

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Dietl**

Wirkung und Wirkmechanismus von AEZS 126 auf verschiedene Subentitäten des
Mammakarzinoms

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
Der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heike Schmidt
aus Schrobenhausen

Würzburg, März 2013



Referent: Prof. Dr. Arnd Hönig

Korreferent: Prof. Dr. Martin Eilers

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2013

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-IV
Abbildungsverzeichnis	V-VI
Abkürzungsverzeichnis	VII-X
1. Einleitung	1
1.1. Brustkrebs	1
1.1.1. Inzidenz	1
1.1.2. Mortalität	1
1.1.3. Prävalenz	2
1.1.4. Risikofaktoren	3
1.2. Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC)	4
1.2.1. Allgemeines	4
1.2.2. Therapie des TNBC	5
1.3. Apoptose, Nekrose und Nekroptose	6
1.3.1. Apoptose	6
1.3.1.1. Extrinsischer Weg (Todesrezeptorweg)	7
1.3.1.2. Intrinsischer Weg (Mitochondraler Weg)	8
1.3.2. Apoptose und AKT	9
1.3.3. Nekroptose	10
1.4. Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT-Signalweg	11
1.4.1. Allgemeines	11
1.4.2. PI3K	12

1.4.6.	Störungen des PI3K/AKT Signalwegs	14
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Material	17
2.1.1.	Verwendete Zelllinien	17
2.1.2.	Chemikalien und Enzyme	18
2.1.3.	Antikörper	19
2.1.3.1.	Primärantikörper	19
2.1.3.1.	Sekundärantikörper	22
2.1.4.	Medien und Puffer	23
2.1.4.1.	Zellkulturmedien	23
2.2.	Methoden	28
2.2.1.	Kultivierung	28
2.2.2.	Passagieren adhärenter Zellen	28
2.2.3.	Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.4.	Waschen der Zellen	29
2.2.5.	Zellen auftauen	29
2.2.6.	Zellen einfrieren	30
2.2.7.	Kristallviolett-Assay	30
2.2.8.	zVAD-fmk/Nekrostatin	30
2.2.9.	Herstellung von Proteinlysaten	30
2.2.10.	Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay	31
2.2.11.	Gelelektrophorese	32

2.2.12.	Übertragung von Proteinen aus Elektrophoresegelen auf Membranen („Semi-dry Blotting“)	34
2.2.13.	Anfärben der transferierten Proteine	34
2.2.14.	Immundetektion der transferierten Proteine	35
2.2.15.	Loslösen von an die Membran gebundenen Antikörpern („strippen der Membran“)	36
2.2.16.	FACS (“fluorescence activated cell sorting”)	36
2.2.17.	Zellzyklus-FACS	37
2.2.18.	AnnexinV/Propidiumiodid FACS zur Apoptose Detektion	38
2.2.19.	Statistik	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	AEZS 126 inhibiert die Phosphorylierung von AKT <i>in vitro</i>	41
3.2.	AEZS 126 reduziert die Vitalität der Brustkrebs-Zelllinien HCC1937, HCC1806, MDA-MB468 und MCF7	42
3.3.	Mechanistische Untersuchungen zur Art des Zelltodes in Brustkrebs-Zelllinien	45
3.3.1.	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der HCC1937 Zellen	45
3.3.2.	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der HCC1806 Zellen	48
3.3.3.	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der MDA-MB468 Zellen	50
3.3.4.	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der MCF7 Zellen	52
3.4.	Zellzyklus FACS	54

3.5.	Propidiumiodid/AnnexinV FACS	58
3.5.1.	HCC1937	59
3.5.2.	HCC1806	60
3.5.3.	MDA-MB468	60
3.5.4.	MCF7	61
3.6.	Western Blot	62
3.6.1.	HCC1937	62
3.6.2.	HCC1806	65
3.6.3.	MDA-MB468	66
3.6.4.	MCF7	68
4.	Diskussion	71
4.1.	Vitalität	71
4.2.	AKT/ERK Inhibition	72
4.3.	Zellzyklus	74
4.4.	PI/AnnexinV FACS	75
4.5.	RIP/PARP Necrostatin-1/zVAD-fmk	76
4.6.	Caspase-3 wird in HCC1937, HCC1806 und MDA-MB468 nicht gespalten	81
4.7.	PARP Spaltung in MCF7	83
5.	Zusammenfassung und Ausblick	85
	Literaturverzeichnis	89-96

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die Signalkaskade bei der Apoptose in Anlehnung an <i>C.elegans</i> [31]	7
Abb. 2: Schematische Darstellung der beiden Apoptosewege [50]	9
Abb. 3: TNF- α Rezeptor und die möglichen intrazellulären Signalwege nach Rezeptoraktivierung [54]	10
Abb. 4: Schematische Darstellung des PI3K/AKT Signalweges nach Hennessy <i>et al.</i> [64]	14
Abb. 5: AEZS 126 inhibiert die Phosphorylierung von AKT mit steigender Konzentration	41
Abb. 6: AEZS 126 reduziert die Vitalität der Zelllinien HCC1937, HCC1806, MDA-MB468 und MCF7..	44
Abb. 7: Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk erhöht die Vitalität der TNBC Zellen.	47
Abb. 8: Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 erhöht die Vitalität der TNBC Zellen, zVAD-fmk zeigt lediglich bei einer Inkubationszeit von 48h Wirkung	49
Abb. 9: Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 verringert die Vitalität der Tumorzellen, zVAD-fmk erhöht diese.	51
Abb. 10: Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk erhöht die Vitalität der Tumorzellen im Bereich von 0,1nM bis 400nM. n.	54
Abb. 11: AEZS 126 induziert Veränderungen im Zellzyklus in HCC1937 Zellen.	56
Abb. 12: AEZS 126 induziert Veränderungen im Zellzyklus in HCC1806 Zellen.	57
Abb. 13: AEZS 126 induziert Veränderungen im Zellzyklus in MDA-MB468 Zellen..	58
Abb. 14: AEZS 126 induziert Nekrose in der Zelllinie HCC1937.	59
Abb. 15: AEZS 126 induziert Nekrose in der Zelllinie HCC1806.	60
Abb. 16: AEZS 126 induziert Nekrose in der Zelllinie MDA-MB468.	60
Abb. 17: AEZS 126 zeigt Tendenzen der Induktion von früher Apoptose und Nekrose in der Zelllinie MCF7.	61
Abb. 18: Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine.	63
Abb. 19: Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine.	64
Abb. 20: Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine.	65
Abb. 21: Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine..	66
Abb. 22 Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine.	67

Abb. 23 Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine..	68
Abb. 24: Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine.	69
Abb. 25: Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine.	70
Abb. 26 Regulierung des Ripoptosom Komplexes durch IAP und cFLIP [50]	78
Abb. 27: Apoptose/Nekrose	81
Abb. 28: Schematische Darstellung der Caspasen-Aktivierung und Caspase-ausgelöste Substrat Proteolyse im Cytochrom c/Apaf-1 Signalweg [114].	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
Apaf	Apoptotic protease activating factor
APS	Ammoniumperoxosulfat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl	B cell lymphoma
BH	Bcl2 Homologe
BRCA1	Breast Cancer 1
°C	Celsius
Ca ²⁺	Calcium Ion
Caspase	Cystein-dependent aspartate-specific protease
CD95	Cluster of Differentiation 95
cIAP1	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2
CREB	cAMP response element-binding
DISC	death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR 1-3	death receptor 1-3
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR2	epidermal growth factor receptor 2
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrogen Rezeptor
eR	endoplasmatisches Retikulum
ErbB-2	human epidermal growth factor receptor 2
Erk1	Mitogen activated Proteinkinase 3
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain protein
FasL	Fas Ligand
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL2	Fluoreszenz 2
FSC	forward scatter
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HRP	horse radish peroxidase
IAP1	Inhibitor of Apoptosis 1
ICE	Interleukin-1 β -Conversionsenzym
IKK-Komplex	I κ B kinase-Komplex
LT-a	Lymphotoxin-a

MAPK	MAP kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NEC-1	Necrostatin-1 (Methylthiohydantoin-DL-tryptophan)
NEMO	NF-Kappa-B Essential Modulator
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
p53	protein 53
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PARP	Poly (ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PDK-1	3-phosphoinositide-dependent kinase-1
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
PR	Progesteron Rezeptor
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PIP2	Phosphoinositolphosphat2
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PKB	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase with tensin homology
Raf	Benannt nach seinem Oncogen
Ras	protein superfamily of small GTPases
RT	Raumtemperatur

RIP-1	Receptor-interacting protein 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser473	Serin473
SHIP	SH2 containing inositol phosphatase
SSC	side scatter
TEMED	Tetramethylethyldiamid
Thr308	Threonin308
TKR	Tyrosinkinase
TNBC	triple-negative breast cancer
TNF-R1	tumor necrosis factor receptor 1
TNF- α	tumor necrosis factor α
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF 2	TNF receptor associated factors
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Tyr474	Tyrosin
UV	ultraviolet
zVAD-fmk	Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH ₂ Fn (Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O- methyl]-fluormethylketon)

1. Einleitung

1.1. Brustkrebs

Das Mammakarzinom nimmt in Deutschland mit 28% den größten Anteil der Krebsneuerkrankungen bei Frauen ein. Durchschnittlich zehn bis zwölf von hundert Frauen erkranken während ihres Lebens an einem bösartigen Tumor der Brustdrüse. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren und hebt sich, mit einer Diskrepanz von 7 Jahren, deutlich vom mittleren Erkrankungsalter für Tumoren ab, welches bei 69 Jahren liegt. 40% der Brustkrebserkrankungen treten vor dem sechzigsten Lebensjahr auf [1].

1.1.1. Inzidenz

Zwischen 1980 und 2004 stieg die altersstandardisierte Inzidenz von Erkrankungen der Brustdrüse um ca. 50% an. Im gleichen Zeitraum erhöhte sich die absolute Zahl an Erkrankungsfällen pro Jahr um 67% auf 57000 Neuerkrankungen. Im Jahr 2006 waren es bereits 72000. Dieser Anstieg während der letzten Jahre gründet auf einem intensiven Früherkennungsprogramm, dem Mammographie-Screening-Programm, welches bei Patientinnen zwischen 50 und 69 Jahren alle zwei Jahre in Praxen und Kliniken durchgeführt wird [2].

1.1.2. Mortalität

Brustkrebs ist bei Frauen die häufigste Todesursache [3]. Er ist für etwa 27% aller registrierten Krebstodesfälle verantwortlich [1]. Zwischen 1980 und 2004 sank die altersstandardisierte Mortalität bei Brustkrebs um 5%. Die Mortalitätsrate ist seit 1990 mit 18000 Todesfällen pro Jahr jedoch nahezu konstant geblieben. Während der letzten 20 Jahre stieg die Überlebensrate von Patientinnen mit Mammakarzinom deutlich an. So lag die 5-Jahres-Überlebensrate 1980 noch bei 69%, wohingegen zu Beginn dieses Jahrzehnts 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 81% erzielt wurden [2].

1.1.3. Prävalenz

In Deutschland lebten 2004 etwa 386.500 Patientinnen, bei denen in den vergangenen 10 Jahren die Diagnose Brustkrebs gestellt worden war. Das entspricht 0,9% der weiblichen Bevölkerung. Ab dem 50. Lebensjahr sind etwa 2% aller Frauen betroffen [2]. Seit 1990 nahmen die 5- und 10-Jahres-Prävalenzen um etwa 40% zu. Besonders ausgeprägt ist der Anstieg bei Frauen zwischen 50 und 69 Jahren [2]. Dieser Anstieg der Prävalenz ist mit der Zunahme der Erkrankungshäufigkeit sowie verbesserter Überlebensraten zu erklären. Ab 2010 kann mit einem weiteren drastischen Anstieg der Prävalenz gerechnet werden [2].

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C50 [1]

	2007		2008		Prognose für 2012	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	520	66.490	520	71.660	600	74.500
Standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	0,9	114,4	1,0	123,1	1,0	124,7
Mittleres Erkrankungsalter ³	69	66	68	65		
Sterbefälle	249	16.780	136	17.209		
Standardisierte Sterberate ^{1,2}	0,5	24,3	0,2	24,6		
5-Jahres-Prävalenz	1.800	260.000	1.900	273.000	2.100	300.900
Absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2007-2008) ⁴			63 (52-64)	78 (75-79)		
Relative. 5-Jahres-Überlebensrate (2007-2008) ⁴			76 (61-77)	86 (83-87)		

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Medien ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

1.1.4. Risikofaktoren

Es sind bisher eine Reihe von beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Risikofaktoren für Brustkrebs benannt worden. Die wichtigsten Vertreter sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Tabelle 2: Risikofaktoren für Brustkrebs [4-6]

nicht beeinflussbar	<ul style="list-style-type: none">• hohes Alter bei der Geburt des ersten Kindes• später Eintritt in die Menopause• Kinderlosigkeit• frühe Regelblutung• Keimbahnmutation in einem der prädisponierenden Gene BRCA1 oder BRCA2• Mutationen in besonders anfälligen Allelen: „rare high-penetrance alleles“, den „rare moderate-penetrance alleles“ und den „common low-penetrance alleles“ [7]
Beeinflussbar	<ul style="list-style-type: none">• Einnahme oraler östrogen- und progesteronhaltiger Kontrazeptiva [2, 8]• BMI• Alkoholkonsum
speziell für TNBC	<ul style="list-style-type: none">• junges Alter• afroamerikanische Rasse• BRCA1 Mutationen• früheres Auftreten des TNBC in der Familie [3]

Ausgetragene Schwangerschaften in jungen Jahren, mehrere Geburten und längere Stillzeit scheinen umgekehrt das Brustkrebsrisiko zu verringern [2].

1.2. Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC)

1.2.1. Allgemeines

Zur Gruppe der bösartigen Neubildungen der weiblichen Brustdrüse gehören verschiedenartige Tumoren, die sich in Verhalten, Aggressivität und Therapierbarkeit deutlich unterscheiden [9].

In aktuellen Studien wurde mittels Genexpressionsprofilen gezeigt, dass Brustkrebs, abhängig von seiner Hormon Rezeptor Expression (negativ oder positiv) und/oder zellulärer Herkunft (basal oder luminal), in mindestens 2 Subtypen aufgegliedert werden kann, nämlich Östrogen Rezeptor (ER) positiv und Östrogen Rezeptor negativ. Je nach Zusammensetzung ergeben sich für den spezifischen Tumor klinische Folgen [9].

ER-negative Tumoren werden in einen „basal-like“ und einen ErbB-2 Subtyp untergliedert. Beide haben eine schlechte Prognose. Im Gegensatz dazu werden ER-positive Tumoren in Typ „luminal A“ und „luminal B“ unterteilt, wobei diese beiden Subtypen deutliche Unterschiede in der Malignität aufweisen. Es bestehen bessere Heilungschancen für Patienten mit Tumoren des Subtyps „luminal A“, wogegen Patienten mit Tumoren des Subtyps „luminal B“ eine schlechte Prognose haben, ähnlich der für ER negativen Tumoren [10].

Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC), welches in der vorgelegten Arbeit im Mittelpunkt steht, stammt von „basal-like“ Zellen ab und trägt weder den Östrogenrezeptor, den Progesteronrezeptor, noch den HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) auf der Zelloberfläche [11].

In einer Studie von Carey *et al.* [12], in der 657 Fälle von Brustkrebs untersucht wurden, war das TNBC mit einem Anteil von 26 % vertreten. In anderen Studien bewegte sich der Anteil an triple-negativen Tumoren in untersuchten Patientinnen zwischen 12 und 24 % [13]. Das untersuchte Tumorgewebe zeigte vornehmlich einen hohen histologischen Differenzierungsgrad [4, 9], hohe Mitoseraten und wurde vor allem bei prämenopausalen Patientinnen gefunden. Charakteristisch für diese Tumorart

sind ihr aggressives klinisches Verhalten, ihre hohe Metastasierungsrate und eine geringe 5-Jahres- Überlebensrate der Patienten. Die Aggressivität dieses Tumors wird weiter durch die Tatsache bestätigt, dass die Wahrscheinlichkeit, nach abgeschlossener Therapie erneut zu erkranken, in den ersten drei Jahren am höchsten ist [14]. Das symptomfreie Intervall nach der adjuvanten Chemotherapie ist kurz [15]. Die meisten Patienten sterben innerhalb von fünf Jahren [14].

1.2.2. Therapie des TNBC

Die Expression der Hormonrezeptoren (ER = Östrogen Rezeptor und PR = Progesteron Rezeptor) sowie des HER-2 sind wichtige Parameter für die therapeutischen Prognose bei der Tumorbekämpfung [13]. Bei ER positiven Tumoren haben sich die Hormonrezeptoren als Ansatzpunkte für wirkungsvolle Antitumorbehandlung mit den Antiöstrogenen Tamoxifen und Raloxifen bewährt [16]. Die Überexpression von HER2 auf der Oberfläche von Tumorzellen geht zwar mit einer schlechten Prognose und Neigung zu Metastasierung einher, jedoch sprechen Tumoren mit HER2 Überexpression gut auf den monoklonalen Antikörper Trastuzumab an, der an den HER2 Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet und das Zellwachstum hemmt [10]. Demzufolge entzieht sich HER2 negatives Tumorgewebe der speziell gegen dieses Protein gerichteten Therapie [9, 14, 17].

TNBC spricht am besten auf hochdosierte zytotoxische Chemotherapie an [9], wobei deren Wirksamkeit ihre Grenzen hat [18, 19]. Kleinere Untergruppen des TNBC sind Chemotherapie-resistent, metastasieren stark und haben eine noch schlechtere Prognose als der klassische TNBC [20]. Deswegen lag während der letzten Jahre der Fokus intensiver Forschung auf dieser Tumorart. Molekulare Analysen zeigten ein hohes Expressionslevel verschiedener Gene, die mit zellulären Wachstums- und Überlebenssignalwegen verknüpft sind, sowie erhöhte Aktivierung von AKT, was eine Reihe von Studien ins Leben rief, die an diesen Rezeptoren und Signalwegen ansetzen [21].

1.3. Apoptose, Nekrose und Nekroptose

Der Begriff Apoptose, der zum ersten Mal im Jahr 1972 von Kerr *et al.* benannt wurde, beschrieb ein neues Modell für das Sterben einer Zelle [22, 23]. Bei dieser Art des Zelltodes gehen nur einzelne, individuelle Zellen in einem sonst gesunden Organ zu Grunde [24]. Während des Vorgangs der Apoptose durchleben Zellen typische Veränderungen, beginnend mit der Translokalisierung von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche, Schrumpfung und Fragmentierung des Zellkerns, Zerfall der Plasmamembran und der Bildung von apoptotischen Körperchen („Apoptotic bodies“) [25]. Die DNA der betroffenen Zellen wird abgebaut, die abgestorbenen Zellen bzw. deren Bruchstücke werden rasch von benachbarten Makrophagen aufgenommen, sodass es nicht zu Entzündungsreaktionen oder Antikörperbildung kommt [24].

Diese charakteristischen Merkmale der Apoptose stehen in Kontrast zur Nekrose, dem Zelltod, der durch unspezifische Verletzungen wie stumpfes Trauma, Intoxikation oder den Verlust der Nährstoffzufuhr herbeigeführt wird. Die Zellen schwellen meist an und rupturieren, was eine Ausschüttung von Zytoplasmabestandteilen und in der Folge eine Entzündung nach sich zieht [26].

Im Jahr 1988 wurde die Hypothese - bei der Nekrose handele es sich um unkontrollierten Zelltod - erstmals in Frage gestellt [27]. Seit dem weisen immer mehr Tatsachen darauf hin, dass die „programmierte Nekrose“ tatsächlich existiert. 2005 wurde schließlich der Neologismus Nekroptose eingeführt, um diese Art von reguliertem nekrotischem Zelltod zu beschreiben [28].

1.3.1. Apoptose

Apoptose wird durch verschiedenste Stimuli eingeleitet. Zellulärer Stress und Rezeptor gesteuerte Signale lösen eine evolutionär hoch konservierte intrazelluläre Todesmaschinerie aus [29, 30].

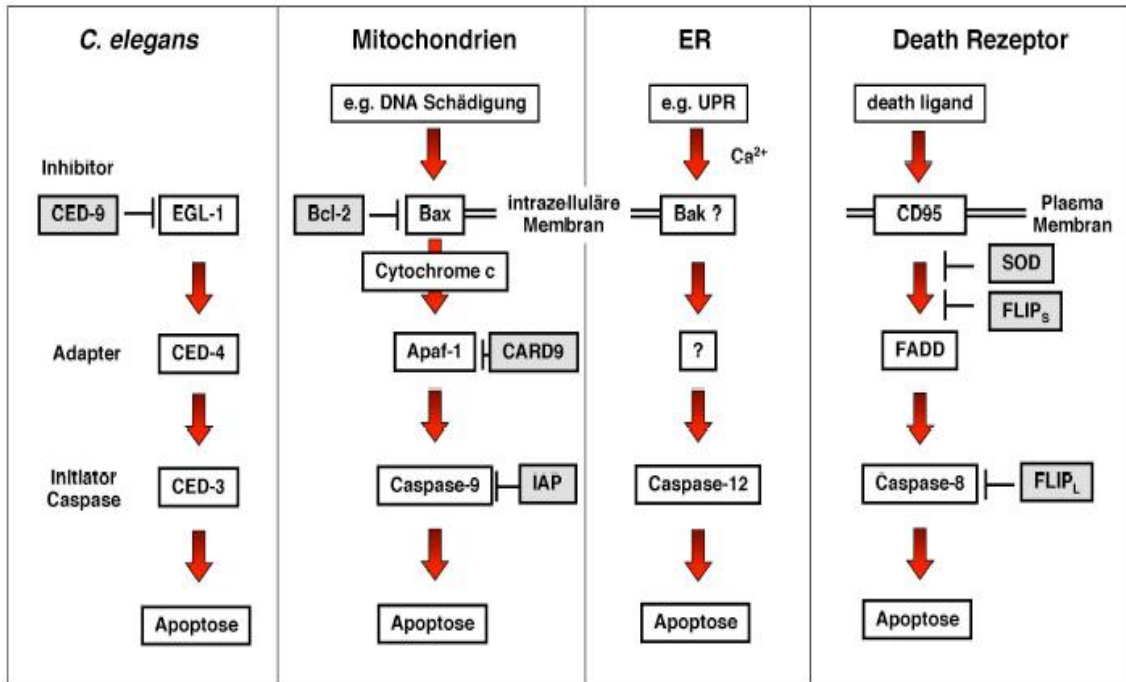


Abb. 1: Übersicht über die Signalkaskade bei der Apoptose in Anlehnung an C.elegans [31]

Das grundlegende Konzept der Aktivierung und Hemmung der Apoptose-Signalkaskade kann evolutionsgeschichtlich bis zu dem Nematoden *Cenorhabditis elegans* (*C. elegans*) zurückverfolgt werden. Dabei entsprechen sich die jeweils in der „Todessignalkaskade“ vorkommenden Proteine. Der humane Apoptosehemmer Bcl-2 ist ein Homolog des *C. elegans* death Gen-9, das apoptosefördernde Bax ist ein Homolog von egl-1. APAF-1 enthält eine Domäne mit Ähnlichkeit zu ced-4 und Caspase-3 ist ein Homolog von ced-3. Bak ist besonders ausgeprägt auch im Endoplasmatischen Retikulum (eR) lokalisiert und induziert dort die Apoptose nach eR-Stress [31]. Die beiden am besten verstandenen Wege der Apoptose sind der Todesrezeptorsignalweg, der unter Beteiligung von Caspase-8 abläuft [32] und der mitochondriale Signalweg, in dem verschiedenste Signale die Freisetzung schädigender Proteine aus den Mitochondrien ins Zytoplasma bewirken, was letzten Endes zur Aktivierung von Caspase-9 und nachgeschalteter Spaltung von Caspase-3, -7 oder -6 führt [33-35].

1.3.1.1. Extrinsischer Weg (Todesrezeptorweg)

Der Todesrezeptor Signalweg wird durch Mitglieder der Todesrezeptoren Superfamilie ausgelöst [36]. Zur Gruppe der Todesrezeptoren gehören Fas (CD95/APO-1), tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) sowie DR-3, DR-4 und DR-5 [37]. Sie werden durch zelloberflächengebundene und - lösliche Liganden wie FasL (CD95L), tumor

necrosis factor- α (TNF- α), lymphotoxin-a (LT- α) und TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) aktiviert [37, 38].

Die Bindung des CD95 Liganden an CD95 induziert die Zusammenlagerung und Formation eines „death-inducing signaling complexes“ (DISC). Dieser Komplex rekrutiert über das Adapter Molekül FADD (Fas-associated death domain protein) multiple Procaspase-8 Moleküle, die wiederum die Autoaktivierung von Caspase-8 bewirken [36] und leitet somit einen Caspase gesteuerten Apoptoseweg ein.

1.3.1.2. Intrinsischer Weg (Mitochondrialer Weg)

Der mitochondriale Apoptoseweg kann unter Anderem durch Chemotherapeutika, Sauerstoffradikale, Kinase- und Phosphataseinhibitoren, Atemgifte, Ca²⁺ Ionophore, UV- und γ -Strahlen, Granzym B, Stressfaktoren, Hitze und Veränderungen der Osmolarität [39-41] in Gang gesetzt werden. Der intrinsische Signalweg wird von der Bcl-2 Protein Familie dominiert, die die Ausschüttung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium überwacht [42, 43]. Die Bcl-2 Familie umfasst anti-apoptotische und pro-apoptotische Mitglieder, die nach struktureller Ähnlichkeit zu den Bcl-2 homologen Domänen (BH1, BH2, BH3 und BH4) [44] und einer transmembranären Domäne klassifiziert werden. Die BH3 Domäne, bei allen Mitgliedern exprimiert und essentiell für die Heterodimerisierung, ist für die proapoptotische Funktion unerlässlich [45, 46]. Die Bcl-2 Familie wird in 3 Klassen unterteilt: in überlebensfördernde Proteine, wie Bcl-XL, deren Mitglieder dem Bcl-2 sehr ähnlich sind, in proapoptotische Proteine, wie Bax und Bak, die Antagonisten zu Bcl-2 und Bcl-XL sind, sowie in die proapoptotischen „BH3-only“ Proteine [47]. Obwohl Bcl-2 zumeist an intrazellulären Membranen angeheftet ist, können sich einige Bcl-Proteine der Klasse 2 und 3, wie zum Beispiel Bax oder Bak zwischen Zytosol und Organellen hin und her bewegen [29]. Pro- und antiapoptotische Bcl-Familienmitglieder treffen auf der Oberfläche des Mitochondriums aufeinander, wo sie um die Regulierung von Cytochrom c konkurrieren. Gewinnen die proapoptotischen Proteine, werden eine Reihe von Molekülen, vor allem Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt, Cytochrom c lagert sich anschließend mit Apaf-1 und Procaspase-9 zum Apoptosom zusammen [48].

Caspase-9 und Caspase-2 reagieren auf Veränderungen des mitochondrialen Potentials, wohingegen Caspase-8 und Caspase-10 auf Aktivität der Todesrezeptoren sensibilisiert

sind. Diese Initiatorcaspasen spalten die Proenzymformen der Effektorcaspasen Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7, die schlussendlich die Apoptose einleiten [49].

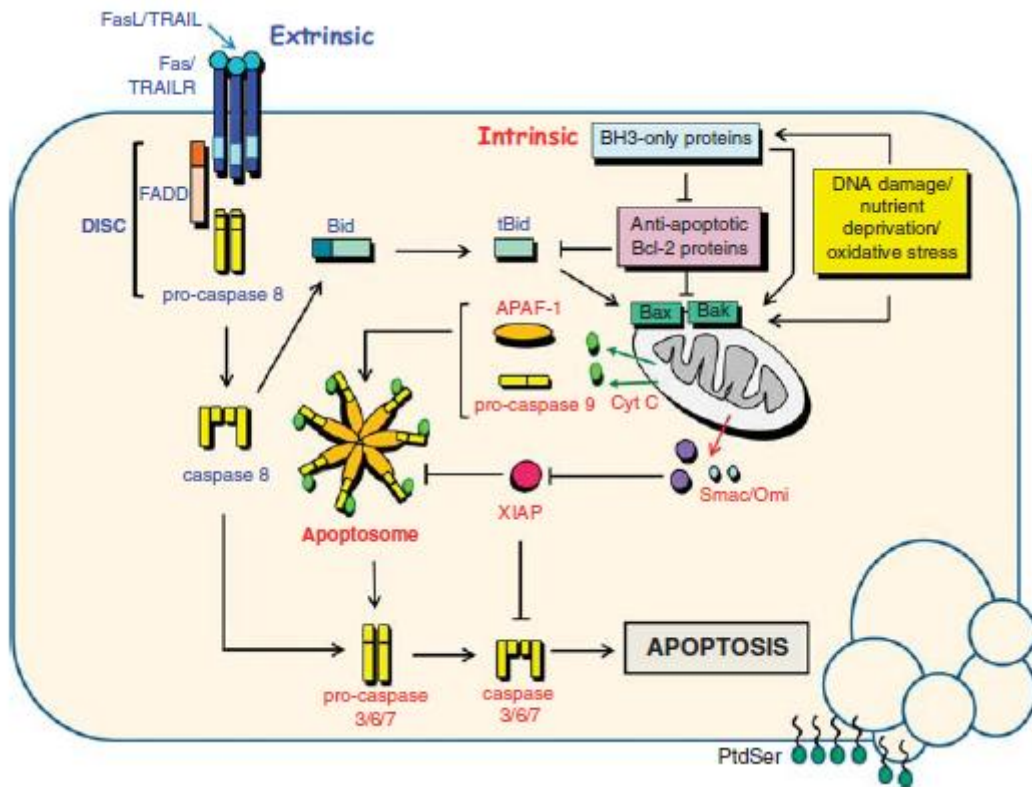


Abb. 2: Schematische Darstellung der beiden Apoptosewege [50]

1.3.2. Apoptose und AKT

AKT wirkt über verschiedene direkte und indirekte Mechanismen der Apoptose entgegen. Aktives AKT phosphoryliert und inhibiert das proapoptotische Bad, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, indem es an das antiapoptotische Bcl-XL bindet und dessen Wirkung verstärkt [51]. Eine durch AKT verursachte Stabilisierung von Mcl-1, ebenfalls Mitglied der Bcl-2 Familie, erfolgt sowohl durch direkte Phosphorylierung und Inhibierung von GSK-3, als auch auf transkriptioneller Ebene durch Phosphorylierung und Aktivierung von CREB [52]. AKT phosphoryliert „Forkhead transcription factors“ und verhindert, dass diese in den Zellkern gelangen und dort ihre

Zielgene aktivieren. Dazu gehören unter anderem die pro-apoptotischen Proteine Bim, Noxa und Fas-Ligand [53].

1.3.3. Nekroptose

Der Mechanismus der Nekroptose, der regulierten Nekrose, ist noch nicht vollständig verstanden und ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Nekroptose wird durch $\text{TNF}\alpha$, FasL und TRAIL stimuliert, denselben Rezeptorliganden, die auch die klassische Apoptose einleiten [54]. Wird der Apoptoseweg zum Beispiel durch zVAD-fmk blockiert, weicht die Zelle auf den nekroptotischen Weg aus. Diese alternative Form des Zelltodes wird durch Kinasen der RIP (receptor interacting family) Familie, nämlich RIP-1 und RIP-3 eingeleitet und ausgeführt [55]. Sie sind eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die mit den Todesrezeptoren assoziiert sind [56-58].

Die Notwendigkeit von RIP-1 für die Nekroptose wird deutlich, wenn man die Zellen mit Necrostatin-1, einem allosterischen RIP-1-kinase Inhibitor inkubiert. Es inhibiert spezifisch die Todesrezeptor vermittelte Nekroptose [57].

Der bisher erforschte Zusammenhang zwischen Rezeptor, Signalwegen und RIP-1 wird in **Abb. 3** veranschaulicht.

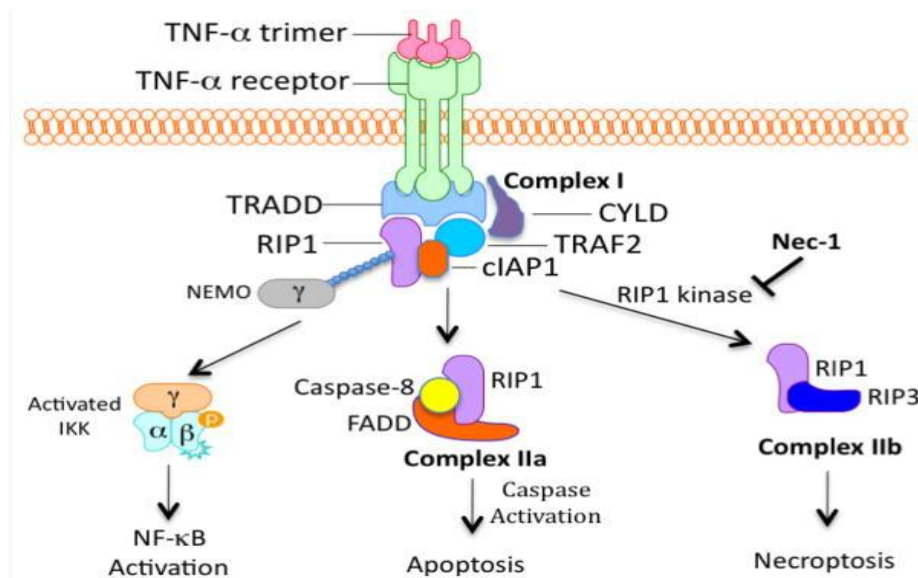


Abb. 3: $\text{TNF}\alpha$ Rezeptor und die möglichen intrazellulären Signalwege nach Rezeptoraktivierung [54]

Die Grafik zeigt die drei Signalkomplexe, die durch TNF- α ausgelöst werden, um entweder die Aktivierung von NF- κ B, die Aktivierung der Apoptose oder der Nekroptose herbeizuführen. Die Stimulation von TNFR1 durch TNF α führt zur Bildung eines intrazellulären Komplexes an der zytoplasmatischen Membran (Komplex 1), der TRADD, TRAF2, RIP-1 und IAP1 beinhaltet. Die dauerhafte Anwesenheit von RIP-1 an K377 durch cIAP1 führt zur Rekrutierung von NEMO, einer regulatorischen Untereinheit des IKK-Komplexes, der wiederum den NF- κ B Signalweg in Gang setzt. RIP-1 ist ebenso in die Bildung des Komplexes IIa verwickelt, der FADD und Caspase-8 enthält. Er aktiviert eine Kaskade von Caspasen, die die Apoptose einleiten. Ist keine Apoptose möglich oder ist die Zelle mit einem Virus infiziert, bildet RIP-1 zusammen mit RIP-3 den Komplex IIb, der Nekroptose herbeiführt. Der Komplex IIb ist auf die Kinaseaktivität von RIP-1 angewiesen und kann deswegen durch Necrostatin-1 inhibiert werden [54].

1.4. Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT-Signalweg

1.4.1. Allgemeines

Lange Zeit lag der Fokus der Antitumorforschung auf der kleinen GTPase RAS, dem ersten als solches identifizierten Onkogen. Die zentrale Bedeutung dieses Signalweges für neoplastische Zellproliferation im Menschen konnte durch klinische Erfolge bei der Behandlung mit signalwegspezifischen Therapeutika bestätigt werden.

Während der letzten Jahre ist ein weiterer Signalweg, der PI3K/AKT Signalweg in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Er regelt grundlegende Zellfunktionen wie Transkription, Translation, Proliferation sowie Wachstum und sorgt für eine Balance zwischen Überleben und Tod der Zelle [59]. In Tumoren ist der PI3K/AKT Signalweg in Folge von genetischen und epigenetischen Veränderungen in Signalproteinen, die PI3K vorgeschaltet sind oder durch Mutationen in Genen, die für Proteine des Signalweges kodieren, oft dauerhaft aktiviert [60]. Die wesentlichen Proteine des PI3K/AKT Signalweges werden im Folgenden kurz dargestellt.

1.4.2. PI3K

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen nehmen die zentrale Rolle im PI3K/AKT Signalweg ein. Sie werden nach Struktur, Bindungspartner, Aktivierung und Substratspezifität in drei Klassen unterteilt: Klasse 1 PI3Ks, Klasse 2 PI3Ks und Klasse 3 PI3Ks [61]. Sie sind eine Familie von Lipidkinasen, die Phosphoinositide an der 3-Hydroxylgruppe phosphorylieren [62].

Die Gruppe der Klasse 1 PI3Ks wird, je nach Rezeptor Expression, in zwei Familien eingeteilt. Klasse 1A PI3Ks werden durch Rezeptor Tyrosinkinase aktiviert, Klasse 1B PI3Ks durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren [63]. Die Klasse 1A PI3Kinase ist ein Heterodimer, welches sich aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110 γ) Einheit zusammensetzt [64]. Die regulatorische p85 Untereinheit koordiniert Rezeptorbindung, Aktivierung und Lokalisation des Enzyms [65].

Vor der Bindung eines Liganden an den Rezeptor liegt der p85-p110-Komplex inaktiv im Zytoplasma vor. Durch Bindung eines Wachstumsfaktors oder Liganden an die zugehörige Rezeptor Tyrosinkinase wird diese aktiviert, und der zytoplasmatische Anteil wird phosphoryliert. Die inhibitorische Wirkung von p85 auf p110 wird aufgehoben [66] und PI3K durch direkte Interaktion seiner p85 Untereinheit mit Tyrosinphosphat enthaltenden Adapterproteinen, die mit dem Rezeptor assoziiert sind (z.B. Insulin receptor substrate 1), an die Plasmamembran rekrutiert [65].

1.4.3. PIP3

Durch Phosphorylierung des 3-Hydroxyl-Endes von PIP₂, einem in der Plasmamembran liegenden Inositol Phospholipids, generiert die p110-Domäne der aktivierten Klasse 1A PI3Kinase Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), welches multiple nachgeschaltete Signalwege aktiviert [65, 67]. PIP₃ agiert als „Second Messenger“, indem es Adapter und Effektorproteine mit einer „pleckstrin homology“-Domäne, einer zentralen katalytischen Domäne mit Kinaseaktivität [59] wie die Serin-Threonin-Kinase AKT, an die Zellmembran bindet, phosphoryliert und dadurch aktiviert [68].

1.4.4. Die Phosphatase PTEN

Die intrazelluläre Menge an PIP3 wird streng durch die Aktivität der Phosphatase PTEN reguliert. PTEN ist ein wichtiger Tumorsuppressor und wirkt der PI3K-Aktivität durch seine intrinsische Phospholipid-Aktivität entgegen. Es verringert die intrazelluläre PIP3 Menge, indem es PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert. [64, 65, 69]. Ein Verlust von PTEN führt zu uneingeschränkter Aktivität des PI3K Signalwegs [70, 71]. Das für PTEN kodierende Gen ist eines der am häufigsten mutierten oder inaktivierten Gene in menschlichen Tumoren [72], was zu unkontrolliertem Wachstum führt. Der Verlust von PTEN zieht Resistenzen gegenüber Antitumormedikamenten wie dem anti-HER2-Wirkstoff Trastuzumab nach sich [73].

1.4.5. AKT

Von der Serin-Threonin-Kinase AKT sind drei Isoformen bekannt: AKT1, AKT2 und AKT3 [69], für die jeweils die Gene PKB α , PKB β und PKB γ kodieren [59, 74]. Sie sind an unterschiedlichen Orten in der Zelle lokalisiert und regulieren zelluläre Prozesse wie Überleben der Zelle, Proliferation und Zellwachstum [75]. Die drei Isoformen sind ähnlich aufgebaut. Jede besitzt eine amino-terminale „pleckstrin homology“ Domäne, eine zentrale katalytische Serin-Threonin-Domäne und eine kleine carboxy-terminale regulatorische Einheit [76].

AKT und die Serin-Threonin-Kinase PDK1 werden durch PIP3 an die Zellmembran gebunden. AKT ändert seine Konformation und Thr308 sowie Ser473 werden exponiert [71]. Thr308 wird durch PDK1 phosphoryliert und es kommt dadurch zu einer Aktivierung und Stabilisierung von AKT [59]. Die zweite Phosphorylierung an Ser473 durch PDK2 führt letztendlich zur vollständigen Aktivierung von AKT [77].

Die durch die Kinasen AKT1, AKT2 oder AKT3 ausgelösten Signale sind unterschiedlich stark [69, 78, 79]. Dennoch löst jede Aktivierung eine Signalkaskade aus, die in der Vermittlung zellulärer Aktivität, wie Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis, Überleben, interzellulärer Kommunikation und Glukosehomöostase endet [63].

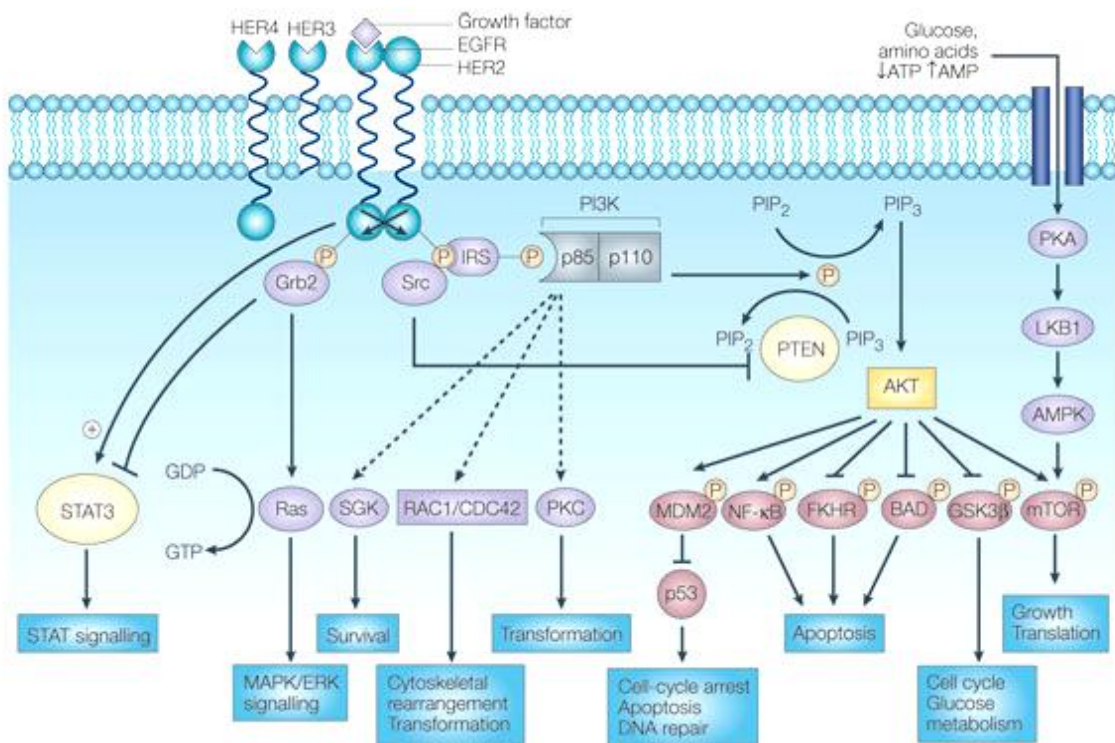


Abb. 4: Schematische Darstellung des PI3K/AKT Signalweges nach Hennessy *et al.* [64]

1.4.6. Störungen des PI3K/AKT Signalwegs

Überaktivierung von AKT führt zu malignem Tumorwachstum. Dies geschieht entweder durch übermäßige Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs, Mutationen in den für PI3K oder AKT kodierenden Genen oder Mutation bzw. Verlust von PTEN [78].

Eine Reihe von Fehlregulationen des PI3K/AKT Signalweges, die beim Mammakarzinom auftreten, ist in **Tabelle 3** aufgeführt

Tabelle 3: Fehlregulationen des PI3K/AKT Signalweges im Mammakarzinom [71, 78, 80]

PI3K	Somatische Mutation des PIK3CA Gens (kodiert für die p110 α Untereinheit von PI3K)
AKT	<ul style="list-style-type: none"> • Somatische Mutation der PH Domäne von AKT1 • AKT1, AKT2 oder AKT3 Überexpression • Erhöhte AKT1, AKT2 oder AKT3 Kinaseaktivität • Erhöhte AKT Phosphorylierung
PTEN	<ul style="list-style-type: none"> • Mutationen von PTEN • Verlust der Heterozygotität von PTEN • Verminderte PTEN Expression durch Transkriptionsrepression des PTEN Gens
eIF4E	<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression von eIF4E durch <i>eIF4E</i> Genamplifikation oder Hochregulation auf Transkriptionsebene
4E-BP1	<ul style="list-style-type: none"> • Verstärkte Expression und Phosphorylierung von 4E-BP1
TKRs	<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression von Genen, die für TKRs und Wachstumsfaktoren kodieren

Im Gegensatz zu p53 und anderen Signalwegen, die die Entstehung von Tumoren unterdrücken, wird der PI3K/AKT Signalweg in malignen Veränderungen verstärkt aktiviert. Da es einfacher ist, aktivierte Wege zu blockieren, als verlorene Tumorsuppressoren zu ersetzen, macht ihn diese Tatsache zu einem optimalen Angriffspunkt für die Antitumorthherapie [64]. Es wurde eine Reihe von Medikamenten entwickelt, die in den PI3K-AKT Signalweg eingreifen. Sie entfalteten nicht nur Wirkung gegen das Tumorstadium an sich, sondern ebenfalls gegen die Proliferation der Gefäße, die das Tumorgewebe versorgen [81]. Allerdings zeigten als vielversprechende Inhibitoren proklamierte Präparate wie LY294002 und Whortmannin schlechte Metabolisierung *in vivo*, weswegen sie in der Antitumorthherapie nicht mehr zum Einsatz kommen.

Von Aeterna Zentaris (Frankfurt, Deutschland) wurde eine neue Generation niedermolekularer Pyridopyrazin-Präparate entwickelt, die bereits als hochpotente und selektive Inhibitoren des Klasse1 PI3K Signalweges eingestuft wurden [82]. Im Zuge

dieser Arbeit wurden die Wirkung und der Wirkmechanismus des Präparates AEZS 126 auf verschiedene Subentitäten des Mammakarzinoms untersucht. Gegenstand der Untersuchungen waren vier verschiedene Brustkrebs Zelllinien, die TNBC Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MDA-MB468 (negativ für Östrogenrezeptor, positiv für Progesteronrezeptor und Mutation im PTEN [83]) und die Tumorzelllinie MCF7 (exprimiert Östrogen- und Progesteronrezeptor).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Zelllinien

HCC1937 (RPMI-Medium)

Die Zelllinie HCC1937 wurde 1995 aus einem Primärtumor des Ausführungsganges der Brustdrüse einer 23-jährigen Kaukasierin gewonnen. Die Linie weist eine Mutation im BRCA1- Gen am Nucleotid 5382, sowie eine Mutation des TP53 auf. Her2/neu - und p53, sowie der Östrogen- und der Progesteronrezeptor sind nicht exprimiert [84].

HCC1806 (RPMI-Medium)

Die Zelllinie HCC1806 wurde 1995 aus einem epithelialen, akantholytischen, squamösen Tumor der weiblichen Brustdrüse einer 60-jährigen Afroamerikanerin isoliert. Her2/neu - und p53 -, sowie Östrogen- und Progesteron Rezeptor sind nicht exprimiert [85].

MCF7 (RPMI-Medium)

Die Zelllinie MCF7 wurde aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Kaukasierin isoliert, die an einem Adenokarzinom der Brustdrüse litt. Sowohl Östrogen- als auch Progesteron Rezeptor sind exprimiert. TNF- α inhibiert das Zellwachstum [86].

MDA-MB 468 (DMEM-Medium)

Die Zelllinie MDA-MB468 wurde 1977 aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen Afroamerikanerin mit einem epithelialen Adenokarzinom der Brustdrüse isoliert. Vorhandene Rezeptoren: EGF (epidermal growth factor) und TGF-alpha (transforming growth factor alpha). Eine Mutation im p53-Gen, [87, 88] sowie im PTEN [83] liegen vor.

2.1.2. Chemikalien und Enzyme

AEZS 126

Tyrosinkinase-assoziierte Oberflächenrezeptoren und G-Protein-assoziierte Rezeptoren vermitteln die Aktivierung der Klasse1 Phosphatidylinositol-3-Kinase. Oft sind fehlregulierte Rezeptoren der Grund für übermäßige Aktivität von PI3K in einer Vielzahl von Tumorarten. Weiterhin wurden in Tumoren häufig Veränderungen in der katalytischen Untereinheit von PI3K α , von PTEN, sowie von ras Genen beobachtet, die zu einer Überaktivierung des PI3K/AKT Signalwegs führen. Aus diesem Grund wurde der Fokus der Antitumorforschung auf Therapeutika gerichtet, die in diesen Signalweg eingreifen.

AEZS 126 ist ein Molekül, das zu einer neuen Generation niedermolekularer Pyridopyrazin-Präparate gehört, die von AEterna Zentaris (Frankfurt, Deutschland) als hochpotente und selektive Inhibitoren des Klasse1 PI3K Signalwegs synthetisiert wurden [82, 89]. AEterna Zentaris ist es gelungen die Leitstruktur seiner Pyridopyrazin-Präparate in den Punkten: Kinaseselektivität, Wirksamkeit innerhalb der Zelle und Metabolisierung im Körper, weiter zu verbessern, so dass AEZS 126 spezifisch PI3K α inhibiert und nachweislich ein potenter Inhibitor der Phosphorylierung von AKT sowie nachgeschalteter Phosphorylierungen weiterer Substrate ist. AEZS 126 zeigte bisher ein sehr gutes pharmakologisches Profil bei der *in vitro* Forschung und bleibt weiterhin ein vielversprechender Kandidat für *in vivo* Untersuchungen [82]. Freundlicherweise wurde AEZS 126 von AEterna Zentaris zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

zVAD-fmk

zVAD-fmk (Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon) ist ein Caspaseinhibitor (Bachem AG, Bubendorf, Schweiz), der in Zellen einzudringen vermag und irreversibel an die katalytische Einheit der intrazellulären Caspasen bindet. Um seine antiapoptotische Wirkung zu entfalten, sollte er zeitgleich mit der Apoptoseinduktion verabreicht werden.

zVAD-fmk wurde in einer Konzentration von $[c] = 5\text{mM}$ in DMSO gelöst und in der Zellkultur mit einer Konzentration von $[c] = 30\mu\text{M}$ eingesetzt [90, 91].

Necrostatin-1

Necrostatin-1 (Methylthiohydantoin-DL-tryptophan) ist ein allosterischer Inhibitor (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) für die Todesrezeptor-assoziierte Adapterkinase RIP1. Es inhibiert die Nekroptose, den programmierten, nicht-apoptotischen Zelltod, der schlussendlich zu Nekrose führt. Necrostatin-1 greift nicht in die Fas/TNFR gesteuerte Apoptosekaskade ein [28, 57].

Necrostatin-1 wurde in einer Konzentration von [c] = 25mM in DMSO gelöst und in der Zellkultur mit einer Konzentration von [c] = 50µM eingesetzt.

2.1.3. Antikörper

Die Gesamtmenge von AKT (bzw. ERK) wurde mit dem Antikörper *AKT1 ,C-term monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)* bzw. *P44 MAPK (Erk1) C-term monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)*, der Anteil des phosphorylierten AKT (bzw.pERK) wurde mit dem Antikörper *Phospho-AKT1 (pS473) monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)* bzw. *Phospho ERK1/p44 monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)* detektiert. Beide Antikörper wurden für Western Blot Analysen in einer Verdünnung von 1:1000-10000 eingesetzt.

2.1.3.1. Primärantikörper

AKT1 ,C-term monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)

AKT1 (Molekulargewicht 59 kDa) ist eine Proteinkinase, die in der Lage ist, einige für die intrazellulären Abläufe wichtige Proteine zu phosphorylieren. AKT ist ein dem PI3K im PI3K/AKT Signalweg nachgeschalteter Mediator. Er beeinflusst hier Wachstumsfaktoren wie den PDGF, den EGF und den insulin and insuline-like growth factor I (IGFI). In dreifach phosphoryliertem Zustand, an Thr308, Ser473 und Tyr474, entfaltet AKT seine volle Funktionsfähigkeit [92, 93].

Verdünnung für Western Blot: 1:1.000-10.000

Phospho-AKT1 (pS473) monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)

Verdünnung für Western Blot: 1:1000-1:10.000

P44 MAPK (ERK1) C-term monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)

P44 MAP Kinase (ERK1; Molekulargewicht: 44kDa) ist ein Mitglied der Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen, an deren Signaltransduktion zwei nah verwandte MAP Kinasen, ERK1 und ERK2 beteiligt sind. Aktives ERK phosphoryliert Serin- und Threoninenden an nukleären Proteinen und beeinflusst so eine Reihe von intrazellulären Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Transkriptionsregulierung und Entwicklung der Zelle [94, 95].

Verdünnung für Western Blot: 1:1000

Phospho ERK1/p44 monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA)

Verdünnung für Western Blot: 1:1000-2000

Caspase-3 polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland)

Molekulargewicht der Spaltprodukte 17kDa und 19kDa

Der Caspase-3 Antikörper detektiert endogene Level des großen Fragments der aktivierten Caspase-3, welche durch Spaltung bei Asp175 entstehen. Der Antikörper erkennt zudem auch die Caspase-3 in ihrer vollen Länge (Pro-Caspase-3) aber keine anderen Caspasen [96, 97].

Verdünnung für Western Blot: 1:1000-4000

RIP-1 monoklonaler Antikörper aus Maus (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)

RIP-1 gehört zur Ser/Thr-Protein-Kinase Familie. Die pro-nekrotischen Kinasen in der receptor-interacting-protein (RIP) Familie sind Schlüsselmediatoren der programmierten Nekrose [98] und spielen eine wichtige Rolle in der TNF- α induzierten Aktivierung von NF- κ B. RIP-1 reguliert einen von NF- κ B unabhängigen Zelltod [99, 100]. Necrostatin-1 (Nec-1) und seine Derivate inhibieren die pro-nekrotische Kinase RIP1/RIPK1 und schützen die Zelle vor der Nekroptose [98]. Zuverlässig erkennt der verwendete Antikörper nur das große Fragment (74kDa) von RIP-1.

Verdünnung für Western Blot: 1:1000

PARP monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland)

PARP, eine 116kDa nukleäre poly ADP-Ribose Polymerase, die sich im Zellkern befindet, ist an der Reparatur der DNA nach Stressexposition beteiligt. Das Protein kann *in vitro* durch viele ICE-like Caspasen gespalten werden und ist einer der Hauptangriffspunkte von Caspase-3 *in vivo*. Humanes PARP wird zwischen Asp214 und Gly215 gespalten und somit seine amino-terminale DNA bindende Domäne (24kDa) von der carboxy-terminalen katalytischen (89kDa) Domäne getrennt. PARP ist essentiell für die Lebensfähigkeit einer Zelle. Eine Spaltung von PARP erleichtert den zellulären Abbau und dient als Marker für apoptotische Zellen [101, 102]. Der verwendete Antikörper erkennt die Fragmente mit einem Molekulargewicht von 116kDa und 89kDa.

Verdünnung für Western Blot: 1:1000

β -Actin monoklonaler Antikörper aus Maus (ABCAM, Cambridge, Grossbritannien)

β -Actin ist ein 43kDa schweres, hoch konserviertes Protein, das ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es ist ein relativ stabiles Zytoskelettprotein und seine Expression ist unabhängig von Experiment-bedingten Veränderungen in einer Zelle.

Aufgrund der normalerweise konstanten β -Actin Expression wird die Detektion des β -Aktins als Kontrollwert und zur Normalisierung verwendet [103].

Verdünnung für Western Blot: 1:1000

2.1.3.2. Sekundärantikörper

Zur Detektion der unter 2.1.3.1. aufgeführten spezifischen Antikörper wurden Meerrettich Peroxidase (HRP)-konjugierte Sekundärantikörper verwendet.

Chemolumineszente Detektionssysteme haben sich als die beste Methode erwiesen um Western Blots auszuwerten. Gefahren, die beispielsweise beim Gebrauch von radioaktivem Material sowie giftigen chemischen Substanzen entstehen können, treten hier nicht auf. Geschwindigkeit und Genauigkeit dieser Methode bleiben von traditionellen Alternativen unübertroffen. Die Ergebnisse werden auf Film fixiert, sie sind dadurch dauerhaft aufgezeichnet und können über längere Zeit hinweg gelagert werden. Blots, die mit oben genanntem Verfahren entwickelt wurden, können sehr einfach gestriped und mit neuen Antikörpern inkubiert werden (vgl. 3.2.14). Mit HRP gekoppelte Sekundärantikörper wurden mit speziellen chemolumineszenten Substraten (ImmobilonWestern Chemiluminescent HRP Substrate Kit, Millipore, Schwalbach, Deutschland) inkubiert, um ein Lichtsignal zu generieren. HRP Konjugate haben eine sehr hohe Umwandlungsrate, sodass unter kurzer Reaktionszeit eine gute Sensitivität erzielt wird [104].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HRP-konjugierter Antikörper gegen Maus IgG, und gegen Kaninchen IgG (Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Beide Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000-1:3000 eingesetzt.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden in der größtmöglichen Reinheit von den üblichen Herstellern bezogen.

2.1.4. Medien und Puffer

2.1.4.1. Zellkulturmedien

Alle sterilen Basismedien sowie die sterilen Medienzusätze wurden von der Firma PAA Laboratories GmbH (Pasching Österreich) bezogen.

RPMI-Medium, RPMI 1640-Standardmedium

Zusätze: 10% FCS

 280µg/ml L-Glutamin

 50 Einheiten/ml Penicillin

 50µg/ml Streptomycin

 2,5ml Natriumpyruvat

DMEM-Medium, Duplecco's modifiziertes Eagle-Medium

Standardlösung mit 4.500mg/l Glucose für die Kultivierung von Zellen mit einem hohen Energieverbrauch

Zusätze: 10% FCS

 280µg/ml L-Glutamin

 50 Einheiten Penicillin

 50µg/ml Streptomycin

 2,5ml Natriumpyruvat

2.1.4.2. Puffer und Lösungen:

Für alle Medien und Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Puffer wurden durch Autoklavieren (120°C, 20 min) oder durch Filtration mit einem 0,2µm Filter sterilisiert.

Trypsin-EDTA-Lösung

0,05% (w/v)	Trypsin
0,016% (w/v)	EDTA
0,9% (w/v)	NaCl

Trypanblaulösung

0,36% (w/v)	Trypanblau
0,9% (w/v)	NaCl

Einfriermedium (EFM)

70%	Medium (DMEM oder RPMI 1640)
20%	FCS
10%	DMSO

PBS (pH7,4)

8,0g	NaCl
0,2g	KCl
2,89g	Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O
0,2g	KH ₂ PO ₄
Aqua bidest. Ad 1000ml	

PBS-T (Phosphat-Tween-Puffer), (pH 7,5)

80mM	Na ₂ HPO ₄
20mM	NaH ₂ PO ₄
100mM	NaCl
3% (v/v)	Tween-20

Kristallviolett

5% (w/v)	Kristallviolett
20% (v/v)	Methanol

Kristallviolettlösung

0,1M	Na-Citrat
50% (v/v)	Methanol

FACS-Puffer

98% (v/v)	PBS
2% (w/v)	FCS

Lysepuffer (pH8):

50mM	Tris-HCl
120mM	NaCl
5mM	EDTA
0,5% (v/v)	NP-40 (Nonylphenylpolyethylenglycol)
20µg/ml	Aprotinin
10µg/ml	Leupeptin
100µg/ml	PMSF (Phenylmethylsulphonylfluorid)

Auf 100ml mit H₂O auffüllen. Pro 1ml Lysepuffer werden folgende Proteinaseinhibitoren zugegeben:

Proteinaseinhibitoren

	Stock	Endkonzentration	1ml Puffer
Aprotinin	10mg/ml in 0,01M HEPES pH8.0	20µg/ml	2µl
Leupeptin	5mg/ml in AD	10µg/ml	2µl
PMSF	100mM in Isopropanol	100µg/ml	5,7µl
NaF	1M in H ₂ O	50mM	50µl
NaVO ₃	20mM in H ₂ O	200µM	10µl

SDS-Polyacrylamid-Laufpuffer, 10x (pH8,3)

30g/l	Tris
144g/l	L-Glycin
10g/l	SDS

Transferpuffer 10× (pH8,8)

25mM	Tris
192mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol

Western Blot Gele

Trenngel:

	6%	8%	10%	12%
dd H ₂ O	2,7ml	2,3ml	2ml	1,7ml
30 % Acrylamid Mix	1ml	1,3ml	1,7ml	2ml
1,5M Tris-HCl pH8,8	1,3ml	1,3ml	1,3ml	1,3ml
10% SDS	0,05ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml
10% APS	0,05ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml
TEMED	0,004ml	0,003ml	0,002ml	0,002ml

Sammelgel:

dd H ₂ O	1,15ml
30% Acrylamid Mix	0,33ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	0,5ml
10% SDS	0,02ml
10% APS	0,02ml
TEMED	0,002ml

2×Laemmli-Ladepuffer (Endkonzentrationen)

100mM	Tris-HCl pH6,8
4% (w/v)	SDS
0,2% (w/v)	Bromphenol-Blau
20% (v/v)	Glycerol

Auf 9ml mit deionisiertem Wasser auffüllen, zum Gebrauch 10% β -Mercaptoethanol zugeben. 20 μ g Protein wurden mit 3 μ l Laemmli-Puffer versetzt und auf das SDS-Gel aufgetragen.

Blocking buffer

5% (w/v) Magermilchpulver in PBS + 0,1% (v/v) TWEEN-20

Stripping solution

1M Glycin, 1% SDS, einstellen auf pH2,5

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung

Die Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF7 wurden in RPMI-Medium, die Zelllinie MDA-MB468 in DMEM-Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit in speziellen Gewebekultur-Flaschen oder -Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Fellbach, Deutschland).

2.2.2. Passagieren adhärenter Zellen

Gemäß dem Phänomen der Kontaktinhibition proliferieren adhärenente Zelllinien nur solange, bis sie einen 100% dichten Zellrasen bilden. Erfolgt bis zu diesem Zeitpunkt keine Teilung der Kultur, sterben die Zellen ab und lösen sich von der Wand der Zellkulturflasche. Aus diesem Grund müssen die Zellen konfluenter Monolayerkulturen regelmäßig mit Trypsin abgelöst und verdünnt wieder ausgesät werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden jede Woche zweimal passagiert.

Hierzu wurde zunächst das Medium aus der Kulturflasche abgenommen, die adhärenen Zellen wurden mit 4ml PBS gespült und anschließend mit 1ml Trypsin überdeckt. Die Inkubationszeit zum Loslösen der Zellen betrug bis zu 20min bei 37°C. Das Trypsin spaltet proteolytisch die Oberflächenproteine der anhaftenden Zellen. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, wurden die abgelösten Zellen anschließend in 5ml Vollmedium aufgenommen und in einer Verdünnung von 1:5 wieder eingesät.

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

10µl einer Zellsuspension wurde mit 10µl Trypanblaulösung gemischt. Von dieser Suspension wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer (Madaus Diagnostik, Köln, Deutschland) überführt. Die Kammer ist in ein Raster von 9 Quadraten eingeteilt, die wiederum in 9 Kleinquadrate unterteilt sind. Zwei mal 9 Kleinquadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Berücksichtigt wurden hierbei nur die lebenden, ungefärbten Zellen. Die gemittelte Zellzahl mal 2×10^4 (dieser Faktor ergab sich aus Vergleichsmessungen in einer geeichten Neubauer-Zählkammer) ergab die Zellzahl pro Milliliter.

2.2.4. Waschen der Zellen

Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und 5min lang mit 1400rpm bei Raumtemperatur in einer Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen im gewünschten Puffer resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert um Reste des vorherigen Mediums zu entfernen. Das so erhaltene Zellpellet wurde wieder im gewünschten Medium resuspendiert.

2.2.5. Zellen auftauen

Ein Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurde aus der Gasphase über flüssigem Stickstoff aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Zellsuspension wurde in 5ml Vollmedium aufgenommen und 5min mit 1400rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert um das zelltoxische DMSO, das im Einfriermedium enthalten ist, zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 10ml Vollmedium in Kultur genommen.

2.2.6. Zellen einfrieren

Die abgelösten Zellen wurden in 5ml Vollmedium aufgenommen und bei Raumtemperatur mit 1400rpm für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gezählt und jeweils 10^6 Zellen wurden in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Um ein langsames Absinken der Temperatur zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst für 24h bei -80°C und anschließend in der Gasphase über flüssigem Stickstoff im Stickstofftank gelagert.

2.2.7. Kristallviolett-Assay

Die in Lösung befindlichen Zellen wurden gezählt und 10^4 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die angewachsenen Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. 24h, 48h und 72h nach Substanzzusatz wurde die Vitalität in den einzelnen Wells mittels Kristallviolett-Assay bestimmt. Hierzu wurde das Medium abgenommen und jedes Well zwei Mal mit $200\mu\text{l}$ PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Die verbleibenden adhärenen Zellen wurden mit jeweils $50\mu\text{l}$ Kristallviolettlösung pro Well für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die überschüssige Färbelösung mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Nach Trocknung der Platte über Nacht wurde jedes Well mit $150\mu\text{l}$ Methanol für 20min bei Raumtemperatur inkubiert, um das gebundene Kristallviolett wieder zu lösen und anschließend im ELISA-Reader (Sunrise, Tecan, Männedorf, Schweiz) die Absorption bei $\lambda=550\text{nm}$ zu messen. Die in den Wells gemessene optische Dichte der Färbung korreliert direkt mit der Anzahl der Zellen im Well.

2.2.8. zVAD-fmk/Nekrostatin

Der Versuch wurde wie in Kristallviolett-Assay (3.2.7.) beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde zu den unterschiedlichen Konzentrationen von AEZS 126 jeweils 30mM zVAD-fmk bzw. 50mM Necrostatin-1 zugefügt und die Platten wie oben beschrieben im ELISA-Reader (Sunrise, Tecan, Männedorf, Schweiz) vermessen.

2.2.9. Herstellung von Proteinlysaten

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten, je 10^6 Zellen pro Well, ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen für 24h in FCS freiem Medium gehalten, um die Zellen zu

synchronisieren. Danach erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit FCS haltigem Medium und die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Nach 24h bzw. 48h wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit je 3ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zell-Schaber (Costar, Cambridge/MA, USA) abgelöst, zentrifugiert (1500rpm, 5min) und der erhaltene Zelniederschlag wurde dann in 1ml kaltem PBS aufgenommen, mit 100mM PMSF versetzt und erneut 10min bei 1500rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100µl Lysepuffer mit zugesetzten Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen, 15min auf Eis inkubiert und das so entstandene Lysat für 20min bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den gewonnenen Proteinen wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und bei -20°C eingefroren.

2.2.10. Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay

In eine 96-Well-Platte wurden 50µl destilliertes Wasser vorgelegt, die Standards und die zu bestimmenden Proben wurden gemäß Pipettierschema als Triplets dazupipettiert und je Well 200µl verdünntes Bradford-Reagenz (Rotiquant, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt.

Pipettierschema:

Standardreihe			Proben			Proben			Proben			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0µl	1mg/ml	BSA	1 1µl	1µl	1µl	9	usw.				
B	1µl	1mg/ml	BSA	2 1µl	1µl	1µl						
C	2µl	1mg/ml	BSA	3 1µl	1µl	1µl						
D	4µl	1mg/ml	BSA	4 1µl	1µl	1µl						
E	6µl	1mg/ml	BSA	5 1µl	1µl	1µl						
F	8µl	1mg/ml	BSA	6 1µl	1µl	1µl						
G	10µl	1mg/ml	BSA	7 1µl	1µl	1µl						
H	12µl	1mg/ml	BSA	8 1µl	1µl	1µl						

Nach ca. 10-minütiger Inkubationszeit wurde die 96-Well-Platte bei 595nm im ELISA-Reader (Sunrise, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die im jeweiligen Well gemessene optische Dichte ist proportional zur Proteinkonzentration und wird vom entsprechenden Programm des ELISA Readers (Magellan, Tecan, Männerdorf, Schweiz) über die in jeder Platte mitgeführte Eichkurve in Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) umgerechnet und angegeben.

2.2.11. Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) handelt es sich um eine Elektrophoresemethode, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970) aufgetrennt werden [105].

Die Proteine werden zunächst denaturiert und anschließend in einem Trenngel in Proteinbanden aufgetrennt. Das Gel enthält Acrylamid, APS (Ammoniumperoxosulfat), TEMED (Tetramethylethylendiamid), SDS, Wasser und Puffer. Acrylamid ist ein

synthetisches hydrophiles Monomer, das in Anwesenheit von APS und TEMED radikalisch zu Polyacrylamid polymerisiert. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Detergens, mit dem die Proben vorbehandelt werden um die darin befindlichen Proteine zu denaturieren (SEK/Primärstruktur). Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken, wodurch das Protein so entfaltet wird, dass die hydrophoben Aminosäurereste außen liegen und durch hydrophobe Wechselwirkung an die SDS-Moleküle binden. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine maskiert und die Proteine werden gleichmäßig negativ geladen. Somit werden die Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die Gelkammer wurde aus fett- und staubfreien Glasplatten und Abstandshaltern, zusammengesetzt. Die Acrylamid-Konzentration und somit die „Dichte“ des Gels variierte zwischen 7,5% (w/v) und 15% (w/v).

Die Glaskammer wurde zunächst zu drei Viertel mit Trenngel gefüllt. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Gel mit wassergesättigtem Isopropanol überschichtet. Nach Beendigung der Polymerisation, d.h. nach ca. 45min, wurde die Geloberfläche mit Wasser abgespült und die Kammer mit Sammelgel aufgefüllt, in die zur Aussparung der Probenaschen ein Kamm eingesetzt wurde. Nach beendeter Polymerisation (ca. 20min) wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen und das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt.

Die Proteinproben wurden aus dem -20°C Schrank entnommen und auf Eis aufgetaut. 30µg Protein wurden in Laemmli Ladepuffer aufgenommen, für 5min bei 90°C denaturiert und danach kurz in einer Tischzentrifuge (Micromax RF, Thermo, Scientific, Dreieich, Deutschland) abzentrifugiert. Danach wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100V, bis die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreichte. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 120V durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Bande das Trenngel durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

2.2.12. Übertragung von Proteinen aus Elektrophoresegelen auf Membranen („Semi-dry Blotting“)

Die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteinbanden sollten mit einem Antikörper nachgewiesen werden. Die Proteine wurden dazu aus dem Gel auf einen geeigneten Träger, hier eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran transferiert, was ebenfalls durch Elektrophorese geschah. Die Technik ermöglicht die Fixierung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Membranen, so dass die Proteine für weitere Untersuchungen zugänglich sind.

Das elektrische Feld wird hier senkrecht zur Membran angelegt um die Proteine auf die Membran zu überführen und an diese zu binden. Die Membran wird zunächst kurz in destilliertem Wasser, anschließend zusammen mit auf die Größe des Gels zugeschnittenen Filterpapieren (3MM Whatman-Papier, Schleier&Schuell, Dassel, Deutschland)) und dem Gel für ca. 5-20min in Transfer-Puffer gelegt. Das darin enthaltene Methanol entfernt das SDS aus den Protein-Detergenz-Komplexen und ermöglicht somit eine stärkere Bindung der SDS-freien Proteine an die Nitrozellulose-Membran. Anschließend werden Filterpapier, Blotting-Membran, Gel und Filterpapier luftblasenfrei in der Semi-dry Blotting-Apparatur platziert. Je nach Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins werden die im Gel aufgetrennten Proteine bei 25V für 55min bis 2h auf die Blotting-Membran übertragen und so fixiert.

2.2.13. Anfärben der transferierten Proteine

Die transferierten Proteine wurden auf den Membranen mit Ponceau S (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Die Membran wurde 2min lang in einer Färbelösung aus 99,5% (v/v) einer 0,1%igen (w/v) Ponceau S-Lösung und 0,5% (v/v) Eisessig geschwenkt. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde die Membran 5min lang mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Lage der Markerproteinbanden mit Bleistift auf der Membran gekennzeichnet. Die Membran wurde vollständig entfärbt, getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.14. Immundetektion der transferierten Proteine

Die Membran wurde für 1h bei RT in Blockierlösung (5% (w/v) Trockenmilchpulver in PBS-T) geschwenkt. Diese hat die Aufgabe unspezifische Proteinbindungen zu blocken und die Antikörperanlagerung an unspezifische Proteine zu reduzieren.

Anschließend wurde die Membran zweimal mit PBS-T-Puffer abgespült und 15min lang bei Raumtemperatur mit PBS-T-Puffer gewaschen.

Um die auf die Nitrozellulose Membran transferierten Proteinbanden sichtbar zu machen, wird das Prinzip der Antigen-Antikörper Bindung genutzt.

Hierfür wurde ein antigenspezifischer mono- oder polyklonaler Primärantikörper in 10ml Milchpulverlösung (5% (w/v) Trockenmilchpulver in PBS-T), gelöst (Verdünnung 1:1000) und die Nitrozellulose Membran darin 24h bei 4°C inkubiert. Der Antikörper bindet spezifisch an das entsprechende Epitop des entsprechenden Antigens/Proteins.

Nicht gebundener Antikörper wurde dreimal jeweils 10min lang in PBS-T-Puffer (0,1% (v/v) Tween-20) abgewaschen. Danach wurde die Membran mit dem ebenfalls in Milchpulverlösung (5% (w/v) Trockenmilchpulver in PBS-T) gelösten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Sekundärantikörper bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers und kann anschließend über seine enzymatische HRP-Aktivität detektiert werden. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut drei Mal jeweils für 10min mit PBS-T-Puffer (0.1% (v/v) Tween-20) bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Detektion der Immunreaktion erfolgte über die verstärkte Chemolumineszenz-Methode (ECL-Detektions-Kit, Millipore, Schwalbach, Deutschland). Die Detektionsreagenzien des ECL-Kits, die Luminol und Wasserstoffperoxid enthalten, wurden unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 (v/v) im Dunkeln gemischt. Zur Detektion wurde die Membran mit der Reagenzlösung (0,1ml/cm²) bedeckt und 2min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde entfernt, die Membran zwischen zwei Folien in eine Röntgenkassette eingebracht und mit einem Röntgenfilm (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) exponiert. Nach einer Expositionszeit

von 10s bis 30min wurden die Filme entwickelt. Die Membran wurde mit PBS-T-Puffer (0,1% (v/v) Tween-20) gewaschen, danach getrocknet und bei -20°C gelagert.

2.2.15. Loslösen von an die Membran gebundenen Antikörpern („strippen der Membran“)

Die Membran wurde zwei Mal für 15min bei Raumtemperatur in Stripping Buffer (s.o.) inkubiert. Danach wurde die Membran zwei Mal in TBS-T-Puffer (0,1% (v/v) Tween-20) gespült. Anschließend wurde die Membran für 1Std bei RT in Blockierlösung (5% (w/v) Trockenmilchpulver in PBS-T) geschwenkt und anschließend für den Western Blot mit Primärantikörper inkubiert.

2.2.16. FACS (“fluorescence activated cell sorting”)

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, mit dem die Quantifizierung und Analyse der molekularen und physikalischen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom möglich ist. Die Methodik basiert auf der Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen. Hierbei wird die Zellsuspension durch eine Kapillare gezogen und passiert einen Laserstrahl. Die Zellen werden durch Überdruck stark beschleunigt, so dass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt und am Messpunkt fokussiert werden. Die Zellen streuen einen Teil des Laserlichtes zurück, welches von Detektoren gemessen wird. Hierbei wird gleichzeitig Vorwärts- und 90°-Seitwärtsstreulicht gemessen und so die relative Zellgröße sowie die relative Zellgranularität von Einzelzellen bestimmt, wobei sowohl die Granularität als auch die Größe direkt mit der Lichtintensität korrelieren.

Ebenso können durch spezielle Färbungen sowohl die Menge an spezifischen Oberflächenstrukturen als auch intrazelluläre Proteine auf Einzelzellebene gemessen werden. Hierzu werden an spezifische Zellstrukturen bindende Antikörper verwendet, die entweder direkt mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind oder die mit entsprechenden Sekundärantikörpern, die mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind, reagieren. Beim Durchwandern des Zytometers werden diese Farbstoffe durch den Argon-Laser angeregt, der Licht mit einer Wellenlänge von 488nm generiert. Das emittierte Licht wird über ein optisches System gemessen. Der Messbereich ist in 1024 Kanäle unterteilt, in welche die Zellen nach unterschiedlicher Expression der

Oberflächenantigene eingeteilt werden, die mit der Intensität der Fluoreszenz korreliert. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, stand ein FACS-Calibur (BD, Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung.

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurde das Histogramm bzw. das Punkt-Wolken-Diagramm der Fluoreszenz 1 (FL1) für Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und der Fluoreszenz 2 (FL2) für Phycoerythrin (PE) verwendet. Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem Programm „Summit“ (Version 4.3)

Während das Vorwärtsstreulicht (FSC) mit der Größe der Zellen korreliert, ist das 90°-Seiten-Streulicht (SSC) proportional zur Granularität der Zellen. Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich Zellen durch das Setzen von Analysefenstern (Gates) in unterschiedliche Populationen einteilen.

2.2.17. Zellzyklus-FACS

Propidiumiodid ist eine Substanz, die sich an die DNA apoptotischer bzw. permeabilisierter Zellen anlagert [106]. So ist es möglich auf den DNA-Gehalt und somit indirekt auf die Anzahl der Zellen zu schließen, die sich in den unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus befinden.

Je 10^6 Zellen wurden trypsinisiert und in eine 6-Well-Platte in je 2ml Vollmedium ausgesät. Nach 24h wurde das Medium auf FCS-freies Medium gewechselt, um die Zellen zu synchronisieren. Nach weiteren 48h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel auf Vollmedium und die Zellen wurden für weitere 48h mit verschiedenen AEZS 126 Konzentrationen inkubiert.

Der Überstand wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und die mit Trypsin abgelösten Zellen in PBS zugegeben. Die Suspension wurde bei 200g für 10min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde mit 2ml PBS gewaschen, erneut bei 200g für 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 500µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5ml EtOH (-20°C) wurden die Röhrchen 24h bei -20°C inkubiert.

Die fixierten Zellen wurden bei 300g 10min abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und erneut bei 300g für 10min bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 300µl kalter Lösung A für 60min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurde 300µl Färbelösung B zugesetzt und die Proben im Dunkeln bei 4°C inkubiert.

Es folgte die zytometrische Messung und Auswertung mit der vorhandenen Software bei 488nm innerhalb von 24h nach Färbung mit FL-2.

Einstellungen:

G0/G1 Peak auf 200/50 relative Fluoreszenzeinheiten
P1: E00 lin
P2: 375 lin
P3: 482 log
P4: 454 log 20000 Zellen zählen
P6: FL-2A 1.00lin
P7: FL-2W 1.00lin

2.2.18. AnnexinV/Propidiumiodid FACS zur Apoptose Detektion

Propidiumiodid wird in Kombination mit AnnexinV benutzt, um über Plasmamembran Integrität und Permeabilität festzustellen, ob Zellen vital, apoptotisch oder nekrotisch sind [106].

Neben AnnexinV hat sich Propidiumiodid als Anfärbereagens bewährt. Es ist kostengünstig, stabil und ein guter Indikator für die Vitalität von Zellen. Ist eine Zelle vital oder frühapoptotisch, wird sie durch Propidiumiodid nicht angefärbt, da ihre Zellmembran noch intakt ist [107]. Propidiumiodid vermag lediglich in eine Zelle mit permeabler Zellwand einzudringen [106]. In spätapoptotischen und nekrotischen Zellen ist die Integrität der Plasma- und der Kernmembran gestört [108]. Nun ist es dem Propidiumiodid möglich die Membran zu passieren, sich an Nukleinsäuren zu binden und die Zelle anzufärben [109].

AnnexinV ist ein Substrat, das sich an Phosphatidylserin [6] der Zellmembran haften kann. Bei der Apoptose wird Phosphatidylserin, welches sich normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Seite der Membran befindet, auf die Außenseite der Zellmembran

transloziert und kann dort detektiert werden. Das an Phosphatidylserin gebundene Annexin V wird mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Ist die Zelle nekrotisch, so kann AnnexinV eindringen und ebenfalls an Phosphatidylserin binden. Somit wären apoptotische nicht von nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Wird aber zusätzlich Propidiumiodid beigefügt, welches ausschließlich in Zellen mit permeabilisierter Zellwand einzudringen vermag, so kann bei der Durchflusszytometrie zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden.

Lebende Zellen sind sowohl AnnexinV als auch Propidiumiodid negativ, apoptotische Zellen AnnexinV-positiv und Propidiumiodid -negativ und nekrotische Zellen AnnexinV-positiv und Propidiumiodid -positiv.

Die Zellen wurden abgelöst und in 6-Well-Platten in Vollmedium ausgesät, jeweils $7 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Nach 24h wurde das Medium auf FCS freies Medium gewechselt, die Zellen wurden für 2 Tage unter FCS Karenz gehalten. Nach erneutem Wechsel auf Vollmedium wurden den Zellen verschiedene Konzentrationen von AEZS 126 zugegeben und die Zellen für weitere 48h inkubiert.

Die Zellen wurden trypsinisiert, in PBS aufgenommen und abzentrifugiert (1600rpm, 10min bei Raumtemperatur). Das entstandene Pellet wurde in 500 μ l verdünnt, in Bindepuffer resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (1600rpm, 10min bei Raumtemperatur).

Das Pellet wurde in 200 μ l Bindepuffer aufgenommen, 100 μ l davon wurden mit 5 μ l AnnexinV-FiTC versetzt und für 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden 300 μ l verdünnter Bindepuffer und 5 μ l Propidiumiodid-Lösung ([c] = 2 μ g/ml) zugegeben.

Die Proben wurden unter Verwendung des PE-Kanals für Propidiumiodid im FACS gemessen.

Einstellungen:

488nm Exzitation
515nm Bordpass Filter für Fluorescin-Detektion
Filter > 560nm für PJ Detektion

2.2.19. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde MicrosoftR Excel genutzt. Bei der deskriptiven Statistik wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, Mittelwerte der Dreierwerte von je drei unabhängigen Experimenten errechnet und die Standardabweichung bestimmt.

3. Ergebnisse

Dysregulationen des PI3K/AKT Signalweges spielen eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Tumoren [110]. Neben Mutationen des Tumorsuppressors PTEN begünstigen fehlregulierte, mutierte oder überexprimierte Oberflächenrezeptoren eine aberrante PI3K Aktivierung in einer Vielzahl maligner Tumoren und führen somit zu einer Überaktivierung des PI3K/AKT Signalweges [82]. Daher stellt die Inhibition des PI3K/AKT Signalweges eine mögliche Therapie für Tumoren dar, wie im Folgenden am Beispiel der AKT Inhibition durch AEZS 126 in Mammakarzinomen untersucht wurde.

3.1. AEZS 126 inhibiert die Phosphorylierung von AKT *in vitro*

Das Pyridopyrazin Derivat AEZS 126 (AEterna Zentaris) zeigte bisher ein sehr gutes pharmakologisches Profil bei diversen *in vitro* Untersuchungen und ist ein vielversprechender Kandidat für den Einsatz in *in vivo* Studien [89]. AEZS 126 inhibiert die PI3K α -Untereinheit und ist ein potenter Inhibitor der Phosphorylierung von AKT, was mittels Western Blot gezeigt wurde (Abb. 5). Die Expression von pAKT in HCC1937 Zellen, die mit und ohne Zusatz von AEZS 126 kultiviert worden waren, ist als repräsentatives Beispiel angeführt. In der Abbildung sinkt der phosphorylierte AKT Anteil mit steigender Konzentration AEZS 126 deutlich.



Abb. 5: AEZS 126 inhibiert die Phosphorylierung von AKT mit steigender Konzentration

3.2. AEZS 126 reduziert die Vitalität der Brustkrebs-Zelllinien HCC1937, HCC1806, MDA-MB468 und MCF7

Zunächst stellte sich die Frage, in welchem Maß AEZS 126 Einfluss auf die Vitalität der Brustkrebszellen nimmt. Einerseits um die Wirksamkeit des Inhibitors in Zellkulturmodellen des Triple-negativen-Brustkrebs (TNBC) zu ermitteln, andererseits um einen Konzentrationsbereich für weiterführende Experimente festzulegen. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die TNBC Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MDA-MB468 (negativ für Östrogenrezeptor, positiv für Progesteronrezeptor und Mutation im PTEN [83]) mit MCF7 (exprimiert Östrogen- und Progesteronrezeptor) verglichen.

Für alle vier im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zeigte sich eine dosis abhängige Verminderung der Vitalität. Die IC_{50} Werte konnten für eine Inkubationsdauer von 24h nicht eindeutig ermittelt werden, da bei allen verwendeten Zelllinien die Vitalität nach 24stündiger Inkubation mit AEZS 126 selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (102,4 μ M) noch deutlich über 50% lag (Abb.6).

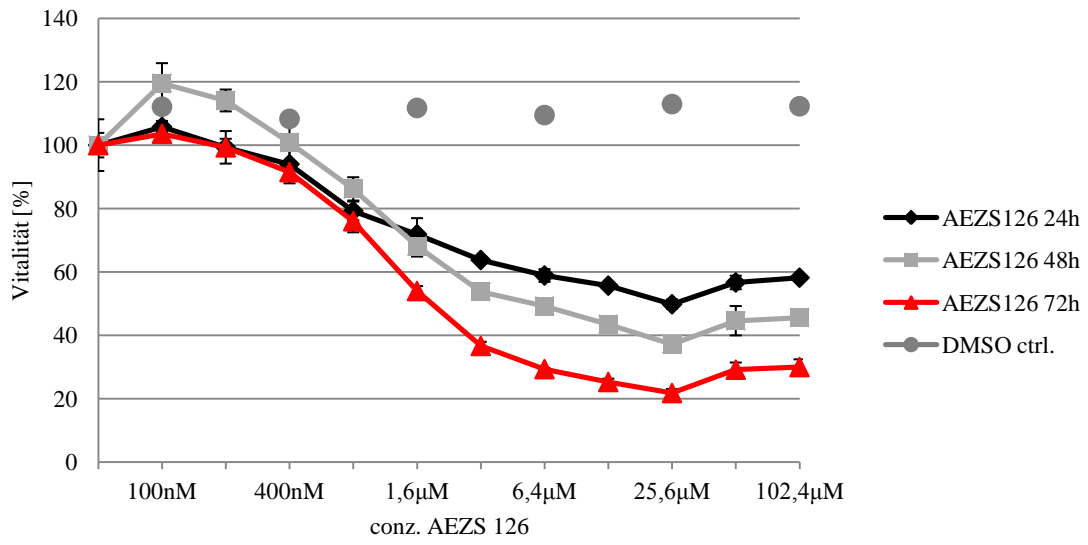
Die IC_{50} Werte bei einer Inkubationszeit von 48h betragen bei HCC1937 3,2 μ M, bei HCC1806 800nM, bei MDA-MB468 600nM und bei MCF7 1,6 μ M. Die IC_{50} Werte für eine Inkubationszeit von 72h betragen bei HCC1937 2 μ M, bei HCC1806 auf 300nM, bei MDA-MB468 auf 500nM und bei MCF7 auf 2,4 μ M.

Eine Zusammenstellung aller im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC_{50} Werte findet sich in Tabelle 4.

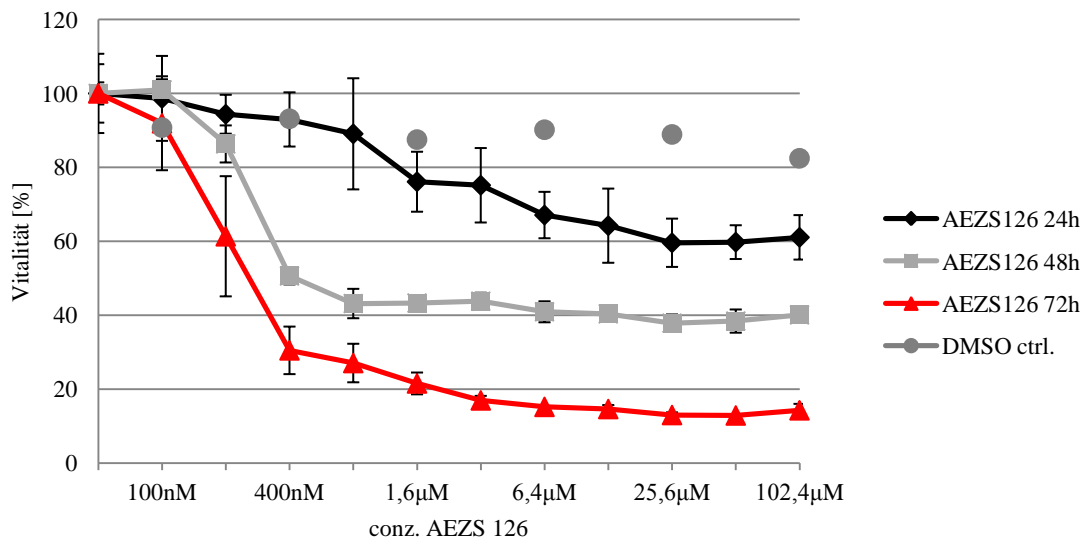
Tabelle 4: Zusammenstellung der IC_{50} Werte der untersuchten Zelllinien HCC1937, HCC1806, MDA-MB468 und MCF7

	HCC 1937	HCC1806	MDA-MB468	MCF7
IC50 48h	3,2 μ M	800nM	600nM	1,6 μ M
IC50 72h	2 μ M	300nM	500nM	2,4 μ M

HCC1937



HCC1806



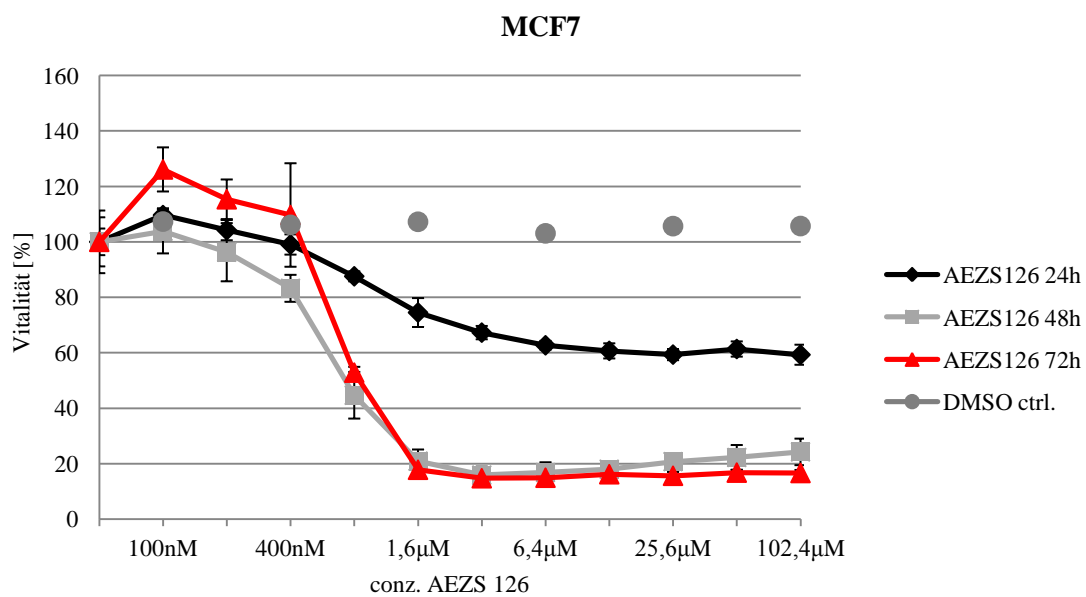
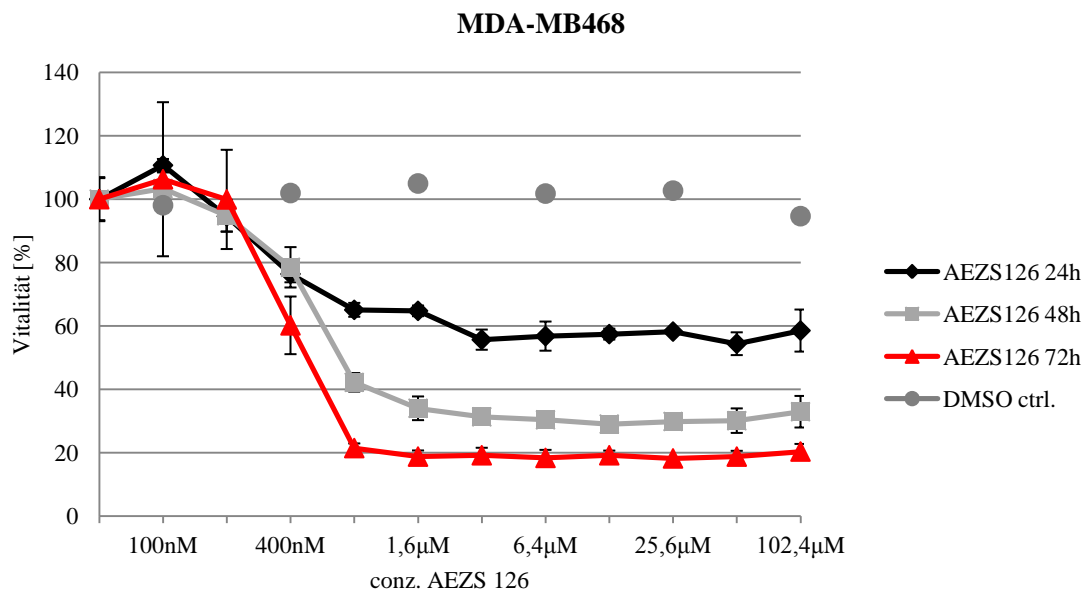


Abb. 6: AEZS 126 reduziert die Vitalität der Zelllinien HCC1937, HCC1806, MDA-MB468 und MCF7. Die Zellen wurden für jeweils 24h, 48h und 72h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100% Wert ist jeweils die Vitalität in unbehandelten Kontrollansätzen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.3. Mechanistische Untersuchungen zur Art des Zelltodes in Brustkrebs-Zelllinien

Um zu ermitteln, welcher Mechanismus des Zelltodes bei den TNBC Zelllinien durch die Inkubation mit AEZS 126 zugrunde liegt, wurden Vitalitätsassays in Anwesenheit des antiapoptotischen Caspaseinhibitors zVAD-fmk (Carbobenzoxy-valyl-alaspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon), beziehungsweise des allosterischen Inhibitors der Todesrezeptor assoziierten Adapterkinase RIP-1 (Rezeptor-interagierendes Protein 1), Necrostatin-1 (Methylthiohydantoin-DL-tryptophan) durchgeführt. Als Kontrolle wurden bei all diesen Versuchen die Zellen auch immer parallel mit dem PI3K Inhibitor AEZS 126 alleine inkubiert. Um das Ausmaß der Apoptose bzw. Nekroptose am Zelltod durch AEZS 126 zu ermitteln, wurde zVAD-fmk in einer Konzentration von 30µM bzw. Necrostatin-1 in einer Konzentration von 50µM eingesetzt. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass beide Substanzen in den hier eingesetzten Konzentrationen das Zellwachstum der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinien nicht beeinflussen (Daten nicht gezeigt). Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk wurde den Zellkulturansätzen jeweils vor der Inkubation mit AEZS 126 beigefügt, um direkt die antiapoptotische bzw. antinekroptotische Wirkung entfalten zu können. Diese Ko-Inkubationsversuche wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt und unabhängig voneinander dreimal wiederholt. In der Abbildung ist jeweils ein repräsentatives Experiment dargestellt (Abb.7-10).

3.3.1. Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der HCC1937 Zellen

Eine Inkubation mit AEZS 126 alleine im Vergleich zu einer Koinkubation von AEZS 126 mit einem der beiden Inhibitoren (zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1) zeigte nach 24h bei den HCC1937 Zellen keine Veränderung der Vitalität. Bei einer Inkubation von 48h zeigte sich für die Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit Necrostatin-1 eine deutliche Erhöhung der Vitalität in den Zellkulturansätzen. Über den gesamten im

Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konzentrationsbereich von AEZS 126 (0,1nM-102,4µM) konnte eine Steigerung der Vitalität von ca. 10% -20 % beobachtet werden. Für zVAD-fmk konnte im mittleren Konzentrationsbereich von AEZS 126 (100nM-1µM) eine Protektion vor den toxischen Effekten festgestellt werden. Hierbei lag die Vitalität durch die Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk im Vergleich zu den Ansätzen, die nur mit AEZS 126 inkubiert worden waren, um ca. 10% höher. Allerdings wurde dieser durch zVAD-fmk vermittelte Schutz vor den toxischen Effekten von AEZS 126 ab einer AEZS 126 Konzentration von 1,6µM komplett aufgehoben.

Nach 72-stündiger-Inkubation konnte durch Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk im Konzentrationsbereich zwischen 0,1nM und 1,6µM eine deutlich gesteigerte Überlebensrate der TNBC Zellen festgestellt werden. Oberhalb einer AEZS 126 Konzentration von 1,6µM glich sich die Vitalität der Zelllinien, die zusätzlich mit Necrostatin-1 behandelt worden waren, der Vitalität der nur mit AEZS 126 behandelten Zellen an. Bei einer Kombinationsbehandlung mit zVAD-fmk wurde auch bei AEZS 126 Konzentrationen oberhalb von 1,6µM eine leicht erhöhte Vitalität in den HCC1937 Zellkulturen beobachtet.

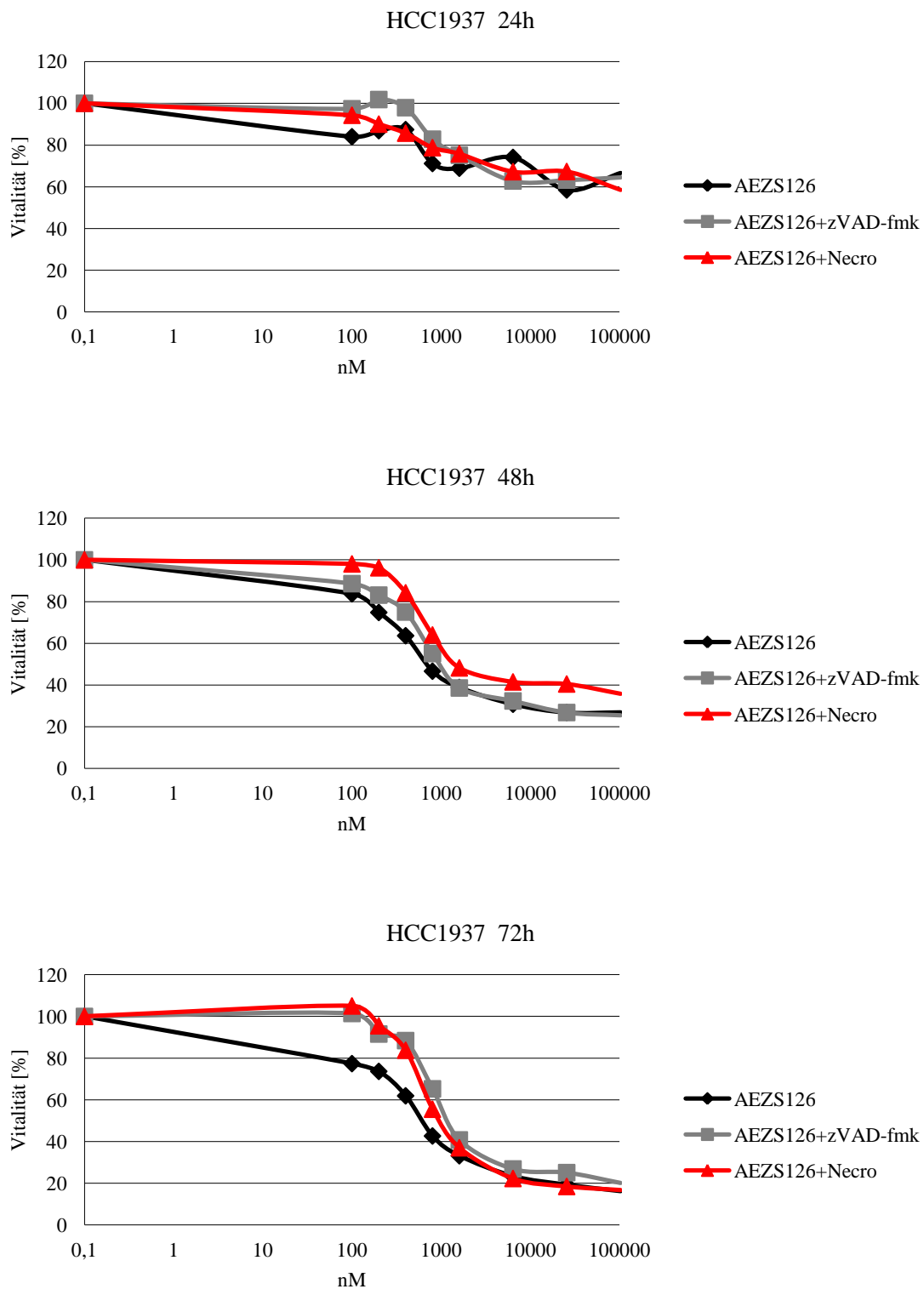


Abb. 7: Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk erhöht die Vitalität der TNBC Zellen. Die Zellen wurden für 24h, 48h und 72h mit AEZS 126 alleine, AEZS 126 + zVAD-fmk (30µM) bzw. AEZS 126 + Necrostatin-1 (50µM) inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100% Wert ist jeweils die Vitalität in

unbehandelten Kontrollansätzen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.3.2. Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der HCC1806 Zellen

Als weiteres Modell für TNBC wurde die Zelllinie HCC1806 verwendet. Auch bei dieser Zelllinie ergaben sich für eine Inkubationsdauer von 24h für die Kombinationsbehandlung mit dem Apoptose Inhibitor zVAD-fmk keine deutlichen Unterschiede zur Inkubation mit AEZS 126 alleine. Jedoch konnte bei einer Kombinationsbehandlung mit Necrostatin-1 eine über den gesamten Konzentrationsbereich von AEZS 126 konstant bleibende Erhöhung der Vitalität um ca. 10% beobachtet werden.

Bei einer Inkubation von 48h konnte bei der Zelllinie HCC1806 die deutlichste Verringerung der Apoptose- bzw. Nekroptose-Rate beobachtet werden. Sowohl die Ko-Inkubation mit Necrostatin-1 als auch die mit zVAD-fmk steigerten im Konzentrationsbereich zwischen 0,1µM und 1,6µM die Vitalität der Zellen um 10-20%. Oberhalb einer Konzentration von 1,6µM AEZS 126 wurde eine Vitalitätssteigerung um ca. 10% nur noch für die Zellen beobachtet, die mit Necrostatin-1 koinkubiert worden waren.

Die 72-stündige Inkubation ergab für die Koinkubation mit zVAD-fmk keine Änderung der Vitalität, wohingegen die Koinkubation mit Necrostatin-1 eine Erhöhung der Vitalität hervorrief.

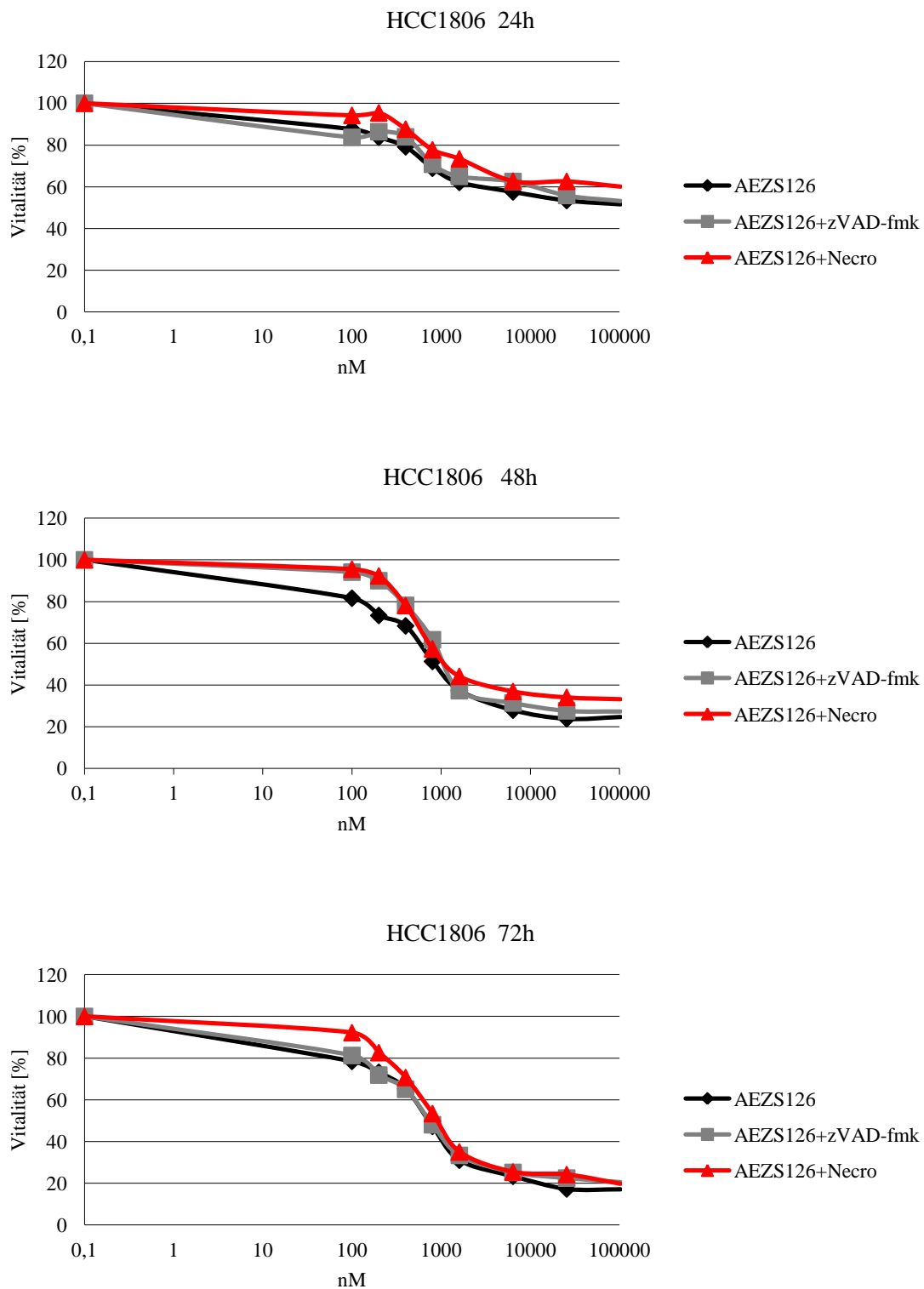


Abb. 8: Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 erhöht die Vitalität der TNBC Zellen, zVAD-fmk zeigt lediglich bei einer Inkubationszeit von 48h Wirkung. Die Zellen wurden für 24h, 48h und 72h mit AEZS 126 alleine, AEZS 126+zVAD-fmk (30µM) bzw. AEZS 126+Necrostatin-1 (50µM) inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt.

Der 100% Wert ist jeweils die Vitalität in unbehandelten Kontrollansätzen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.3.3. Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der MDA-MB468 Zellen

Daneben wurde die Brustkrebszelllinie MDA-MB468, die ebenfalls zur Gruppe der TNBC gehört [83], untersucht. Die 24stündige Koinkubation der Zelllinie MDA-MB468 mit zVAD-fmk ergab für den Konzentrationsbereich von 0,1nM bis 1,6µM AEZS 126 eine Apoptoseminderung um mehr als 20%. Im Konzentrationsbereich zwischen 1,6µM und 102,4µM AEZS 126 konnte keine Diskrepanz zur reinen Inkubation mit AEZS 126 festgestellt werden. Für Necrostatin-1 konnte lediglich im Konzentrationsbereich von 0,1nM bis 800nM AEZS 126 eine geringe Vitalitätssteigerung verzeichnet werden.

Bei einer Inkubation von 48h zeigte die Koinkubation mit Necrostatin-1 von 0,1nM bis 400nM AEZS 126 erstaunlicherweise eine Verringerung der Vitalität von bis zu 20%. Ab einer AEZS 126 Konzentration von 400nM glich sich die Vitalität der mit Necrostatin-1 koinkubierten Zellen und der nur AEZS 126 behandelten Zellen an. Für die Zugabe von zVAD-fmk ergab sich eine Vitalitätssteigerung um ca. 10% im Konzentrationsbereich von 0,1nM bis 200nM AEZS 126, bei 400nM AEZS 126 sogar um 20%. Ab einer AEZS 126 Konzentration von 800nM war keine deutliche Diskrepanz zur Kontrollkurve mehr feststellbar.

Bei einer 72-stündigen Inkubation zeigten sich die deutlichsten Effekte der Vitalitätsminderung durch Necrostatin-1 bzw. der Vitalitätssteigerung durch zVAD-fmk im Konzentrationsbereich von 0,1nM bis 800nM AEZS 126. Ab einer AEZS 126 Konzentration von 800nM war keine deutliche Diskrepanz zur Kontrollkurve mehr feststellbar weder durch Ko-Inkubation mit zVAD-fmk noch durch Koinkubation mit Necrostatin-1.

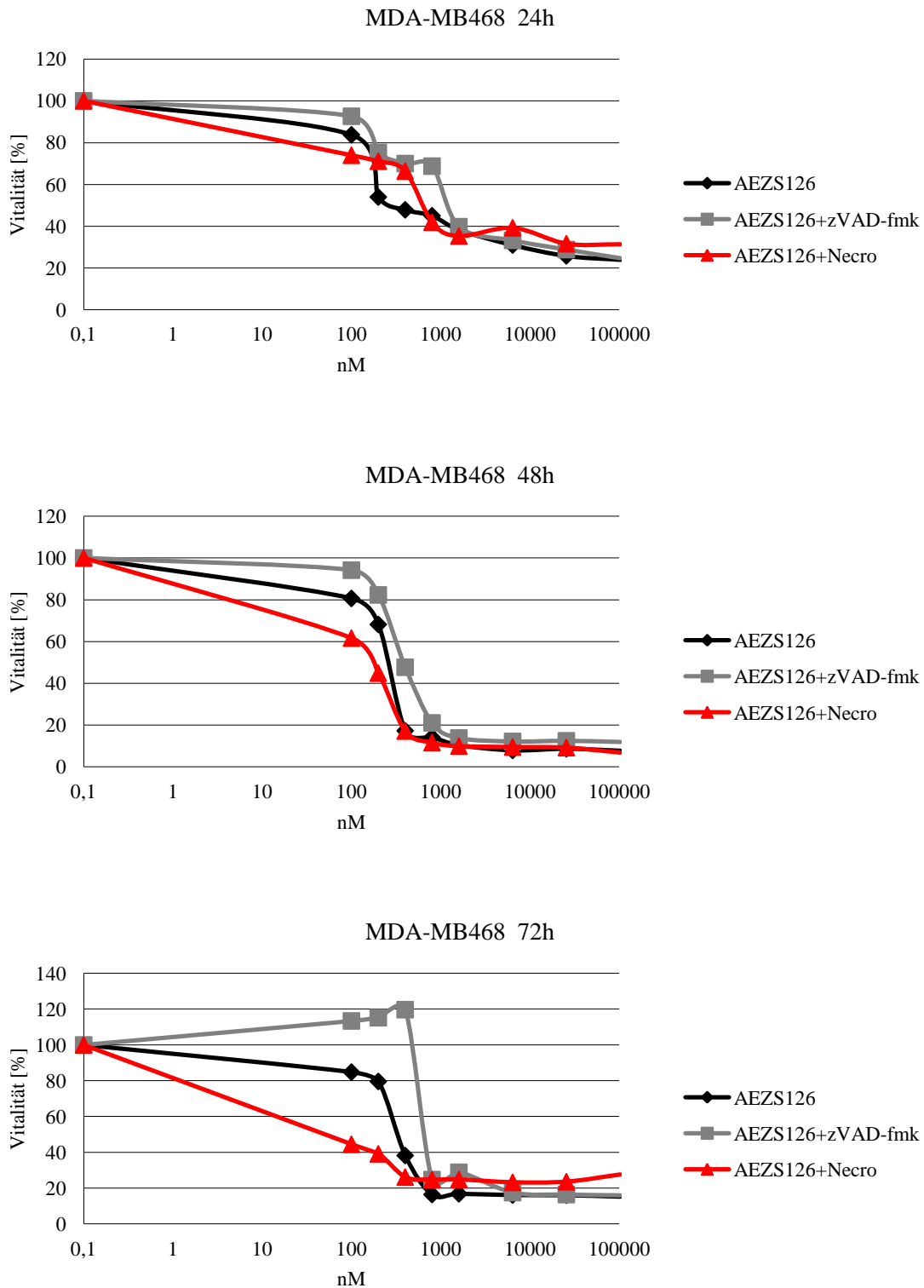


Abb. 9: Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 verringert die Vitalität der Tumorzellen, zVAD-fmk erhöht diese. Die Zellen wurden für 24h, 48h und 72h mit AEZS 126 alleine, AEZS 126+zVAD-fmk (30µM) bzw. AEZS 126+Necrostatin-1 (50µM) inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100% Wert ist jeweils die Vitalität in

unbehandelten Kontrollansätzen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

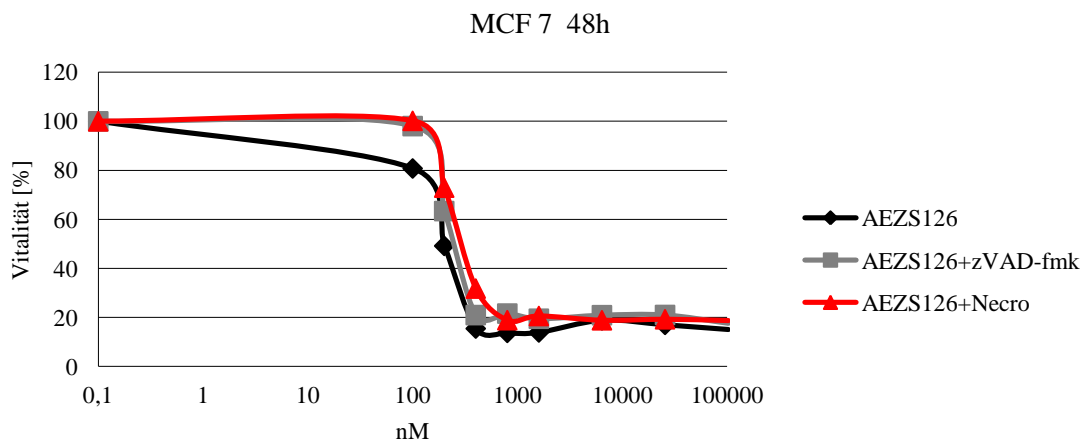
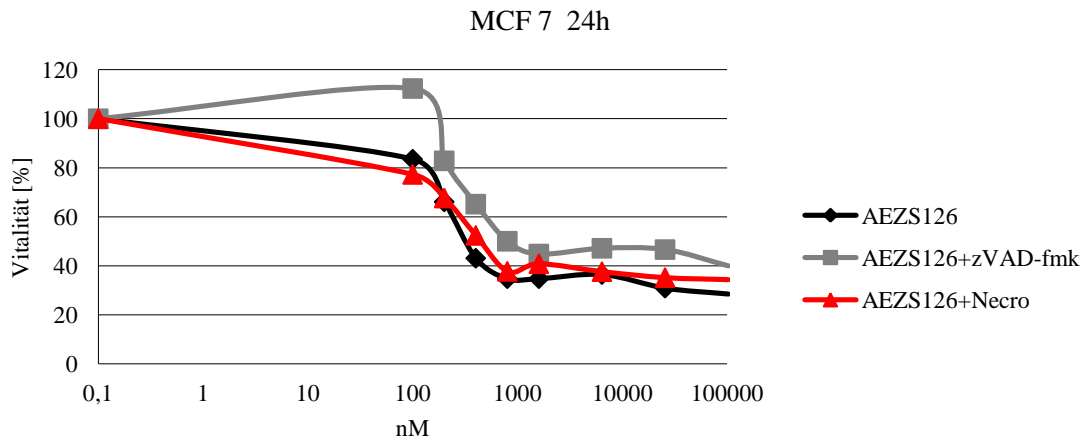
3.3.4. Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk auf die Vitalität der MCF7 Zellen

Als Modell für Brustkrebszellen, die sowohl den Östrogen- als auch den Progesteronrezeptor exprimieren, wurde die Zelllinie MCF7 verwendet. Eine Koinkubation von AEZS 126 mit Necrostatin-1 zeigte nach 24h bei den MCF7 Zellen für die gesamte Konzentrationsreihe keine deutlichen Abweichungen zur reinen Inkubation mit AEZS 126. Für die Koinkubation mit zVAD-fmk ergab sich eine konstante Vitalitätssteigerung von ca. 20% im Konzentrationsbereich zwischen 0,1nM und 800nM AEZS 126 und 10% zwischen 800nM und 102,4µM AEZS 126.

Nach 48h-stündiger-Inkubation konnte durch Kombinationsbehandlung mit AEZS 126 und Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk im Konzentrationsbereich zwischen 0,1µM und 6,4µM eine deutlich gesteigerte Überlebensrate der Tumorzellen festgestellt werden. Oberhalb einer AEZS 126 Konzentration von 6,4µM, glich sich die Vitalität der Zelllinien, die zusätzlich mit Necrostatin-1 behandelt worden waren, der Vitalität der nur mit AEZS 126 behandelten Zellen an. Bei einer Kombinationsbehandlung mit Necrostatin-1 wurde im Konzentrationsbereich von 0,1nM bis 400nM AEZS 126 eine Verminderung der Nekroptoserate um 20%, im Konzentrationsbereich von 400nM bis 6,4µM eine Verminderung der Nekroptoserate um 10% festgestellt. Für die Koinkubation mit zVAD-fmk ergab sich eine konstante Verminderung der Apoptoserate um 10% im Konzentrationsbereich von 0,1nM bis 6,4µM AEZS 126.

72h nach der Koinkubation der Tumorzellen mit Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk ergab sich für eine AEZS 126 Konzentration von 800nM bis 102,4µM keine Minderung der Nekroptose- bzw. Apoptoserate. Eine geringfügige Inhibition der Nekroptose konnte lediglich im Konzentrationsbereich von 200nM bis 800nM AEZS 126 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Inhibition der Apoptose durch die

Koinkubation mit zVAD-fmk im Konzentrationsbereich zwischen 0,1nM und 400nM AEZS 126 festgestellt werden. Der Höchstwert belief sich hier auf eine Vitalitätserhöhung um 40%.



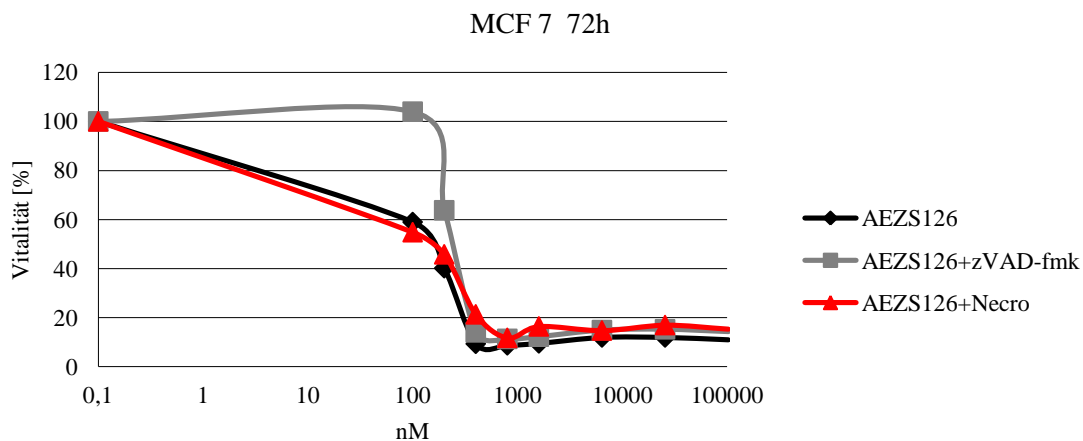


Abb. 10: Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit Necrostatin-1 bzw. zVAD-fmk erhöht die Vitalität der Tumorzellen im Bereich von 0,1nM bis 400nM. Die Zellen wurden für 24h, 48h und 72h mit AEZS 126 alleine, AEZS 126+zVAD-fmk (30µM) bzw. AEZS 126+Necrostatin-1 (50µM) inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100% Wert ist jeweils die Vitalität in unbehandelten Kontrollansätzen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.4. Zellzyklus FACS

Bei kontinuierlicher Proliferation treten Zellen nach der Zellteilung, der Mitose (M-Phase), in die Interphase ein, die aus der G0/1-Phase (gap), der S-Phase und der G2-Phase besteht. In der G0/1-Phase befinden sich die Zellen in einem diploiden Zustand, wogegen in der G2 Phase die Replikation bereits beendet ist [24]. In der S-Phase befinden sich die Zellen, mit intermediärem DNA-Gehalt, welche gerade die Synthesephase des Zellzyklus durchlaufen. Der sub G0-Peak ist ein Maß für die Apoptose während des Zellzyklus [24]. Hier findet Kondensation des Chromatins, Fragmentierung der DNA und der Kerne statt, somit ist der DNA-Gehalt reduziert und dadurch wird eine Quantifizierung der Apoptose nach Fluoreszenzmarkierung der DNA durch FACS Messung möglich [111].

So stellte sich die Frage, inwiefern und in welchen Konzentrationen AEZS 126 Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus in den untersuchten Zelllinien nimmt und inwiefern sich

die prozentuale Verteilung der Zellzyklusabschnitte verändert. Weiterhin stellte sich die Frage nach dem Ausmaß der Apoptose.

Hierfür wurden die Tumorzelllinien HCC1937, HCC1806, MDA-MB468 und MCF7 für je 48h mit den für die jeweilige Zelllinie ermittelten $0,5 IC_{50}$, IC_{50} und $5IC_{50}$ – Werten des Inhibitors AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle wurden parallel zur Inkubation mit AEZS 126 die Werte aller vier Zelllinien ohne Zusatz von AEZS 126 erhoben, als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Die Messung erfolgte nach Vorbereitung und Färbung der Tumor-Zellen mit Propidiumiodid (s.o.) Die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors AEZS 126 zeigen die Abbildungen 11, 12 und 13. Für die Zelllinie MCF7 konnte kein aussagekräftiges Diagramm erstellt werden.

In jeder FACS Messung wurde eine Zellmenge von 20000 Zellen gemessen, weshalb in diesem Versuch auf eine statistische Berechnung verzichtet wird. Jedes Experiment wurde mit mehreren unabhängig voneinander angesetzten Versuchen reproduziert, die sich in ihrer Aussage nicht unterschieden.

Die Inkubation der Tumorzelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen AEZS 126 veränderte die Verteilung im Zellzyklus. Bei den Zelllinien HCC1937, HCC1806 und MDA-MB468 traten deutliche Tendenzen hervor, die auf die Induktion von Apoptose in MDA-MB468 und auf Zellzyklusarrest in HCC1937 und HCC1806 durch AEZS 126 hinwiesen.

HCC1937

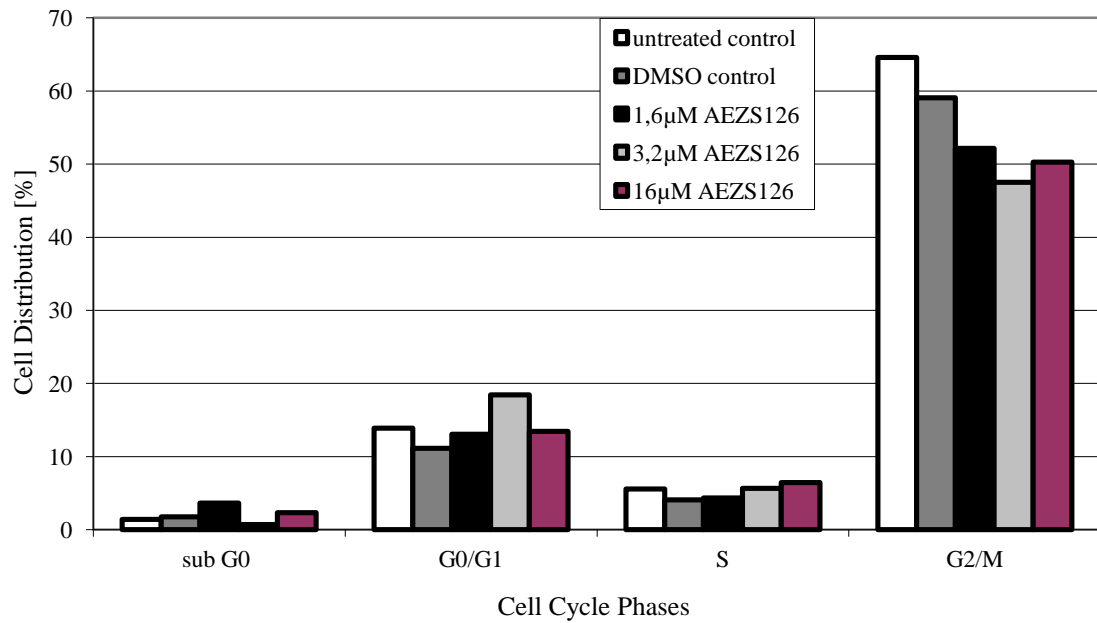


Abb. 11: AEZS 126 induziert Veränderungen im Zellzyklus in HCC1937 Zellen. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Messung mit unbehandelten Zellen, als Lösungsmittelkontrolle dienten die mit DMSO behandelten Zellen. Die für die Messung vorbereiteten Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Die Aufteilung auf die unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus wurde mittels FACS Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. In Abb. 11 ist eines von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, die sich in ihrer Aussage nicht unterscheiden.

HCC1806

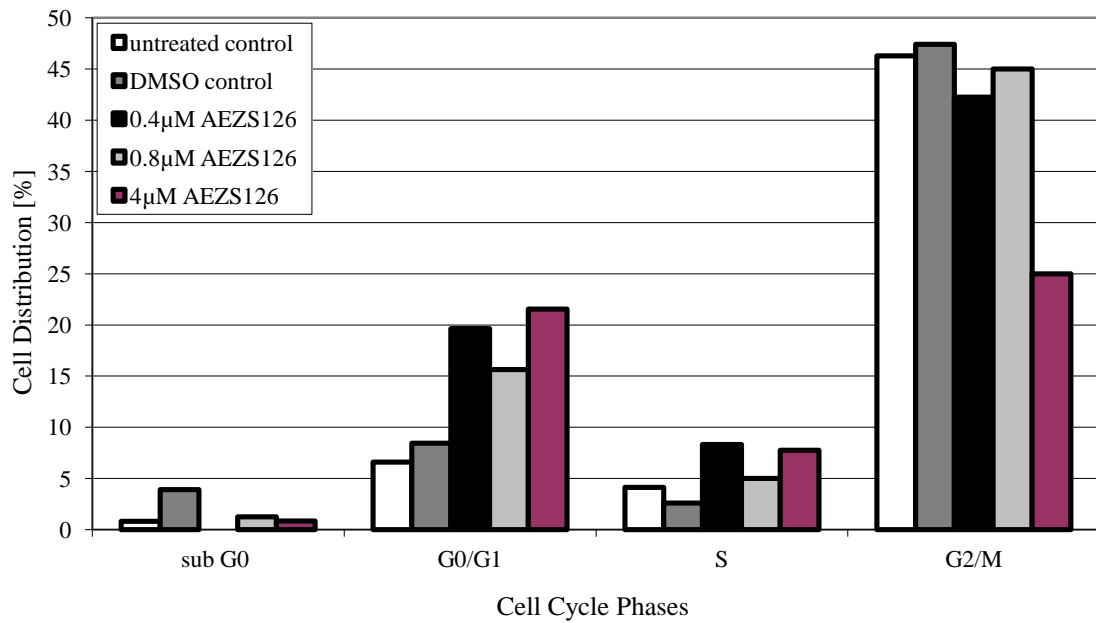


Abb. 12: AEZS 126 induziert Veränderungen im Zellzyklus in HCC1806 Zellen. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Messung mit unbehandelten Zellen, als Lösungsmittelkontrolle die mit DMSO behandelten Zellen. Die für die Messung vorbereiteten Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Die Aufteilung auf die unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus wurde mittels FACS Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. In Abb. 12 ist eines von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, die sich in ihrer Aussage nicht unterscheiden.

MDA-MB468

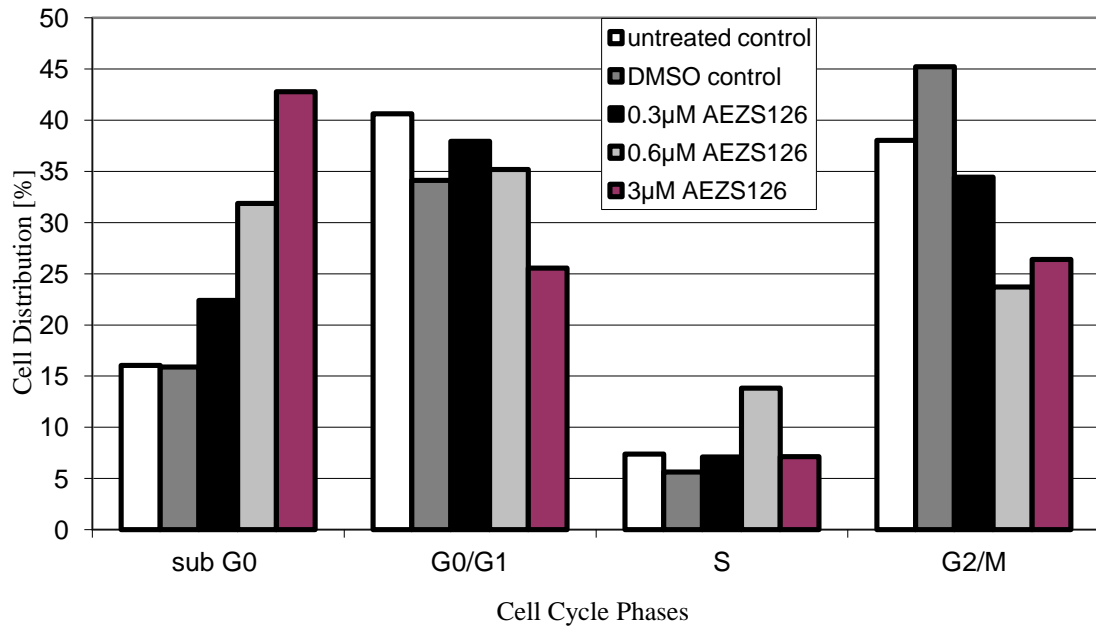


Abb. 13: AEZS 126 induziert Veränderungen im Zellzyklus in MDA-MB468 Zellen. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Messung mit unbehandelten Zellen, als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO behandelte Zellen. Die für die Messung vorbereiteten Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Die Aufteilung auf die unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus wurde mittels FACS Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. In Abb.13 ist eines von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, die sich in ihrer Aussage nicht unterscheiden.

3.5. Propidiumiodid/AnnexinV FACS

Wie im Material und Methoden Teil beschrieben, wird das Propidiumiodid/AnnexinV FACS verwendet, um zu untersuchen, welcher Anteil der mit AEZS 126 inkubierten Zellen durch frühe Apoptose oder durch Nekrose zu Grunde geht [112]. Auch hier diente als Kontrollwert die Messung mit unbehandelten Zellen. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO verwendet.

Die Zellen wurden für 48h mit dem Inhibitor AEZS 126 inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen basierten auf den für die jeweilige Zelllinie ermittelten $0,5IC_{50}$, IC_{50} und $5IC_{50}$ Werten.

In jeder FACS Messung wurde eine Zellmenge von 20000 Zellen gemessen, weshalb in diesem Versuch auf eine statistische Berechnung verzichtet wurde. Jedes Experiment wurde mit mehreren unabhängig voneinander angesetzten Versuchen reproduziert, die sich in ihrer Aussage nicht unterschieden.

Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb.14 bis Abb.17 dargestellt. Hier konnten lediglich Tendenzen ermittelt werden, die jedoch alle darauf hinweisen, dass mit erhöhter AEZS 126 Konzentration der Anteil der nekrotischen Zellen für jede der vier Zelllinien zunahm. Lediglich bei der Zelllinie MCF7 verteilte sich der Anteil der nicht mehr vitalen Zellen gleichmäßig auf den früh-apoptotischen und den nekrotischen Bereich.

3.5.1. HCC1937

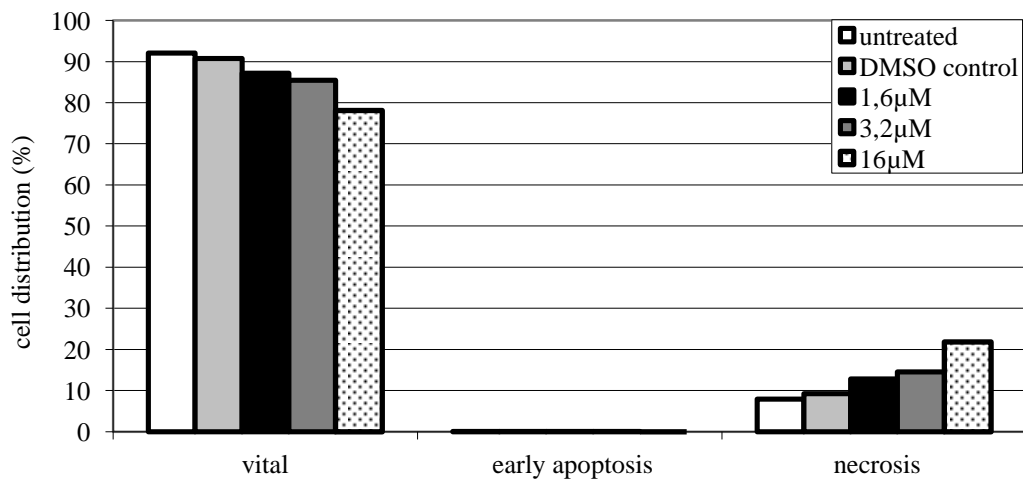


Abb. 14: AEZS 126 induziert Nekrose in der Zelllinie HCC1937. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Messung mit unbehandelten, als Lösungsmittelkontrolle die Messung mit DMSO behandelten Zellen. Die vorbereiteten Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinV gefärbt. Mittels FACS Analyse wurden die unterschiedlichen Stadien des Zelltodes ermittelt und prozentual dargestellt. Die Abbildung zeigt eines von vier unabhängigen Experimenten, die sich in ihrer Aussage nicht unterschieden.

3.5.2. HCC1806

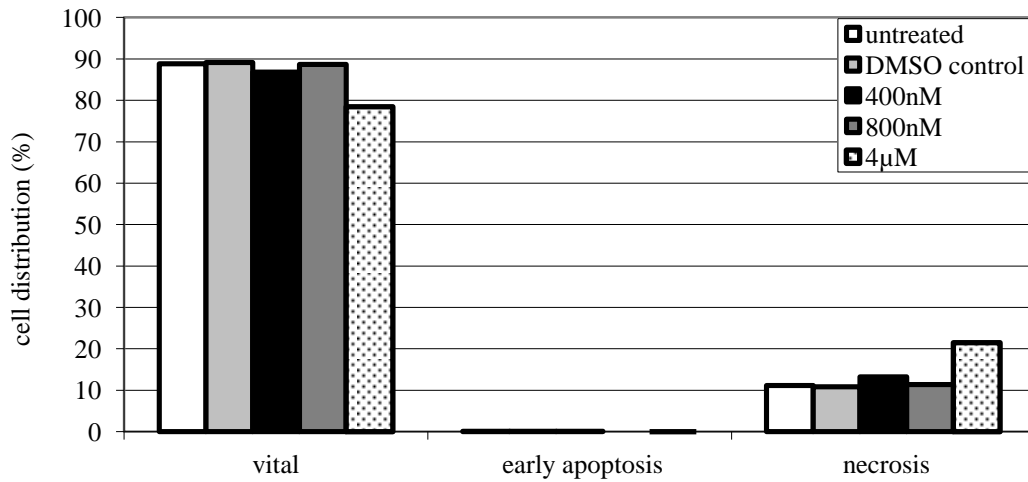


Abb. 15: AEZS 126 induziert Nekrose in der Zelllinie HCC1806. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Messung mit unbehandelten, als Lösungsmittelkontrolle die Messung mit DMSO behandelten Zellen. Die vorbereiteten Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinV gefärbt. Mittels FACS Analyse wurden die unterschiedlichen Stadien des Zelltodes ermittelt und prozentual dargestellt. Die Abbildung zeigt eines von vier unabhängigen Experimenten, die sich in ihrer Aussage nicht unterschieden.

3.5.3. MDA-MB468

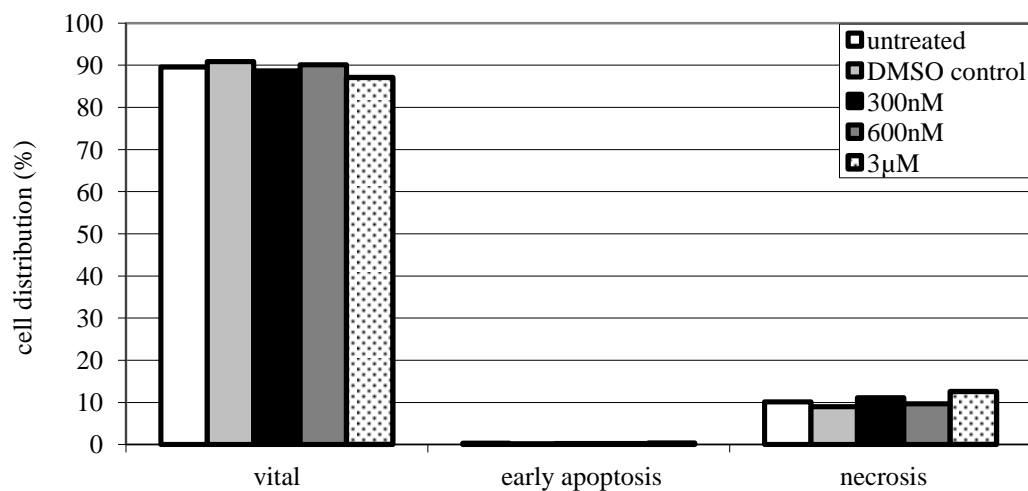


Abb. 16: AEZS 126 induziert Nekrose in der Zelllinie MDA-MB468. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Messung mit

unbehandelten, als Lösungsmittelkontrolle die Messung mit DMSO behandelten Zellen. Die vorbereiteten Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinV gefärbt. Mittels FACS Analyse wurden die unterschiedlichen Stadien des Zelltodes ermittelt und prozentual dargestellt. Die Abbildung zeigt eines von vier unabhängigen Experimenten, die sich in ihrer Aussage nicht unterschieden.

3.5.4. MCF7

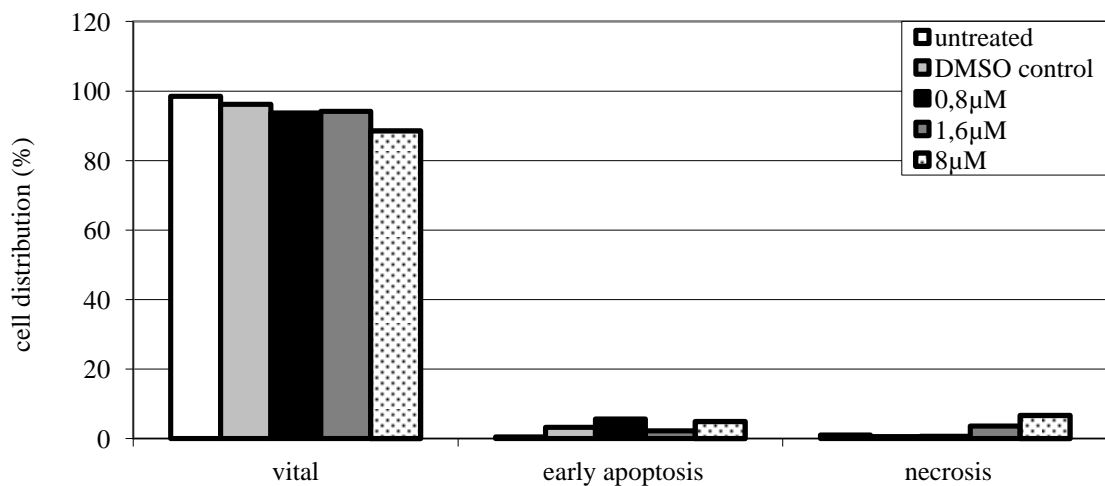


Abb. 17: AEZS 126 zeigt Tendenzen der Induktion von früher Apoptose und Nekrose in der Zelllinie MCF7. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Messung mit unbehandelten, als Lösungsmittelkontrolle die Messung mit DMSO behandelten Zellen. Die vorbereiteten Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinV gefärbt. Mittels FACS Analyse wurden die unterschiedlichen Stadien des Zelltodes ermittelt und prozentual dargestellt. Die Abbildung zeigt eines von vier unabhängigen Experimenten, die sich in ihrer Aussage nicht unterschieden.

3.6. Western Blot

Um einen genaueren Einblick in die molekularen Mechanismen von AEZS 126-vermittelter Inhibition des PI3K/AKT Signalwegs, sowie Apoptose bzw. Nekroptose-Inhibition durch zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 zu gewinnen, wurden dafür einige relevante Proteine ausgewählt und deren Expressionslevel proteinbiochemisch mittels Western Blot analysiert. Dazu wurde die jeweilige Zelllinie mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors AEZS 126 und zusätzlich die jeweilige IC₅₀ Konzentration von AEZS 126 in Kombination mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 für 48h inkubiert und die Veränderungen des Proteinexpressionslevels untersucht.

Im Einzelnen wurde mit verschiedenen spezifischen Antikörpern die Expression der zentralen Signaltransduktionsproteine pAKT, pERK-1 und pERK-2 analysiert. Zusätzlich wurde mit weiteren spezifischen Antikörpern die Kinase RIP-1, ein zentrales Molekül bei der Nekroptose, Caspase-3 als eine wichtige Effektor-Caspase und PARP, ein Substrat von Caspasen als Apoptosemarker analysiert. Als Ladungskontrolle wurde bei allen Analysen das ubiquitär exprimierte Protein β -Aktin verwendet.

3.6.1. HCC1937

Wie in Abb.18 veranschaulicht, wurde pAKT nach einer Inkubationsdauer von 48h mit steigender Konzentration von AEZS 126 verstärkt herunter reguliert. pERK1 und pERK2 verhielten sich bei der reinen Behandlung mit den drei steigenden Konzentrationen AEZS 126 analog, wobei pERK1 schwächer exprimiert war als pERK2, das Verhältnis der beiden Proteine zueinander blieb konstant.

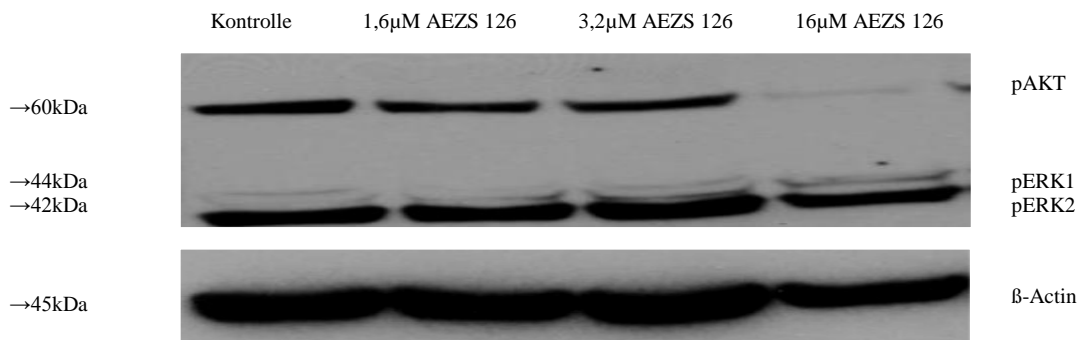


Abb. 18: Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine. Die Zellen der Zelllinie HCC1937 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von pAKT/pERK erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilo-Dalton (kDa) angegeben. β -Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

RIP-1 ist ein wichtiger Vermittler in der Nekroptose verursachenden Signaltransduktions- Maschinerie [113]. RIP-1 kann entweder über Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert werden oder durch Caspasen (insbesondere durch Caspase-7 und -8) gespalten werden [114]. In beiden Fällen wird die Nekroptose der Zelle inhibiert. Die Spaltung des Proteins ist im Blot nicht zu sehen. Der verwendete Antikörper gegen RIP-1 erkennt nur eine Bande bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 74kDa, die dem Volllängenprotein von RIP-1 entspricht. Die Proteinexpression und die damit verbundene Neigung zur Nekroptose lässt sich dennoch indirekt aus der Intensität des Signals der 74kDa Bande ablesen (Abb. 19).

Die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 bewirkte eine verstärkte Expression von RIP-1. Die Koinkubation mit AEZS 126 und zVAD-fmk bzw. AEZS 126 und Necrostatin-1 führte zu einem abgeschwächten Signal der RIP-1 Bande, woraus auf eine verringerte Nekroptoseaktivität in den Zellen geschlossen werden kann. Mit dem Caspase-3-spezifischen Antikörper wurde in HCC1937 Zellen nur das Volllängenprotein, die Pro-Caspase-3 mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 35kDa detektiert, obwohl dieser Antikörper auch die biologisch aktiven Spaltprodukte der Caspase-3 detektieren kann.

Die Spaltung des Caspasesubstrates PARP ist ein Nachweis für Apoptose. Das Auftreten des PARP Spaltproduktes (scheinbares Molekulargewicht 89kDa) neben dem Volllängenprotein PARP bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 119kDa wurde durch die Behandlung mit steigenden AEZS 126 Konzentrationen verstärkt. Bei Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit dem Multicaspaseinhibitor zVAD-fmk sowie Necrostatin-1 wurde die Spaltung von PARP inhibiert.

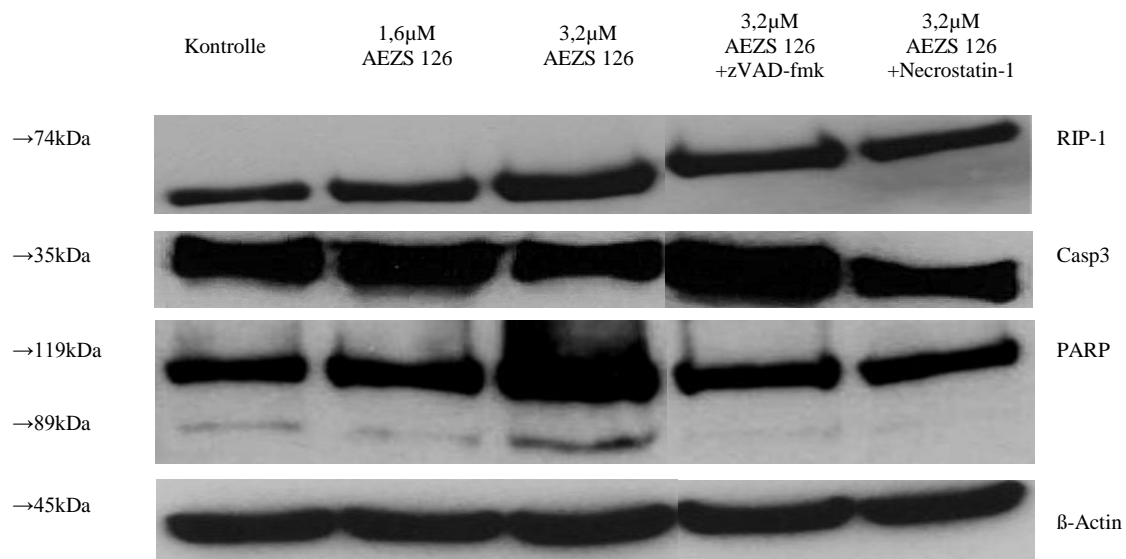


Abb. 19: Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine. Die Zellen der Zelllinie HCC1937 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 sowie mit 3,2µM AEZS 126 und 30µM zVAD-fmk bzw. 3,2µM AEZS 126 und 50µM Necrostatin-1 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von RIP-1, Caspase-3 und PARP erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilo-Dalton (kDa) angegeben. β-Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

3.6.2. HCC1806

Die Zelllinie HCC1806 zeigte ein ähnliches Verhalten wie die TNBC Zelllinie HCC1937. Nach einer leichten Verstärkung der pAKT Bande bei einer Inkubation der Zellen mit 800nM AEZS 126 wurde das Signal bei einer Inkubation mit 4 μ M AEZS 126 deutlich abgeschwächt (Abb. 20). Das gleiche Verhalten wurde bei pERK1 und pERK2 festgestellt, wobei hier ebenfalls pERK1 schwächer exprimiert wurde als pERK2. Das Verhältnis von pERK1 und pERK2 zueinander blieb weitestgehend konstant.

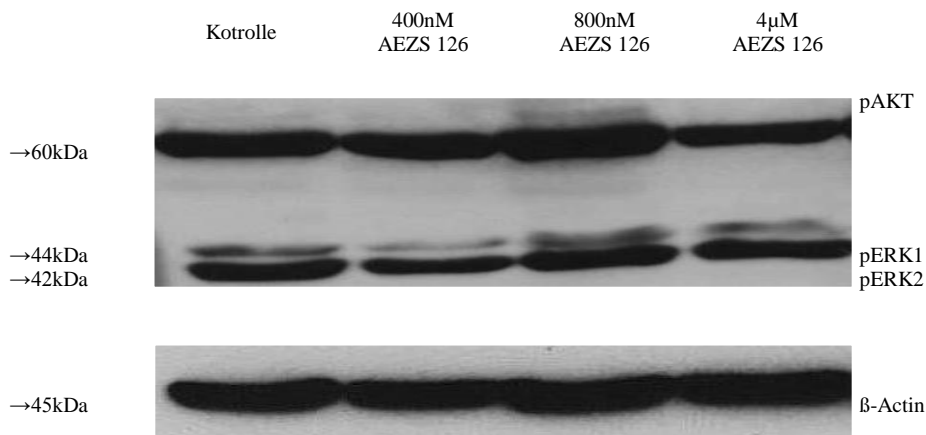


Abb. 20: Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine. Die Zellen der Zelllinie HCC1806 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von pAKT/pERK, erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilo-Dalton (kDa) angegeben. β -Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Die RIP-1 Expression in HCC1806 Zellen zeigte bei Steigerung der Konzentration von AEZS 126 eine deutliche Zunahme der Intensität (Abb. 21). Auch durch die Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 verstärkte sich die Intensität der RIP-1 Bande im Vergleich zum Kontrollansatz. Caspase-3 wurde auch in den HCC1806 Zellen nicht gespalten. Es konnte erneut nur die Procaspase-3 spezifische Bande detektiert werden. Die PARP Spaltung wurde durch steigende

Konzentrationen von AEZS 126 verstärkt. Bei der Kombinationsbehandlung von 800nM AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 wurde eine verstärkte Expression des PARP Volllängenproteins (119kDa) beobachtet. Überraschenderweise konnte bei der Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk die Spaltung von PARP nicht inhibiert werden, jedoch resultierte aus der Koinkubation von AEZS 126 mit Necrostatin-1 eine Inhibition der PARP Spaltung.

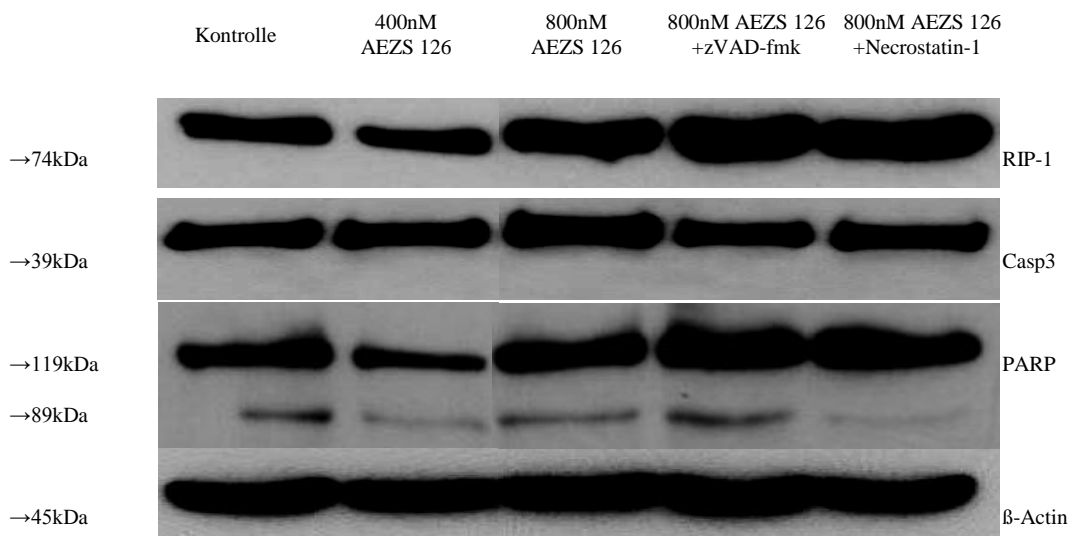


Abb. 21: Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine. Die Zellen der Zelllinie HCC1806 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 sowie mit 800nM AEZS 126 und 30µM zVAD-fmk bzw. 800nM AEZS 126 und 50µM Necrostatin-1 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von RIP-1, Caspase-3 und PARP erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilodalton (kDa) angegeben. β-Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

3.6.3. MDA-MB468

Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 rief in MDA-MB468 ein, mit der Konzentrationssteigerung von AEZS 126 schwächer werdendes Signal von pAKT hervor (Abb. 22). Der pERK1 und der pERK2 Spiegel waren bei der Inkubation

mit 600nM AEZS 126 am höchsten und fielen bei einer Behandlung mit 3µM AEZS 126 wieder ab. pERK1 war durchgehend schwächer exprimiert als pERK2, das Verhältnis von pERK1 und pERK2 zueinander blieb konstant.

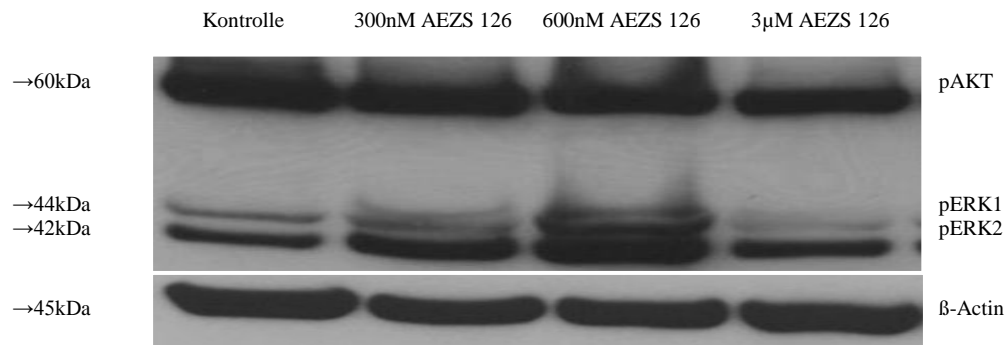


Abb. 22 Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine. Die Zellen der Zelllinie MDA-MB468 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von pAKT/pERK erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilo-Dalton (kDa) angegeben. β-Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Intensität der RIP-1 Bande wurde bei MDA-MB468 mit steigender Konzentration AEZS 126 sowie durch Koinkubation mit Necrostatin-1 schwächer. Die Nekroptoseneigung in den MDA-MB468 Zellen sank folglich bei steigenden AEZS 126 Konzentrationen (Abb. 23). Das Signal der 74kDa Bande wurde nur durch Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk verstärkt. Auch in MDA-MB468 Zellen konnte eine Caspase-3 Spaltung nicht detektiert werden. Bei der Inkubation mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 verringerte sich die PARP Spaltung. Die Koinkubation mit zVAD-fmk verstärkte die 119kDa Bande von PARP. Diese erhöhte Proteinexpression von Vollängen PARP weist auf eine Verringerung der Apoptose hin. Jedoch war es mit der in diesen Versuchen eingesetzten Konzentration von zVAD-fmk nicht möglich, die PARP-Spaltung vollständig zu inhibieren. Necrostatin-1 rief

ebenfalls eine verstärkte Proteinexpression von PARP hervor, aber neben dem Vollängenprotein wurde zugleich auch das Spaltprodukt (89kDa Fragment) induziert.

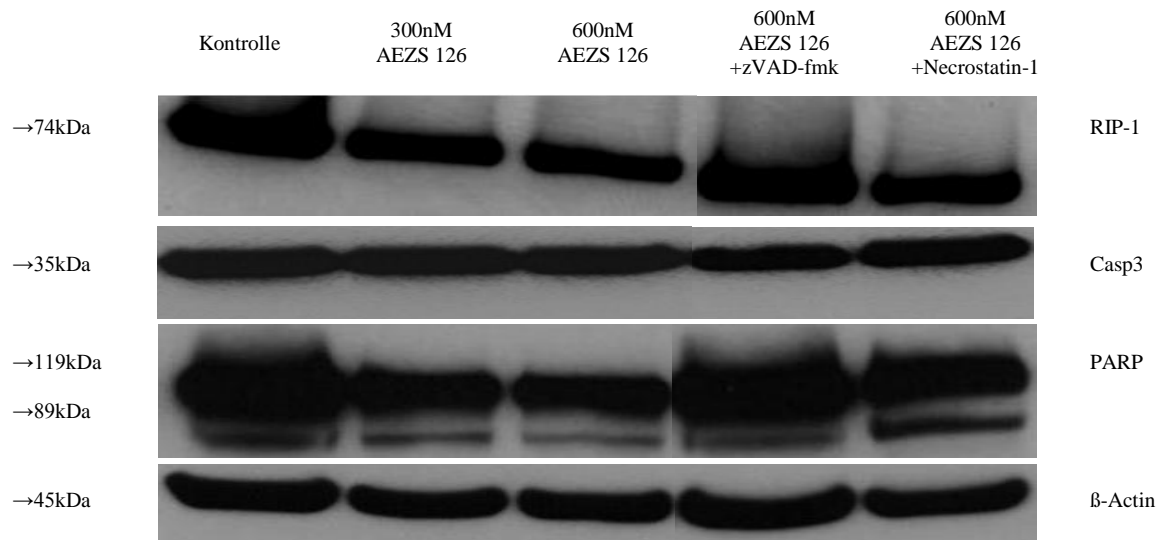


Abb. 23 Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine. Die Zellen der Zelllinie MDA-MB468 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 sowie mit 600nM AEZS 126 und 30µM zVAD-fmk bzw. 600nM AEZS 126 und 50µM Necrostatin-1 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von RIP-1, Caspase-3 und PARP erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilo-Dalton (kDa) angegeben. β-Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

3.6.4. MCF7

Der in Abb. 24 dargestellte Western Blot zeigt, dass in MCF7-Zellen das pAKT Signal bei Inkubation mit 800nM AEZS 126 zunächst stärker wurde, sich dann jedoch mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 abschwächte. Erstaunlicherweise war die Bandenintensität von pAKT selbst beim Zusatz von 8µM AEZS 126 noch stärker als in der unbehandelten Kontrolle. Die pERK1 und pERK2 Banden wurden durch die

Behandlung mit AEZS 126 stärker, das Verhältnis von pERK1 zu pERK2 war nahezu konstant.

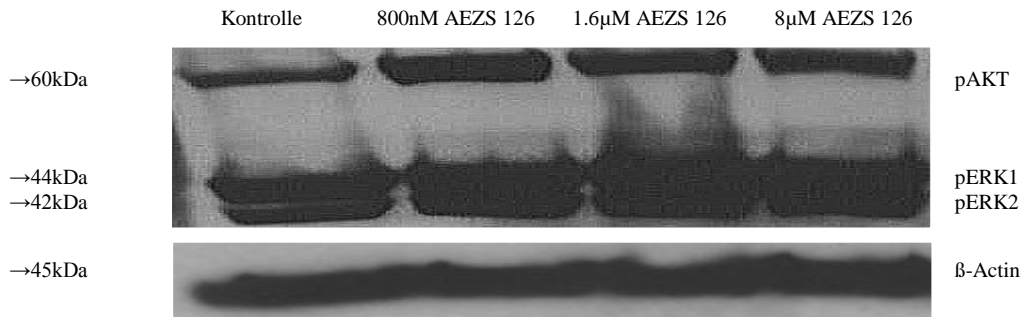


Abb. 24: Effekt der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 auf verschiedene Signaltransduktionsproteine. Die Zellen der Zelllinie MCF7 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von pAKT/pERK erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilo-Dalton (kDa) angegeben. β -Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 bewirkte eine Zunahme der Intensität des RIP-1 Signals mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 74kDa bei den MCF7-Zellen. Eine Zunahme der Bandenintensität spricht für einen verstärkten Anteil der Nekroptose am Zelltod. Durch die Inkubation der MCF7 Zellen mit AEZS 126 wurde eine PARP Spaltung induziert. Jedoch wurde die PARP Spaltung mit steigender Konzentration von AEZS 126 schwächer. Eine PARP Spaltung trat ebenfalls bei der Kombinationsbehandlung von 16µM AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf, wobei die Spaltung des Proteins in den beiden Kombinationsansätzen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 16µM AEZS 126 erhöht war. Die Zelllinie MCF7 exprimiert keine Caspase-3 [115], weswegen für dieses Protein mit dem Caspase-3 spezifischen Antikörper im Western Blot mit MCF7 Zelllysaten erwartungsgemäß kein Signal erhalten wurde.

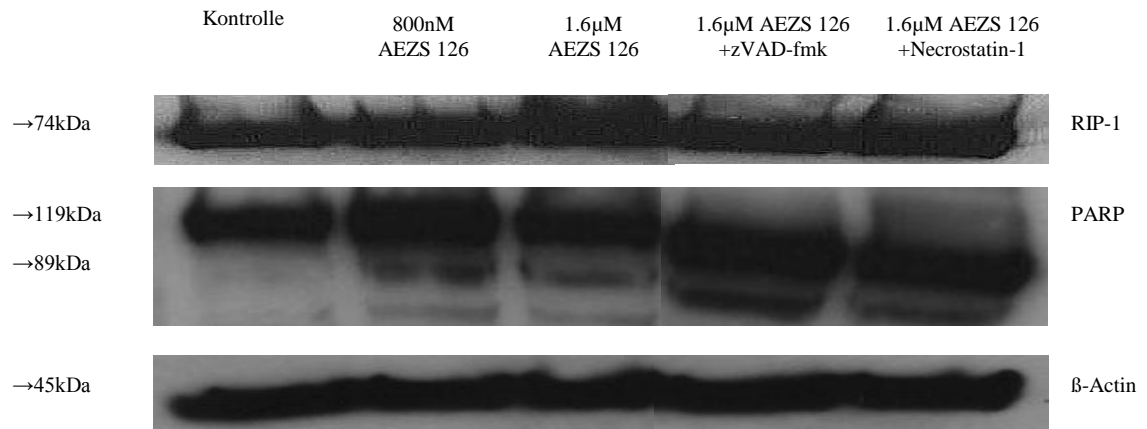


Abb. 25: Effekt der Behandlung mit AEZS 126 bzw. der Kombinationsbehandlung von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf verschiedene Regulationsproteine. Die Zellen der Zelllinie MCF7 wurden für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS 126 sowie mit 1,6µM AEZS 126 und 30µM zVAD-fmk bzw. 1,6µM AEZS 126 und 50µM Necrostatin-1 inkubiert. Die anschließende Detektion der Expressionslevel von RIP-1 und PARP erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kilo-Dalton (kDa) angegeben. β-Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen

4. Diskussion

Trotz intensiver Bemühungen, neue und verbesserte Therapieansätze für Krebserkrankungen zu finden, ist die Heilungsrate besonders bei TNBC Patienten nach wie vor gering. Schlussfolgernd besteht die Notwendigkeit, detaillierte Kenntnisse über die für Tumorgenese und Progression bedeutenden Signalwege zu gewinnen, um neue, gezielte Behandlungsmodelle zu finden. Die in der Einleitung beschriebenen möglichen Veränderungen und Fehlregulierungen des PI3K/AKT Signalweges machen diesen zu einem attraktiven Angriffspunkt in der Antitumortherapie [116]. Vielfach konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen durch Inhibition der PI3K apoptotisch werden und für Radio- und Chemotherapie sensitiviert werden können. Als potenter Inhibitor dient seit langem LY294002, ein PI3K-Inhibitor der ersten Generation sowie Wortmannin [80]. Beide Inhibitoren erwiesen sich jedoch aufgrund ihrer geringen Selektivität und ihrer schlechten Löslichkeit als ungeeignet für die klinische Anwendung [117, 118]. AEZS 126, ein Pyridopurazinderivat von der Firma AEterna Zentaris zeigte in Vorstudien mit Zellkulturmodellen für colorektales Karzinom, Adenokarzinom, Glioblastom sowie Prostata tumor eine gute Antitumorwirkung [89]. In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob AEZS 126 ebenfalls eine Wirkung auf verschiedene Subentitäten des Mammakarzinoms hat, um eine mögliche neue Therapieoption aufzuzeigen. Um die Wirkungsweise von AEZS 126 genauer zu beleuchten, wurden basale Untersuchungen zum Mechanismus des durch AEZS 126 ausgelösten Zelltodes in Zellkulturmodellen des Mammakarzinoms durchgeführt.

Dazu wurden die TNBC Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MDA-MB468 (negativ für Östrogenrezeptor und positiv für Progesteronrezeptor, Mutation im PTEN [83]) und die Brustkrebszelllinie MCF7 (exprimiert Östrogen- und Progesteronrezeptor) mit dem PI3K Inhibitor AEZS 126 behandelt und die Effekte miteinander verglichen.

4.1. Vitalität

AEZS 126 zeigte nach 48h bei allen vier Brustkrebszelllinien sehr gute antiproliferative Wirkung mit IC_{50} -Werten im Bereich zwischen $0,6\mu\text{M}$ und $3,2\mu\text{M}$. Noch deutlicher war

der Effekt nach 72h mit IC₅₀-Werten zwischen 0,2µM und 2µM ausgeprägt. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC₅₀-Werte für Brustkrebszelllinien stehen in guter Übereinstimmung mit den von AEterna Zentaris veröffentlichten Daten für die Zelllinien Hct115 und Hct116 (colorektales Karzinom), A549 (Adenokarzinom), MDA-MB468 (Mammakarzinom), U87 (Glioblastom) und PC-3 (Prostatakarzinom). In den bisher durchgeführten Untersuchungen mit AEZS 126 in oben genannten Zellkulturmodellen lagen die IC₅₀-Werte für AEZS 126 im nanomolar Bereich [89] und damit ein wenig niedriger als in den hier untersuchten Modellen des Mammakarzinoms. In ersten pharmakokinetischen *in vivo* Studien und Antitumorstudien in xenotransplantierten Mäusen mit AEZS 126, betrug die orale Bioverfügbarkeit ca. 60% und führte zu einem Plasmalevel im mikromolaren Bereich [82], also einem Bereich, in dem die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente eine gute Wirkung von AEZS 126 zeigten. Signifikante Antitumoraktivität wurde bei einer täglichen oralen Gabe von 30mg/kg Körpergewicht erreicht [89].

In ähnlichen Studien konnte gezeigt werden, dass andere Inhibitoren des PI3K/AKT Signalweges wie PX-866 (ProIX Pharmaceuticals) und das LY294002 RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) konjugierte SF1126 (Semafore Pharmaceuticals), nachgewiesenermaßen eine Aktivität gegen subkutane weichteiltransplantierte Ovarial- (OvCar3), Colon- (HT29), Lungen- (A549), Prostata- (PC3) und Brustkarzinome (MDA-MB468) sowie Glioblastom (U87MG) zeigten [119-121]. Diese Tatsache unterstützt die Behauptung, dass Inhibition des PI3K/AKT Signalweges dem Tumorwachstum entgegenwirkt.

4.2. AKT/ERK Inhibition

Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von AKT Dosis abhängig durch AEZS 126 sowohl in den Modellzelllinien des TNBC als auch in den Östrogenrezeptor-positiven Zellen inhibiert wird. Eine Ausnahme trat lediglich bei der Behandlung von HCC1806 mit 800nM AEZS 126 auf. Bei dieser Konzentration von AEZS 126 wurde eine Erhöhung des pAKT Expressionsniveaus in den HCC1806 Zellen beobachtet, die pAKT Menge wurde bei höheren Konzentrationen von AEZS 126 dann aber wieder vermindert.

Weitestgehend galt: Je höher die AEZS 126 Konzentration, desto geringer das pAKT Expressionsniveau in den verschiedenen Mammakarzinomzellen mit defizitärer Hormon Rezeptor Expression. Der pAKT Spiegel ist ausschlaggebend für die Signaltransduktion im PI3K/AKT Signalweg [62]. Er wird einerseits durch die Phosphorylierung von AKT, andererseits durch die Phosphatase PTEN, die für die Dephosphorylierung von pAKT verantwortlich ist, reguliert [122-124]. Entgleisungen beider Faktoren können wie bereits in der Einleitung dargestellt, für eine gesteigerte pAKT Konzentration in den Zellen des Mammakarzinoms verantwortlich sein. Insgesamt geht aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervor, dass das Tumorstadium durch eine Herunterregulierung von pAKT auch in Zellkulturmodellen für das Mammakarzinom inhibiert werden kann. Gleiches konnte in anderen Tumorentitäten wie dem kleinzelligen Lungenkarzinom, dem non-Hodgkin Lymphom oder dem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden [122-124]. Zusätzlich bewirkt AEZS 126 bei HCC1937 eine herunter Regulierung von pERK1 und pERK2, wobei pERK1 generell auf einem niedrigeren Niveau exprimiert wird als pERK2, sich jedoch im Verhältnis konstant mit pERK2 verändert. Betrachtet man die Veränderung in den Expressionslevels von pAKT bzw. pERK1/pERK2 bei HCC1806, verhält sich die Zelllinie bis auf einige geringfügige Abweichungen bei 800nM analog zu den HCC1937 Zellen. Bei MDA-MB468 waren die pERK1 und pERK2 Bande bei der Inkubation mit 600nM AEZS 126 verstärkt, fielen bei einer Inkubation mit 3µM AEZS 126 aber deutlich unter die Intensität der Banden, die bei einer Inkubation mit 300nM AEZS 126 beobachtet wurden. Die Expression von pERK1 war bei einer Inkubation mit 3µM AEZS 126 sogar geringer als in dem unbehandelten Kontrollansatz. Bei MCF7 bewirkte die Inkubation mit steigenden AEZS 126 Konzentrationen eine Verstärkung des Signals von pERK1 und pERK2. Zudem wurde in den MCF7 Zellen die Expression von pAKT durch Inkubation mit AEZS 126 verstärkt. Eine Dosiserhöhung von AEZS 126 bewirkte auch bei MCF7 eine Reduktion der pAKT Expression, aber selbst bei einer Konzentration von 8 µM AEZS 126 war die pAKT Bande noch stärker als in der unbehandelten Kontrolle. Somit hat AEZS 126 in den MCF7 Zellen, die sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptor exprimieren, keine so starke Wirkung wie in den Modellzelllinien des TNBC.

pERK1 bzw. pERK2 sind Mitglieder des antiapoptotischen MEK-ERK Signalweges. Die Tatsache, dass sich das pERK-Niveau durch Behandlung mit AEZS 126, einem Inhibitor des PI3K/AKT Signalweges verändert, deutet auf eine Verbindung beider Signaltransduktionswege hin. Diese Beobachtung steht in Einklang mit neuesten Studien, in denen gezeigt wurde, dass der MEK/ERK Signalweg modulierenden Einfluss auf die Signaltransduktion im PI3K/AKT/mTOR Signalweg nehmen kann [125]. Laut einer Studie von Sunayama *et al.* ist die Verbindung dieser beiden Signalwege das Protein p70S6K, eine Serin/Threonin-Kinase, die im PI3K/AKT Signalweg PIP3 und PDK1 nachgeschaltet ist und ein Angriffsziel für mTOR darstellt. Das Protein p70S6K beeinflusst also sowohl den MEK/ERK als auch den PI3K/AKT Signalweg und ist das Bindeglied der gegenseitigen Einflussnahme [126]. In weiteren Studien wurde beschrieben, dass die Aktivierung von p70S6K in die vorgeschaltete PI3K/AKT Signaltransduktion eingreift [44] und ein Schlüsselbestandteil des negativen Feedbackkreislaufes über S6K/PI3K ist [127].

4.3. Zellzyklus

Der PI3K/AKT Signalweg spielt eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und das Überleben einer Zelle [70]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass AEZS 126 den Zellzyklus in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien beeinflusst. Besonders stark ausgeprägt ist dieser Effekt bei den MDA-MB468 Zellen. Zellzyklusanalysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten für MDA-MB468 Zellen mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 eine verstärkte Ansammlung der Zellen in der subG0 Phase, der Phase, die als Maß für Apoptose gilt. Gleichermäßen verringerte sich der prozentuale Zellanteil in den drei übrigen Zellzyklusphasen, vor allem der Anteil der replizierten Zellen in der G2 Phase. In Analogie zu den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse in MDA-MB468 Zellen wurde eine deutliche Reduktion in der G2 Phase auch bei HCC1937- und HCC1806-Zellen festgestellt. Somit also verringerte sich die Anzahl von überlebenden, replizierten Zellen in Abhängigkeit von der AEZS 126 Konzentration bei allen drei TNBC-Zelllinien.

Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den von AEterna Zentaris in anderen Tumorarten erhobenen Daten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass AEZS 126 in HCT116 (colorektales Karzinom) und A549 (Adenokarzinom) Zellen Apoptose auslöst [89].

4.4. PI/AnnexinV FACS

Während mit der Zellzyklusanalyse die Quantität der Apoptose ermittelt wird, können mit dem PI/AnnexinV FACS Veränderungen in der Morphologie und Oberflächenbeschaffenheit erfasst und zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden [128]. Für HCC1937 und HCC1806 ergab sich mit steigender Konzentration von AEZS 126 eine deutliche Steigerung der späten Apoptose bzw. der programmierten Nekrose. Frühe Apoptose wurde in beiden Zelllinien nicht induziert. Daraus kann geschlossen werden, dass AEZS 126 in diesen beiden Tumorzellen sowohl Apoptose, als auch Nekrose induziert. Dafür sprechen auch die Vitalitätsuntersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Durch die Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 konnte die Vitalität in HCC1937 und HCC1806 Zellen in unterschiedlichem Ausmaß erhöht werden. Somit konnte auch in dem Proliferationsassay die Beteiligung von Apoptose und Nekroptose am Zelltod gezeigt werden. Auch bei den MCF7 Zellen wurde durch eine Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 die Vitalität erhöht. In Übereinstimmung damit wurde bei MCF7 Zellen, welche Östrogen- und Progesteronrezeptoren exprimieren, im PI/AnnexinV FACS eine Induktion der frühen Apoptose ebenso wie der Nekrose durch AEZS 126 festgestellt. In einer Studie mit entartetem Endometrium Gewebe wurde die Verteilung und die Häufigkeit der apoptoseassoziierten Proteine und ihre Korrelation mit Östrogen- und Progesteron Rezeptoren untersucht [129]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Ovarialhormone einen regulierenden Einfluss auf das Bcl-2 Protein haben und dass eine Korrelation zwischen Hormonrezeptoren und anderen Mitgliedern der Bcl-2 Familie besteht, darunter auch Bax/Bcl-x, welche Hauptkontrollpunkte der Apoptose in fortgeschrittenen Karzinomen sind [129]. Überträgt man diese Erkenntnisse allgemein auf Östrogen – und Progesteronrezeptor exprimierende Gewebe, kann vermutet werden, dass über die Bax/Bcl-x Signalkaskade durch Aktivierung der Östrogen- bzw.

Progesteronrezeptoren in den MCF7 Zellen frühe Apoptose ausgelöst werden könnte. Bei MDA-MB468 Zellen war im Gegensatz dazu in den Proliferationsassays eine Steigerung der Vitalität nur durch den Zusatz von zVAD-fmk zu AEZS 126 möglich. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass in MDA-MB468 Zellen durch AEZS 126 besonders stark Apoptose ausgelöst wird. Da zudem durch die Koinkubation von Necrostatin-1 mit AEZS 126 keine Steigerung der Vitalität erreicht werden konnte, scheint Nekrose in dieser Zelllinie keinen Beitrag zum Zelltod zu leisten. In den FACS-Analysen von MDA-MB468 Zellen mit PI/AnnexinV löst AEZS 126 jedoch Nekrose (vgl. Abb. 16) aus. Diese scheinbare Diskrepanz lässt sich damit erklären dass sowohl nekrotische als auch spät apoptotische Zellen ihre Membranintegrität verlieren. Somit ist die DNA von nekrotischen und spät apoptotischen Zellen für PI, das normalerweise von einer Zell-Penetration ausgeschlossen ist, anfärbbar. Somit sind diese Zellen anhand der Doppelfärbung mit AnnexinV und PI detektierbar. Nekrotische und spät apoptotische Zellen lassen sich bei dieser FACS-Analyse nicht unterscheiden, aber durch die oben erwähnten Proliferationsunterschiede liegt es sehr nahe, dass AEZS 126 in MDA-MB468 Zellen Apoptose induziert.

4.5. RIP/PARP Necrostatin-1/zVAD-fmk

Mittels Western Blot wurde der Einfluss von AEZS 126 auf RIP-1 und auf PARP untersucht, um Apoptose bzw. Nekroptose auch auf Proteinebene nachzuweisen.

RIP-1 ist eine der pro-nekrotischen Kinasen in der „receptor interacting protein“ (RIP) Familie und ist ein Schlüsselmediator der programmierten Nekrose [98]. Durch Necrostatin-1 (Nec-1), einem allosterischen Inhibitor, wird die Kinase-Aktivität von RIP-1 blockiert und somit die RIP-1 Aktivität inhibiert. Necrostatin-1 und seine Derivate schützen die Zelle vor Nekroptose [98]. Die Spaltung von RIP-1 in kleinere Fragmente konnte im Western Blot nicht direkt gezeigt werden, da der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen RIP-1 lediglich in der Lage ist, das Volllänge RIP-1 zu detektieren. Allerdings zeigte das Signal der 74kDa Bande von RIP-1 bei Behandlung mit unterschiedlichen AEZS 126 Konzentrationen eine Änderung

in der Intensität. Die Veränderungen in der Intensität der großen RIP-1 Bande ließen Rückschlüsse auf die Spaltung und somit Inaktivierung des Proteins zu.

PARP, eine 116kDa nukleäre poly ADP-ribose Polymerase, die sich im Zellkern befindet, ist an der Reparatur der DNA nach Stressexposition beteiligt. Das Protein kann *in vitro* durch viele ICE-like Caspasen gespalten werden und ist einer der Hauptangriffspunkte von Caspase-3 *in vivo* [101]. PARP ist essentiell für die Lebensfähigkeit einer Zelle, seine Spaltung dient zuverlässig als Apoptosemarker. Daher kann die Spaltung von PARP durch zVAD-fmk, einem Pan-Caspase-Inhibitor verhindert werden [101, 102].

In der Zelllinie HCC1937 wurde bei Inkubation mit AEZS 126 das Signal der Bande des ungespaltenen RIP-1 stärker. Genauso wurde die PARP Spaltung mit steigender Konzentration von AEZS 126 verstärkt, was sich am Signal der 89kDa Bande ablesen ließ (Abb.19). Dieser Befund spricht für eine Induktion der Apoptose durch AEZS 126. Die Induktion der RIP-1 Proteinexpression lässt vermuten, dass in den HCC1937 Zellen der nekroptotische Zelltod ebenfalls induziert wird. Durch die Koinkubation von AEZS 126 mit spezifischen Inhibitoren (zVAD-fmk in Bezug auf die PARP-Spaltung und Necrostatin-1 für RIP-1) konnten die Effekte von AEZS 126 in den HCC1937 Zellen aufgehoben werden. Somit stehen die mittels Western Blot erhaltenen Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den Resultaten aus den FACS-Analysen sowie den Ergebnissen des Kristallviolett-Assays.

Die identische Wirkung einer Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk sowie Necrostatin-1 in Bezug auf die Abschwächung der RIP-1 Bande und der Inhibition der PARP-Spaltung verdeutlicht, dass sich in den untersuchten Zellen Apoptose und Nekroptose gegenseitig beeinflussen. Dieses Phänomen wurde bereits in einer Studie von Christofferson *et al.* beschrieben [54]. Nekroptose kann durch TNF α , FasL und Trail stimuliert werden, denselben Liganden, die imstande sind Apoptose zu aktivieren. Demnach kann der Zelltod, der durch die Aktivierung von Todesrezeptoren induziert wird, durch unterschiedliche Wege exekutiert werden [54]. Weiterhin konnte in einer Studie von Lin *et al.* ein Zusammenhang zwischen RIP-1 Aktivierung und Caspase-8, einem Bestandteil des Apoptosemaschinerie hergestellt werden, Apoptose und

Nekroptose sind miteinander verknüpft und können in Zellpopulationen auch parallel ablaufen [101].

Neuere Arbeiten beschreiben zudem ein sogenanntes Ripoptosom, einen Komplex aus Caspase-8, RIP-1, FADD und cFLIP [50]. Dieser Komplex ist Tumorzell spezifisch und wird gebildet, wenn IAPs durch genotoxischen Stress oder pharmakologische Substanzen inhibiert werden. Je nach cFLIP-Art findet Nekroptose oder Apoptose statt oder aber es werden beide Zelltodesarten blockiert und somit die Tumorzelle am Leben erhalten [50, 130, 131].

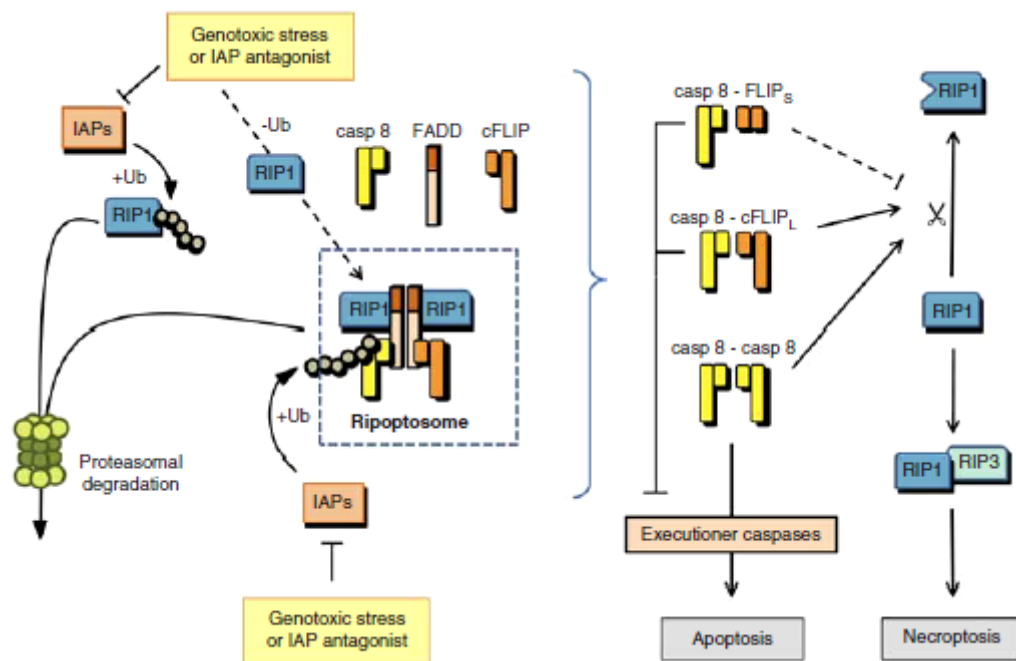


Abb. 26 Regulierung des Ripoptosom Komplexes durch IAP und cFLIP [50]

Unter normalen Bedingungen wechselwirken IAPs mit dem RIP-1 Protein, welches anschließend im Proteasom abgebaut wird. Erschöpfung oder Inhibition der IAPs durch genotoxischen Stress oder IAP Antagonisten verhindern den Abbau von RIP-1 und stimulieren die Bildung des Ripoptosom Komplexes, der Caspase-8, FADD, RIP-1 und cFLIP enthält. Dies geschieht unabhängig von der Rezeptoraktivierung auf der Zelloberfläche.

IAPs können ebenfalls direkt das Ripoptosom inaktivieren, indem sie mit einzelnen Komponenten des Ripoptosom Komplexes in Wechselwirkung treten. Die Zusammensetzung des Ripoptosom Komplexes ist ausschlaggebend für die Folgen für das Überleben der Zelle bzw. der Art des Zelltodes. Caspase-8-Homodimere im Ripoptosom aktivieren nachgeschaltete Caspasen, die den apoptotischen Signalweg in

Gang setzen. Caspase-8-cFLIP_L Heterodimere sind nicht in der Lage Apoptose zu aktivieren, die Heterodimere können aber RIP-1 spalten und Nekroptose inhibieren.

Im Gegensatz dazu sind Caspase-8-cFLIP Heterodimere inaktiv, sind also nicht in der Lage Apoptose zu aktivieren oder RIP-1 zu spalten. Dies führt zu Nekroptose

Die Zelllinie HCC1806, ebenfalls trippel negativ, zeigte bei der Koinkubation mit AEZS 126 und zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 ein ähnliches Verhalten wie die HCC1937 Zellen. Lediglich die Ausprägung der Veränderung war schwächer. Bei der Koinkubation von 4µM AEZS 126 mit zVAD-fmk entsprach das Signal von PARP und von RIP-1 in etwa dem Signal welches bei der alleinigen Inkubation mit 800nM AEZS 126 beobachtet werden konnte. In Übereinstimmung dazu konnte auch im Kristallviolettassay keine Vitalitätssteigerung bei einer Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk verzeichnet werden. Eine Koinkubation von AEZS 126 mit Necrostatin-1 zeigte im Western Blot überraschender Weise eine fast vollständige Inhibition der Spaltung des PARP Proteins ohne die Intensität der RIP-1 Bande zu verändern. In Übereinstimmung dazu zeigte sich in der Vitalitäts-Kurve beim Kristallviolett-Assay eine Vitalitätssteigerung durch die Koinkubation von AEZS 126 mit Necrostatin-1. Die Inhibition von PARP durch Necrostatin-1 könnte mit der oben erwähnten Interaktion der beiden Wege des Zelltodes zusammenhängen [132].

Für die Zelllinie MCF7 wurde im Western Blot, nach Inkubation der Zellen mit AEZS 126 alleine oder in Kombination mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1, ein vergleichbares PARP- und RIP-1-Proteinmuster beobachtet wie für die TNBC-Zelllinien HCC1937 und HCC1806.

Bei den Progesteronrezeptor-positiven MDA-MB468 Zellen wurde im Western Blot das Signal der RIP-1 Proteinande mit gesteigerter Konzentration von AEZS 126 abgeschwächt. Das Ausmaß der PARP Spaltung wurde durch steigende AEZS 126 Konzentrationen ebenfalls vermindert. Bei Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 gab es deutliche Abweichungen von den für die anderen beiden TNBC-Zelllinien HCC1937 und HCC1806 erhobenen Ergebnissen. Die

Spaltung von PARP wurde durch Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk deutlich inhibiert, eine Koinkubation von AEZS 126 mit Necrostatin-1 hingegen förderte die PARP Spaltung. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass durch eine Blockade der Nekroptose in diesen Zellen verstärkt die Apoptose ausgelöst wurde. Das Signal der RIP-1 Bande wurde durch die Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk verstärkt. Somit scheint in MDA-MB468 Zellen eine Blockade der Apoptose zu einer verstärkten Nekroptoseneigung zu führen. Eine Koinkubation von AEZS 126 mit Necrostatin-1 beeinflusste überraschenderweise die Intensität der RIP-1 Bande nicht wesentlich. Somit konnte bei den MDA-MB468 Zellen mit der hier eingesetzten Konzentration von Necrostatin-1 keine Inhibition der Nekroptose erreicht werden. Die Ergebnisse des Western Blots stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Kristallviolettassays, in denen durch Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk die Vitalität der Zellen steigt, wohingegen die Vitalität der Zellen durch Koinkubation von AEZS 126 mit Necrostatin-1 deutlich unter die Vitalität der nur mit AEZS 126 behandelten Zellen fiel. Necrostatin-1 verstärkt also den Zelltod in dieser Zelllinie.

Eine mögliche Erklärung für die Induktion der Apoptose durch Necrostatin-1 und die verstärkte Nekroptose nach zVAD-fmk Inkubation in den MDA-MB468 Zellen findet sich in einer Studie von Han *et al.*, in der beschrieben wird, dass sich die beiden Wege des programmierten Zelltodes, die Apoptose und die Nekroptose, gegenseitig beeinflussen können. Sollte die Caspase-abhängige Apoptose inhibiert oder abwesend sein, wählt die Zelle als alternativen Todesweg die Nekroptose [133]. Bei einer Inhibition des nekroptotischen Zelltodes wird als Alternative in der Zelle dann der apoptotische Zelltod initiiert [133]. Abb. 27 verdeutlicht diese Behauptung.

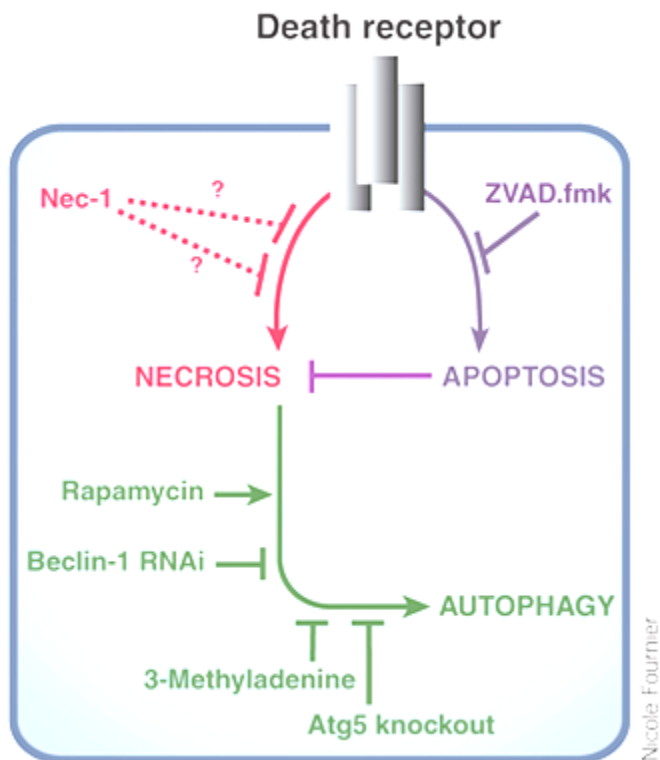


Abb. 27: Apoptose/Nekrose

Apoptose wird durch definierte zelluläre Signalwege exekutiert, wohingegen Nekrose bisher als unspezifische zelluläre Antwort auf externe Zerstörung galt. Allerdings deutet die Identifizierung eines spezifischen chemischen Inhibitors nekrotischen Zelltodes darauf hin, dass spezifische molekulare Signalwege ebenfalls Nekrose auslösen können [134].

4.6. Caspase-3 wird in HCC1937, HCC1806 und MDA-MB468 nicht gespalten

In den Zelllinien HCC1937, HCC1806 und MDA-MB468 konnte zwar Caspase-3 nachgewiesen werden, jedoch wurde in keiner der Zelllinien eine Spaltung des Enzyms beobachtet, obwohl der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen Caspase-3 in der Lage ist neben dem Procaspasen-Protein auch die Spaltprodukte der Caspase-3 zu detektieren [135]. Eine PARP Spaltung hingegen wurde bei allen drei Zelllinien detektiert, was aufgrund der bekannten Interaktion dieser beiden Proteine unerwartet ist. Aber auch in den MCF-7 Zellen, die bekannter Weise keine Caspase-3 exprimieren, [115] konnte nach Inkubation mit AEZS 126 eine Spaltung von PARP im

Western Blot detektiert werden. Somit erfolgt die im Rahmen dieser Arbeit durch AEZS 126 beobachtete Spaltung von PARP höchstwahrscheinlich in einer Caspase-3 unabhängigen Art und Weise.

In einer Studie von Jänicke *et al.* konnte gezeigt werden, dass Caspase-3 für die Spaltung wichtiger Effektor Proteine, wie PARP, Rb, PAK2, DNA-PK_{cs}, Gelsolin und DFF-45 nicht zwingend nötig ist [136]. Es existieren offensichtlich andere Caspasen, die ebenfalls in der Lage sind Effektorproteine wie z.B. PARP zu schneiden. Übereinstimmend damit wurde in einer weiteren Studie von Slee *et al.* (2001) gezeigt, dass Zellen, die keine Caspase-3 exprimieren, in der Lage sind, PARP zu spalten [114]. Diese Aufgabe wird in Abwesenheit der Caspase-3 von Caspase-7 übernommen, deren Sequenz der katalytischen Domäne zu 57% mit der katalytischen Domäne von Caspase-3 übereinstimmt. Caspase-7 ist sogar in der Lage PARP noch effizienter zu spalten als Caspase-3. Diese Erkenntnis wird durch weitere neuere Studien bestätigt, die zeigen, dass Caspase-3 und Caspase-7 ein sehr ähnliches Substratspektrum haben und sich gegenseitig ersetzen können [114, 137]. Eine PARP-Spaltung ist also auch durch Caspase-7 möglich, was erklären könnte, warum in der Zelllinie MCF7 Spaltprodukte von PARP detektiert werden konnten, ohne dass die Zellen Caspase-3 exprimieren [115].

Die Caspase-7-Aktivität wird ihrerseits durch einen Apoptosom Komplex reguliert, der über ein mitochondriales Signal induziert wird [114]. Dieser Komplex entsteht durch rasche Oligomerisierung von Apaf-1 und eine sich anschließende langsame Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase-9 zu Caspase-9, welches Bestandteil des Apoptosom Komplexes ist [138]. Dieser Apoptosom-Komplex ist wiederum in der Lage Caspase-7 zu schneiden und zu aktivieren [139].

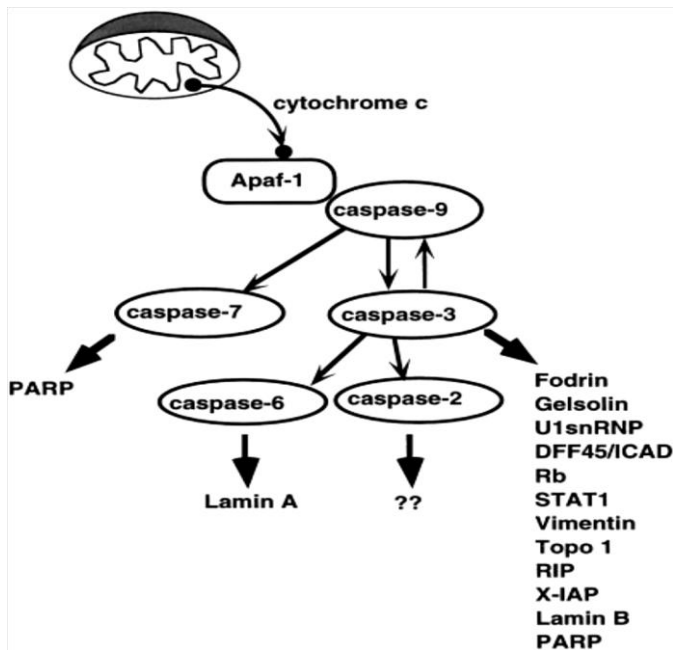


Abb. 28: Schematische Darstellung der Caspasen-Aktivierung und Caspase-ausgelöste Substrat Proteolyse im Cytochrom c/Apaf-1 Signalweg [114].

4.7. PARP Spaltung in MCF7

Im Western Blot konnte bei einer Inkubation mit dem Caspase-3-Antikörper bei den MCF7 Zellen kein Signal detektiert werden. MCF7 exprimiert wegen einer Deletion des Basenpaares 47 im Exon 3 des CASP-3-Gens keine Caspase-3. Diese Mutation hat zur Folge, dass während des splicens der pre-RNA das Exon 3 übersprungen und dabei die Translation der CASP-3 mRNA ausgelassen wird [115]. Eine Erklärung dafür, dass in MCF7 Zellen trotzdem Apoptose detektiert werden kann, liefert unter anderem eine Studie von Cregan *et al.* [140].

Die Mitochondrien sind in der Lage Caspase abhängigen sowie Caspase unabhängigen Zelltod einzuleiten [141, 142]. Beim Caspase unabhängigen Zelltod werden der Apoptose-induzierende-Faktor (AIF) und die Endonuclease G (EndoG) freigesetzt [143]. Apoptose, die durch diese beiden Vermittler ausgelöst wird, führt zur Spaltung der Todessubstrate PARP, Rb, PAK2, DANN-PKcs, Gelsolin und DFF-45 [136]. Da analog zu den Caspase-3 defizienten MCF7 Zellen auch in den anderen hier untersuchten Mammakarzinomzelllinien keine Spaltung der Caspase-3 beobachtet

werden konnte, erscheint es sehr wahrscheinlich dass durch AEZS 126 in Mammakarzinomzellen neben Nekroptose auch eine Caspase-unabhängige Apoptose induziert wird.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In den durchgeführten Versuchen konnte eine sehr gute Antitumorwirkung des Pyridopurazinderivates AEZS 126 auf die untersuchten Zelllinien HCC1937, HCC1806, MDA-MB468 und MCF7 *in vitro* gezeigt werden. Die mittels Kristallviolettassay ermittelten Vitalitätskurven ergaben IC_{50} Werte von AEZS 126 für die Mammakarzinomzellen im mikromolaren Bereich. Eine Inhibition des PI3K/AKT Signalweges konnte im Western Blot über eine verringerte Expression von pAKT mit steigenden Konzentrationen von AEZS 126 wie erwartet festgestellt werden. Mittels Zellzyklusanalysen konnte ein prozentualer Anstieg der Zellen in der G₀ Phase und ein Abfall in der G₂ Phase gezeigt werden. Somit konnte auch in der FACS-Analyse eine Apoptoseinduktion durch AEZS 126 nachgewiesen werden. Im PI/AnnexinV FACS konnte gezeigt werden, dass in den Zelllinien HCC1937, HCC1806 und MDA-MB 468 nur späte Apoptose sowie Nekrose stattfindet. In MCF7 Zellen tritt zusätzlich frühe Apoptose auf. Die Koinkubation von AEZS 126 mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 bewirkte bei HCC1937-, HCC1806- und MCF7-Zellen eine Vitalitätssteigerung und belegt die Beteiligung von Apoptose und Nekroptose am Zelltod durch AEZS 126. Dies wurde sowohl mittels Kristallviolettassay auf zellulärer Ebene als auch mittels spezifischer Markerproteine für die Apoptose bzw. Nekroptose auf proteinbiochemischer Ebene im Western Blot nachgewiesen. Sowohl die RIP-1 als auch die PARP Proteinexpression werden jeweils durch zVAD-fmk und Necrostatin-1 beeinflusst, was erneut auf eine Beteiligung sowohl von Apoptose als auch Nekroptose am Zelltod durch AEZS 126 hinweist. Bei MDA-MB468 Zellen bewirkte zVAD-fmk genau wie in den anderen Zelllinien eine Vitalitätssteigerung im Kristallviolettassay. Necrostatin-1 reduzierte erstaunlicherweise in erheblichem Maße die Vitalität in den MDA-MB468 Zellen.

All diese Daten belegen, dass AEZS 126 in Modellzelllinien für TNBC eine gute anti-Tumor Wirkung hat und den Zelltod über apoptotische und nekroptotische Signalwege vermittelt. Somit eignen sich diese Zelllinien gut für weiterführende Versuche mit AEZS 126 *in vitro*. Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit der Zelllinie MDA-MB468,

zeigen jedoch auch, dass AEZS 126 nicht in allen Subentitäten des Mammakarzinoms in gleichem Maße die gewünschte apoptotische bzw. nekroptotische Wirkung hervorruft. Hier muss vielmehr abgewogen werden ob neuen Behandlungsmöglichkeiten, wie der Behandlung mit AEZS 126, nicht herkömmliche Behandlungsmethoden gegen Tumoren, die Hormonrezeptoren auf der Oberfläche tragen, vorgezogen werden sollten.

Da die von der Firma AEterna Zentaris [89] durchgeführten *in vivo* Experimente mit xenotransplantierten Mäusen alle auf eine hervorragende Verteilung des Inhibitors im Blutplasma und eine gute Antitumorwirkung von AEZS 126 in diversen Zelllinien, wie z.B. Hct116, Hct115 (colorektales Karzinom), A549 (Adenokarzinom), MDA-MB 468 (Mammakarzinom), U87 (Glioblastom) und PC-3 (Prostatakarzinom) hindeuten, sollten solche *in vivo* Tierversuche auch mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TNBC Zellen durchgeführt werden, um die klinische Wirkung des Präparates näher zu untersuchen. Weiterhin sollte die Kombinationsbehandlung mit konventioneller Bestrahlung, sowie der klassischen hochdosierten Chemotherapie untersucht werden.

Weiterhin wurde in einer Studie von Özel *et al.* in ausgewählten Zelllinien Nebensignaleffekte zwischen RAF und AKT beschrieben. Wird AKT und somit RAF inhibiert, setzt das den RAF-1-MAPK Signalweg in Gang, was zu einer Proliferation der behandelten Tumorzellen führt [132]. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Inhibition nur eines Signalweges eventuell gar nicht die erwünschte Antitumorwirkung erbringen kann und man zukünftig ein stärkeres Gewicht auf Kombinationsbehandlungen legen sollte. Hier besteht die Wahl zwischen der Kombinationsbehandlung mit Inhibitoren anderer Signalwege oder einem weiteren Inhibitor desselben Signalweges, in unserem Fall des PI3K/AKT Signalweges, der die therapeutischen Effekte von AEZS 126 eventuell verstärken kann. Gulhati *et al.* konnten dieses Phänomen an CRC Zellen nachweisen [144]. In der Studie wurde gezeigt, dass eine Inhibition von mTORC1 durch Rapamycin (Inhibitor des PI3K/AKT Signalweges) zu einer feedback Aktivierung des PI3K/AKT- und des Ras-MAPK Signalweges und folglich zu gesteigerter Vitalität und möglicher Resistenz gegen Rapamycin führt. Kombiniert man jedoch Rapamycin mit dem Multikaspaseinhibitor Sorafenib, so hebt dieser die Rapamycin-induzierte Aktivierung der beiden Signalwege

auf. Die CRC Zellen reagieren also hoch sensitiv auf die Kombinationsbehandlung der beiden Inhibitoren [144].

Bevor jedoch eine Kombinationstherapie am Patienten erprobt werden kann, müssen sowohl im ersten Schritt *in vitro* Zellkulturversuche, als auch im zweiten Schritt *in vivo* Tierversuche an entsprechenden Modellen durchgeführt werden.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des 15. HAMBURGER SYMPOSIUMS
ÜBER TUMORMARKER (29. Mai – 31. Mai 2011, Hamburg, Deutschland)
vorgestellt:

Engel Jörg B., Schmidt Heike, Hahne Jens C, Häussler Sebastian, Diessner Joachim ,
Meyer Susanne, Wischhusen Jörg, Dietl Johannes, Hönig Arnd. Anti-tumor activity of
PI3K antagonist AEZS 126 in models of triple negative breast cancer.

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit sind zur Publikation angenommen worden:
J.C. Hahne, H. Schmidt, S. Meyer, J.B. Engel, J. Dietl und A. Hönig. Anti-tumour
activity of phosphoinositide-3-kinase antagonist AEZS 126 in models of triple negative
breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (Im Druck).

Literaturverzeichnis

1. Giersiepen, K., et al., *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Brustkrebs, Robert Koch Institut, Berlin, 2005. **25**.
2. Gesellschaft, A.R.K.-I.H.u.d. and d.e.K.i.D.e.V.H. Berlin, *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. 2010.
3. Pal, S.K., B.H. Childs, and M. Pergram, *Triple negative breast cancer: unmet medical needs*. Breast Cancer Research and Treatment 2011. **125**: p. 627-636.
4. Kabat, G., et al., *Reproductive and menstrual factors and risk of ductal carcinoma in situ of the breast in a cohort of postmenopausal women*. Cancer Causes and Control, 2011. **22**: p. 1-10.
5. Goldberg, J.I. and P.I. Borgen, *Breast cancer susceptibility testing: past, present and future*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2006. **6** p. 1205-1214.
6. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. The American Journal of Human Genetics 2003. **72**: p. 1117-1130.
7. Stratton, M.R. and N. Rahman, *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. Nature Genetics, 2008. **40**: p. 17-22.
8. Siegmund-Schultze, N., et al., *Hormontherapie und Brustkrebs: Ein Blick auf aktuelle Datenlage*. Deutsches Ärzteblatt, 2008. **105**: p. A260-A266.
9. Rakha, E.A., et al., *Prognostic markers in triple-negative breast cancer*. Cancer, 2007. **109**: p. 25-32.
10. Sarkar, S. and M. Mandal, *Growth Factor Receptors and Apoptosis Regulators: Signaling Pathways, Prognosis, Chemosensitivity and Treatment Outcomes of Breast Cancer*. Breast Cancer: Basic and Clinical Research, 2009. **3**: p. 47-60.
11. Gluz, O., et al., *Triple-negative breast cancer-current status and future directions*. Annals of Oncology, 2009. **20**: p. 1913-1927.
12. Carey, L.A., et al., *Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA, 2006. **295**: p. 2492-2502.
13. Rakha, E.A. and I.O. Ellis, *Triple-negative/basal-like breast cancer: review*. Pathology, 2009. **41**: p. 40-47.
14. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**: p. 4429-4434.
15. Dent, R., et al., *Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treat., 2009. **115**: p. 423-428.
16. Putti, T.C., et al., *Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis*. Modern Pathology, 2005 **18**: p. 26-35.
17. Bauer, K.R., et al., *Descriptive analysis of estrogen recdptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER-2 negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry*. Cancer, 2007. **109**: p. 1721-1728.
18. Carey, L.A., et al., *The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**: p. 2329-2334.
19. Harris, L.N., et al., *Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342*. Breast Cancer Research, 2006. **8**: p. R66.
20. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**: p. 8418-8423.

21. Arnedos, M., et al., *Triple-negative breast cancer: are we making headway at least?* Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2012. **4**: p. 195-210.
22. Blatt, N.B. and G.D. Glick, *Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001. **9**: p. 1371-1384.
23. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. British Journal of Cancer, 1972. **26**: p. 239-257.
24. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Vol. 6. 1998.
25. Kerr, J.F., *A personal account of events leading to the definition of the apoptosis concept*. Results and Problems in Cell Differentiation 1999. **23**: p. 1-10.
26. Levine, J.S. and J.S. Koh, *The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen and accelerant*. Seminars in nephrology, 1999. **19**: p. 34-47.
27. Laster, S.M., J.G. Wood, and L.R. Gooding, *Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis*. Journal of Immunology, 1988. **141**: p. 2629-2634.
28. Degtarev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nature Chemical Biology, 2005. **1**: p. 112-119.
29. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**: p. 770-776.
30. Green, D.R., *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors*. Cell, 2000. **102**: p. 1-4.
31. Daniel, P.T., *Dissecting the pathways to death*. Leukemia, 2000. **14**: p. 2935-2944.
32. Medema, J.P., et al., *FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)*. The EMBO Journal, 1997. **16**: p. 2794-2804.
33. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**: p. 479-489.
34. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**: p. 1309-1312.
35. Grutter, M.G., *Caspases: key players in programmed cell death*. Current Opinion in Structural Biology, 2000. **10**: p. 649-655.
36. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. **388**: p. 190-195.
37. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**: p. 1305-1308.
38. Krammer, P.H., *CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die*. Advances in Immunology, 1999. **71**: p. 163-210.
39. Kroemer, G., N. Zamzami, and S.A. Susin, *Mitochondrial control of apoptosis*. Immunology Today, 1997. **18**: p. 44-51.
40. Hirsch, T., et al., *The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death*. Oncogene, 1997. **15**: p. 1573-1581.
41. Rich, T., R.L. Allen, and A.H. Wyllie, *Defying death after DNA damage*. Nature, 2000. **407**: p. 777-783.
42. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**: p. 647-656.

43. Kuwana, T., et al., *Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane*. *Cell*, 2002. **111**: p. 331-342.
44. Harrington, L.S., et al., *The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins*. *The Journal of Cell Biology*, 2004. **166**: p. 213-223.
45. Kelekar, A. and C.B. Thompson, *Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis*. *Trends in Cell Biology*, 1998. **8**: p. 324-330.
46. Yu, J., et al., *PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells*. *Molecular Cell*, 2001. **7**: p. 673-682.
47. Bouillet, P. and A. Strasser, *BH3-only proteins - evolutionarily conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death*. *Journal of Cell Science*, 2002. **115**: p. 1567-1574.
48. Jaattela, M., *Escaping cell death: survival proteins in cancer*. *Experimental Cell Research*, 1999. **248**: p. 30-43.
49. MacLachlan, T.K. and W.S. El-Deiry, *Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**: p. 9492-9497.
50. Long, J.S. and K.M. Ryan, *New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy*. *Oncogene*, 2012. **31**: p. 5045-5060.
51. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. *Cell*, 1997. **91**: p. 231-241.
52. Parcellier, A., et al., *PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis*. *Cell Signal*, 2008. **20**: p. 21-30.
53. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**: p. 857-868.
54. Christofferson, D.E. and J. Yuan, *Necroptosis as an alternative form of programmed cell death*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010. **22**: p. 263-268.
55. He, S., et al., *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. *Cell*, 2009. **137**: p. 1100-1111.
56. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. *Nature Immunology*, 2000. **1**: p. 489-495.
57. Degterev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. *Nature Chemical Biology*, 2008. **4**: p. 313-321.
58. Festjens, N., et al., *RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die*. *Cell Death & Differentiation*, 2007. **14**: p. 400-410.
59. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway in human cancer*. *Nature*, 2002. **2**: p. 489-500.
60. Samuels, Y., et al., *Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells*. *Cancer Cell*, 2005. **7**: p. 561-573.
61. Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley, *Phosphoinositide kinases*. *Annual Review of Biochemistry*, 1998. **67**: p. 481-507.
62. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. *Science*, 2002. **296**: p. 1655-1657.
63. Katso, R., et al., *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2001. **17**: p. 615-675.
64. Hennessy, B.T., et al., *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery*. *Nature*, 2005. **4**: p. 988-1004.

65. Liu, P., et al., *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer*. Nature Reviews, 2009. **8**: p. 627-644.
66. Baselga, J., *Targeting the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer*. The Oncologist, 2011. **16**: p. 12-19.
67. Pawson, T. and P. Nash, *Protein-protein interactions define specificity in signal transduction*. Genes and Development, 2000. **14**: p. 1027-1047.
68. Chalhoub, N. and S.J. Baker, *PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer*. Annual Review of Pathology, 2009. **4**: p. 127-150.
69. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**: p. 1261-1274.
70. Cully, M., et al., *Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**: p. 184-192.
71. Calvo, E., V. Bolós, and E. Grande, *Multiple roles and therapeutic implications of Akt signaling in cancer*. OncoTargets and Therapy, 2009. **2**: p. 135-150.
72. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism* Nature Reviews Genetics, 2006. **7**: p. 606-619.
73. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 2004. **6**: p. 117-127.
74. Scheid, M.P. and J.R. Woodgett, *PKB/AKT: functional insights from genetic models*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**: p. 760-768.
75. Castaneda, C.A., et al., *The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer*. Cancer Metastasis Reviews, 2010. **29**: p. 751-759.
76. Alessi, D.R., et al., *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila D STPK61 kinase*. Current biology, 1997. **7**: p. 776-789.
77. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**: p. 1098-1101.
78. Osaki, M., M. Oshimura, and H. Ito, *PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer*. Apoptosis, 2004. **9**: p. 667-676.
79. Luo, J., B.D. Manning, and L.C. Cantley, *Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise*. Cancer Cell, 2003. **4**: p. 257-262.
80. Ghayad, S.E. and P.A. Cohen, *Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR Pathway: New Hope for Breast Cancer Patients*. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2010. **5**: p. 29-57.
81. Schnell, C.R., et al., *Effects of the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 on the tumor vasculature: implications for clinical imaging*. Cancer Research, 2008. **68**: p. 6598-6607.
82. Seipelt, I., et al., *AEZS-126, a new orally bioavailable PI3K inhibitor with antitumor effects*. Poster presentation Signaling in Disease, Signal Transduction and Drug Discovery, 2009.
83. Lehmann, B.D., et al., *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**: p. 2750-2767.
84. Tomlinson, G.E., et al., *Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier*. Cancer Research, 1998. **58**: p. 3237-3242.

85. Ahmadian, M., et al., *Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands.* Cancer Research, 1997. **57**: p. 3664-3668.
86. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.* Journal of the National Cancer Institute, 1973. **51**: p. 1409-1416.
87. Cailleau, R., M. Olivé, and Q.V. Cruciger, *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization.* In Vitro, 1978. **14**: p. 911-915.
88. Siciliano, M.J., P.E. Barker, and R. Cailleau, *Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker.* Cancer Research, 1979. **39**: p. 919-922.
89. Seipelt, I., et al., *In vitro profiling of the potent and selective PI3K inhibitor, AEZS-126.* Æterna Zentaris Presents two Posters on its PI3K Inhibitor Compound, AEZS-126, at AACR Annual Meeting 2009.
90. Durrieu, F., et al., *Caspase activation is an early event in anthracycline-induced apoptosis and allows detection of apoptotic cells before they are ingested by phagocytes.* Experimental Cell Research, 1998. **240**: p. 165-175.
91. Belloc, F., et al., *Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells.* Cytometry, 2000. **40**: p. 151-160.
92. Burgering, B.M. and P.J. Coffey, *Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction.* Nature, 1995. **376**: p. 599-602.
93. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.* Science, 1998. **282**: p. 1318-1321.
94. Charest, D.L., et al., *Molecular cloning, expression, and characterization of the human mitogen-activated protein kinase p44erk1.* Molecular and Cellular Biology, 1993. **13**: p. 4679-4690.
95. Marshall, C.J., *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.* Cell, 1995. **80**: p. 179-185.
96. Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, and E.S. Alnemri, *CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.* The Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**: p. 30761-30764.
97. Nicholson, D.W., et al., *Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.* Nature, 1995. **376**: p. 37-43.
98. Cho, Y., et al., *RIP1-Dependent and Independent Effects of Necrostatin-1 in Necrosis and T Cell Activation.* PLOS ONE, 2011. **6**: p. e23209.
99. O'Donnell, M.A., et al., *Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling.* Current Biology 2007. **17**: p. 418-424.
100. Huye, L.E., et al., *Interferon regulatory factor 7 is activated by a viral oncoprotein through RIP-dependent ubiquitination.* Molecular and Cell Biology, 2007. **27**: p. 2910-2918.
101. Satoh, M.S. and T. Lindahl, *Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair.* Nature, 1992. **356**: p. 356-358.
102. Lazebnik, Y.A., et al., *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE.* Nature, 1994. **371**: p. 346-347.

103. Nguyen, T.N., et al., *Purification and characterization of beta-actin-rich tumor cell pseudopodia: role of glycolysis*. Experimental Cell Research 2000. **258**: p. 171-183.
104. Wu, M., et al., *Acetaminophen improves protein translational signaling in aged skeletal muscle*. Rejuvenation Research, 2010. **13**: p. 571-579.
105. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
106. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V*. Journal of Immunological Methods, 1995. **184**: p. 39-51.
107. Bacso, Z., R.B. Everson, and J.F. Eliason, *The DNA of Annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented*. Cancer Research, 2000. **60**: p. 4623-4628.
108. Denecker, G., et al., *Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors*. Cellular and Molecular Life Sciences 2001. **50**: p. 356-370.
109. Faleiro, L. and Y. Lazebnik, *Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier*. The Journal of Cell Biology, 2000. **151**: p. 951-959.
110. Chang, F., et al., *Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy*. Leukemia, 2003. **17**: p. 590-603.
111. Biosciences, B., *Techniques for Immune Function Analysis, Application Handbook 1st Edition*, 2003.
112. Rieger, A.M., et al., *Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death*. Journal of Visualized Experiments, 2011. **50**: p. e2597.
113. Meylan, E. and J. Tschopp, *The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**: p. 151-159.
114. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 7320-7326.
115. Jänicke, R.U., et al., *Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis*. The Journal of Biological Chemistry 1998 **273**: p. 9357-9360.
116. Hernandez-Aya, L.F. and A.M. Gonzalez-Angulo, *Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer* The Oncologist, 2011. **16** p. 404-414.
117. Fan, Q.W., et al., *A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma*. Cancer Cell 2006. **9**: p. 341-349.
118. Garcia-Echeverria, C. and W.R. Sellers, *Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer*. Oncogene 2008. **27**: p. 5511-5526.
119. Ihle, N.T., et al., *Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling*. Molecular Cancer Therapeutics 2004. **3**: p. 763-772.
120. Ihle, N.T., et al., *The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts*. Molecular Cancer Therapeutics, 2005. **4**: p. 1349-1357.
121. Garlich, J.R., et al., *A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity*. Cancer Research, 2008. **68**: p. 206-215.
122. Zito, C.R., et al., *Multi-Level Targeting of the Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer Cells*. PLoS One, 2012. **7**: p. e31331.

123. Ramakrishnan, V., et al., *Sorafenib, a multikinase inhibitor, is effective in vitro against non-Hodgkin lymphoma and synergizes with the mTOR inhibitor rapamycin*. American Journal of Hematology, 2012. **87**: p. 277-283.
124. Lee, J.K., et al., *Effects and mechanisms of the combination of suberoylanilide hydroxamic acid and bortezomib on the anticancer property of gemcitabine in pancreatic cancer*. Pancreas, 2011. **40**: p. 966-973.
125. Ma, L., et al., *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell, 2005. **121**: p. 179-193.
126. Sunayama, J., et al., *Crosstalk Between the PI3K/mTOR and MEK/ERK Pathways Involved in the Maintenance of Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-Like Cells*. Stem Cells, 2010. **28**: p. 1930-1940.
127. Um, S.H., et al., *Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity*. Nature, 2004. **431**: p. 200-205.
128. Darzynkiewicz, Z., E. Bedner, and P. Smolewski, *Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis*. Seminars in Hematology, 2001. **38**: p. 179-193.
129. Bozdoğan, O., et al., *Apoptosis-related proteins and steroid hormone receptors in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium*. International Journal of Gynecologic Pathology, 2002. **21**: p. 375-382.
130. Feoktistova, M., et al., *cIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms*. Molecular Cell, 2011. **43**: p. 449-463.
131. Tenev, T., et al., *The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs*. Molecular Cell, 2011. **43**: p. 432-488.
132. Özel, C., et al., *Hybrid cells derived from breast epithelial cell/breast cancer cell fusion events show a differential RAF-AKT crosstalk*. Cell Communication and Signal, 2012. **10**: p. 1-12.
133. Han, J., C.Q. Zhong, and D.W. Zhang, *Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system*. Nature immunology, 2011. **12**: p. 1143-1149.
134. D., W., *Probing cell death by chemical screening*. Nature Chemical Biology, 2005. **1**: p. 68-69.
135. Engel, J.B., et al., *Effects of loboplatin as a single agent and in combination with TRAIL on the growth of triple-negative p53-mutated breast cancers in vitro*. Anti-Cancer Drugs, 2012. **23**: p. 426-436.
136. Jänicke, R.U., et al., *Caspase-3 is required for α -Fodrin Cleavage but Dispensable for Cleavage of Other Death Substrates in Apoptosis*. The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 15540-15545.
137. Boucher, D., V. Blais, and J.-B. Denault, *Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis*. PNAS, 2012. **109**: p. 5669-5674.
138. Park, H.H., *Structural features of caspase-activating complexes*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**: p. 4807-4814.
139. Twiddy, D., et al., *Caspase-7 Is Directly Activated by the ~ 700kDa Apoptosome Complex and Is Released as a Stable XIAP-Caspase-7 ~ 200kDa Complex*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**: p. 3876-3888.
140. Cregan, S.P., V.L. Dawson, and R.S. Slack, *Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death*. Oncogene, 2004. **23**: p. 2785-2796.
141. Y., T., *Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria*. Journal of Cellular Physiology, 2003. **195**: p. 158-167.

142. Zheng, T.S., et al., *Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation*. Nature Medicine, 2000. **6**: p. 1241-1247.
143. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**: p. 95-99.
144. Gulhati, P., et al., *Sorafenib enhances the therapeutic efficacy of rapamycin in colorectal cancers harboring oncogenic KRAS and PIK3CA*. Carcinogenesis, 2012. **33**: p. 1782-1790.

Danksagung

Zu besonderem Dank bin ich Prof. Dr. med. Arnd Hönig und Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Engel für die Überlassung des Themas und die fachliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit verpflichtet.

Herzlich bedanken möchte ich mich weiterhin bei Dr. rer. nat. Jens C. Hahne, der mich sowohl während des praktischen, als auch während des theoretischen Teils dieser Arbeit mit hohem zeitlichen und konstruktivem Aufwand unterstützt und dank seines fundierten Fachwissens erheblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Auch gilt großer Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „tumor progression and immune escape“ der Frauenklinik der Universität Würzburg und des Labors. Im Besonderen sind Jörg Wischhusen, Susanne Meyer, Evi Horn und Markus Junker hervorzuheben, die mir immer mit Spaß und Rat zur Seite standen.

Zuletzt ein riesen Dankeschön an alle meine Freunde und meine Familie, die mich während der gesamten Zeit auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Heike Schmidt
Geburtsdaten	29.04.1986 in Schrobenhausen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1992 – 1996	Grundschule Mühlried
1996 – 2005	Gymnasium Schrobenhausen, Abitur
2006 – 2011	Studium der Zahnmedizin an der Julius Maximilian Universität Würzburg
09/2008	Physikum , Beginn des klinischen Abschnitts
2010/2011	Staatsexamen
2012/2013	zahnärztliche Tätigkeit in Bergisch Gladbach

Freiwilliges Engagement und Ehrenamt

03/2010 – 04/2010	Ehrenamtliche Arbeit für „Zahnärzte ohne Grenzen“ in Trishuli, Nepal
09/2011 – 11/2011	Ehrenamtliche Arbeit für das „zahnärztliche Hilfsprojekt Brasilien e.V.“ in Recife, Brasilien