verglichen. Die Abbildung repräsentiert die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Für jede Zellreihe wurden mit Hilfe des t-Tests die Werte der Kombinationen gegen die Werte der einzelnen Inhibitoren getestet. Der für die Kombinationen jeweils angegebene p-Wert entspricht der Einzelinhibitor Testung mit dem geringsten statistischen Unterschied. p-Wert (Kombination vs. Einzelinhibitor) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Siehe Kapitel 8 „Anhang“

4.1.2.3 Dreifach-Kombination: LiCl, ATO und Itraconazol

Nachdem die Kombination des GSK-3-Inhibitors LiCl mit dem Gli-Inhibitor ATO bereits erste additive Effekte gezeigt hatte, wurde eine Dreifachkombination aus LiCl, ATO und dem SMO-Inhibitor Itraconazol getestet.

Die Ergebnisse in Abbildung 15 zeigen, dass die Kombination aus 1 μ M ATO, 2 μ M Itraconazol und 25 mM LiCl die Vitalität der RD Zellen auf $58 \pm 12\%$ verringerte. Allerdings war die Zweifach-Kombination aus 1 μ M ATO und 25 mM LiCl mit $41 \pm 8\%$ verbleibender Vitalität effizienter. 2 μ M Itraconazol und 25 mM LiCl erzielten mit einem Vitalitätsrückgang auf $62 \pm 16\%$ einen ähnlichen Wert wie die Dreifachkombination. Eine Kombination aus 2 μ M Itraconazol und 1 μ M ATO senkte die Vitalität der RD Zellen nur wenig ($93 \pm 6\%$). Die einzelnen Inhibitoren zeigten in den verwendeten Konzentrationen ebenfalls keine große Wirkung (A: $73 \pm 9\%$; I: $100 \pm 7\%$; L: $66 \pm 6\%$). Durch Erhöhung der Itraconazol Konzentration auf 5 μ M stieg die Wirkung der Dreifach-Kombination in den RD Zellen deutlich ($28 \pm 2\%$). Ähnlich gut wirkte hier nur die Zweifach-Kombination aus LiCl und Itraconazol ($31 \pm 2\%$), während die Kombination aus 5 μ M Itraconazol und 1 μ M ATO die Vitalität auf $76 \pm 22\%$ senkte. Der Vitalitätsrückgang bei 5 μ M Itraconazol blieb gering ($87 \pm 14\%$).

In SRH Zellen war die Dreifach-Kombination aus 1 μ M ATO, 2 μ M Itraconazol und 25 mM LiCl mit $31 \pm 1\%$ vitalen Zellen deutlich effizienter als alle anderen Einzel- oder Doppelbehandlungen. Nach der Kombination von 1 μ M ATO mit 25 mM LiCl verblieben $59 \pm 4\%$ vitale Zellen, 2 μ M Itraconazol und 25 mM LiCl führten zu einem Rückgang der Vitalität auf $65 \pm 5\%$. Die Kombination aus 1 μ M ATO und 2 μ M Itraconazol führte zu einem geringeren Vitalitätsverlust ($95\% \pm 4\%$) als die Einzelbehandlung mit 25 mM LiCl ($72 \pm 4\%$). 2 μ M Itraconazol beeinträchtigten die SRH Zellen nicht (I: $98 \pm 8\%$), 1 μ M ATO erhöhte sogar die Vitalität ($108 \pm 1\%$). Nach Erhöhung der Itraconazol-Dosis auf 5 μ M stieg die Wirkung der Dreifach-Kombination noch leicht an ($27 \pm 2\%$), blieb aber weiterhin allen Einzel- und Doppelbehandlungen überlegen. Allerdings war die Vitalität auch bei den Zweifach-Kombinationen aus 1 μ M ATO und 5 μ M Itraconazol ($72 \pm 6\%$) sowie 25 mM LiCl und 5 μ M Itraconazol ($53 \pm 2\%$) stärker beeinträchtigt. Dabei erreichten alle drei Zweifach-Kombinationen ähnliche

Vitalitätswerte. 5 μM Itraconazol alleine senkte die Vitalität ebenfalls in den Bereich ($65 \pm 4\%$).

Auch in RH-30 Zellen war die Dreifach-Kombination aus 1 μM ATO, 2 μM Itraconazol und 25 mM LiCl mit $21\% \pm 1\%$ vitalen Zellen effizienter als alle anderen Einzel- oder Doppelbehandlungen. Die Kombination aus 1 μM ATO und 25 mM LiCl lag noch bei $35 \pm 2\%$ vitalen Zellen. Die Vitalität bei den Kombinationen 2 μM Itraconazol/ 25 mM LiCl ($59 \pm 1\%$) sowie 1 μM ATO/ 2 μM Itraconazol ($58 \pm 10\%$) lag sogar deutlich höher. Im Vergleich dazu war sogar LiCl alleine mit $47 \pm 6\%$ wirksamer, während 1 μM ATO ($73 \pm 2\%$) bzw. 2 μM Itraconazol ($88 \pm 2\%$) weniger Wirkung zeigten. Durch Steigerung der Itraconazol-Zugabe auf 5 μM nahm die Vitalität nach der Dreifach-Behandlung kaum mehr ab ($19 \pm 1\%$), blieb aber effizienter als alle anderen Behandlungen. Die beiden Zweifach-Kombinationen 1 μM ATO/ 5 μM Itraconazol ($41 \pm 1\%$) und 25 mM LiCl/ 5 μM Itraconazol ($39 \pm 1\%$) zeigten jeweils einen deutlicheren Vitalitätsverlust und beide erreichten einen ähnlichen Wert wie die dritte Zweifach-Kombination ATO und LiCl. Nach Zugabe von 5 μM Itraconazol alleine sank die Vitalität auf $63 \pm 4\%$.

Die ZF Zelllinie hatte nach Behandlung mit der Dreifach-Kombination aus 1 μM ATO, 2 μM Itraconazol und 25 mM LiCl noch immer $43 \pm 9\%$ vitale Zellen. Dies war mehr als bei den Kombinationen 1 μM ATO/ 25 mM LiCl ($21 \pm 1\%$) und 2 μM Itraconazol/ 25 mM LiCl ($39 \pm 4\%$). Selbst 25 mM LiCl senkte die Vitalität auf $36 \pm 6\%$. Nach Behandlung mit 1 μM ATO lag die Vitalität bei $75 \pm 4\%$, während 2 μM Itraconazol zu kaum einer Veränderung führten ($109 \pm 23\%$). Die Steigerung der Itraconazol-Dosis auf 5 μM führte in der Dreifach-Kombination zu einem stärkeren Vitalitätsrückgang ($27 \pm 6\%$). Doch auch die Effizienz der Kombination 5 μM Itraconazol/ 25 mM LiCl war hier besser ($21 \pm 2\%$) und lag nun im Bereich von 1 μM ATO/ 25 mM LiCl ($21 \pm 1\%$). Die Kombination aus 1 μM ATO und 5 μM Itraconazol ($77 \pm 6\%$) war hingegen noch weniger wirksam als die Kombination mit 2 μM Itraconazol ($68 \pm 4\%$). Beide lagen damit über den Werten der anderen Zweifach-Kombinationen. Die Itraconazol Einzelbehandlung mit 5 μM senkte die Vitalität auf $84 \pm 15\%$.

Ein Einfluss der drei Inhibitoren auf die primären Skelettmuskelzellen ist bei beiden Dreifach-Kombination nicht feststellbar (A 1 μM , L 25 mM, I 2 μM : $105 \pm 7\%$ bzw. I 5

μM : $103\% \pm 9\%$). Auch die Zweifach-Kombinationen verändern die Vitalität der SKMC kaum (A $1 \mu\text{M}$, L 25 mM : $102 \pm 9\%$; A $1 \mu\text{M}$, I $2 \mu\text{M}$: $114 \pm 13\%$; A $1 \mu\text{M}$, I $5 \mu\text{M}$: $113 \pm 3\%$; I $2 \mu\text{M}$, L 25 mM : $97 \pm 8\%$; I $5 \mu\text{M}$, L 25 mM : $102 \pm 12\%$). Die geringste Vitalität ist bei alleiniger Inkubation mit 25 mM LiCl zu vermerken ($88\% \pm 2\%$). $1 \mu\text{M ATO}$ und 2 sowie $5 \mu\text{M Itraconazol}$ haben hingegen auch alleine keine Wirkung auf die SKMC (A: $103 \pm 2\%$; I $2 \mu\text{M}$: $111 \pm 3\%$; I $5 \mu\text{M}$: $100 \pm 4\%$).

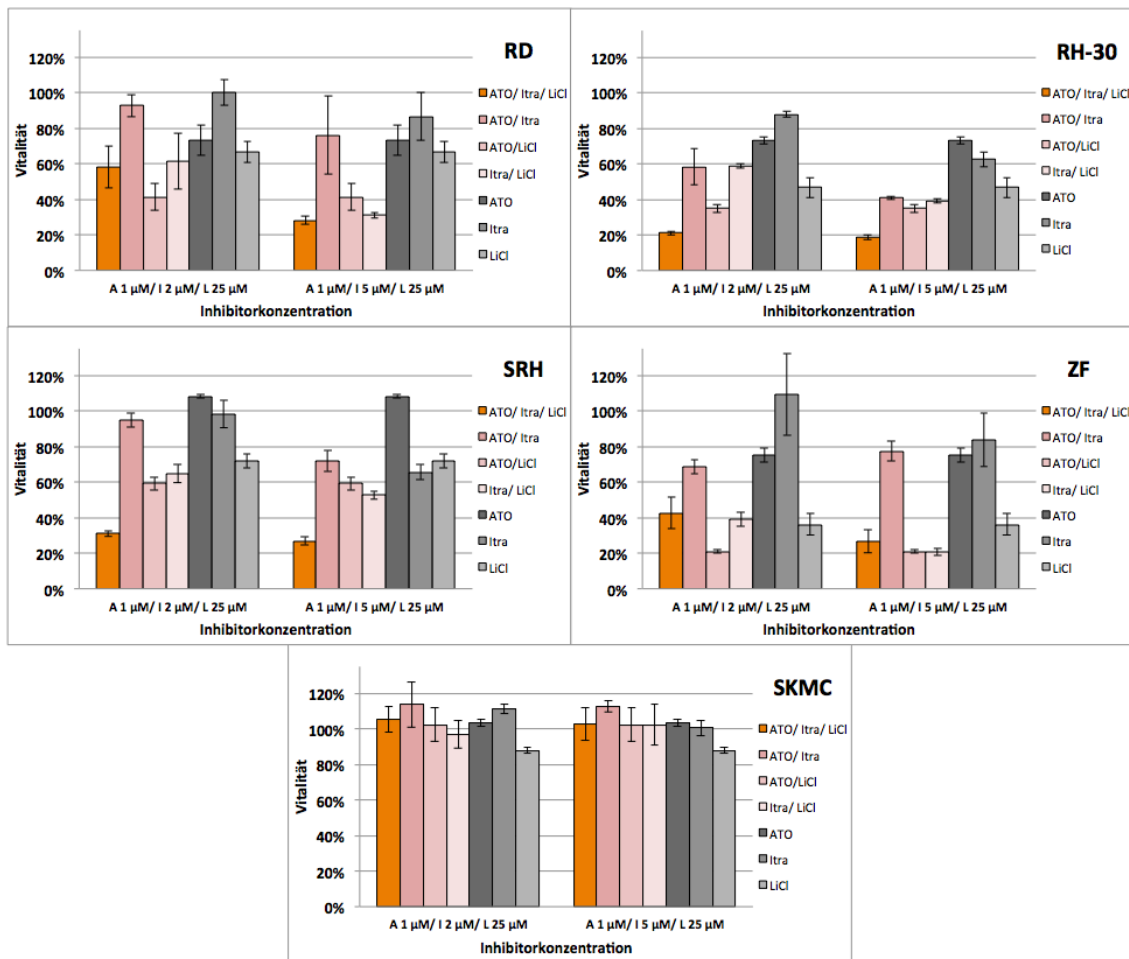


Abbildung 15: Einfluss der Dreifach-Kombination von ATO, Itraconazol und LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen (SKMC). Die Durchführung entspricht der Beschreibung in **Abbildung 12**. Untersucht wurde die Kombination von 25 mM LiCl, mit 1 µM ATO und entweder 2 µM oder 5 µM Itraconazol. Die unbehandelten Kontrollzellen wurden nur mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren (LiCl und ATO: H₂O; Itraconazol: DMSO) im Kulturmedium inkubiert. In den Säulendiagrammen wird die Wirkung der Dreifach-Kombination aus ATO (A), Itraconazol (I) und LiCl (L) (oranger Balken) mit den Wirkungen der Zweifach-Kombinationen (rosa Balken, von links nach rechts: ATO/ Itraconazol, ATO/LiCl, Itraconazol/ LiCl) sowie der einzelnen Inhibitoren (graue Balken, – von links nach rechts: ATO, Itraconazol, LiCl) gegenübergestellt. Die Abbildung repräsentiert die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

4.1.2.4 Zusammenfassung der Vitalitätsassays

Die Vitalitätsassays mit LiCl zeigten bis zu einer Konzentration von 50 mM eine stärkere Reaktion der RMS Zelllinien im Vergleich zu den SKMC. Dabei war die ZF Zelllinie am sensitivsten.

Bei Betrachtung der Zweifach-Kombinationen ATO/ LiCl und GANT61/ LiCl zeigte sich in Abhängigkeit von der Zelllinie jeweils eine unterschiedliche Wirkung. Die deutlichste Wirkungssteigerung bei der Kombination von ATO mit LiCl trat bei den RH-30 Zellen auf. Bei der Kombination von LiCl mit GANT61 reagierten die RMS Zellen zumindest bei einer Kombination von LiCl mit 10 μ M GANT61 stärker als nach den einzelnen Inhibitoren. Eine Steigerung auf 15 μ M GANT61 sorgte zwar bei den RD Zellen für einen höheren Vitalitätsverlust, doch auch die SKMCs litten unter dieser Kombination.

Unter der Wirkung von den drei Inhibitoren ATO, Itraconazol und LiCl war der Vitalitätsrückgang in RH-30 und SRH Zellen noch deutlich stärker als nach den entsprechenden Zweifach-Kombinationen. Die RD und ZF Zelllinien wiesen im Vergleich zu einzelnen Doppelbehandlungen jedoch antagonistische Effekte unter der Dreifach-Kombination auf. Die Skelettmuskelzellen zeigten keine Reaktion auf die Kombination von LiCl mit den beiden Hh-Inhibitoren, wodurch die Selektivität deutlich wird.

4.2 Inhibition der Koloniebildung in RMS Zelllinien durch LiCl

Durch die Vitalitätsassays konnten erste Erkenntnisse über die Wirksamkeit von LiCl als potentiell Therapeutikum in der RMS Behandlung gewonnen werden. Als Nächstes wurde die Fähigkeit der RMS Zelllinien untersucht, unter verschiedenen LiCl Konzentrationen Kolonien zu bilden. In der Abbildung 16 werden die Ergebnisse der „Clonogenic Assays“ der vier RMS Zelllinien dargestellt, welche mit je fünf LiCl-Konzentrationen behandelt wurden. Da SRH Zellen bei sehr geringen Zelldichten nur schlecht auswachsen, wurden hier nur bedingt verwertbare Ergebnisse erreicht. Die folgende Auswertung bezieht sich immer auf die Negativkontrolle bzw. auf andere Konzentrationen in einer Zelllinie. Somit können beispielsweise bei den gleichen Inhibitorkonzentrationen in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich viele Kolonien

sichtbar sein, doch im Vergleich zur unbehandelten Kavität der jeweiligen Linie erfolgt dennoch eine Abnahme.

Bei allen vier RMS Zelllinien war bei der niedrigsten Konzentration (5 mM LiCl) noch kein Unterschied der Koloniebildung im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar. Der Rückgang der Koloniezahl begann ab einer Konzentration von 10 mM. Hier reagierten RD und SRH Zellen besonders sensitiv. 15 mM und 20 mM LiCl reduzierten die Anzahl der sichtbaren Kolonien weiter. Die höchste verwendete Dosis von 25 mM LiCl verhinderte in SRH und RD Zellen die Koloniebildung vollständig. Auch bei den ZF Zellen waren nur noch wenige, sehr kleine Kolonien sichtbar. Lediglich die RH-30 Zelllinie bildete noch einige kleine Kolonien.

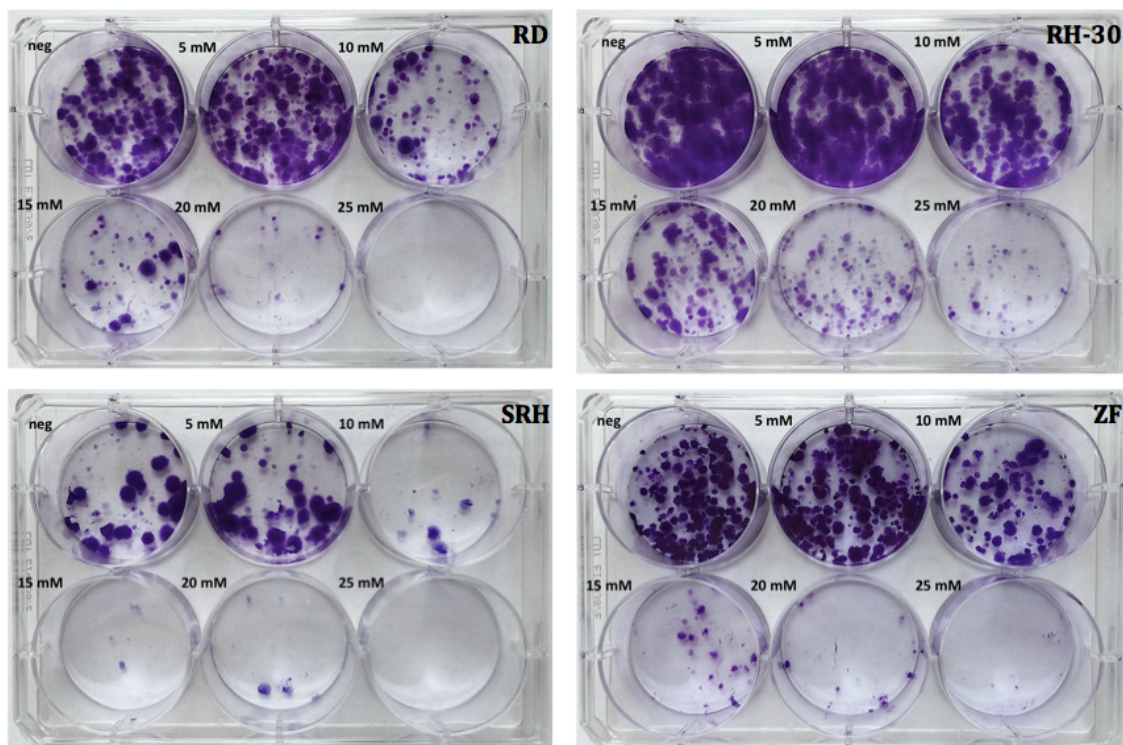


Abbildung 16: Koloniebildungsfähigkeit der RMS Zelllinien unter Einfluss von LiCl. In einer 6-Loch-Platte wurden je Kavität 500 Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 h im Brutschrank (5% CO₂; 21% O₂) wurde LiCl in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und die Zellen für weitere 72 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das LiCl-haltige Medium gegen normales Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen weiter kultiviert, bis die Kolonien der Negativkontrolle (nur Zugabe des LiCl-Lösungsmittels H₂O) deutlich sichtbar waren. Die fixierten Zellen wurden mit Kristallviolett angefärbt und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert.

4.3 Einfluss von LiCl auf das Wachstum von RMS Zelllinien in 3D-Sphäroidkulturen

Um ein *in vivo* Wachstum in 3D zu simulieren, wurden die RMS Zelllinien in 96-Lochplatten mit U-Böden ausgesät, welche keine Zelladhäsion erlauben. Dadurch bildete sich in jeder Kavität eine rundliche Tumorzellansammlung: ein Sphäroid. Die Sphäroide wurden für 4 Tage mit 25 mM bzw. 50 mM LiCl inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop fotografiert. Da SRH Zellen keine Sphäroide bilden, konnte dieser Test nur mit den RD, RH-30 und ZF Zelllinien durchgeführt werden.

4.3.1 Sphäroide der RD Zellen

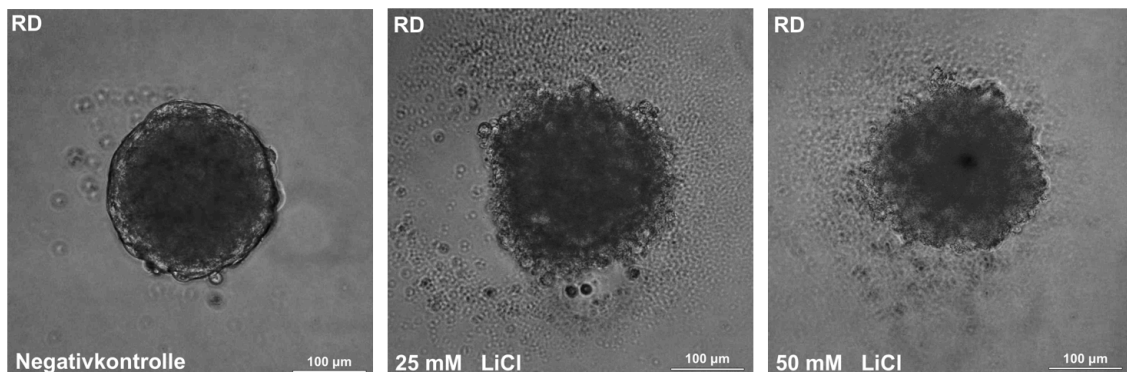


Abbildung 17: Zellwachstum von RD Zellen in einer 3D-Sphäroidkultur unter LiCl Einfluss. In eine 96-Loch-Platte mit nicht adhärenen U-Böden wurden je Kavität 5×10^3 Zellen ausgesät und für vier Tage im Brutschrank (5% CO₂; 21% O₂) inkubiert. Nach Zugabe von 25 mM bzw. 50 mM LiCl wurden die Sphäroide weitere vier Tage im Brutschrank inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop fotografisch dokumentiert. Die Negativkontrolle enthielt Medium mit dem LiCl-Lösungsmittel H₂O. Aus drei unabhängigen Experimenten wird je ein repräsentatives Sphäroid pro Konzentration dargestellt.

Abbildung 17 zeigt, dass bei der RMS Zelllinie RD die Negativkontrolle nach 4 Tagen eine Zell-Kugel mit klar umrissenen Grenzen enthielt. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Zugabe von 25 mM LiCl eine Auflockerung der Oberfläche, wodurch das Sphäroid sogar etwas größer erschien. Bei einer Konzentration von 50 mM LiCl zerfiel das Sphäroid noch stärker und auch der Durchmesser war etwas geringer als bei der Negativkontrolle.

4.3.2 Sphäroide der RH-30 Zellen

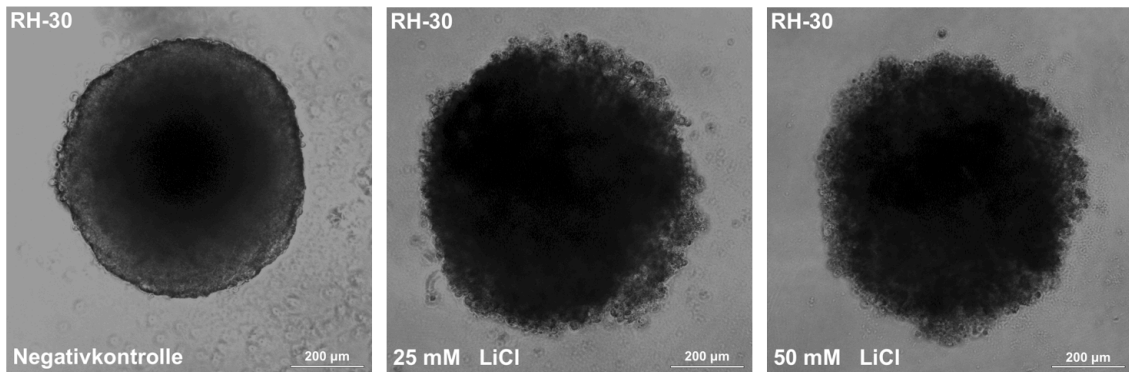


Abbildung 18: Zellwachstum von RH-30 Zellen in einer 3D-Sphäroidkultur unter LiCl Einfluss. Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 17.

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, bildeten die RH-30 Zellen in der Negativkontrolle, ebenso wie die RD Zellen, fast vollständig runde Sphäroide. Allerdings waren diese, bei anfänglich gleicher Zellzahl, deutlich größer. Nach der LiCl-Behandlung ließ sich nach 4 Tagen auch hier eine Lösung der Zell-Zell-Kontakte erkennen, was zu einer aufgelockerten Oberfläche mit scheinbarer Volumenzunahme führte.

4.3.3 Sphäroide der ZF Zellen

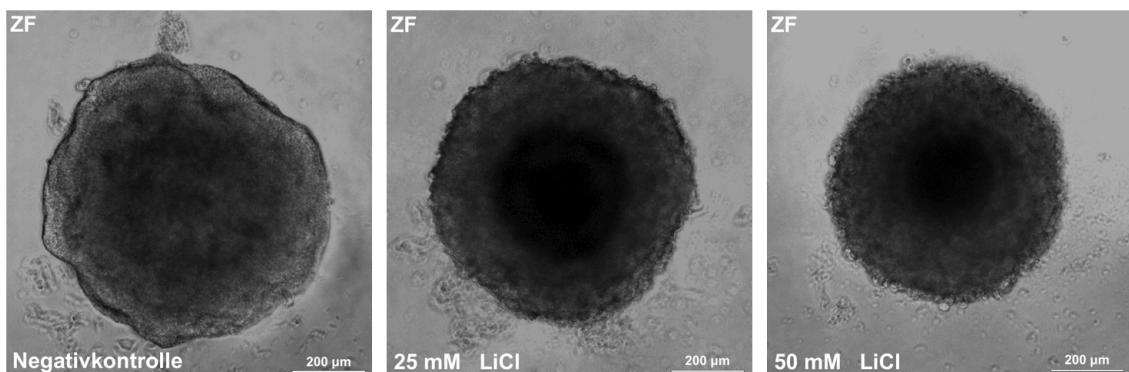


Abbildung 19: Zellwachstum von ZF Zellen in einer 3D-Sphäroidkultur unter LiCl-Einfluss. Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 17.

In Abbildung 19 wird dargestellt, dass die ZF Zellen, in gleicher Zellzahl wie RD und RH-30 Zellen ausgesät, die größten Sphäroide der drei untersuchten RMS Zelllinien bildeten. In der Negativkontrolle zeigte sich eine unregelmäßig geformte Kugel mit klar abgrenzbarer Oberfläche. Bei steigender LiCl-Konzentration lösten sich im Gegensatz

zu den beiden vorherigen Zelllinien weniger Zellen ab. Allerdings verkleinerte sich bei ZF Zellen bereits ab einer Konzentration von 25 mM LiCl der Durchmesser der Sphäroide im Vergleich zur Negativkontrolle, was bei 50 mM LiCl noch deutlicher wurde als bei 25 mM LiCl.

4.4 Einfluss von LiCl auf die GLI1 und GSK-3 β mRNA Expression in RMS Zelllinien

Nachdem der hemmende Einfluss von LiCl auf die Vitalität, Koloniebildung und das Wachstum in 3D-Kulturen gezeigt werden konnte, wurde als Nächstes die Expression der GLI1 und GSK-3 β -mRNA untersucht, um Rückschlüsse auf Veränderungen der beteiligten Signalwege zu ziehen und damit ein Verständnis für die zellulären Prozesse zu erlangen. GLI1 ist ein Transkriptionsfaktor im Hh-Signalweg und zugleich selber Zielgen der Hh-abhängigen Genexpression (Aberger and Ruiz 2014; Kasper *et al.* 2006). Die Untersuchung der Basalexpression der Hh-Signalweg Gene in den RMS Zelllinien RD, RH-30, ZF und SRH sowie primären Skelettmuskelzellen (SKMC) wurde bereits von Sabrina Schweiß im Rahmen einer Bachelorarbeit im Zellbiologischen Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen durchgeführt (Boehme *et al.* 2016). GSK-3 β ist ein direktes Ziel von LiCl (Ryves and Harwood 2001), zugleich reguliert die Kinase aber auch Menge und Aktivität der GLI Transkriptionsfaktoren (Peng *et al.* 2013).

Es wurde der Einfluss von 25 mM LiCl alleine und in Kombination mit 10 μ M GANT61 oder 1 μ M ATO auf die Expression von GLI1 und GSK-3 β in den vier RMS Zelllinien analysiert. Die Ergebnisse sind in Relation zur unbehandelten Probe der jeweiligen RMS Zelllinie ausgewertet, deren Expression 100% entspricht.

4.4.1 GLI1-mRNA Expression nach Behandlung mit LiCl, ATO und GANT61

In Abbildung 20 wird deutlich, dass die GLI1-mRNA Expression in den RMS Zelllinien unterschiedlich auf die verschiedenen Inhibitoren reagiert. Die Zelllinien RD

und SRH zeigten insgesamt den stärksten Rückgang der GLI1-mRNA Expression. Die ZF Zellen exprimierten ausschließlich bei der Kombination von 1 μ M ATO mit 25 mM LiCl weniger GLI1-mRNA ($61 \pm 19\%$) als ihre Negativkontrolle. Unter dieser Kombination verringerte sich auch bei den anderen drei Zelllinien die GLI1-Expression signifikant, wobei die SRH und RH-30 Zelllinien unter ATO und LiCl sogar die niedrigste GLI1-mRNA Expression aller Behandlungen aufwiesen (RD: $47 \pm 23\%$, SRH: $24 \pm 27\%$, RH-30: $44 \pm 19\%$). Die RD Zellen zeigten bei der Kombination GANT61/ LiCl eine GLI1 Expression von $40 \pm 31\%$, erreichten ihren niedrigsten Wert allerdings nach der alleinigen Behandlung mit 25 mM LiCl ($23 \pm 34\%$). Die Einzelbehandlung mit ATO oder GANT61 änderte dagegen die GLI1-mRNA Expression nicht (A: $100 \pm 8\%$; G: $103 \pm 18\%$). ATO alleine zeigte bei SRH Zellen ebenfalls keine Wirkung ($103 \pm 23\%$), hingegen verringerte GANT61 die GLI1-mRNA Expression auf $46 \pm 15\%$. Auch unter LiCl sank die Expression auf $60 \pm 19\%$ und in Kombination mit GANT61 weiter auf $55 \pm 17\%$. Bei der RH-30 Zelllinie fiel auf, dass die Behandlung mit 10 μ M GANT61, alleine oder in Kombination mit LiCl, eine Überexpression der GLI1-mRNA zur Folge hatte (G+L: $177 \pm 6\%$, G: $140 \pm 22\%$). ATO und LiCl, die in Kombination den höchsten Rückgang verzeichneten, senkten auch einzeln die GLI1-Expression (A: $62 \pm 32\%$; L: $73 \pm 22\%$). Die ZF Zellen zeigten unter allen Behandlungen mit Ausnahme der Kombination von ATO/ LiCl und LiCl ($103 \pm 18\%$) eine deutliche Überexpression der GLI1-mRNA (G+L: $130 \pm 17\%$; A: $121 \pm 4\%$; G: $131 \pm 16\%$) im Vergleich zur Negativkontrolle.

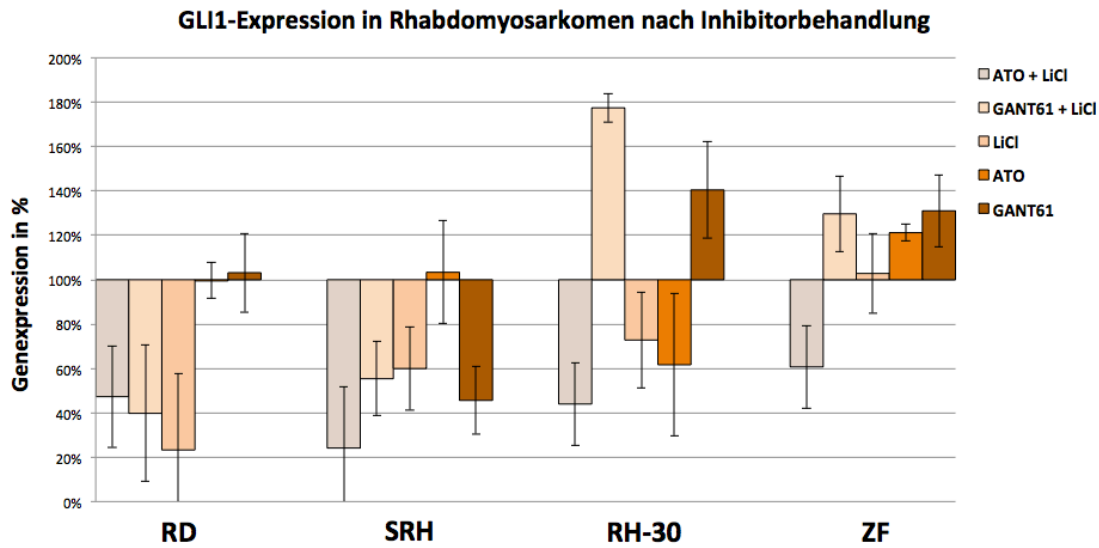


Abbildung 20: Expression der GLI1-mRNA in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF unter dem Einfluss von LiCl und den Hedgehog-Inhibitoren ATO und GANT61. In einer 6-Loch-Platte wurden je Kavität $2,5 \times 10^5$ Zellen mit 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 h im Brutschrank (5% CO₂; 21% O₂) wurden die Inhibitoren (25 mM LiCl, 1 μM ATO bzw. 10 μM GANT61) wie angegeben in die Kavitäten gegeben und die Zellen danach weitere 96 h im Brutschrank inkubiert. Die Negativkontrollen erhielten nur die Inhibitor-Lösungsmittel (LiCl und ATO: H₂O; GANT61: DMSO). Anschließend wurden die Zellen lysiert, die mRNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Für die Messung im Thermocycler (CFX96 Real-Time PCR Detection System) wurden je 50 ng cDNA eingesetzt. Die Ct-Werte von GLI1 und dem Referenzgen TBP wurden gemessen und die Differenz gebildet (Δ Ct). Zum Vergleich der Expression mit und ohne Inhibitor wurde der $\Delta\Delta$ Ct-Wert berechnet und daraus der Expressionsfaktor gebildet. Dieser wird in Prozent angegeben, wobei 100% Expression den jeweils Lösungsmittel-behandelten Tumorzellen entsprechen. Die Abbildung präsentiert die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Fehlerbalken entsprechend der Standardabweichung.

4.4.2 GSK-3β-mRNA Expression nach Behandlung mit LiCl, ATO und GANT61

Tendenziell zeigten die RMS Zelllinien unter Behandlung mit LiCl, ATO und GANT61 eine erhöhte GSK-3β-mRNA Expression (Abbildung 21), doch nur die Kombination von ATO und LiCl erhöhte die Expression in allen vier RMS Zelllinien. Bei den anderen Behandlungen ließ sich für mindestens eine Zelllinie keine signifikante Zunahme feststellen.

In RD Zellen stieg die GSK-3β-mRNA Expression nach kombinierter Zugabe von 1 μM ATO und 25 mM LiCl auf $243 \pm 39\%$, in SRH Zellen auf $191 \pm 26\%$. In RH-30 ($129 \pm 23\%$) und ZF ($166 \pm 9\%$) fiel die Überexpression etwas geringer aus. Die

Behandlung mit LiCl erhöhte in der SRH (202 ± 21%) und ZF Zelllinie (245 ± 21%) die GSK-3β-mRNA Expression deutlich. Bei den RD Zellen stieg der Wert auf 153 ± 13% ,während bei RH-30 Zellen eine Expression von 115 ± 28% erreicht wurde. Ebenfalls ließ sich bei drei der vier RMS Zelllinien ein eindeutiger Expressionsanstieg nach Behandlung mit der Kombination von LiCl und GANT61 feststellen (SRH: 169 ± 5%; RH-30: 176 ± 22%; ZF: 171 ± 14%). Im Gegensatz dazu lag die GSK-3β Expression in der RD Zelllinie nach Zugabe dieser Kombination bei 92% (± 36%). Die ZF Zelllinie zeigte als einzige nach alleiniger ATO und GANT61 Zugabe eine deutliche Erhöhung der GSK-3β-mRNA Expression auf 186 ± 8% bzw. 182 ± 11%. Die anderen Zelllinien reagierten auf die Inhibitoren nur mit einer geringen Änderung der Expression (A: RD: 104 ± 18%; SRH: 128 ± 21%; RH-30: 116 ± 29%; G: RD: 114 ± 2%; SRH: 101 ± 34%; RH-30: 116 ± 11%).

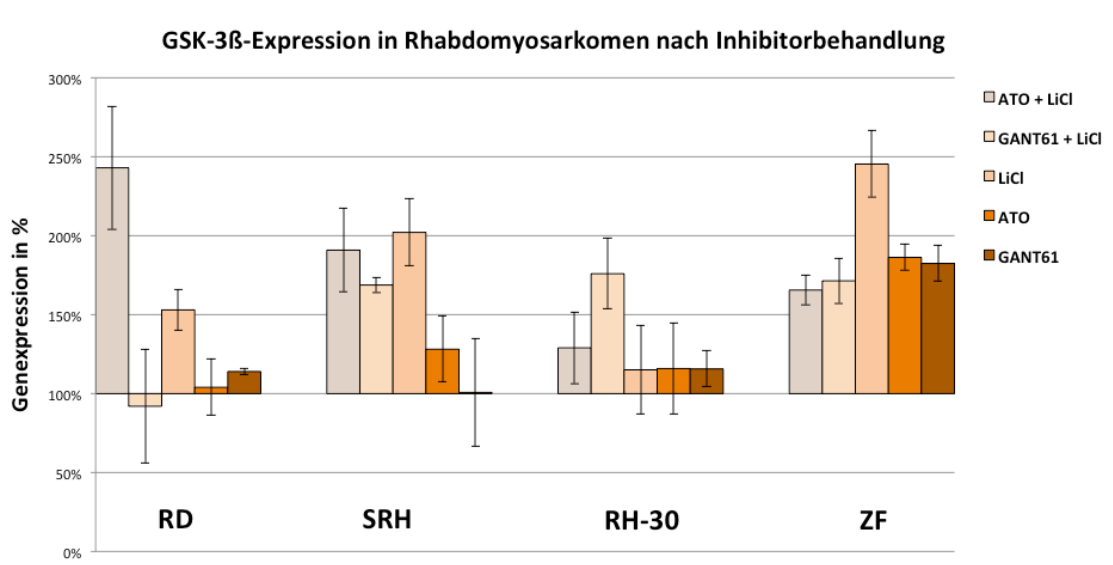


Abbildung 21: Expression der GSK-3β mRNA in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF unter dem Einfluss von LiCl und den Hedgehog-Inhibitoren ATO und GANT61. Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 20. Statt des Ct-Wertes von GLI1, wurde der Ct-Wert von GSK-3β gemessen und mit dem Wert des Referenzgens TBP die Differenz gebildet (ΔCt).

4.5 Zelltod-Induktion in LiCl-behandelten RMS Zelllinien

Auch wenn eine Einschränkung von Vitalität und Proliferation einen ersten Hinweis auf die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen geben, so ist die Induktion des Zelltods das eigentliche Ziel der Behandlung. Hierfür wurde als qualitative Methode die Zellkernfragmentierung der RMS Zelllinien mittels DAPI-Färbung dargestellt. Um die Zelltod-Induktion zu quantifizieren, erfolgte eine Analyse der Membranintegrität mittels Durchflusszytometrie.

4.5.1 Darstellung der Apoptose-Induktion mittels Fluoreszenzmikroskopie

Während des programmierten Zelltods kommt es zur Kernfragmentierung in der Zelle. Diese kann durch Anfärbung der DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Zellen nach Inhibitor-Behandlung mit DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher in die DNA interkaliert, inkubiert. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes CellTracker® das Zytoplasma der Zelle sichtbar gemacht.

Um die Ergebnisse leichter einstufen zu können, wurde die Fragmentierung des Zellkerns in 4 Phasen unterteilt (siehe Abbildung 22).

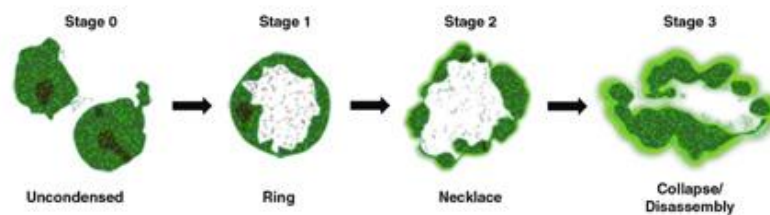


Abbildung 22: Darstellung der Phasen der Zellkernfragmentierung im Verlauf der Apoptose

http://www.biotek.com/assets/tech_resources/10589/figure1.jpg Zu Beginn (Phase 0) liegt die DNA im Zellkern noch uncondensiert vor. In Phase 1 kondensiert die DNA und bildet im Kern eine Ringstruktur aus. Anschließend bilden sich Poren im Kern und die DNA fängt an sich zu allen Seiten hin auszubreiten (Phase 2). In Phase 3 kommt es zur völligen Degradation des Zellkerns und die DNA verteilt sich im Zytoplasma, bis sich die Zelle schlussendlich in kleine Vesikel abschnürt, welche von umgebenden Zellen phagozytiert werden.

4.5.1.1 Zellkernfragmentierung in RD Zellen

Nach 72 Stunden Inkubationszeit unter 25 mM LiCl trat die DNA aus dem zerfallenden Kern der vergrößert dargestellten Zelle aus, die Kernfragmentierung in dieser Zelle befand sich somit in Phase 2 (Abbildung 23). Nach Zugabe von 50 mM LiCl verteilten sich die DNA-Fragmente der vergrößert dargestellten Zelle im Zytoplasma bzw. fingen Vesikel an sich abzuschneiden. Die Negativkontrolle zeigte hingegen nur Zellen mit einheitlich strukturiertem Kern und klar erkennbaren Pseudopodien (Abbildung 23). Die mit Staurosporin in einer Verdünnung von 1:1000 behandelte Positivkontrolle führte in allen abgebildeten Zellen zur Phase 3 der Kernfragmentierung.

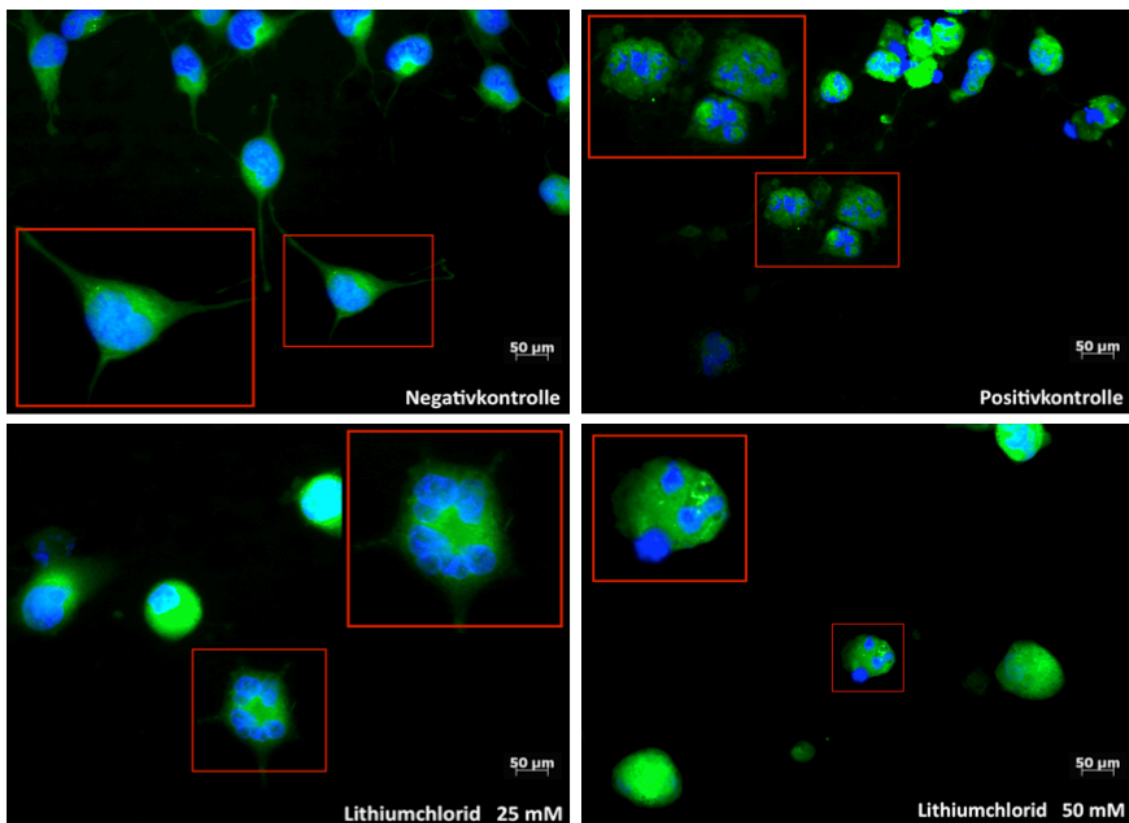


Abbildung 23: Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in RD Zellen. In die Kammern eines Kammerobjektträgers wurden je 1×10^4 Zellen mit 500 µl Medium ausgesät und für 24 h im Brutschrank (5% CO₂; 21% O₂) inkubiert. Nach Zugabe von 25 mM bzw. 50 mM LiCl wurden die Zellen für weitere 72 h inkubiert. Die Negativ- und Positivkontrollen erhielten über diesen Zeitraum normales Medium, wobei die Positivkontrolle die letzten 6 h mit Staurosporin behandelt wurde. Darauf folgte die Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau) und des Zytoplasmas mit CellTracker® (grün). Die roten Kästchen der Abbildung zeigen vergrößerte Bildausschnitte. Die Aufnahmen wurden unter 40-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

4.5.1.2 Zellkernfragmentierung in SRH Zellen

In Abbildung 24 zeigen die SRH Zellen in der Negativkontrolle einen homogenen Zellkern und Pseudopodien. Im Gegensatz dazu ließ sich bei einer Konzentration von 25 mM LiCl nach 72 h abermals die Phase 2 der Zellkernfragmentierung erkennen, DNA trat ins Zytoplasma und formte eine Perlenketten-artige Struktur in der Zelle. Unter der Wirkung von 50 mM LiCl befand sich die dargestellte SRH Zelle in Phase 3 der Kernfragmentierung und zeigte DNA-Ansammlungen über das Gesamtvolumen verteilt. Die Zelle zeigte keine Ausläufer mehr, war aber noch scharf von der Umgebung abgegrenzt. In der Positivkontrolle hatte sich die DNA schon in eine Vielzahl von kleinen Fragmenten aufgeteilt (vergrößerter Bildausschnitt). In einer weiteren Zelle war bereits eine Vesikelbildung sichtbar.

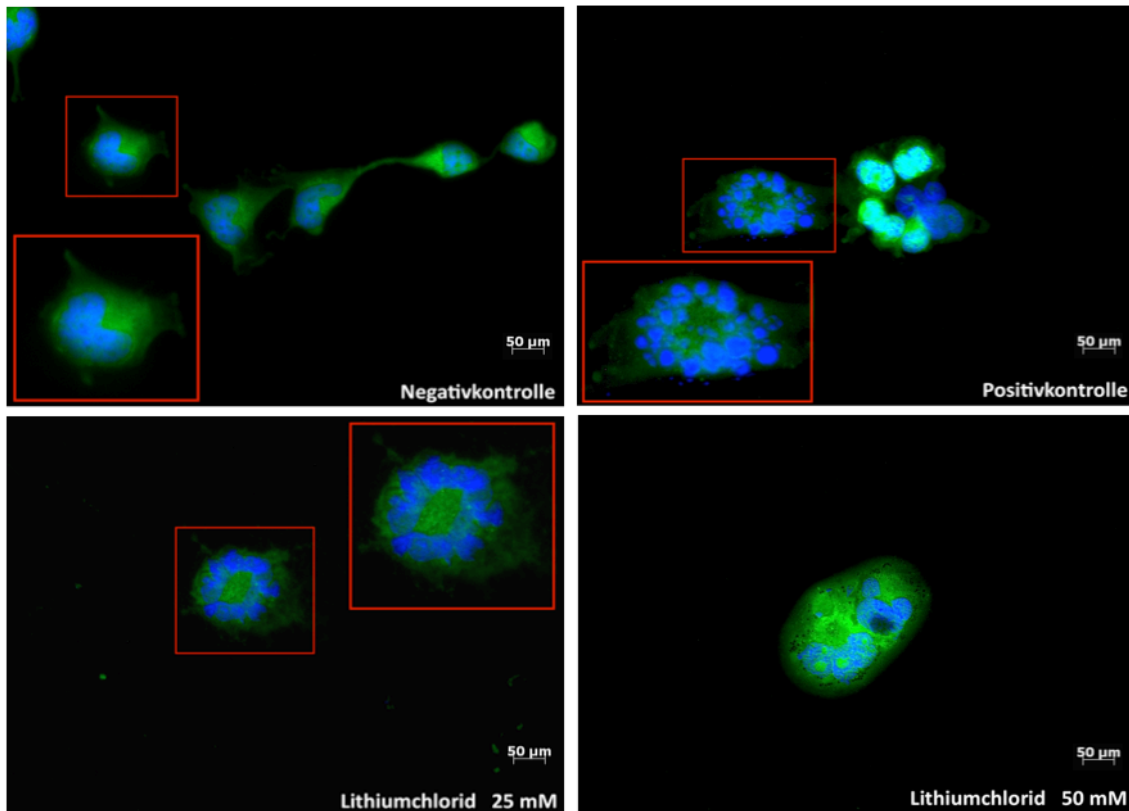


Abbildung 24: Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in SRH Zellen. Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 23.

4.5.1.3 Zellkernfragmentierung in RH-30 Zellen

RH-30 Zellen hatten in der Negativkontrolle einen prominenten, intakten Zellkern und gleichmäßig angefärbtes Zytoplasma (Abbildung 25). Unter Behandlung mit 25 mM LiCl zeigte sich eine deutliche DNA Fragmentierung sowie eine unregelmäßige Zytoplasma-Abgrenzung. Unter 50 mM LiCl wurde nach der Inkubationszeit von 72 h Phase 3 der Kernfragmentierung erreicht, die Zelle begann zu zerfallen. Als Anzeichen für eine vorangeschrittene Phase 3 schnürt die dargestellte Zelle der Positivkontrolle Vesikel mit einzelnen DNA Fragmenten ab.

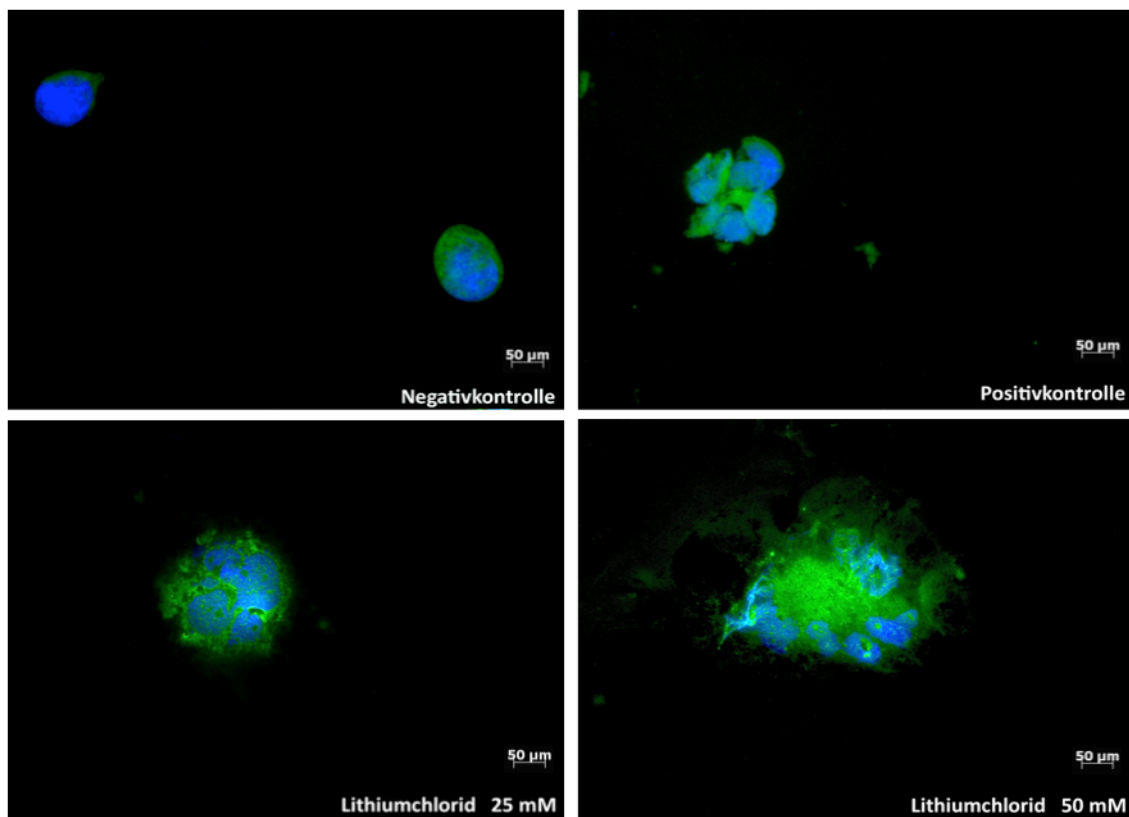


Abbildung 25: Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in RH-30 Zellen. Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 23.

4.5.1.4 Zellkernfragmentierung in ZF Zellen

Wie in Abbildung 26 dargestellt, zeigte die Negativkontrolle der ZF Zellen eine ovale Zelle mit großem Kern. Bei einer Konzentration von 25 mM LiCl bildeten sich bereits DNA Fragmente. Die Erhöhung der Lithiumkonzentration auf 50 mM führte zum Zerfall der DNA in kleine Stücke, welche partiell außerhalb des grün fluoreszierenden Zytoplasmas lagen. In der Staurosporin-behandelten Positivkontrolle war die Zellmembran ebenfalls nicht mehr intakt und DNA Fragmente wurden freigesetzt.

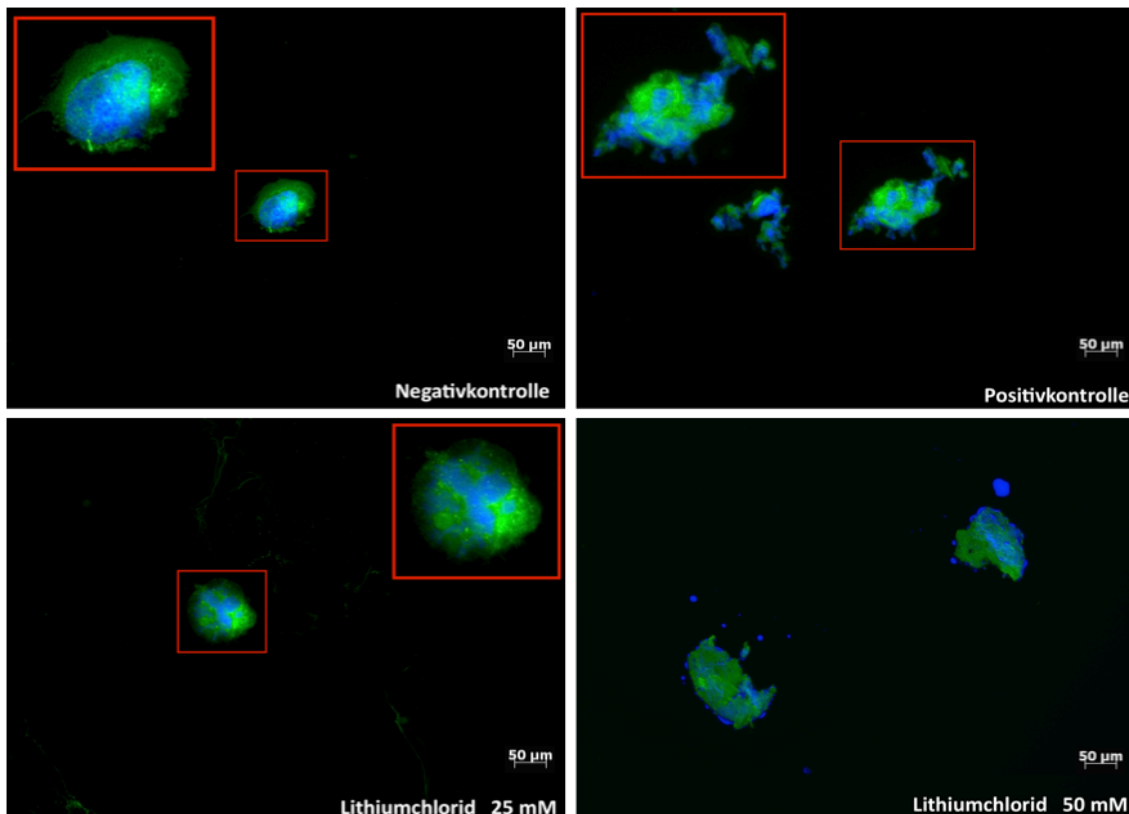


Abbildung 26: Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in ZF Zellen. Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 23.

4.5.2 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers wurde die Zelltod-Induktion quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden die RMS Zelllinien und SKMC mit dem fluoreszierenden Farbstoff „Fixable Viability Dye eFluor[®] 450“ inkubiert, der intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann und somit ausschließlich tote Zellen anfärbt.

Zunächst wurde der Einfluss von 25 mM bzw. 50 mM LiCl untersucht. Im Anschluss daran wurden 25 mM LiCl jeweils in Kombination mit 1 μ M ATO oder 10 μ M GANT61 geprüft. Die entsprechenden Konzentrationen wurden anhand der Erkenntnisse in Kapitel 4.1.2.1 und 4.1.2.2 ausgewählt.

4.5.2.1 Quantifizierung der Zelltod-Induktion durch LiCl

Die RMS Zelllinien zeigten hinsichtlich der Aufnahme des „Fixable Viability Dye eFluor[®] 450“ verschiedene Reaktionen auf die LiCl Behandlung. Abbildung 27 zeigt, dass sich bei drei der vier Zelllinien eine zunehmende Aufnahme des Farbstoffs nachweisen ließ und nur bei den ZF Zellen keine Anfärbung detektiert wurde. Unter 25 mM LiCl wurden nur $2 \pm 1\%$ der ZF Zellen angefärbt, unter 50 mM LiCl waren es sogar $-2 \pm 1\%$ und somit etwas weniger als in der Negativkontrolle. Bei den übrigen RMS Zellen wurden signifikante Zelltod-Induktionen gemessen und Unterschiede zwischen den LiCl Konzentrationen wurden sichtbar. Den höchsten Anteil eFluor[®] 450 positiver Zellen wies die RD Zelllinie auf (25mM LiCl: $42 \pm 6\%$, 50 mM LiCl: $53 \pm 3\%$). Die SRH Zelllinie erreichte $12 \pm 2\%$ tote Zellen unter 25 mM LiCl und $18 \pm 4\%$ tote Zellen unter 50 mM LiCl. Ein Viertel der mit 25 mM LiCl behandelten RH-30 Zellen hatte zum Zeitpunkt der Messung keine intakte Zellmembran mehr ($25 \pm 1\%$). Durch Erhöhung der LiCl Konzentration auf 50 mM stieg dieser Wert kaum an ($26 \pm 5\%$). Ebenso wie bei den ZF Zellen, ergab die Messung bei den gesunden Skelettmuskelzellen keine signifikante Zelltod-Induktion. Das Durchflusszytometer verzeichnete bei beiden LiCl Konzentrationen lediglich $3 \pm 2\%$ tote Zellen.

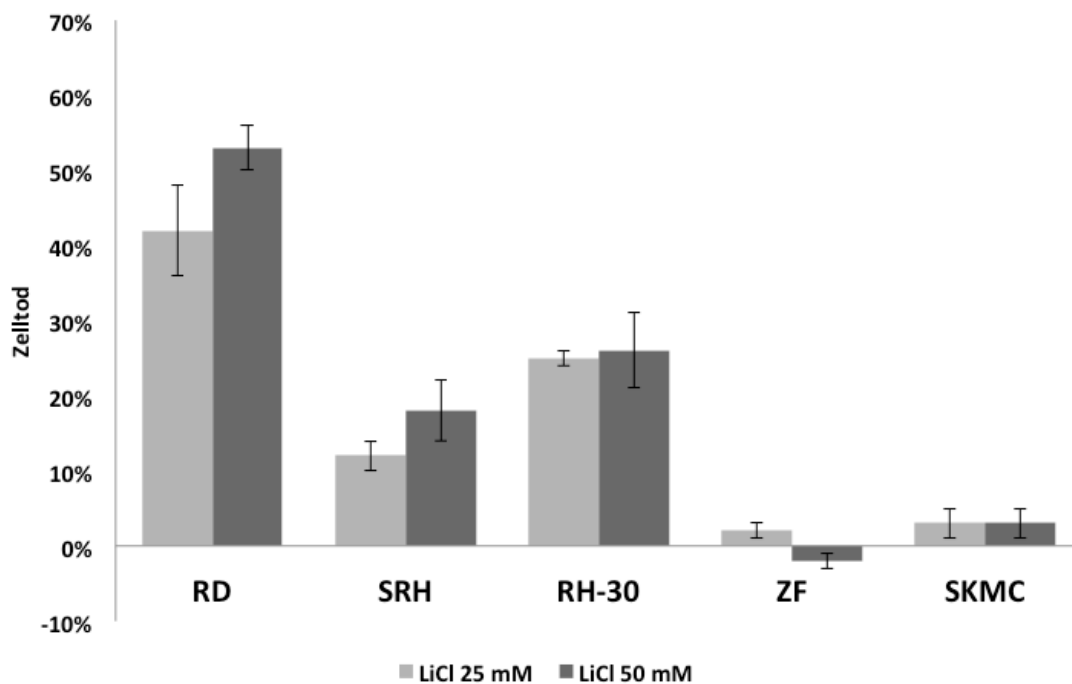


Abbildung 27: Der Einfluss von LiCl auf die Zelltodinduktion in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen (SKMC). In 6-Loch-Platten wurden je Kavität $2,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und für 24 h im Brutschrank (5% CO₂; 21% O₂) inkubiert. Unter Zugabe von 25 mM bzw. 50 mM LiCl wurden die Zellen weitere 72 h im Brutschrank inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen mit dem Fixable Viability Dye eFluor[®] 450 angefärbt und der Anteil eFluor[®] 450 positiven Zellen im Durchflusszytometer (LSRII Flow Cytometer, BD Bioscience) ermittelt. Die Säulendiagramme zeigen die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten, wobei die Zelltodrate in % angegeben wird und 0 % der mit dem Inhibitor-Lösungsmittel behandelten Negativkontrolle entspricht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.5.2.2 Quantifizierung der Zelltodinduktion durch die Kombination aus ATO und LiCl

Die in anderen Experimenten effiziente Kombination aus 25 mM LiCl und 1 μ M ATO wurde auf ihre Fähigkeit getestet, den Zelltod in RMS Zelllinien einzuleiten. In Abbildung 28 fällt auf, dass bis auf die RH-30 Zelllinie ($15 \pm 2\%$) keine der RMS Zelllinien unter Zugabe von 1 μ M ATO Anzeichen von Zelltod zeigte. In der Kombination mit 25 mM LiCl nahmen $70 \pm 1\%$ der RH-30 Zellen den Farbstoff auf. Dies war eine Steigerung von 45% im Vergleich zur alleinigen LiCl Behandlung ($25 \pm 1\%$). Auch die RD und SRH Zellen wiesen nach Behandlung mit der Kombination aus ATO und LiCl einen Anstieg eFluor[®] 450 positiver Zellen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen auf. Bei der RD Zelllinie stieg der Anteil angefärbter Zellen unter Zugabe der Kombination von $42 \pm 6\%$ auf $51 \pm 0\%$ und bei der SRH Linie von $12 \pm 2\%$ auf $21 \pm 3\%$. Bei den ZF Zellen konnte weder bei einzelner Inhibitorzugabe noch in Kombination eine Aufnahme von eFluor[®] 450 gemessen werden. Maximal $4 \pm 2\%$ der SKMC nahmen unter dem Einfluss der Kombination eFluor[®] 450 auf.

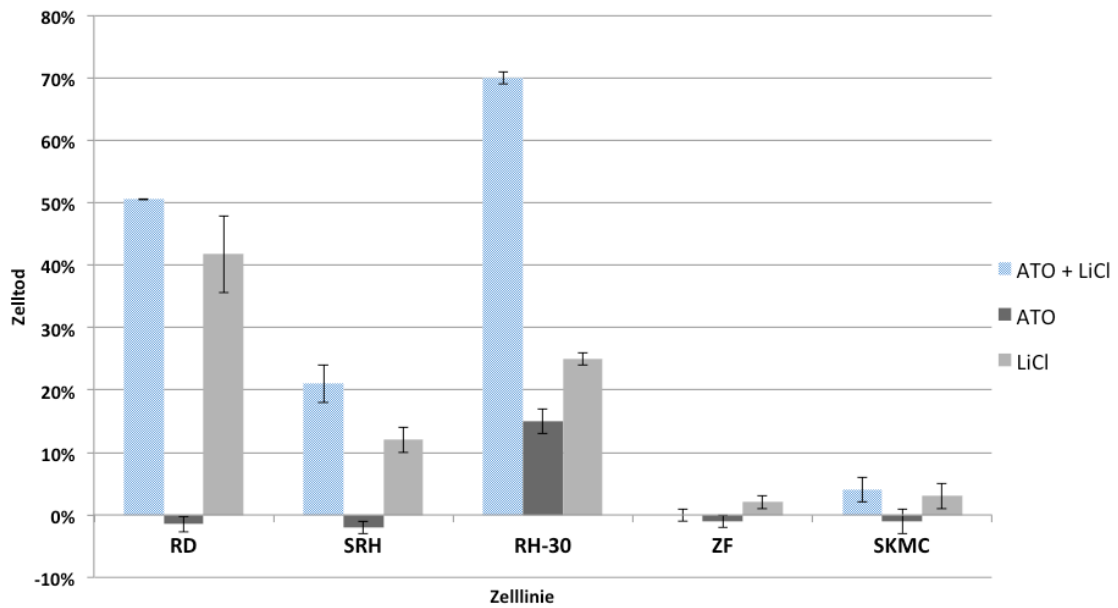


Abbildung 28: Einfluss der Kombination von ATO und LiCl auf die Zelltodinduktion in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen (SKMC). Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 27. Es wurden 25 mM LiCl und 1 μ M ATO eingesetzt. In den Säulendiagrammen werden die eFluor[®] 450 positiven Zellen (Zelltodinduktion) nach Behandlung mit der Kombination aus ATO und LiCl (blaue Säule) mit den Einzelinhibitoren (Mitte, dunkelgrau: ATO, rechts, hellgrau: LiCl) verglichen. Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

4.5.2.3 Quantifizierung der Zelltodinduktion durch die Kombination aus GANT61 und LiCl

In Abbildung 29 werden die Ergebnisse der FACS Analyse in RMS Zelllinien unter dem Einfluss einer Kombination aus LiCl und GANT61 dargestellt. Die Kombination von 25 mM LiCl und 10 μ M GANT61 zeigte bei allen RMS Linien eine stärkere Wirkung als die einzelnen Inhibitoren. Bei der RD Zelllinie, die unter alleiniger LiCl Behandlung $42 \pm 6\%$ tote Zellen aufwies, stieg der Anteil toter Zellen unter der Kombination auf $85 \pm 3\%$ an. Dagegen lag der Anteil toter Zellen bei alleiniger GANT61 Behandlung bei $17 \pm 5\%$. Dieser Effekt trat ebenfalls bei den SRH Zellen auf, wo nach Behandlung mit der Kombination $50 \pm 7\%$ der Zellen eFluor[®] 450 positiv waren. Dagegen erzielte die Einzelbehandlung mit LiCl nur $12 \pm 2\%$ angefärbte Zellen, die Behandlung mit GANT61 $8 \pm 2\%$. Mit $68 \pm 1\%$ war die Zelltodinduktion nach Behandlung mit der Inhibitorkombination aus LiCl und GANT61 in den RH-30 Zellen am zweithöchsten. Nach Einzelbehandlung betrug der Anteil toter Zellen $34 \pm 4\%$ bei GANT61 und $25 \pm 1\%$ bei LiCl. Die ZF Zellen, bei denen unter LiCl kaum Zelltod festgestellt werden konnte ($2 \pm 1\%$), reagierten auf GANT61 ($13 \pm 6\%$) leicht. In Kombination erhöhte sich der Anteil eFluor[®] 450 positiver Zellen auf $22 \pm 1\%$. Die Skelettmuskelzellen wurden wiederum nur minimal beeinflusst und zeigten unter GANT61 maximal $9 \pm 0\%$ eFluor[®] 450 positive Zellen.

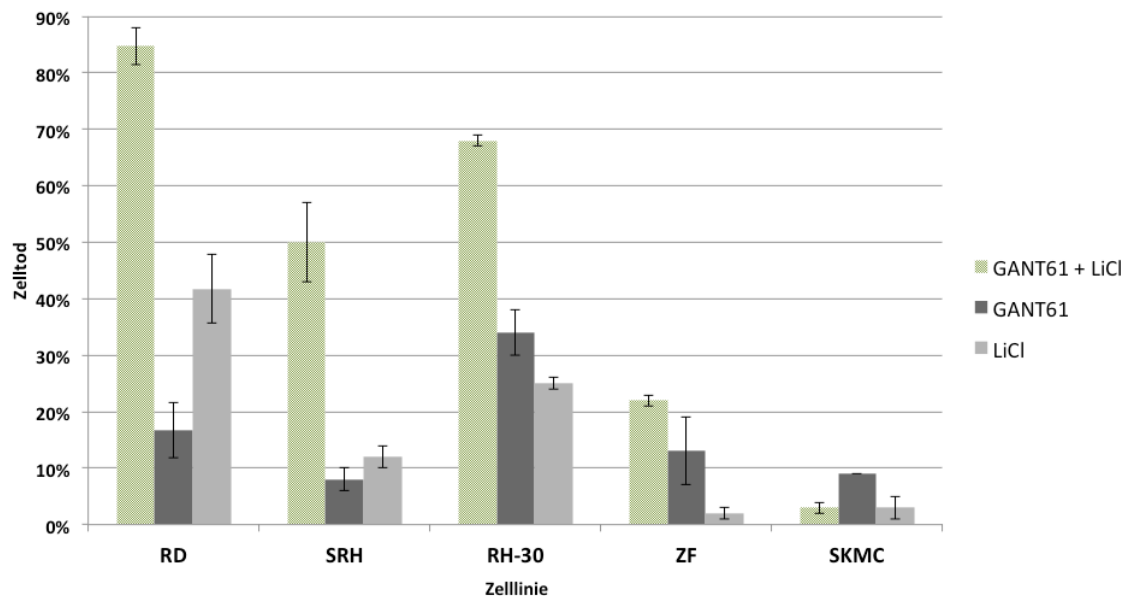


Abbildung 29: Einfluss der Kombination von GANT61 und LiCl auf die Zelltodinduktion in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen (SKMC). Die Durchführung entspricht der Beschreibung in Abbildung 27. Es wurden 25 mM LiCl und 10 μ M GANT61 eingesetzt. In den Säulendiagrammen werden die eFluor[®] 450 positiven Zellen (Zelltodinduktion) nach Behandlung mit der Kombination aus GANT61 und LiCl (grüne Säule) mit den Einzelbehandlungen (Mitte, dunkelgrau: GANT61, rechts, hellgrau: LiCl) verglichen. Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Versuchen ermittelt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

4.5.3 Zusammenfassung der Zelltodanalyse

Die RD Zelllinie zeigte den größten Anteil toter Zellen nach Zugabe von 25 mM und 50 mM LiCl gemessen an der eFluor[®] 450 Aufnahme. Auch die Zellkernfragmentierung als Zeichen für den programmierten Zelltod war bei RD Zellen nach Behandlung mit LiCl deutlich sichtbar. Unter den Kombinationen aus ATO/ LiCl und GANT61/ LiCl erhöhte sich der Anteil eFluor[®] 450 positiver RD Zellen noch einmal deutlich. Bei den SRH Zellen war besonders die Kombination aus GANT61 und LiCl bei der Zelltodinduktion effizient. LiCl in Verbindung mit ATO führte zu einem geringeren Anteil eFluor[®] 450 positiver Zellen. Außerdem zeigten die SRH Zellen nach Inkubation mit LiCl Zeichen der Apoptose in Form einer Zellkernfragmentierung. In RH-30 Zellen steigerten beide Kombinationen im Vergleich zur Einzelbehandlung mit ATO, GANT61 oder LiCl die Aufnahme von eFluor[®] 450 erheblich. Auch hier war in LiCl behandelten Zellen nach DAPI Färbung eine Zellkernfragmentierung sichtbar. ZF Zellen wiesen in der FACS Analyse allein nach der Inkubation mit GANT61 bzw. GANT61 und LiCl einen signifikanten Anteil eFluor[®] 450 positiver Zellen auf. Die Fluoreszenzaufnahmen der Zellkernfragmentierung zeigten hingegen auch bei beiden LiCl Konzentrationen eindeutige Anzeichen von Zelltod in den betrachteten Zellen.

Da nur bei den RMS ein qualitativer Zelltodnachweis mit dem Fluoreszenzmikroskop gemacht wurde, fehlt hier die Vergleichbarkeit mit den SKMC. Dafür war die eFluor[®] 450 Aufnahme in den gesunden Skelettmuskelzellen unter LiCl alleine und zusammen mit den Gli-Inhibitoren durchgehend sehr niedrig. Lediglich GANT61 führte zu einer geringen Zelltodinduktion.

5 Diskussion

Der Anteil der Sarkome an der Gesamtheit maligner Tumorerkrankungen ist mit weniger als 1% bei Erwachsenen nur gering (Burningham *et al.* 2012). Auch wenn der Anteil an der Gesamtheit der Tumorerkrankungen bei Kindern mit 20% vergleichsweise hoch ist (Burningham *et al.* 2012), fehlen dennoch viele Erkenntnisse über Genetik, zelluläre Prozesse und Therapie von Sarkomen. Die chirurgische Entfernung ist bis heute die wichtigste Behandlung und wird je nach Resektionsgrad und Tumorstadium mit einer neoadjuvanten und/oder adjuvanten Strahlen- und Chemotherapie verbunden (Riedel 2012).

Das häufigste Weichgewebe-Sarkom im Kinder- und Jugendalter ist das Rhabdomyosarkom (El Demellawy *et al.* 2017). Etwa 350 Neuerkrankungen werden jedes Jahr in den USA diagnostiziert (Hawkins *et al.* 2013). Bei metastasierten RMS liegt die 10 Jahres Überlebensrate trotz Chemotherapie bei nur 20% (Weigel *et al.* 2016). Hierbei spielt die Entstehung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika eine entscheidende Rolle (El Demellawy *et al.* 2017) und es werden dringend neue Behandlungsmöglichkeiten benötigt. Ein möglicher molekularer Angriffspunkt in RMS ist GSK-3 β . Es konnte gezeigt werden, dass Signalwege mit Beteiligung von GSK-3 β in vielen Tumoren aktiv sind, unter anderem auch in RMS (Annavarapu *et al.* 2013; Jahangiri and Weiss 2013; McCubrey *et al.* 2014). Weitere Studien zeigten, dass die GSK-3 β -Inhibition mit LiCl einen Rückgang der Proliferation und die Induktion des Zelltods bei verschiedenen Tumorzellen bewirken kann (Kaufmann *et al.* 2011; Ronchi *et al.* 2010). Auch mit dem Hh-Signalweg interagiert GSK-3 β (Kalderon 2002; Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011). Eine erhöhte Aktivität des Hh-Signalwegs in RMS ist bekannt (Kawabata *et al.* 2011) und es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Hh-Signalwegs das Wachstum von RMS Zelllinien *in vitro* verringert (Kawabata *et al.* 2011; Tostar *et al.* 2010; Boehme *et al.* 2016). Welchen Einfluss LiCl auf das Überleben und die Vitalität verschiedener RMS Zelllinien hat, soll im Folgenden diskutiert werden. Dabei werden seine Wirkung als GSK-3 β -Inhibitor, aber auch die Kombinationen von LiCl mit ATO, GANT61 und Itraconazol und die Auswirkung auf den Hh-Signalweg sowie Wechselwirkungen der Signalwege betrachtet.

5.1 Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs in RMS

Die Analyse der mRNA-Basalexpression von Hh-Signalweg Genen in RMS Zelllinien zeigte größtenteils eine deutliche Überexpression im Vergleich zu SKMC. Vor allem die *GLII*-mRNA wurde in den RMS Zelllinien RD, RH-30 und ZF überexprimiert, wobei die aRMS Zelllinien RH-30 und ZF die stärkste Expression gegenüber SKMC verzeichneten (Boehme *et al.* 2016). RH-30 Zellen besitzen eine *GLII* Genamplifikation, die zu einer starken Expression verschiedener GLII Isoformen führt (Forus *et al.* 1993). Dies erklärt das hohe mRNA Aufkommen und spiegelt sich auch bei der Proteinexpression wider. Dagegen zeigten die ZF Zellen auf Proteinebene keine starke GLII Überexpression (Boehme *et al.* 2016). Die SRH Zelllinie unterschied sich in der GLII Expression am wenigsten von den SKMC (Boehme *et al.* 2016).

5.2 GSK-3-Inhibitor LiCl als therapeutischer Ansatz für RMS

GSK-3 phosphoryliert zahlreiche Proteine und reguliert so verschiedene Signalwege, die für Proliferation, Überleben und Differenzierung verantwortlich sind. Darunter sind beispielsweise der PI3K/Akt-Signalweg, der Wnt-Signalweg, der NOTCH-Signalweg und der Hh-Signalweg (Kalderon 2002; Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011). LiCl inhibiert GSK-3 und wird seit über 60 Jahren als Medikament bei psychischen Erkrankungen eingesetzt (Cade 1949). Eine protektive Wirkung gegenüber malignen Tumoren wurde später entdeckt (McCubrey *et al.* 2014). Lithium wirkt zum einen als direkter Inhibitor durch kompetitive Hemmung an der Magnesiumbindungsstelle von GSK-3 und zum anderen als indirekter Inhibitor, in dem es die inhibitorische Phosphorylierung von GSK-3 steigert (Jope 2003).

Die spindelzellförmige, sklerosierende RMS Zelllinie SRH zeigte nach LiCl Zugabe den geringsten Rückgang der Vitalität von allen untersuchten RMS Zelllinien, reagierte aber bei Konzentrationen von 25 mM und 50 mM immer noch signifikant sensitiver als die SKMC. Die Koloniebildung aus Einzelzellen war bei der SRH Zelllinie bereits im unbehandelten Zustand stark eingeschränkt, wurde aber durch LiCl weiter inhibiert. Die SRH Zellen waren darüber hinaus nicht in der Lage, stabile Sphäroide zu bilden. Die

Durchflusszytometrie ergab eine leicht erhöhte Zelltodrate unter LiCl, welche dosisabhängig zunahm. Bedingt verwertbar waren die Bilder der Kernfragmentierung, auf denen nur wenige Zellen ausgewertet werden konnten, welche allerdings Anzeichen für einen apoptotischen Zelltod unter LiCl zeigten. Wahrscheinlich ist hier ein Ablösen vieler Zellen durch die Wasch- und Färbeschritte der Vorbereitung. Die GSK-3 β -mRNA Expression war in SRH Zellen nach LiCl Behandlung etwa zweifach erhöht, während die GLI1-mRNA Expression zurückging. Allerdings war die basale GLI1-mRNA und Protein Expression sowie die Expression weiterer Komponenten des Hh-Signalwegs in SRH Zellen von allen untersuchten RMS Zelllinien am geringsten (Boehme *et al.* 2016). Spätere Untersuchungen im Zellbiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Orthopädie zeigten außerdem eine Zunahme der inhibitorischen GSK-3 β Ser9 Phosphorylierung nach LiCl Behandlung (Schleicher *et al.* 2017), allerdings ebenfalls eine Zunahme der GLI1 Protein Expression unter LiCl.

Die eRMS Zelllinie RD verlor mit steigender LiCl-Konzentration stärker an Vitalität als die SRH Zellen. Auch bei der Koloniebildung und in 3D Kulturen wurden Proliferation und Vitalität in RD Zellen durch LiCl deutlich beeinträchtigt. Im Durchflusszytometer zeigten die RD Zellen unter LiCl die stärkste Zelltod-Induktion aller untersuchten RMS Zelllinien. Auch die Bilder der Kernfragmentierung zeigten Einfluss von LiCl auf die RD Zellen, welche sich mutmaßlich in der Apoptose befanden. Allerdings konnten auch hier nicht viele Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Die GSK-3 β -mRNA Expression stieg durch LiCl Zugabe in RD Zellen 1,5 fach an, während die GLI1-mRNA Expression am deutlichsten von allen RMS Zelllinien um fast 80% sank. Auch konnte in weiteren Untersuchungen im Zellbiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Orthopädie bei RD Zellen eine sehr starke Zunahme der inhibitorischen GSK-3 β Ser9 Phosphorylierung nach LiCl Behandlung festgestellt werden, sowie ein deutlicher Rückgang der GLI1 Protein Expression (Schleicher *et al.* 2017).

Die aRMS Zelllinie RH-30 reagierte im Vitalitätsassay sensitiver als die SRH und RD Zellen. Bei der Koloniebildung aus Einzelzellen konnten allerdings noch unter der höchsten verwendeten LiCl Konzentration Kolonien nachgewiesen werden, während die 3D Sphäroidkulturen nach LiCl Zugabe den Zusammenhalt verloren, optisch allerdings dadurch größer erschienen als unbehandelte Sphäroide. Die Zelltodinduktion durch

LiCl, gemessen durch eFluor[®] 450 Aufnahme, war zwar niedriger als in den RD Zellen, aber immer noch eindeutig höher als in SRH Zellen. Der Nachweis der Kernfragmentierung nach LiCl Behandlung war auch bei RH-30 Zellen möglich, allerdings eingeschränkt aussagekräftig durch den Verlust der meisten Zellen in der Vorbereitung. LiCl führte in RH-30 Zellen zu einem leichten Rückgang der GLI1-mRNA Expression, wobei die hohen Ausgangswerte durch die *GLI1* Genamplifikation zu beachten sind. Die Auswirkung von LiCl auf die GSK-3 β -mRNA Expression war nur gering, während spätere Untersuchungen im Zellbiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Orthopädie eine deutliche, wenn auch nicht ganz so stark wie in RD Zellen, ausgeprägte Zunahme der inhibitorischen GSK-3 β Ser9 Phosphorylierung ergaben. Ein Rückgang der GLI1 Proteinmenge durch LiCl Behandlung konnte in RH-30 Zellen hingegen nicht nachgewiesen werden (Schleicher *et al.* 2017).

Die ZF Zelllinie reagierte im Vitalitätsassay am sensitivsten auf LiCl. Im Koloniebildungsassay oder bei den 3D-Kulturen waren ZF Zellen jedoch nicht empfindlicher als die anderen RMS Zelllinien. Bei der Durchflusszytometrie konnte kein Zelltod nach LiCl Behandlung nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Kernfragmentierung ergab bei ZF Zellen insbesondere bei der hohen LiCl Konzentration Hinweise auf nekrotischen Zelltod. Erneut konnten aber nur sehr wenige Zellen ausgewertet werden. Die gemessene GSK-3 β -mRNA Expression stieg unter LiCl 2,5 fach an, sogar stärker als in den anderen untersuchten RMS Zelllinien. Im Gegensatz dazu hatte LiCl keine Auswirkung auf die GLI1-mRNA Expression in ZF Zellen. Spätere Untersuchungen im Zellbiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Orthopädie ergaben in ZF Zellen eine Zunahme der inhibitorischen GSK-3 β Ser9 Phosphorylierung unter LiCl, während die GLI1 Proteinmenge leicht abnahm.

ARMS Zelllinien weisen unterschiedliche Fusionsgene auf, so auch die RH-30 Linie mit PAX3/ FOXO1 (Galili *et al.* 1993) und die ZF Linie mit PAX7/ FOXO1 (unveröffentlichte Daten, Sabine Schleicher). Dionyssiou *et al.* konnten für die RH-30 Zellen feststellen, dass das Fusionsgen die GSK-3 β Aktivität verstärkt und so die Myogenin-Funktion unterdrückt, was zu einem transformierten und proliferativen Phänotyp führt (Dionyssiou *et al.* 2014). Durch gezielte GSK-3 β Inhibition konnte eine

Inhibition der Proliferation und eine Apoptoseinduktion in der PAX3/ FOXO1-positiven RH-30 Zelllinie erreicht werden.

Da GSK-3 in *Drosophila* mitverantwortlich für den Abbau des Ci Proteins (GLI Homolog) ist (Jia *et al.* 2002; Price and Kalderon 2002), könnte man auf Grundlage der erhöhten GSK-3 β -mRNA Expression nach LiCl Zugabe einen Rückgang der GLI Proteinmenge erwarten. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht die GSK-3 β Proteinexpression und Aktivität untersucht. Spätere Untersuchungen im Zellbiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Orthopädie zeigten in den RMS Zelllinien nach LiCl Zugabe eine weitgehend unveränderte GSK-3 β Proteinexpression bei einem gleichzeitigen Anstieg der inhibitorischen Ser 9 Phosphorylierung. Verschiedene Signalwege mit GSK-3 β -Beteiligung, wie der NOTCH-Signalweg (Conti *et al.* 2016) oder der Wnt-Signalweg (Chen *et al.* 2014; Chen 2016), können Einfluss auf die beobachtete Vitalitätsabnahme und Zelltodinduktion haben.

Sphäroide sind bei LiCl-Behandlung resistenter als Zellen in einer Monolayerkultur. Der Zellverband erschwert es dem Inhibitor, Zellen im Inneren des Sphäroids zu erreichen. Zum anderen ist es auch vorstellbar, dass eine enge Formation die Signaltransduktion der einzelnen Zellen untereinander verstärkt und somit vermehrt Überlebenssignale ausgesendet werden können. Ein Beispiel dafür ist der NOTCH-Signalweg, der über Zell-Zell-Verbindungen aktiviert wird (Fortini 2009).

In Konzentrationen zwischen 10 und 25 mM hat LiCl zudem weitere molekulare Targets wie die Casein Kinase 2 (CK2), MAPKAPK5 und MAPKAPK2 sowie die Inositol Monophosphatase und Histon Deacetylase 1 (HDAC1), deren Hemmung ebenfalls Auswirkungen auf Vitalität und Überleben haben kann (Cohen and Goedert 2004; Phiel and Klein 2001; Davies *et al.* 2000; Wu *et al.* 2013). CK2 wurde bereits als anti-apoptotischer Faktor in den RMS Zelllinien JR1 und RH-30 identifiziert (Izeradjene *et al.* 2004). Auch der MAPK-Signalweg wurde mit dem Wachstum von RMS in Verbindung gebracht (Jahangiri and Weiss 2013; Ciccarelli *et al.* 2016). Zudem reduzierte die HDAC Inhibition die Proliferation der eRMS Zelllinie RD und induzierte myogene Differenzierung (Vleeshouwer-Neumann *et al.* 2015). Da für diese Arbeit LiCl Konzentrationen in entsprechender Höhe verwendet wurden, könnten Zellvitalität und Zelltodrate auch durch Aktivitätsveränderungen dieser Enzyme mitbeeinflusst

worden sein. Gleichzeitig könnte LiCl in diesen Dosen problematisch bei einer *in vivo* Behandlung sein, da der therapeutische Bereich für Patienten mit bipolaren Störungen nur bei 0,5 – 1,5 mM LiCl im Serum liegt (Phiel and Klein 2001). Diese Konzentrationen kommen allerdings bei Langzeitbehandlungen zum Einsatz. Für *in vitro* Studien zur Tumorthherapie wird LiCl in Konzentrationen bis zu 50 mM verwendet (Peng *et al.* 2013; Kaufmann *et al.* 2011).

Die doch sehr unterschiedlich starke Zelltod-Induktion in den einzelnen RMS Zelllinien lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Zelllinien SRH und ZF bei ihrer Etablierung durch Sabine Schleicher an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin durch multimodale Vorbehandlung und ein weit fortgeschrittenes Tumorstadium bereits viele resistenzbildende Mutationen akkumuliert haben. ZF Zellen weisen eine sehr hohe Proliferationsrate auf, welche durch verschiedene Substanzen transient stark beeinträchtigt wird. Sobald die Behandlung vorüber ist, können ZF Zellen allerdings das Wachstum fortsetzen. SRH Zellen proliferieren eher langsam, wachsen schlecht als Einzelzellen und zeigen nur einen geringen Zusammenhalt in 3D-Kulturen. Sie zeichnen sich bereits im Vitalitätsassay durch eine hohe Resistenz gegenüber allen bisher untersuchten Substanzen aus (Boehme *et al.* 2016).

5.3 Wirksamkeit von Inhibitorkombinationen

Oft werden bei einer Tumorthherapie mehrere Wirkstoffe kombiniert, was den Behandlungserfolg vergrößern soll. So kann durch Angriffspunkte in verschiedenen Signalwegen, neben der stärkeren Hemmung des Tumorwachstums, eventuell auch die Einzeldosis der Komponenten gesenkt und somit eine bessere Verträglichkeit erzielt werden. Außerdem wird eine Resistenzbildung unwahrscheinlicher, da unterschiedliche Mutationen für eine Resistenz gegen die verschiedenen Wirkstoffe nötig sind.

GSK-3 β ist als Zielprotein von LiCl in viele Signalwege involviert, wie z.B. den PI3K/Akt-Signalweg, den Wnt-Signalweg, den NOTCH-Signalweg und den Hh-Signalweg (Kalderon 2002; Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011). Zudem hat LiCl in der verwendeten Konzentration weitere molekulare Ziele. Der Hh-Signalweg scheint bei RMS eine wichtige Rolle zu spielen, da eine Überexpression der Gene nachgewiesen werden konnte (Boehme *et al.* 2016; Kawabata *et al.* 2011) und Erfolge bei der

Inhibition von Proliferation und Überleben mit Hh-Inhibitoren wie Cyclopamin und GANT61 (Tostar *et al.* 2010; Kawabata *et al.* 2011) oder ATO (Boehme *et al.* 2016) in RMS Zelllinien verzeichnet wurden. Als Ansatz für eine mögliche Kombinationstherapie wurde in dieser Arbeit daher LiCl in Kombination mit den GLI1- und GLI2-Inhibitoren ATO und GANT61 getestet (Raju 2011; Lauth *et al.* 2007). Außerdem wurden Vitalitätsassays mit einer Dreierkombination aus LiCl, ATO und dem SMO-Inhibitor Itraconazol durchgeführt.

5.3.1 Kombination von LiCl und ATO

Eine Möglichkeit den Hh-Signalweg zu hemmen sind SMO-Inhibitoren (Lin and Matsui 2012; Ruat *et al.* 2014). Allerdings zeigten SMO-Inhibitoren nicht die gewünschte Wirkung, wenn nachgeschaltete Teile des Hh-Signalwegs dereguliert waren, wie z.B. bei einer Überexpression der GLI Proteine (Kasper *et al.* 2006). Die Wirksamkeit von ATO auf die Vitalitätsreduktion und die Apoptoseinduktion in RMS konnte schon im Zellbiologischen Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen festgestellt werden (Boehme *et al.* 2016). Dies war mit einer deutlichen Herunterregulation der GLI1 Protein Expression in RD und RH-30 Zellen verbunden. In ZF Zellen sank die GLI1 Protein Expression unter ATO jedoch nur leicht. Lediglich in SRH Zellen erhöhte ATO die GLI1 Protein Expression. Neben der Inhibition des Hh-Signalwegs induziert ATO außerdem oxidativen Stress (Lu *et al.* 2011) und mitochondriale Apoptose (Jiang *et al.* 2015; Han *et al.* 2008).

Bei der Kombination von ATO und LiCl zeigten sich, je nach Zelllinie und Konzentration, unterschiedliche Wirkungen im Vitalitätsassay. In der RH-30 Zelllinie trat bei der Kombination von ATO mit LiCl die deutlichste Wirkungssteigerung gegenüber den einzelnen Inhibitoren auf. Aber auch in RD Zellen waren die Kombinationen den Einzelinhibitoren überlegen, wohingegen in SRH Zellen nur bei der Kombination von 1 μ M ATO und 25 mM LiCl ein leicht additiver Effekt erzielt werden konnte. In ZF Zellen wurde kein additiver Effekt beobachtet. Die Messungen am Durchflusszytometer belegten die Ergebnisse des Vitalitätsassays. Hier verzeichneten die RD und RH-30 Zelllinien nach Kombination von ATO und LiCl verglichen mit den Einzelinhibitoren einen signifikant erhöhten Anteil toter, eFluor[®] 450 positiver Zellen.

Vor allem in der RH-30 Zelllinie zeigte sich hier ein stark additiver Effekt. Auch in der SRH Zelllinie konnte ein additiver Effekt beobachtet werden, wenngleich die Apoptoseinduktion insgesamt geringer war als in RD und RH-30 Zellen. Bei der ZF Zelllinie konnte weder bei den Einzelinhibitoren, noch in Kombination Zelltod detektiert werden. Bei allen untersuchten RMS Zelllinien zeigte sich unter Gabe von 1 μM ATO und 25 mM LiCl eine geringere GLI1-mRNA Expression sowie eine erhöhte GSK-3 β -mRNA Expression. Spätere Untersuchungen im Zellbiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Orthopädie zeigten zudem in RH-30 Zellen eine signifikant erhöhte inhibitorische GSK-3 β Ser9 Phosphorylierung unter Kombination von 1 μM ATO und 25 mM LiCl verglichen mit den einzelnen Inhibitoren, während die GLI1 Protein Expression in RH-30 Zellen unter derselben Kombination eindeutig stärker zurückging als bei Zugabe der einzelnen Inhibitoren. In RD Zellen konnte hingegen durch Kombination mit ATO keine Verstärkung der LiCl Wirkung auf die GLI1 Protein Expression festgestellt werden. Auch nahm die GSK-3 β Ser9 Phosphorylierung verglichen mit LiCl alleine kaum weiter zu. Ebenso war in SRH Zellen durch die Kombination von ATO und LiCl kaum eine Verstärkung der GSK-3 β Ser9 Phosphorylierung festzustellen, während die GLI1 Protein Expression sogar noch weiter stieg im Vergleich mit den einzelnen Inhibitoren.

Da RH-30 Zellen im Vergleich zu den anderen RMS Zelllinien deutlich mehr GLI1 exprimieren (Boehme *et al.* 2016), ist es vorstellbar, dass ihre Proliferation und ihr Überleben auch stärker von GLI1 abhängig sind. Ein möglicher Grund für eine unterschiedliche ATO Sensitivität ist die Expression von Aquaporin 9 (AQP9). Dieses Membranprotein, welches für die Aufnahme von ATO verantwortlich ist (Leung *et al.* 2007; Iriyama *et al.* 2013), könnte in den Zelllinien zu unterschiedlichen intrazellulären ATO Konzentrationen führen.

Letztendlich entscheidet ein kompliziertes Zusammenspiel verschiedener Signalwege über den Erfolg der Kombination von ATO und LiCl in den einzelnen RMS Zelllinien. Eine direkte Phosphorylierung von GLI1 durch GSK-3 ist nicht bekannt. Wohl aber wirken PKA, GSK-3 und CK1 auf die proteasomale Degradation von GLI2 (Bhatia *et al.* 2006), welches sowohl Aktivator- als auch Repressorfunktionen im Hh-Signalweg übernehmen kann. *In vivo* liegt allerdings nur eine kleine Fraktion des murinen GLI2 proteolytisch prozessiert vor, so dass die Aktivatorform überwiegt (Pan *et al.* 2006). Die

Aktivierung der Transkriptionsaktivität von GLI1 erfordert die Phosphorylierung von SuFu durch GSK-3, wodurch GLI1 aus dem Komplex mit SuFu entlassen wird (Takenaka *et al.* 2007). Stabilisiertes β -Catenin interagiert in murinen Medulloblastom-Kulturen mit GLI1, was durch Lithium Behandlung verstärkt wurde und zu einer GLI1 Degradation führte, verbunden mit einem G2/M Zellzyklus-Arrest und der Induktion eines Seneszenz-ähnlichen Zustands (Zinke *et al.* 2015). In humanen Pankreaskarzinom Zelllinien reduzierte die Lithium Behandlung die GLI1-mRNA und Protein Expression (Peng *et al.* 2013). Zusätzlich konnte auch in A431 Epidemoid Karzinomzellen und immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) sowohl durch ATO als auch LiCl eine GSK-3 β Inaktivierung durch Ser9 Phosphorylierung nachgewiesen werden (Huang, Liu, and Cheng 2011). LiCl induzierte Apoptose in humanen Sarkom- und Karzinomzelllinien wurde von einer erhöhten TNF- α und FasL Expression begleitet, welche PARP und Caspase 3, 8 und 10 Spaltung induzierte (Kaufmann *et al.* 2011). 6-bromoindirubin-3'-oxime (Mora *et al.*), ein GSK-3 Inhibitor, induzierte Wnt/ β -catenin abhängige terminale myogene Differenzierung in RD, 381T, Rh6 und Rh18 eRMS Zelllinien, wohingegen die aRMS Zelllinien Rh3, Rh5, Rh7 und RH-30 auch nach BIO Behandlung in einem undifferenzierten Zustand blieben (Chen *et al.* 2014). In RH-30 Zellen werden die Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin, welche für eine terminale myogene Differenzierung wichtig sind, exprimiert, sind aber inaktiv. Die posttranslationale Repression der Myogenin-Aktivität geht hierbei auf eine GSK-3 β -abhängige Phosphorylierung zurück. PAX3-FKHR verstärkt die GSK-3 β Aktivität und Proliferation in RH-30 Zellen, was durch pharmakologische Inhibition von GSK-3 β inhibiert werden kann (Dionyssiou *et al.* 2014). Auch Zeng *et al.* zeigten, dass verschiedene GSK-3 Inhibitoren in der aRMS Zelllinie RH-30 effizienter als in der eRMS Zelllinie RD das Wachstum inhibierten und Apoptose induzierten. Hierbei wurde nicht die Lokalisation von PAX3-FKHR im Zellkern beeinträchtigt, sondern nur die transkriptionelle Aktivität durch Phosphorylierung (Zeng *et al.* 2010).

5.3.2 Kombination von LiCl und GANT61

GANT61 bindet an die GLI1 und GLI2 Proteine, verhindert so das Andocken an die DNA und damit ihre Aktivität als Transkriptionsfaktor (Agyeman *et al.* 2014; Lauth

and Toftgard 2007). Bei der Kombination von LiCl mit GANT61 nahm die Vitalität der RMS Zellen zumindest bei der Kombination mit 10 μ M GANT61 signifikant stärker ab als nach Zugabe der einzelnen Inhibitoren, wobei GANT61 im Gegensatz zu ATO ebenfalls die Vitalität der SKMC reduzierte. Dabei zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Kombination und einzelner GANT61 Gabe.

Während 10 μ M GANT61 alleine in den RMS Zelllinien SRH, RD und ZF sowie SKMC nur geringe Zelltodraten zwischen 8 und 17% induzierte, bei RH-30 Zellen allerdings bereits 34%, erhöhte die Kombination mit LiCl die eFluor[®] 450 Aufnahme erheblich. Sogar in ZF Zellen war eine Zunahme auf über 20% tote Zellen feststellbar, während die Zelltodrate in SKMC durch die Kombination abnahm.

Die RD und SRH Zelllinien reagierten unter der Kombination von GANT61 und LiCl mit einer Reduktion, die beiden aRMS Zelllinien RH-30 und ZF mit einer Steigerung der GLI1-mRNA Expression. Die GSK-3 β -mRNA Expression stieg in drei der RMS Zelllinien durch die Inhibitorkombination an, nur die RD Zellen zeigten keine eindeutige Reaktion.

Der Einfluss von LiCl, auch in Verbindung mit dem GLI Inhibitor ATO, auf Tumorzellen und verschiedene Signalwege wurde schon in den Kapiteln 5.2 und 5.3.1 beschrieben. Daneben wird in anderen Untersuchungen der Einfluss der GLI-Inhibition durch GANT61 deutlich. So konnte bereits gezeigt werden, dass GANT61 in RD und RH-30 Zellen eine Hemmung der Proliferation und die Induktion des Zelltods zur Folge hat. Dabei wurde eine Wirkung auf den Hh- und den Akt/mTOR-Signalweg beobachtet. GANT61 verminderte die GLI1 und GLI2 Expression und dadurch die Aktivität beider Signalwege. Außerdem führte die Inhibition von GLI zu einer Abnahme der Cyclin D1 Proteine und zu einem G0/G1 Zellzyklus-Arrest (Srivastava *et al.* 2014).

Auch in Medulloblastom Zelllinien verhinderte GANT61 die Bindung von GLI an die Cyclin D1-Promotorregion, wodurch keine Transkription mehr stattfand und es in der Folge zu einer Absenkung der GLI und Cyclin D1 mRNA- und Proteinmenge kam. Allerdings führte GANT61 in der Studie zu einem G1/S Zellzyklus-Arrest (Lin *et al.* 2017).

In Gliom Zelllinien verringerte die Inhibition des Hh-Signalwegs durch GANT61 die Funktion des DNA-Reperaturenzym O6-Mehtylguanin-DNA-Methyltransferase und

inhibierte den NOTCH1-Signalweg, was erhöhte DNA-Schäden und Apoptose zur Folge hatte (Li *et al.* 2016).

Durch die Inhibition von GLI durch GANT61 wird ebenfalls der KRAS/BRAF-Signalweg gehemmt, der unabhängig vom Hh-Signalweg die GLI-Aktivität steigert (Agyeman *et al.* 2014).

Genauere Untersuchungen in Kolonkarzinom Zelllinien zeigten, dass GANT61 die Bindung der RNA-Polymerase II verhindert und so an einem frühen Punkt die Transkription unterbunden wird. Gleichzeitig wird durch zwei Mechanismen die DNA-Replikation blockiert. Zum einen interagiert GLI am Replikationsursprung mit ORC4 (Zhang *et al.* 2016), einem Teil des „Origin Recognition Complex“ (ORC), der am Replikationsursprung bindet und die Replikation mit einleitet (DePamphilis 2005). Die GLI-Inhibition durch GANT61 verhindert diese Bindung und damit die Replikation. Zum Zweiten ist GLI ein Transkriptionsfaktor für CDT1, einem „Licensing“-Faktor, der Teil des Prä-Replikationskomplexes ist. Durch GANT61 konnte eine Verringerung der GLI1 und CDT1 mRNA und Proteine festgestellt werden, was ebenfalls zu einer Hemmung der DNA-Replikation führte (Zhang *et al.* 2016).

5.3.3 Kombination von LiCl, ATO und Itraconazol

Um die inhibitorische Wirkung von LiCl in Kombination mit zwei Hh-Signalweg Inhibitoren zu beobachten, wurde im Vitalitätsassay ATO und LiCl auch in Kombination mit Itraconazol getestet. Der SMO-Inhibitor greift, im Gegensatz zum GLI-Inhibitor ATO, weiter oben in der Hh-Signalkaskade ein, indem er die Ansammlung und Aktivierung von SMO in den Cilien verhindert (Kim *et al.* 2010).

Tatsächlich war der Vitalitätsrückgang in RH-30 und SRH Zellen nach Kombination der drei Inhibitoren ATO, Itraconazol und LiCl noch deutlich stärker als nach den entsprechenden Zweifach-Kombinationen. In RD und ZF Zelllinien zeigten sich im Vergleich zu einzelnen Doppelbehandlungen jedoch sogar antagonistische Effekte unter der Dreifach-Kombination. Die Skelettmuskelzellen zeigten keine Reaktion auf die Kombination von LiCl mit den beiden Hh-Inhibitoren, wodurch auch hier die Selektivität deutlich wurde.

Die antitumorale Wirkung von Itraconazol konnte schon in einigen Studien festgestellt werden. So hemmt Itraconazol als SMO-Inhibitor in Medulloblastom Zelllinien den Hh-Signalweg und verringerte damit das Tumorwachstum (Kim *et al.* 2010). Außerdem hemmt Itraconazol auch den mTOR-Signalweg (Xu *et al.* 2010), der SMO-unabhängig GLI1 aktivieren und so in den Hh-Signalweg eingreifen kann (Wang *et al.* 2012). Durch die Inhibition des mTOR-Signalwegs mit Itraconazol konnte in Endometriumkarzinom Zellen die Proliferation verringert werden (Tsubamoto *et al.* 2017) und in Glioblastom Zelllinien induzierte Itraconazol darüber hinaus Autophagie (Liu *et al.* 2014). Ursächlich für die Signalweg-Inhibition war ein durch Itraconazol verzögerter intrazellulärer Cholesterol-Transport (Xu *et al.* 2010; Liu *et al.* 2014). *In vitro* und *in vivo* konnte Itraconazol in Melanom Zellen die Proliferation senken und das Überleben der Xenograft-Mäuse verlängern. Dabei kam es zu einer Verringerung der GLI1, GLI2, Wnt-3A, β -Catenin und Cyclin D1 mRNA Expression. In diesem Fall inhibierte Itraconazol also neben dem Hh- und dem mTOR-Signalweg auch den Wnt-Signalweg (Liang *et al.* 2017).

Die Effizienz einer Inhibitor Kombination zur Hemmung des mTOR-Signalwegs und des Hh-Signalwegs konnte schon in Pankreaskarzinom-Zelllinien (Miyazaki *et al.* 2016) und RMS Zelllinien, darunter RH-30 und RD (Graab *et al.* 2015), festgestellt werden. Auch eine Kombination aus ATO und Itraconazol verringerte in multiplen Myelom Zellen die Zellproliferation und senkte die GLI1 und Cyclin D1 Protein Expression (Huang *et al.* 2016).

Die teils stärkere Wirkung einer Kombinationstherapie mit Itraconazol könnte auch durch die Hemmung des P-Glykoproteins (PGP) zustande kommen (Wang *et al.* 2002). Dieses Plasmamembranprotein ist für viele Therapieresistenzen von Malignomen mitverantwortlich, da es Chemotherapeutika wieder aus der Zelle transportiert (Ferte 2000). Somit könnte Itraconazol durch die entsprechende Hemmung die intrazelluläre Konzentration seiner Kombinationspartner erhöhen. Zusätzlich inhibiert Itraconazol Cytochrom P450 3A4 und verhindert damit den Abbau einiger Medikamente (Pantziarka *et al.* 2015).

Außerdem wurde festgestellt, dass Itraconazol die Angiogenese hemmt (Chong *et al.* 2007). So reduzierte Itraconazol in Xenograft-Mäusen bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen das Tumorwachstum und die Angiogenese (Aftab *et al.* 2011).

Genauere Untersuchungen zeigten, dass sich durch Itraconazol die Glykolysierung und Phosphorylierung des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (VEGFR2) verändert (Nacev *et al.* 2011) und der Spannungsabhängige Anionen-Kanal 1 (VDAC1) inhibiert wird (Head *et al.* 2015). Die Hemmung des mitochondrialen VDAC1 verringert neben der endothelialen Zellproliferation auch die Aktivität des mTOR-Signalwegs (Head *et al.* 2015).

Erste klinische Studien zeigten auch in der Tumorthherapie am Menschen Erfolg; so konnte durch Itraconazol bei Patienten mit Basalzellkarzinomen (Kim *et al.* 2014), Prostatakarzinomen (Antonarakis *et al.* 2013) und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Rudin *et al.* 2013) das progressionsfreie Überleben verlängert werden. Außerdem stellten zwei retrospektive Studien eine höhere Überlebensrate bei Brustkrebspatientinnen fest (Tsubamoto, Sonoda, and Inoue 2014; Tsubamoto, Sonoda, Yamasaki, *et al.* 2014).

5.4 Fazit und Ausblick

LiCl präsentierte sich in der verwendeten Konzentration als effektiver Wirkstoff bei der *in vitro* Behandlung von RMS Zelllinien. Es konnte durchweg ein höherer Vitalitätsverlust festgestellt werden als bei den SKMC. Außerdem konnte LiCl bei den SKMC keinen Zelltod induzieren. Auch die statistischen Auswertungen der Vitalitätsassays bestätigen eine selektiv stärkere LiCl Wirkung auf RMS. Allerdings lassen die statistischen Ergebnisse aufgrund der geringen Stichprobenzahl keine verlässliche Interpretation zu. Durch LiCl stieg in den RMS Zelllinien die mRNA Expression von GSK-3 β an. Spätere Untersuchungen zeigten, dass die GSK-3 β Proteinmenge kaum verändert wurde, wohl aber die inhibitorische Ser9 Phosphorylierung zunahm. Durch die Vielzahl von Reaktionen, die GSK-3 in den Zellen katalysiert, gibt es verschiedene Erklärungen, wie GSK-3 die Vitalität beeinflussen kann.

Um Aufschlüsse über die Aktivität der beteiligten Signalwege, wie den PI3K/Akt-Signalweg, den Wnt-Signalweg, den NOTCH-Signalweg und den Hh-Signalweg (Kalderon 2002; Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011) zu erhalten, müssten weitere Untersuchungen erfolgen. Dies könnte zum einen durch qRT-PCR auf mRNA-Ebene

geschehen und zum anderen durch Western Blot oder ELISA auf Proteinebene. Um die GSK-3-Aktivität zu quantifizieren, könnte ein Immunoblot mit einem GSK-3-Substrat oder ein Kinaseassay durchgeführt werden (Cole and Sutherland 2008).

Die erhöhte GLI1 Expression in allen untersuchten RMS Zelllinien stellt ein potentielles Angriffsziel für Therapeutika dar. So führte die Kombination von LiCl mit GLI-Inhibitoren zu einer Steigerung des Vitalitätsverlustes. Dabei erzielte sowohl die Kombination mit ATO als auch die Kombination mit GANT61 im Vitalitätsassay ähnliche Erfolge. Interessanterweise lässt der Grad der GLI Überexpression kaum Rückschlüsse auf die Wirkung eines Inhibitors auf Vitalität und Überleben zu. Möglicherweise spielt hier die Inhibition weiterer Proteine eine Rolle. So wird ebenfalls ein Einfluss von ATO auf den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NFκB beschrieben, der eine entscheidende Rolle in hämatologischen Malignomen spielt (Miller *et al.* 2002). Eine Analyse der Proteinexpression durch qRT-PCR und Western Blot würde Aufschluss über eine Beteiligung geben. Um weitere Erkenntnisse zur Art der Zelltodinduktion zu erlangen, wurde inzwischen ein Caspase Assay durchgeführt (Schleicher *et al.* 2017). Hierbei zeigte sich, vor allem in RD und RH-30 Zellen unter ATO, LiCl und der Kombination aus ATO und LiCl, eine deutliche Zunahme der Apoptose Induktion.

Tatsächlich ist es schwer, allein anhand der Form und Größe der Sphäroide einen Rückschluss auf ihre Vitalität zu ziehen. Daher wurde die Vitalität von LiCl, ATO und LiCl + ATO behandelten RD und RH-30 Sphäroiden in der Zwischenzeit mit einem „Cell Titer Blue Assay“ bestimmt, wobei bestätigt werden konnte, dass auch in den 3D-Kulturen beide Inhibitoren sowie die Kombination zu einem deutlichen Vitalitätsrückgang führten (Schleicher *et al.* 2017). Allerdings war nur in den RD Zellen die Kombination signifikant besser als die Wirkung beider Einzelinhibitoren.

Bei der Vitalitätsbestimmung unter Einfluss der Dreierkombination aus Itraconazol, ATO und LiCl zeigen nur SRH und RH-30 Zellen eine weitere Absenkung der Vitalität gegenüber den Zweifachkombinationen. Hier spielt offensichtlich das komplizierte Zusammenspiel verschiedener Signalwege eine Rolle. Besonders interessant wäre hier die Untersuchung des mTOR-Signalwegs, der GLI1 aktiviert und auch durch Itraconazol gehemmt wird.

Diese Arbeit zeigt, dass für die Behandlung von RMS die GSK-3-Inhibition durch LiCl eine mögliche Therapieoption für die Zukunft sein könnte. Ob LiCl oder spezifische GSK-3 Inhibitoren in Kombination mit Hh-Signalweg Inhibitoren auch *in vivo* die gewünschten Ergebnisse erzielen, muss noch im Mausmodell untersucht werden. Grundsätzlich reagierten die RMS Zelllinien deutlich sensitiver als gesunde Muskelzellen, was die Selektivität verdeutlicht. Bei nur vier untersuchten Zelllinien lassen sich die Ergebnisse allerdings nur bedingt auf RMS im Allgemeinen übertragen. Auch wenn die verwendeten RMS die unterschiedlichen Subtypen repräsentieren, wäre hier eine Untersuchung von weiteren Zelllinien sinnvoll.

Erste Einblicke in beteiligte zelluläre Prozesse konnten durch die Analyse der mRNA Expression von GLI1 und GSK-3 β gewonnen werden. Hier erschließt sich aus dieser Arbeit allerdings noch kein klares Bild und es bedarf weiterer Untersuchungen, welche in der Zwischenzeit auch bereits durchgeführt wurden, um ein Verständnis für die intrazellulären Vorgänge zu entwickeln. Dennoch sind die möglichen Angriffspunkte der Inhibitoren und die dadurch beeinflussten Signalwege vielfältig. Einzig GANT61 hat mit GLI1 und GLI2 klar definierte Angriffsziele und trotzdem besteht durch die multiplen Einflüsse der GLI Proteine in verschiedene Signalwege eine Vielzahl an Möglichkeiten der Zellbeeinflussung. Um hier ein Verständnis für die komplexen Interaktionen zu erlangen, benötigt es noch viel Forschungsarbeit. Zumindest sind bis auf GANT61 alle verwendeten Inhibitoren in der Klinik zugelassen, was den Weg vom Tierversuch in eine klinische Studie verkürzen könnte.

6 Zusammenfassung

Rhabdomyosarkome (RMS) sind mit über 20% Anteil die häufigsten Weichteilsarkome im Kindesalter. Die Behandlung erfolgt primär durch eine chirurgische Resektion, kombiniert mit einer adjuvanten sowie neoadjuvanten Strahlen- und Chemotherapie. Vor allem bei metastasierten RMS ist die Prognose, trotz Kombinationstherapie, mit einer 10 Jahres Überlebensrate von 20% sehr schlecht. Dabei spielt die Entstehung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika eine entscheidende Rolle und es werden dringend neue Behandlungsmöglichkeiten benötigt.

Ein möglicher molekularer Angriffspunkt ist die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3). Diese Proteinkinase, die in viele Signalwege involviert ist, zeigt eine Beteiligung an der Entstehung und Progression zahlreicher Tumoren, so auch von RMS.

Lithiumchlorid (LiCl) inhibiert, neben weiteren Enzymen, GSK-3. Die untersuchten RMS Zelllinien reagierten unter LiCl durchweg mit einem höheren Vitalitätsverlust als die SKMC. Auch wurde die Koloniebildungsfähigkeit durch LiCl eingeschränkt. Außerdem konnte LiCl in drei von vier RMS Zelllinien den Zelltod induzieren. Die LiCl Behandlung erhöhte dabei die GSK-3 β -mRNA Expression, während die GLI1-mRNA Expression in drei der vier untersuchten RMS Zelllinien sank.

Außerdem wurde LiCl in Kombination mit Hedgehog (Hh)-Inhibitoren getestet, da auch die Aktivität des Hh-Signalwegs mit der Malignität der RMS in Verbindung gebracht wird. Da darüber hinaus eine Interaktion von GSK-3 mit dem Hh-Signalweg bekannt ist, wurden mit der Kombination potentielle additive Effekte untersucht. Neben LiCl zur GSK-3-Inhibition wurden für die Hemmung des Hh-Signalwegs die Gli-Inhibitoren Arsentrioxid (ATO) und GANT61 sowie der SMO-Inhibitor Itraconazol verwendet.

Die Kombinationen aus LiCl mit ATO bzw. GANT61 führte zu einem verstärkten Vitalitätsverlust und einer höheren Zelltodinduktion. Während die Vitalität unter beiden Kombinationen gleichwertig abnahm, zeigte sich die Kombination aus LiCl/ GANT61 bei der Zelltodinduktion überlegen. Die GSK-3 β -mRNA Expression wurde durch die Inhibitorkombinationen, mit Ausnahme von LiCl/ GANT61, erhöht, während der Einfluss auf die GLI1-mRNA Expression unterschiedlich war. In RD und SRH Zellen senkten beide Inhibitorkombinationen die GLI1-mRNA Expression. In RH-30 und ZF Zellen stieg die GLI1-mRNA Expression nach GANT61 und LiCl Zugabe hingegen

leicht an. Eine Dreifachkombination aus LiCl, ATO und Itraconazol konnte die Vitalität von zwei der vier RMS Zelllinien noch weiter senken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die GSK-3-Inhibition durch LiCl ein möglicher Ansatz zur RMS Behandlung ist. Dabei kann durch die Kombination mit Hh-Inhibitoren eine Wirkungsverstärkung erzielt werden, was gleichzeitig Resistenzen vorbeugen und die Einzeldosen senken könnte. Um die Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen zu verstehen, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Dass bis auf GANT61 alle verwendeten Inhibitoren in der Klinik zugelassen sind, könnte den Weg vom Tierversuch in eine klinische Studie verkürzen.

7 Abstract

Rhabdomyosarcomas (RMS) are with 20% the most common pediatric soft tissue sarcomas. Treatment includes primary surgical resection, combined with adjuvant and neoadjuvant radiation and chemotherapy. Especially for patients with metastatic RMS, the prognosis is really poor with a long term survival rate of 20% despite a combination therapy. The emergence of resistance to chemotherapeutic agents plays a decisive role and new treatment options are urgently needed.

A possible molecular target is Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3). This protein kinase which is involved in many signaling pathways, is implicated in the development and progression of many tumors, including RMS. Lithium chloride (LiCl) inhibits, besides other enzymes, GSK-3. Viability was generally reduced by LiCl in the examined RMS cell lines compared to SKMC. Also colony formation was compromised by LiCl. Moreover, LiCl induced cell death in three of the four RMS cell lines. This was accompanied by increased GSK-3 β -mRNA expression, whereas GLI1-mRNA expression was reduced in three of the four RMS cell lines. In addition, LiCl was tested in combination with Hedgehog (Hh) inhibitors, because the activity of the Hh signaling pathway is also associated with the malignancy of RMS. Furthermore, an interaction of GSK-3 with the Hh signaling pathway is known, in order that the combination gives information about potential additive effects. In addition to LiCl for the GSK-3 inhibition, the GLI inhibitors arsenic trioxide (ATO) and GANT61 as well as the SMO inhibitor itraconazole were used for the inhibition of the Hh signaling pathway.

The combination of LiCl with both ATO and GANT61 led to a further decrease of viability and a higher rate of cell death induction. GSK-3 β -mRNA expression increased using both inhibitor combinations, whereas GLI1-mRNA expression was affected individually. In RD and SRH cells also both inhibitor combinations reduced GLI1-mRNA expression. However, in RH-30 and ZF cells GLI1-mRNA expression slightly increased by combined application of GANT61 and LiCl. A triple combination of LiCl, ATO and itraconazole was able to further reduce the vitality of two of the four RMS cell lines.

The results of this work suggest that GSK-3 inhibition by LiCl is a possible approach for RMS treatment. The combination with Hh inhibitors may enhance the effect which could prevent resistances and may reduce single doses administered. However, further

studies are needed to understand the crosstalk with other signaling pathways. That all inhibitors, with exception of GANT61, are already approved for clinical use, may accelerate progression to a clinical trial after animal testing.

8 Anhang

1. Statistische Tests:

	10mM LiCl	25mM LiCl	50mM LiCl	100mM LiCl	250mM LiCl	500mM LiCl
RD	0,273	0,000***	0,000***	0,386	0,000***	0,000***
RH-30	0,083*	0,000***	0,000***	0,002***	0,000***	0,000***
ZF	0,001***	0,000***	0,000***	0,525	0,013**	0,006***
SRH	0,356	0,001***	0,000***	0,119	0,013**	0,225

Tabelle 11: Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummentests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede bei unterschiedlichen Konzentrationen LiCl zwischen den RMS Zelllinien und den SKMC: Die Einzelwerte aus dem MTS Assays wurden jeweils in Relation zu den unbehandelten Zellen (100%) gesetzt. Die prozentualen Werte der Zelllinien wurden dann mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests gegen die prozentualen Werte der SKMC getestet. p-Wert (RMS vs. SKMC) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

	10mM LiCl	25mM LiCl	50mM LiCl	100mM LiCl	250mM LiCl	500mM LiCl
RD	0,322	0,000***	0,000***	0,366	0,000***	0,000***
RH-30	0,125	0,000***	0,000***	0,018**	0,000***	0,000***
ZF	0,000***	0,000***	0,000***	0,204	0,021**	0,015**
SRH	0,952	0,001***	0,000***	0,16	0,018**	0,119

Tabelle 12: Ergebnisse des Student t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede bei unterschiedlichen Konzentrationen LiCl zwischen den RMS Zelllinien und den SKMC: Die Einzelwerte aus dem MTS Assays wurden jeweils in Relation zu den unbehandelten Zellen (100%) gesetzt. Die prozentualen Werte der Zelllinien wurden dann mit Hilfe des Student t-Tests gegen die prozentualen Werte der SKMC getestet. p-Wert (RMS vs. SKMC) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

	10mM LiCl	25mM LiCl	50mM LiCl	100mM LiCl	250mM LiCl	500mM LiCl
RD	0,324	0,000***	0,000***	0,366	0,021**	0,000***
RH-30	0,126	0,000***	0,000***	0,018**	0,000***	0,000***
ZF	0,001***	0,000***	0,000***	0,214	0,030**	0,023**
SRH	0,952	0,001***	0,000***	0,16	0,020**	0,123

Tabelle 13: Ergebnisse des Welch t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede bei unterschiedlichen Konzentrationen LiCl zwischen den RMS Zelllinien und den SKMC: Die Einzelwerte aus dem MTS Assays wurden jeweils in Relation zu den unbehandelten Zellen (100%) gesetzt. Die prozentualen Werte der Zelllinien wurden dann mit Hilfe des Welch t-Tests gegen die prozentualen Werte der SKMC getestet. p-Wert (RMS vs. SKMC) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

	0,5 μ M A / 25 mM L vs. 0,5 μ M A	0,5 μ M A / 25 mM L vs. 25mM L	1 μ M A / 25 mM L vs. 1 μ M A	1 μ M A / 25 mM L vs. 25mM L	2 μ M A / 25 mM L vs. 2 μ M A	2 μ M A / 25 mM L vs. 25mM L
RD	0,000***	0,003***	0,000***	0,000***	0,000***	0,000***
RH-30	0,001***	0,002***	0,000***	0,000***	0,001***	0,000***
SRH	0,028**	0,003***	0,005***	0,080*	0,002***	0,168
ZF	0,001***	0,296	0,001***	0,136	0,007***	0,394
SKMC	0,000***	0,103	0,017**	0,118	0,008***	0,023**

Tabelle 14: Ergebnisse des t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede einer Kombination aus ATO und LiCl mit den jeweiligen Einzelinhibitoren: Die Einzelwerte aus dem MTS Assays wurden jeweils in Relation zu den unbehandelten Zellen (100%) gesetzt. Die prozentualen Werte der getestet. p-Wert (Kombination vs. Einzelinhibitor) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

	5 μ M G / 25 mM L vs. 5 μ M G	5 μ M G / 25 mM L vs. 25 mM L	10 μ M G / 25 mM L vs. 10 μ M G	10 μ M G / 25 mM L vs. 25 mM L	15 μ M G / 25 mM L vs. 15 μ M G	15 μ M G / 25 mM L vs. 25 mM L
RD	0,002***	0,285	0,039**	0,003***	0,001***	0,001***
RH-30	0,001***	0,942	0,007***	0,012**	0,088*	0,001***
SRH	0,002***	0,001***	0,000***	0,001***	0,007***	0,002***
ZF	0,001***	0,942	0,000***	0,014	0,010**	0,010**
SKMC	0,035**	0,799	0,002***	0,138	0,964	0,021**

Tabelle 15: Ergebnisse des t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede einer Kombination aus GANT61 und LiCl mit den jeweiligen Einzelinhibitoren: Die Einzelwerte aus dem MTS Assays wurden jeweils in Relation zu den unbehandelten Zellen (100%) gesetzt. Die prozentualen Werte der Kombinationen wurden dann mit Hilfe des t-Tests gegen die prozentualen Werte der Einzelinhibitoren getestet. p-Wert (Kombination vs. Einzelinhibitor) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

9 **Abbildungsverzeichnis**

1.	Inhibitorische Wirkung von Lithium auf GSK-3	18
2.	Der Hedgehog-Signalweg	20
3.	Der Zellzyklus	22
4.	Enantiomer von Itraconazol	24
5.	Reaktion von GANT61 zu GANT61-diamin mit Strukturformel	25
6.	Strukturformel von Arsentrioxid	26
7.	Lichtmikroskopische Aufnahme von RD Zellen	28
8.	Lichtmikroskopische Aufnahme von SRH Zellen	29
9.	Lichtmikroskopische Aufnahme von RH-30 Zellen	30
10.	Lichtmikroskopische Aufnahme von ZF Zellen	30
11.	Lichtmikroskopische Aufnahme von SKMC Zellen	31
12.	Einfluss des GSK-3-Inhibitors LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich zu primären Skelettmuskelzellen (SKMC)	52
13.	Einfluss der Kombination von ATO und LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit primären Skelettmuskelzellen (SKMC)	55
14.	Einfluss der Kombination von GANT61 und LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit primären Skelettmuskelzellen (SKMC)	57
15.	Einfluss der Dreifach-Kombination von ATO, Itraconazol und LiCl auf die Vitalität der RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen (SKMC)	61
16.	Koloniebildungsfähigkeit der RMS Zelllinien unter Einfluss von LiCl	63
17.	Zellwachstum von RD Zellen in einer 3D-Sphäroidkultur unter LiCl Einfluss	64
18.	Zellwachstum von RH-30 Zellen in einer 3D-Sphäroidkultur unter LiCl Einfluss	65
19.	Zellwachstum von ZF Zellen in einer 3D-Sphäroidkultur unter LiCl Einfluss	65
20.	Expression der GLI1-mRNA in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und	68

	ZF unter dem Einfluss von LiCl und den Hedgehog-Inhibitoren ATO und GANT61	
21.	Expression der GSK-3 β -mRNA in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF unter dem Einfluss von LiCl und den Hedgehog-Inhibitoren ATO und GANT61	69
22.	Darstellung der Phasen der Zellkernfragmentierung im Verlauf der Apoptose	70
23.	Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in RD Zellen	71
24.	Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in SRH Zellen	72
25.	Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in RH-30 Zellen	73
26.	Zellkernfragmentierung unter Einfluss von LiCl in ZF Zellen	74
27.	Der Einfluss von LiCl auf die Zelltodinduktion in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen (SKMC)	76
28.	Der Einfluss der Kombination ATO und LiCl auf die Zelltodinduktion in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen	78
29.	Der Einfluss der Kombination GANT61 und LiCl auf die Zelltodinduktion in den RMS Zelllinien RD, SRH, RH-30 und ZF im Vergleich mit Skelettmuskelzellen	80

10 Tabellenverzeichnis

1.	Zellkulturmedium und Zusätze	31
2.	Verwendete Inhibitoren	32
3.	Verwendete Inhibitor-Stocklösungen	32
4.	Verwendete Chemikalien	32
5.	Verwendete Kits und Enzyme	34
6.	Verwendete Oligonukleotide	34
7.	Verwendete Verbrauchsmaterialien	35
8.	Verwendete Geräte	36
9.	Verwendete Software	38
10.	Reaktionsansatz für eine Probe (qRT-PCR)	43
11.	Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummentests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede bei unterschiedlichen Konzentrationen LiCl zwischen den RMS Zelllinien und den SKMC	100
12.	Ergebnisse des Student t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede bei unterschiedlichen Konzentrationen LiCl zwischen den RMS Zelllinien und den SKMC	100
13.	Ergebnisse des Student t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede bei unterschiedlichen Konzentrationen LiCl zwischen den RMS Zelllinien und den SKMC	101
14.	Ergebnisse des t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede einer Kombination aus ATO und LiCl mit den jeweiligen Einzelinhibitoren	101
15.	Ergebnisse des t-Tests zum Vergleich der Vitalitätsunterschiede einer Kombination aus GANT61 und LiCl mit den jeweiligen Einzelinhibitoren	101

11 Quellen

- Aberger, F., and Ruiz, I. A. A. (2014). 'Context-dependent signal integration by the GLI code: the oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy'. *Semin Cell Dev Biol* **33**:93-104, doi 10.1016/j.semcdb.2014.05.003.
- Aftab, B. T., Dobromilskaya, I., Liu, J. O., and Rudin, C. M. (2011). 'Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer'. *Cancer Res* **71** (21):6764-72, doi 10.1158/0008-5472.CAN-11-0691.
- Agaram, N. P., Chen, C. L., Zhang, L., LaQuaglia, M. P., Wexler, L., and Antonescu, C. R. (2014). 'Recurrent MYOD1 mutations in pediatric and adult sclerosing and spindle cell rhabdomyosarcomas: evidence for a common pathogenesis'. *Genes Chromosomes Cancer* **53** (9):779-87, doi 10.1002/gcc.22187.
- Agyeman, A., Jha, B. K., Mazumdar, T., and Houghton, J. A. (2014). 'Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding'. *Oncotarget* **5** (12):4492-503.
- Anderson, J., Gordon, A., McManus, A., Shipley, J., and Pritchard-Jones, K. (1999). 'Disruption of imprinted genes at chromosome region 11p15.5 in paediatric rhabdomyosarcoma'. *Neoplasia* **1** (4):340-8.
- Annavarapu, S. R., Cialfi, S., Dominici, C., Kokai, G. K., Uccini, S., Ceccarelli, S., McDowell, H. P., and Helliwell, T. R. (2013). 'Characterization of Wnt/beta-catenin signaling in rhabdomyosarcoma'. *Lab Invest* **93** (10):1090-9, doi 10.1038/labinvest.2013.97.
- Antman, K. H. (2001). 'Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy'. *Oncologist* **6 Suppl 2**:1-2.
- Antonarakis, E. S., Heath, E. I., Smith, D. C., Rathkopf, D., Blackford, A. L., Danila, D. C., King, S., Frost, A., Ajiboye, A. S., Zhao, M., Mendonca, J., Kachhap, S. K., Rudek, M. A., and Carducci, M. A. (2013). 'Repurposing itraconazole as a treatment for advanced prostate cancer: a noncomparative randomized phase II trial in men with metastatic castration-resistant prostate cancer'. *Oncologist* **18** (2):163-73, doi 10.1634/theoncologist.2012-314.
- Arndt, C. A., Rose, P. S., Folpe, A. L., and Laack, N. N. (2012). 'Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence'. *Mayo Clin Proc* **87** (5):475-87, doi 10.1016/j.mayocp.2012.01.015.

- Beauchamp, E. M., Ringer, L., Bulut, G., Sajwan, K. P., Hall, M. D., Lee, Y. C., Peaceman, D., Ozdemirli, M., Rodriguez, O., Macdonald, T. J., Albanese, C., Toretsky, J. A., and Uren, A. (2011). 'Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway'. *J Clin Invest* **121** (1):148-60, doi 10.1172/JCI42874.
- Belyea, B., Kephart, J. G., Blum, J., Kirsch, D. G., and Linardic, C. M. (2012). 'Embryonic signaling pathways and rhabdomyosarcoma: contributions to cancer development and opportunities for therapeutic targeting'. *Sarcoma* **2012**:406239, doi 10.1155/2012/406239.
- Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M., and Chattopadhyay, P. K. (2012). 'A deep profiler's guide to cytometry'. *Trends Immunol* **33** (7):323-32, doi 10.1016/j.it.2012.02.010.
- Bentley, R., and Chasteen, T. G. (2002). 'Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth'. *Microbiol Mol Biol Rev* **66** (2):250-71.
- Berman. (2003). 'Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours.'. *nature*.
- Bhatia, N., Thiyagarajan, S., Elcheva, I., Saleem, M., Dlugosz, A., Mukhtar, H., and Spiegelman, V. S. (2006). 'Gli2 is targeted for ubiquitination and degradation by beta-TrCP ubiquitin ligase'. *J Biol Chem* **281** (28):19320-6, doi 10.1074/jbc.M513203200.
- Boehme, K. A., Zaborski, J. J., Riester, R., Schweiss, S. K., Hopp, U., Traub, F., Kluba, T., Handgretinger, R., and Schleicher, S. B. (2016). 'Targeting hedgehog signalling by arsenic trioxide reduces cell growth and induces apoptosis in rhabdomyosarcoma'. *Int J Oncol* **48** (2):801-12, doi 10.3892/ijo.2015.3293.
- Bowden, C. L. (2000). 'Efficacy of lithium in mania and maintenance therapy of bipolar disorder'. *J Clin Psychiatry* **61 Suppl 9**:35-40.
- Bridge, J. A., Liu, J., Weibolt, V., Baker, K. S., Perry, D., Kruger, R., Qualman, S., Barr, F., Sorensen, P., Triche, T., and Suijkerbuijk, R. (2000). 'Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study'. *Genes Chromosomes Cancer* **27** (4):337-44.

- Bucher, N., and Britten, C. D. (2008). 'G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer'. *Br J Cancer* **98** (3):523-8, doi 10.1038/sj.bjc.6604208.
- Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L., and Schiffman, J. D. (2012). 'The epidemiology of sarcoma'. *Clin Sarcoma Res* **2** (1):14, doi 10.1186/2045-3329-2-14.
- Cade, J. F. (1949). 'Lithium salts in the treatment of psychotic excitement'. *Med J Aust* **2** (10):349-52.
- Cavazzana, A. O., Schmidt, D., Ninfo, V., Harms, D., Tollot, M., Carli, M., Treuner, J., Betto, R., and Salviati, G. (1992). 'Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma'. *Am J Surg Pathol* **16** (3):229-35.
- Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1998). 'BCL-2 family: regulators of cell death'. *Annu Rev Immunol* **16**:395-419, doi 10.1146/annurev.immunol.16.1.395.
- Chen, E. (2016). 'Wnt Signaling in Rhabdomyosarcoma - A Potential Targeted Therapy Option'. *Curr Drug Targets* **17** (11):1245-51.
- Chen, E. Y., DeRan, M. T., Ignatius, M. S., Grandinetti, K. B., Clagg, R., McCarthy, K. M., Lobbardi, R. M., Brockmann, J., Keller, C., Wu, X., and Langenau, D. M. (2014). 'Glycogen synthase kinase 3 inhibitors induce the canonical WNT/beta-catenin pathway to suppress growth and self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (14):5349-54, doi 10.1073/pnas.1317731111.
- Cherry, A. L., Finta, C., Karlstrom, M., Jin, Q., Schwend, T., Astorga-Wells, J., Zubarev, R. A., Del Campo, M., Criswell, A. R., de Sanctis, D., Jovine, L., and Toftgard, R. (2013). 'Structural basis of SUFU-GLI interaction in human Hedgehog signalling regulation'. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69** (Pt 12):2563-79, doi 10.1107/S0907444913028473.
- Chong, C. R., Xu, J., Lu, J., Bhat, S., Sullivan, D. J., Jr., and Liu, J. O. (2007). 'Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole'. *ACS Chem Biol* **2** (4):263-70, doi 10.1021/cb600362d.
- Choudhry, Z., Rikani, A. A., Choudhry, A. M., Tariq, S., Zakaria, F., Asghar, M. W., Sarfraz, M. K., Haider, K., Shafiq, A. A., and Mobassarrah, N. J. (2014). 'Sonic

- hedgehog signalling pathway: a complex network'. *Ann Neurosci* **21** (1):28-31, doi 10.5214/ans.0972.7531.210109.
- Ciccarelli, C., Vulcano, F., Milazzo, L., Gravina, G. L., Marampon, F., Macioce, G., Giampaolo, A., Tombolini, V., Di Paolo, V., Hassan, H. J., and Zani, B. M. (2016). 'Key role of MEK/ERK pathway in sustaining tumorigenicity and in vitro radioresistance of embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population'. *Mol Cancer* **15**:16, doi 10.1186/s12943-016-0501-y.
- Cipriani, A., Pretty, H., Hawton, K., and Geddes, J. R. (2005). 'Lithium in the prevention of suicidal behavior and all-cause mortality in patients with mood disorders: a systematic review of randomized trials'. *Am J Psychiatry* **162** (10):1805-19, doi 10.1176/appi.ajp.162.10.1805.
- Cohen, P., and Goedert, M. (2004). 'GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential'. *Nat Rev Drug Discov* **3** (6):479-87, doi 10.1038/nrd1415.
- Cohen, Y., Chetrit, A., Cohen, Y., Sirota, P., and Modan, B. (1998). 'Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment'. *Med Oncol* **15** (1):32-6.
- Cole, A., Frame, S., and Cohen, P. (2004). 'Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event'. *Biochem J* **377** (Pt 1):249-55, doi 10.1042/BJ20031259.
- Cole, A. R., and Sutherland, C. (2008). 'Measuring GSK3 expression and activity in cells'. *Methods Mol Biol* **468**:45-65, doi 10.1007/978-1-59745-249-6_4.
- Conti, B., Slemmons, K. K., Rota, R., and Linardic, C. M. (2016). 'Recent Insights into Notch Signaling in Embryonal Rhabdomyosarcoma'. *Curr Drug Targets* **17** (11):1235-44.
- Curran, G., and Ravindran, A. (2014). 'Lithium for bipolar disorder: a review of the recent literature'. *Expert Rev Neurother* **14** (9):1079-98, doi 10.1586/14737175.2014.947965.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000). 'Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors'. *Biochem J* **351** (Pt 1):95-105.

- DePamphilis, M. L. (2005). 'Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex'. *Cell Cycle* **4** (1):70-9, doi 10.4161/cc.4.1.1333.
- Ding, D., Lim, K. S., and Eberhart, C. G. (2014). 'Arsenic trioxide inhibits Hedgehog, Notch and stem cell properties in glioblastoma neurospheres'. *Acta Neuropathol Commun* **2** (1):31, doi 10.1186/2051-5960-2-31.
- Dionyssiou, M. G., Ehyai, S., Avrutin, E., Connor, M. K., and McDermott, J. C. (2014). 'Glycogen synthase kinase 3beta represses MYOGENIN function in alveolar rhabdomyosarcoma'. *Cell Death Dis* **5**:e1094, doi 10.1038/cddis.2014.58.
- Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003). 'GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase'. *J Cell Sci* **116** (Pt 7):1175-86.
- Douglass, E. C., Valentine, M., Etcubanas, E., Parham, D., Webber, B. L., Houghton, P. J., Houghton, J. A., and Green, A. A. (1987). 'A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma'. *Cytogenet Cell Genet* **45** (3-4):148-55.
- Duan, F., Lin, M., Li, C., Ding, X., Qian, G., Zhang, H., Ge, S., Fan, X., and Li, J. (2014). 'Effects of inhibition of hedgehog signaling on cell growth and migration of uveal melanoma cells'. *Cancer Biol Ther* **15** (5):544-59, doi 10.4161/cbt.28157.
- Efferth, T., Li, P. C., Konkimalla, V. S., and Kaina, B. (2007). 'From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy'. *Trends Mol Med* **13** (8):353-61, doi 10.1016/j.molmed.2007.07.001.
- Eichenmuller, M., Hemmerlein, B., von Schweinitz, D., and Kappler, R. (2010). 'Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma'. *Br J Cancer* **103** (1):43-51, doi 10.1038/sj.bjc.6605715.
- El Demellawy, D., McGowan-Jordan, J., de Nanassy, J., Chernetsova, E., and Nasr, A. (2017). 'Update on molecular findings in rhabdomyosarcoma'. *Pathology*doi: 10.1016/j.pathol.2016.12.345, doi 10.1016/j.pathol.2016.12.345.
- Embi. (1980). 'Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle'. *European Journal of biochemistry*.
- Eriksson, M. (2010). 'Histology-driven chemotherapy of soft-tissue sarcoma'. *Ann Oncol* **21 Suppl 7**:vii270-6, doi 10.1093/annonc/mdq285.
- Farooqi, A. A., Mukhtar, S., Riaz, A. M., Waseem, S., Minhaj, S., Dilawar, B. A., Malik, B. A., Nawaz, A., and Bhatti, S. (2011). 'Wnt and SHH in prostate

- cancer: trouble mongers occupy the TRAIL towards apoptosis'. *Cell Prolif* **44** (6):508-15, doi 10.1111/j.1365-2184.2011.00784.x.
- Ferte, J. (2000). 'Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane'. *Eur J Biochem* **267** (2):277-94.
- Fletcher, C. D. M., Unni, K. K., and Mertens, F. (2002). Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. In, *World Health Organization classification of tumours*. Lyon : IARC Press, 2002.
- Fortini, M. E. (2009). 'Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation'. *Dev Cell* **16** (5):633-47, doi 10.1016/j.devcel.2009.03.010.
- Forus, A., Florenes, V. A., Maelandsmo, G. M., Meltzer, P. S., Fodstad, O., and Myklebost, O. (1993). 'Mapping of amplification units in the q13-14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplica do not include MDM2'. *Cell Growth Differ* **4** (12):1065-70.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). 'Clonogenic assay of cells in vitro'. *Nat Protoc* **1** (5):2315-9, doi 10.1038/nprot.2006.339.
- Fredericks, W. J., Galili, N., Mukhopadhyay, S., Rovera, G., Bennicelli, J., Barr, F. G., and Rauscher, F. J., 3rd. (1995). 'The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3'. *Mol Cell Biol* **15** (3):1522-35.
- Freland, L., and Beaulieu, J. M. (2012). 'Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks'. *Front Mol Neurosci* **5**:14, doi 10.3389/fnmol.2012.00014.
- Galili, N., Davis, R. J., Fredericks, W. J., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F. J., 3rd, Emanuel, B. S., Rovera, G., and Barr, F. G. (1993). 'Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma'. *Nat Genet* **5** (3):230-5, doi 10.1038/ng1193-230.
- Gillett, C. E., and Barnes, D. M. (1998). 'Demystified ... cell cycle'. *Mol Pathol* **51** (6):310-6.
- Gordon, T., McManus, A., Anderson, J., Min, T., Swansbury, J., Pritchard-Jones, K., Shipley, J., United kingdom Children's Cancer Study, G., and United Kingdom

- Cancer Cytogenetics, G. (2001). 'Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study'. *Med Pediatr Oncol* **36** (2):259-67, doi 10.1002/1096-911X(20010201)36:2<259::AID-MPO1063>3.0.CO;2-K.
- Gould, T. D., and Manji, H. K. (2005). 'Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs'. *Neuropsychopharmacology* **30** (7):1223-37, doi 10.1038/sj.npp.1300731.
- Graab, U., Hahn, H., and Fulda, S. (2015). 'Identification of a novel synthetic lethality of combined inhibition of hedgehog and PI3K signaling in rhabdomyosarcoma'. *Oncotarget* **6** (11):8722-35, doi 10.18632/oncotarget.2726.
- Grant, S. M., and Clissold, S. P. (1989). 'Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses'. *Drugs* **37** (3):310-44.
- Gray, J. E., Infante, J. R., Brail, L. H., Simon, G. R., Cooksey, J. F., Jones, S. F., Farrington, D. L., Yeo, A., Jackson, K. A., Chow, K. H., Zamek-Gliszczynski, M. J., and Burris, H. A., 3rd. (2015). 'A first-in-human phase I dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of intravenous LY2090314, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, administered in combination with pemetrexed and carboplatin'. *Invest New Drugs* **33** (6):1187-96, doi 10.1007/s10637-015-0278-7.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Specht, K., Kappler, R., Calzada-Wack, J., Potter, D., Zimmer, A., Muller, U., Samson, E., Quintanilla-Martinez, L., and Zimmer, A. (2000). 'Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma'. *J Biol Chem* **275** (37):28341-4, doi 10.1074/jbc.C000352200.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Hall, J., Miller, G., and Zimmer, A. (1998). 'Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome'. *Nat Med* **4** (5):619-22.
- Han, Y. H., Kim, S. Z., Kim, S. H., and Park, W. H. (2008). 'Arsenic trioxide inhibits the growth of Calu-6 cells via inducing a G2 arrest of the cell cycle and apoptosis accompanied with the depletion of GSH'. *Cancer Lett* **270** (1):40-55, doi 10.1016/j.canlet.2008.04.041.

- Harper, J. V., and Brooks, G. (2005). 'The mammalian cell cycle: an overview'. *Methods Mol Biol* **296**:113-53.
- Hassounah, N. B., Bunch, T. A., and McDermott, K. M. (2012). 'Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling'. *Clin Cancer Res* **18** (9):2429-35, doi 10.1158/1078-0432.CCR-11-0755.
- Hawkins, D. S., Spunt, S. L., Skapek, S. X., and Committee, C. O. G. S. T. S. (2013). 'Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Soft tissue sarcomas'. *Pediatr Blood Cancer* **60** (6):1001-8, doi 10.1002/pbc.24435.
- Head, S. A., Shi, W., Zhao, L., Gorshkov, K., Pasunooti, K., Chen, Y., Deng, Z., Li, R. J., Shim, J. S., Tan, W., Hartung, T., Zhang, J., Zhao, Y., Colombini, M., and Liu, J. O. (2015). 'Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112** (52):E7276-85, doi 10.1073/pnas.1512867112.
- Hinson, A. R., Jones, R., Crose, L. E., Belyea, B. C., Barr, F. G., and Linardic, C. M. (2013). 'Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls'. *Front Oncol* **3**:183, doi 10.3389/fonc.2013.00183.
- Huang, H. S., Liu, Z. M., and Cheng, Y. L. (2011). 'Involvement of glycogen synthase kinase-3beta in arsenic trioxide-induced p21 expression'. *Toxicol Sci* **121** (1):101-9, doi 10.1093/toxsci/kfr023.
- Huang, X. B., Shi, Y., Wang, C. S., Wang, X. D., Cheng, J., and Che, F. F. (2016). '[Synergistic Inhibitory Effect of Arsenic Trioxide Combined with Itraconazole on Hedgehog Pathway of Multiple Myeloma NCI-H929 Cells]'. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **24** (5):1459-65, doi 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.05.032.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). 'Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis'. *Nat Rev Cancer* **2** (4):277-88, doi 10.1038/nrc776.
- Ingham, P. W., and McMahon, A. P. (2001). 'Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles'. *Genes Dev* **15** (23):3059-87, doi 10.1101/gad.938601.
- Iriyama, N., Yuan, B., Yoshino, Y., Hatta, Y., Horikoshi, A., Aizawa, S., Takeuchi, J., and Toyoda, H. (2013). 'Aquaporin 9, a promising predictor for the cytotoxic

- effects of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts'. *Oncol Rep* **29** (6):2362-8, doi 10.3892/or.2013.2388.
- Izeradjene, K., Douglas, L., Delaney, A., and Houghton, J. A. (2004). 'Influence of casein kinase II in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells'. *Clin Cancer Res* **10** (19):6650-60, doi 10.1158/1078-0432.CCR-04-0576.
- Jahangiri, A., and Weiss, W. A. (2013). 'It takes two to tango: Dual inhibition of PI3K and MAPK in rhabdomyosarcoma'. *Clin Cancer Res* **19** (21):5811-3, doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-2177.
- Jia, J., Amanai, K., Wang, G., Tang, J., Wang, B., and Jiang, J. (2002). 'Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus'. *nature* **416** (6880):548-52, doi 10.1038/nature733.
- Jiang, L., Wang, L., Chen, L., Cai, G. H., Ren, Q. Y., Chen, J. Z., Shi, H. J., and Xie, Y. H. (2015). 'As₂O₃ induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway and activation of caspases'. *Int J Clin Exp Med* **8** (2):2190-6.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr., and Scott, M. P. (1996). 'Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome'. *Science* **272** (5268):1668-71.
- Jope, R. S. (2003). 'Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes'. *Trends Pharmacol Sci* **24** (9):441-3, doi 10.1016/S0165-6147(03)00206-2.
- Jung, H. S., Kim, H. S., Lee, M. J., Shin, H. Y., Ahn, H. S., Ryu, K. H., Seoh, J. Y., Kim, C. J., and Jang, J. J. (2006). 'Arsenic trioxide concentration determines the fate of Ewing's sarcoma family tumors and neuroblastoma cells in vitro'. *FEBS Lett* **580** (20):4969-75, doi 10.1016/j.febslet.2006.07.077.
- Kaidanovich-Beilin, O., and Woodgett, J. R. (2011). 'GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models'. *Front Mol Neurosci* **4**:40, doi 10.3389/fnmol.2011.00040.
- Kalderon, D. (2002). 'Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways'. *Trends Cell Biol* **12** (11):523-31.

- Karaosmanoglu, A. D., Butros, S. R., and Arellano, R. (2013). 'Imaging findings of renal toxicity in patients on chronic lithium therapy'. *Diagn Interv Radiol* **19** (4):299-303, doi 10.5152/dir.2013.097.
- Kashi, V. P., Hatley, M. E., and Galindo, R. L. (2015). 'Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems'. *Nat Rev Cancer* **15** (7):426-39, doi 10.1038/nrc3961.
- Kasper, M., Regl, G., Frischauf, A. M., and Aberger, F. (2006). 'GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling'. *Eur J Cancer* **42** (4):437-45, doi 10.1016/j.ejca.2005.08.039.
- Kasper, M., and Toftgard, R. (2013). 'Smoothing out drug resistance'. *Cancer Cell* **23** (1):3-5, doi 10.1016/j.ccr.2012.12.011.
- Katoh, Y., and Katoh, M. (2009). 'Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation'. *Curr Mol Med* **9** (7):873-86.
- Kaufmann, L., Marinescu, G., Nazarenko, I., Thiele, W., Oberle, C., Sleeman, J., and Blattner, C. (2011). 'LiCl induces TNF-alpha and FasL production, thereby stimulating apoptosis in cancer cells'. *Cell Commun Signal* **9**:15, doi 10.1186/1478-811X-9-15.
- Kawabata. (2011). 'Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth.'. *International journal of oncology*.
- Kawabata, N., Ijiri, K., Ishidou, Y., Yamamoto, T., Nagao, H., Nagano, S., Maeda, S., Komiya, S., and Setoguchi, T. (2011). 'Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth'. *Int J Oncol* **39** (4):899-906, doi 10.3892/ijo.2011.1076.
- Kerl, K., Moreno, N., Holsten, T., Ahlfeld, J., Mertins, J., Hotfilder, M., Kool, M., Bartelheim, K., Schleicher, S., Handgretinger, R., Schuller, U., Meisterernst, M., and Fruhwald, M. C. (2014). 'Arsenic trioxide inhibits tumor cell growth in malignant rhabdoid tumors in vitro and in vivo by targeting overexpressed Gli1'. *Int J Cancer* **135** (4):989-95, doi 10.1002/ijc.28719.
- Kim, D. J., Kim, J., Spaunhurst, K., Montoya, J., Khodosh, R., Chandra, K., Fu, T., Gilliam, A., Molgo, M., Beachy, P. A., and Tang, J. Y. (2014). 'Open-label,

- exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma'. *J Clin Oncol* **32** (8):745-51, doi 10.1200/JCO.2013.49.9525.
- Kim, J., Kato, M., and Beachy, P. A. (2009). 'Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (51):21666-71, doi 10.1073/pnas.0912180106.
- Kim, J., Tang, J. Y., Gong, R., Kim, J., Lee, J. J., Clemons, K. V., Chong, C. R., Chang, K. S., Fereshteh, M., Gardner, D., Reya, T., Liu, J. O., Epstein, E. H., Stevens, D. A., and Beachy, P. A. (2010). 'Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth'. *Cancer Cell* **17** (4):388-99, doi 10.1016/j.ccr.2010.02.027.
- Klein, P. S., and Melton, D. A. (1996). 'A molecular mechanism for the effect of lithium on development'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (16):8455-9.
- Kurita, S., Mott, J. L., Cazanave, S. C., Fingas, C. D., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Roberts, L. R., Fernandez-Zapico, M. E., and Gores, G. J. (2011). 'Hedgehog inhibition promotes a switch from Type II to Type I cell death receptor signaling in cancer cells'. *Plos one* **6** (3):e18330, doi 10.1371/journal.pone.0018330.
- Lauth, M., Bergstrom, A., Shimokawa, T., and Toftgard, R. (2007). 'Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (20):8455-60, doi 10.1073/pnas.0609699104.
- Lauth, M., and Toftgard, R. (2007). 'The Hedgehog pathway as a drug target in cancer therapy'. *Curr Opin Investig Drugs* **8** (6):457-61.
- Lentze. (2007). *Pädiatrie - Grundlagen und Praxis*.
- Leung, J., Pang, A., Yuen, W. H., Kwong, Y. L., and Tse, E. W. (2007). 'Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells'. *Blood* **109** (2):740-6, doi 10.1182/blood-2006-04-019588.
- Li, J., Cai, J., Zhao, S., Yao, K., Sun, Y., Li, Y., Chen, L., Li, R., Zhai, X., Zhang, J., and Jiang, C. (2016). 'GANT61, a GLI inhibitor, sensitizes glioma cells to the temozolomide treatment'. *J Exp Clin Cancer Res* **35** (1):184, doi 10.1186/s13046-016-0463-3.

- Li, S., Chen, Y., Shi, Q., Yue, T., Wang, B., and Jiang, J. (2012). 'Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothed trafficking and cell surface expression in *Drosophila*'. *PLoS Biol* **10** (1):e1001239, doi 10.1371/journal.pbio.1001239.
- Liang, G., Liu, M., Wang, Q., Shen, Y., Mei, H., Li, D., and Liu, W. (2017). 'Itraconazole exerts its anti-melanoma effect by suppressing Hedgehog, Wnt, and PI3K/mTOR signaling pathways'. *Oncotarget* doi: 10.18632/oncotarget.15324, doi 10.18632/oncotarget.15324.
- Lin, T. L., and Matsui, W. (2012). 'Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development'. *Onco Targets Ther* **5**:47-58, doi 10.2147/OTT.S21957.
- Lin, Z., Sheng, H., You, C., Cai, M., Zhang, Y., Yu, L. S., Yu, X., Lin, J., and Zhang, N. (2017). 'Inhibition of the CyclinD1 promoter in response to sonic hedgehog signaling pathway transduction is mediated by Gli1'. *Exp Ther Med* **13** (1):307-14, doi 10.3892/etm.2016.3969.
- Liu, R., Li, J., Zhang, T., Zou, L., Chen, Y., Wang, K., Lei, Y., Yuan, K., Li, Y., Lan, J., Cheng, L., Xie, N., Xiang, R., Nice, E. C., Huang, C., and Wei, Y. (2014). 'Itraconazole suppresses the growth of glioblastoma through induction of autophagy: involvement of abnormal cholesterol trafficking'. *Autophagy* **10** (7):1241-55, doi 10.4161/auto.28912.
- Lu, T. H., Su, C. C., Chen, Y. W., Yang, C. Y., Wu, C. C., Hung, D. Z., Chen, C. H., Cheng, P. W., Liu, S. H., and Huang, C. F. (2011). 'Arsenic induces pancreatic beta-cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways'. *Toxicol Lett* **201** (1):15-26, doi 10.1016/j.toxlet.2010.11.019.
- Lubner, S. J., Kunnimalaiyaan, M., Holen, K. D., Ning, L., Ndiaye, M., Loconte, N. K., Mulkerin, D. L., Schelman, W. R., and Chen, H. (2011). 'A preclinical and clinical study of lithium in low-grade neuroendocrine tumors'. *Oncologist* **16** (4):452-7, doi 10.1634/theoncologist.2010-0323.
- Mackenzie, R. W., and Elliott, B. T. (2014). 'Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes'. *Diabetes Metab Syndr Obes* **7**:55-64, doi 10.2147/DMSO.S48260.

- Marshall, A. D., and Grosveld, G. C. (2012). 'Alveolar rhabdomyosarcoma - The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis'. *Skelet Muscle* **2** (1):25, doi 10.1186/2044-5040-2-25.
- Martins, A. S., Olmos, D., Missiaglia, E., and Shipley, J. (2011). 'Targeting the insulin-like growth factor pathway in rhabdomyosarcomas: rationale and future perspectives'. *Sarcoma* **2011**:209736, doi 10.1155/2011/209736.
- McAllister, R. M., Melnyk, J., Finkelstein, J. Z., Adams, E. C., Jr., and Gardner, M. B. (1969). 'Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma'. *Cancer* **24** (3):520-6.
- McCall, T. D., Pedone, C. A., and Fults, D. W. (2007). 'Apoptosis suppression by somatic cell transfer of Bcl-2 promotes Sonic hedgehog-dependent medulloblastoma formation in mice'. *Cancer Res* **67** (11):5179-85, doi 10.1158/0008-5472.CAN-06-4177.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Bertrand, F. E., Davis, N. M., Sokolosky, M., Abrams, S. L., Montalto, G., D'Assoro, A. B., Libra, M., Nicoletti, F., Maestro, R., Basecke, J., Rakus, D., Gizak, A., Demidenko, Z. N., Cocco, L., Martelli, A. M., and Cervello, M. (2014). 'GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer'. *Oncotarget* **5** (10):2881-911.
- Mentzel, T., and Katenkamp, D. (2000). 'Sclerosing, pseudovascular rhabdomyosarcoma in adults. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of three cases'. *Virchows Arch* **436** (4):305-11.
- Miller, W. H., Jr., Schipper, H. M., Lee, J. S., Singer, J., and Waxman, S. (2002). 'Mechanisms of action of arsenic trioxide'. *Cancer Res* **62** (14):3893-903.
- Miyazaki, Y., Matsubara, S., Ding, Q., Tsukasa, K., Yoshimitsu, M., Kosai, K., and Takao, S. (2016). 'Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by hedgehog/GLI inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition'. *Mol Cancer* **15** (1):49, doi 10.1186/s12943-016-0534-2.
- Mo, W., Xu, X., Xu, L., Wang, F., Ke, A., Wang, X., and Guo, C. (2011). 'Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell'. *Pancreatology* **11** (6):601-9, doi 10.1159/000333542.

- Mora, A., Sabio, G., Risco, A. M., Cuenda, A., Alonso, J. C., Soler, G., and Centeno, F. (2002). 'Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A'. *Cell Signal* **14** (6):557-62.
- Mosmann, T. (1983). 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays'. *J Immunol Methods* **65** (1-2):55-63.
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., and Fujita, S. C. (2002). 'Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta'. *J Neurochem* **81** (5):1073-83.
- Muller-Oerlinghausen, B., Felber, W., Berghofer, A., Lauterbach, E., and Ahrens, B. (2005). 'The impact of lithium long-term medication on suicidal behavior and mortality of bipolar patients'. *Arch Suicide Res* **9** (3):307-19, doi 10.1080/13811110590929550.
- Munshi, A., Hobbs, M., and Meyn, R. E. (2005). 'Clonogenic cell survival assay'. *Methods Mol Med* **110**:21-8, doi 10.1385/1-59259-869-2:021.
- Nacev, B. A., Grassi, P., Dell, A., Haslam, S. M., and Liu, J. O. (2011). 'The antifungal drug itraconazole inhibits vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, trafficking, and signaling in endothelial cells'. *J Biol Chem* **286** (51):44045-56, doi 10.1074/jbc.M111.278754.
- Norbury, C. J., and Hickson, I. D. (2001). 'Cellular responses to DNA damage'. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:367-401, doi 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367.
- Oberlin, O., Rey, A., Lyden, E., Bisogno, G., Stevens, M. C., Meyer, W. H., Carli, M., and Anderson, J. R. (2008). 'Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups'. *J Clin Oncol* **26** (14):2384-9, doi 10.1200/JCO.2007.14.7207.
- Oue. (2013). 'Hedgehog signal inhibitors suppress the invasion of human rhabdomyosarcoma cells'. *Pediatric Surgery International*.
- Ouo. (2010). 'Increased expression of the hedgehog signaling pathway in pediatric solid malignancies'. *Journal of Pediatric Surgery*.
- Pan, Y., Bai, C. B., Joyner, A. L., and Wang, B. (2006). 'Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and

- degradation'. *Mol Cell Biol* **26** (9):3365-77, doi 10.1128/MCB.26.9.3365-3377.2006.
- Pandya, N. A., Atra, A. A., Riley, U., and Pinkerton, C. R. (2003). 'Role of itraconazole in haematology/oncology'. *Arch Dis Child* **88** (3):258-60.
- Pantziarka, P., Sukhatme, V., Bouche, G., Meheus, L., and Sukhatme, V. P. (2015). 'Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-itraconazole as an anti-cancer agent'. *Ecancermedicalscience* **9**:521, doi 10.3332/ecancer.2015.521.
- Penel, N., Van Glabbeke, M., Marreaud, S., Ouali, M., Blay, J. Y., and Hohenberger, P. (2011). 'Testing new regimens in patients with advanced soft tissue sarcoma: analysis of publications from the last 10 years'. *Ann Oncol* **22** (6):1266-72, doi 10.1093/annonc/mdq608.
- Peng, Z., Ji, Z., Mei, F., Lu, M., Ou, Y., and Cheng, X. (2013). 'Lithium inhibits tumorigenic potential of PDA cells through targeting hedgehog-GLI signaling pathway'. *Plos one* **8** (4):e61457, doi 10.1371/journal.pone.0061457.
- Phiel, C. J., and Klein, P. S. (2001). 'Molecular targets of lithium action'. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:789-813, doi 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.789.
- Phukan, S., Babu, V. S., Kannoji, A., Hariharan, R., and Balaji, V. N. (2010). 'GSK3beta: role in therapeutic landscape and development of modulators'. *Br J Pharmacol* **160** (1):1-19, doi 10.1111/j.1476-5381.2010.00661.x.
- Platanias, L. C. (2009). 'Biological responses to arsenic compounds'. *J Biol Chem* **284** (28):18583-7, doi 10.1074/jbc.R900003200.
- Price, M. A., and Kalderon, D. (2002). 'Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1'. *Cell* **108** (6):823-35.
- Quiroz, J. A., Gould, T. D., and Manji, H. K. (2004). 'Molecular effects of lithium'. *Mol Interv* **4** (5):259-72, doi 10.1124/mi.4.5.6.
- Radzikowska, J., Kukwa, W., Kukwa, A., Czarnecka, A., and Krzeski, A. (2015). 'Rhabdomyosarcoma of the head and neck in children'. *Contemp Oncol (Pozn)* **19** (2):98-107, doi 10.5114/wo.2015.49158.
- Raju, G. P. (2011). 'Arsenic: a potentially useful poison for Hedgehog-driven cancers'. *J Clin Invest* **121** (1):14-6, doi 10.1172/JCI45692.

- Raney, R. B., Anderson, J. R., Barr, F. G., Donaldson, S. S., Pappo, A. S., Qualman, S. J., Wiener, E. S., Maurer, H. M., and Crist, W. M. (2001). 'Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V'. *J Pediatr Hematol Oncol* **23** (4):215-20.
- Rapoport, S. I., and Bosetti, F. (2002). 'Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder?'. *Arch Gen Psychiatry* **59** (7):592-6.
- Riedel, R. F. (2012). 'Systemic therapy for advanced soft tissue sarcomas: highlighting novel therapies and treatment approaches'. *Cancer* **118** (6):1474-85, doi 10.1002/cncr.26415.
- Rimkus, T. K., Carpenter, R. L., Qasem, S., Chan, M., and Lo, H. W. (2016). 'Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors'. *Cancers (Basel)* **8** (2), doi 10.3390/cancers8020022.
- Roberts, W. M., Douglass, E. C., Peiper, S. C., Houghton, P. J., and Look, A. T. (1989). 'Amplification of the gli gene in childhood sarcomas'. *Cancer Res* **49** (19):5407-13.
- Roboz, G. J., Dias, S., Lam, G., Lane, W. J., Soignet, S. L., Warrell, R. P., Jr., and Rafii, S. (2000). 'Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis'. *Blood* **96** (4):1525-30.
- Roma, J., Almazan-Moga, A., Sanchez de Toledo, J., and Gallego, S. (2012). 'Notch, wnt, and hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network'. *Sarcoma* **2012**:695603, doi 10.1155/2012/695603.
- Ronchi, A., Salaroli, R., Rivetti, S., Della Bella, E., Di Tomaso, T., Voltattorni, M., Cammelli, S., Ceccarelli, C., Giangaspero, F., Barbieri, E., and Cenacchi, G. (2010). 'Lithium induces mortality in medulloblastoma cell lines'. *Int J Oncol* **37** (3):745-52.
- Ruat, M., Hoch, L., Faure, H., and Rognan, D. (2014). 'Targeting of Smoothed for therapeutic gain'. *Trends Pharmacol Sci* **35** (5):237-46, doi 10.1016/j.tips.2014.03.002.

- Rudin, C. M., Brahmer, J. R., Juergens, R. A., Hann, C. L., Ettinger, D. S., Sebree, R., Smith, R., Aftab, B. T., Huang, P., and Liu, J. O. (2013). 'Phase 2 study of pemetrexed and itraconazole as second-line therapy for metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer'. *J Thorac Oncol* **8** (5):619-23, doi 10.1097/JTO.0b013e31828c3950.
- Ryves, W. J., and Harwood, A. J. (2001). 'Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium'. *Biochem Biophys Res Commun* **280** (3):720-5, doi 10.1006/bbrc.2000.4169.
- Sasai, K., Romer, J. T., Lee, Y., Finkelstein, D., Fuller, C., McKinnon, P. J., and Curran, T. (2006). 'Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies'. *Cancer Res* **66** (8):4215-22, doi 10.1158/0008-5472.CAN-05-4505.
- Schaffer, B., Wiedau-Pazos, M., and Geschwind, D. H. (2003). 'Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in neural and non-neural tissues'. *Gene* **302** (1-2):73-81.
- Schleicher, S. B., Zaborski, J. J., Riester, R., Zenkner, N., Handgretinger, R., Kluba, T., Traub, F., and Boehme, K. A. (2017). 'Combined application of arsenic trioxide and lithium chloride augments viability reduction and apoptosis induction in human rhabdomyosarcoma cell lines'. *Plos one* **12** (6):e0178857, doi 10.1371/journal.pone.0178857.
- Sertel, S., Tome, M., Briehl, M. M., Bauer, J., Hock, K., Plinkert, P. K., and Efferth, T. (2012). 'Factors determining sensitivity and resistance of tumor cells to arsenic trioxide'. *Plos one* **7** (5):e35584, doi 10.1371/journal.pone.0035584.
- Shen, Z. X., Chen, G. Q., Ni, J. H., Li, X. S., Xiong, S. M., Qiu, Q. Y., Zhu, J., Tang, W., Sun, G. L., Yang, K. Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z. W., Wang, Y. T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T. D., Chen, S. J., Chen, Z., and Wang, Z. Y. (1997). 'Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients'. *Blood* **89** (9):3354-60.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). 'CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression'. *Genes Dev* **13** (12):1501-12.

- Song, J., Park, S., Kim, M., and Shin, I. (2008). 'Down-regulation of Notch-dependent transcription by Akt in vitro'. *FEBS Lett* **582** (12):1693-9, doi 10.1016/j.febslet.2008.04.024.
- Sorensen, P. H., Lynch, J. C., Qualman, S. J., Tirabosco, R., Lim, J. F., Maurer, H. M., Bridge, J. A., Crist, W. M., Triche, T. J., and Barr, F. G. (2002). 'PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group'. *J Clin Oncol* **20** (11):2672-9.
- Spiegelberg, B. D., Dela Cruz, J., Law, T. H., and York, J. D. (2005). 'Alteration of lithium pharmacology through manipulation of phosphoadenosine phosphate metabolism'. *J Biol Chem* **280** (7):5400-5, doi 10.1074/jbc.M407890200.
- Srivastava, R. K., Kaylani, S. Z., Edrees, N., Li, C., Talwelkar, S. S., Xu, J., Palle, K., Pressey, J. G., and Athar, M. (2014). 'GLI inhibitor GANT-61 diminishes embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma growth by inhibiting Shh/AKT-mTOR axis'. *Oncotarget* **5** (23):12151-65, doi 10.18632/oncotarget.2569.
- Stecca, B., and Ruiz, I. A. A. (2010). 'Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals'. *J Mol Cell Biol* **2** (2):84-95, doi 10.1093/jmcb/mjp052.
- Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I. H., Janssen, O., Kabelitz, D., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (2001). 'Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation'. *Oncogene* **20** (10):1193-202, doi 10.1038/sj.onc.1204221.
- Stratton, M. R., Fisher, C., Gusterson, B. A., and Cooper, C. S. (1989). 'Detection of point mutations in N-ras and K-ras genes of human embryonal rhabdomyosarcomas using oligonucleotide probes and the polymerase chain reaction'. *Cancer Res* **49** (22):6324-7.
- Sun, Y., Guo, W., Ren, T., Liang, W., Zhou, W., Lu, Q., Jiao, G., and Yan, T. (2014). 'Gli1 inhibition suppressed cell growth and cell cycle progression and induced apoptosis as well as autophagy depending on ERK1/2 activity in human chondrosarcoma cells'. *Cell Death Dis* **5**:e979, doi 10.1038/cddis.2013.497.

- Szalat, A., Mazeh, H., and Freund, H. R. (2009). 'Lithium-associated hyperparathyroidism: report of four cases and review of the literature'. *Eur J Endocrinol* **160** (2):317-23, doi 10.1530/EJE-08-0620.
- Takenaka, K., Kise, Y., and Miki, H. (2007). 'GSK3beta positively regulates Hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells'. *Biochem Biophys Res Commun* **353** (2):501-8, doi 10.1016/j.bbrc.2006.12.058.
- Thornton. (2008). 'Phosphorylation by p38 MAPK as an Alternative Pathway for GSK3 β Inactivation'. *Science*.
- Tondo, L., and Baldessarini, R. J. (2009). 'Long-term lithium treatment in the prevention of suicidal behavior in bipolar disorder patients'. *Epidemiol Psychiatr Soc* **18** (3):179-83.
- Tostar, U., Toftgard, R., Zaphiropoulos, P. G., and Shimokawa, T. (2010). 'Reduction of human embryonal rhabdomyosarcoma tumor growth by inhibition of the hedgehog signaling pathway'. *Genes Cancer* **1** (9):941-51, doi 10.1177/1947601910385449.
- Tsubamoto, H., Inoue, K., Sakata, K., Ueda, T., Takeyama, R., Shibahara, H., and Sonoda, T. (2017). 'Itraconazole Inhibits AKT/mTOR Signaling and Proliferation in Endometrial Cancer Cells'. *Anticancer Res* **37** (2):515-19, doi 10.21873/anticanres.11343.
- Tsubamoto, H., Sonoda, T., and Inoue, K. (2014). 'Impact of itraconazole on the survival of heavily pre-treated patients with triple-negative breast cancer'. *Anticancer Res* **34** (7):3839-44.
- Tsubamoto, H., Sonoda, T., Yamasaki, M., and Inoue, K. (2014). 'Impact of combination chemotherapy with itraconazole on survival of patients with refractory ovarian cancer'. *Anticancer Res* **34** (5):2481-7.
- Tsujimoto, Y. (1998). 'Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?'. *Genes Cells* **3** (11):697-707.
- Vinci, M., Box, C., and Eccles, S. A. (2015). 'Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay'. *J Vis Exp*doi: 10.3791/52686 (99):e52686, doi 10.3791/52686.
- Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., and Eccles, S. A. (2012). 'Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based

- functional assays for target validation and drug evaluation'. *BMC Biol* **10**:29, doi 10.1186/1741-7007-10-29.
- Vleeshouwer-Neumann, T., Phelps, M., Bammler, T. K., MacDonald, J. W., Jenkins, I., and Chen, E. Y. (2015). 'Histone Deacetylase Inhibitors Antagonize Distinct Pathways to Suppress Tumorigenesis of Embryonal Rhabdomyosarcoma'. *Plos one* **10** (12):e0144320, doi 10.1371/journal.pone.0144320.
- Wang, D., Hu, G., Du, Y., Zhang, C., Lu, Q., Lv, N., and Luo, S. (2017). 'Aberrant activation of hedgehog signaling promotes cell proliferation via the transcriptional activation of forkhead Box M1 in colorectal cancer cells'. *J Exp Clin Cancer Res* **36** (1):23, doi 10.1186/s13046-017-0491-7.
- Wang, E. J., Lew, K., Casciano, C. N., Clement, R. P., and Johnson, W. W. (2002). 'Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein'. *Antimicrob Agents Chemother* **46** (1):160-5.
- Wang, Y., Ding, Q., Yen, C. J., Xia, W., Izzo, J. G., Lang, J. Y., Li, C. W., Hsu, J. L., Miller, S. A., Wang, X., Lee, D. F., Hsu, J. M., Huo, L., Labaff, A. M., Liu, D., Huang, T. H., Lai, C. C., Tsai, F. J., Chang, W. C., Chen, C. H., Wu, T. T., Buttar, N. S., Wang, K. K., Wu, Y., Wang, H., Ajani, J., and Hung, M. C. (2012). 'The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways'. *Cancer Cell* **21** (3):374-87, doi 10.1016/j.ccr.2011.12.028.
- Wang-Wuu, S., Soukup, S., Ballard, E., Gotwals, B., and Lampkin, B. (1988). 'Chromosomal analysis of sixteen human rhabdomyosarcomas'. *Cancer Res* **48** (4):983-7.
- Weber-Hall, S., Anderson, J., McManus, A., Abe, S., Nojima, T., Pinkerton, R., Pritchard-Jones, K., and Shipley, J. (1996). 'Gains, losses, and amplification of genomic material in rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization'. *Cancer Res* **56** (14):3220-4.
- Weigel, B. J., Lyden, E., Anderson, J. R., Meyer, W. H., Parham, D. M., Rodeberg, D. A., Michalski, J. M., Hawkins, D. S., and Arndt, C. A. (2016). 'Intensive Multiagent Therapy, Including Dose-Compressed Cycles of Ifosfamide/Etoposide and Vincristine/Doxorubicin/Cyclophosphamide, Irinotecan, and Radiation, in Patients With High-Risk Rhabdomyosarcoma: A

- Report From the Children's Oncology Group'. *J Clin Oncol* **34** (2):117-22, doi 10.1200/JCO.2015.63.4048.
- Wickstrom, M., Dyberg, C., Shimokawa, T., Milosevic, J., Baryawno, N., Fuskevag, O. M., Larsson, R., Kogner, P., Zaphiropoulos, P. G., and Johnsen, J. I. (2013). 'Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo'. *Int J Cancer* **132** (7):1516-24, doi 10.1002/ijc.27820.
- Woodgett, J. R. (1990). 'Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A'. *EMBO J* **9** (8):2431-8.
- Wu, S., Zheng, S. D., Huang, H. L., Yan, L. C., Yin, X. F., Xu, H. N., Zhang, K. J., Gui, J. H., Chu, L., and Liu, X. Y. (2013). 'Lithium down-regulates histone deacetylase 1 (HDAC1) and induces degradation of mutant huntingtin'. *J Biol Chem* **288** (49):35500-10, doi 10.1074/jbc.M113.479865.
- Xie. (1998). 'Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma.'. *nature*.
- Xu, J., Dang, Y., Ren, Y. R., and Liu, J. O. (2010). 'Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (10):4764-9, doi 10.1073/pnas.0910872107.
- Yamanaka, H., Oue, T., Uehara, S., and Fukuzawa, M. (2011). 'Hedgehog signal inhibitor forskolin suppresses cell proliferation and tumor growth of human rhabdomyosarcoma xenograft'. *J Pediatr Surg* **46** (2):320-5, doi 10.1016/j.jpedsurg.2010.11.010.
- Yang, J., Ren, Z., Du, X., Hao, M., and Zhou, W. (2014). 'The role of mesenchymal stem/progenitor cells in sarcoma: update and dispute'. *Stem Cell Investig* **1**:18, doi 10.3978/j.issn.2306-9759.2014.10.01.
- Yauch, R. L., Dijkgraaf, G. J., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C. P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C. A., Tang, T., Bazan, J. F., Kan, Z., Seshagiri, S., Hann, C. L., Gould, S. E., Low, J. A., Rudin, C. M., and de Sauvage, F. J. (2009). 'Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma'. *Science* **326** (5952):572-4, doi 10.1126/science.1179386.

- Zeng, F. Y., Dong, H., Cui, J., Liu, L., and Chen, T. (2010). 'Glycogen synthase kinase 3 regulates PAX3-FKHR-mediated cell proliferation in human alveolar rhabdomyosarcoma cells'. *Biochem Biophys Res Commun* **391** (1):1049-55, doi 10.1016/j.bbrc.2009.12.017.
- Zhang, R., Wu, J., Ferrandon, S., Glowacki, K. J., and Houghton, J. A. (2016). 'Targeting GLI by GANT61 involves mechanisms dependent on inhibition of both transcription and DNA licensing'. *Oncotarget* **7** (49):80190-207, doi 10.18632/oncotarget.13376.
- Zhao, Z., Yin, Y., Zhang, J., Qi, J., Zhang, D., Ma, Y., Wang, Y., Li, S., and Zhou, J. (2015). 'Spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma: case series from a single institution emphasizing morphology, immunohistochemistry and follow-up'. *Int J Clin Exp Pathol* **8** (11):13814-20.
- Zibat, A., Missiaglia, E., Rosenberger, A., Pritchard-Jones, K., Shipley, J., Hahn, H., and Fulda, S. (2010). 'Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma'. *Oncogene* **29** (48):6323-30, doi 10.1038/onc.2010.368.
- Zinke, J., Schneider, F. T., Harter, P. N., Thom, S., Ziegler, N., Toftgard, R., Plate, K. H., and Liebner, S. (2015). 'beta-Catenin-Gli1 interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma'. *Mol Cancer* **14**:17, doi 10.1186/s12943-015-0294-4.

12 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Zellbiologischen Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung meines Betreuers, Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger, Ärztlicher Direktor der Allgemeinen Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie, Kinderklinik Tübingen, durchgeführt.

Die Studie wurde durch Dr. rer. nat. Karen A. Böhme und Dr. rer. nat. Sabine B. Schleicher konzipiert. Die Betreuung im Labor übernahm Dr. rer. nat. Karen A. Böhme, Leiterin des Zellbiologischen Forschungslabors der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen. Sie schrieb außerdem die Artikel, welche im International Journal of Oncology und in PLOS ONE veröffentlicht wurden.

Die verwendeten SRH und ZF Zelllinien wurden durch Dr. rer. nat. Sabine B. Schleicher etabliert. Die Kultivierung der Zellen sowie die MTS-Assays, Koloniebildungstests, qRT-PCR und den Nachweis der Zellkernfragmentierung mittels Fluoreszenzmikroskopie führte ich nach der Einarbeitung durch R. Riester und J. Liedke selbstständig durch. R. Riester und J. Liedke kümmerten sich auch in meiner Abwesenheit um die Zellkultur. J. Liedke unterstützte mich außerdem bei der Bedienung des Durchflusszytometers und der Auswertung der dort bestimmten Daten. Die restlichen Auswertungen, das Erstellen der Diagramme und die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen führte ich selbstständig durch. Der 3D Sphäroid Assay wurde während meiner Laborzeit unter der Leitung von Dr. rer. nat. Karen A. Böhme etabliert.

Hiermit versichere ich, die Arbeit selbstständig verfasst und wörtlich sowie inhaltlich übernommene Textstellen als solche gekennzeichnet zu haben. Die Korrektur der Arbeit übernahm Dr. rer. nat. Karen A. Böhme.

Tübingen,

Julian Zaborski

13 Veröffentlichungen

Artikel:

1. Boehme, K. A., Zaborski, J. J., Riester, R., Schweiss, S. K., Hopp, U., Traub, F., Kluba, T., Handgretinger, R., and Schleicher, S. B. (2016). 'Targeting hedgehog signalling by arsenic trioxide reduces cell growth and induces apoptosis in rhabdomyosarcoma'. *Int J Oncol* 48 (2):801-12, doi 10.3892/ijo.2015.3293.
2. Schleicher, S. B., Zaborski, J. J., Riester, R., Zenkner, N., Handgretinger, R., Kluba, T., Traub, F., and Boehme, K. A. (2017). 'Combined application of arsenic trioxide and lithium chloride augments viability reduction and apoptosis induction in human rhabdomyosarcoma cell lines'. *Plos one* 12 (6):e0178857, doi 10.1371/journal.pone.0178857.

Poster:

1. Boehme KA, Zaborski JJ, Riester R, Kluba T, Handgretinger R, Traub F, Schleicher SB. Hedgehog pathway inhibition in combination with lithium chloride– a treatment option for rhabdomyosarcoma? Poster“CESAR Jahrestagung 2015”, Innsbruck 2015

Vorträge:

1. Boehme KA, Schweiss S, Liedke J , Zaborski JJ, Riester R, Kluba T, Handgretinger R, Schleicher SB. Arsenic trioxide – an old poison effective in sarcoma treatment? Vortrag “CESAR Jahrestagung 2014”, Bonn 2014
2. Böhme KA, Riester R, Zaborski JJ, Hopp U, Traub F, Handgretinger R, Kluba T, Schleicher SB. GLI Inhibition als neuer therapeutischer Ansatz für Patienten mit Rhabdomyosarkomen. Vortrag „Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 2015“, Berlin 2015
3. Traub F, Zaborski JJ, Riester R, Handgretinger R, Schleicher SB, Boehme KA. Orphan drugs for rare disease. Is lithium or arsenic trioxide a treatment option for rhabdomyosarcoma? Vortrag “30th Annual Meeting of the European Musculo Skeletal Oncology Society (E.M.S.O.S.)”, Budapest 2017

14 Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. R. Handgretinger für die Überlassung des Themas und die Annahme als Doktoranden bedanken.

Mein größter Dank gebührt Frau Dr. rer. nat. Karen A. Böhme, in deren Forschungsteam ich arbeiten durfte und die mich großartig betreute. Sie konzipierte zusammen mit Dr. rer. nat. Sabine B. Schleicher die Studie und ohne ihre Anleitung und Hilfsbereitschaft wäre mir die Anfertigung und Vollendung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen im Labor, die mir bei freundschaftlicher Arbeitsatmosphäre jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Rosa Riester und Jens Liedke, die mich geduldig in die Arbeitsabläufe des zellbiologischen Labors eingearbeitet haben und auf deren Unterstützung ich jederzeit zählen konnte.

Ein weiterer Dank gilt meinen Freunden Sören Loescher und Hagen Ritter, die mir bei der Korrektur der Arbeit halfen und die mir seit Kindheitstagen in jeder Lebenssituation zur Seite stehen.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen liebevollen Eltern, Andrea und Karl-Heinz, die mich stets auf meinem Lebensweg unterstützen, mir meinen Traum vom Medizinstudium ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.