

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

Hemmung des PI3K-Signalweges im Ovarialkarzinom

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Antje Kurz
aus Würzburg
Würzburg, Januar 2014**



Referent: Prof. Dr. med Arnd Hönig

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. Martin Eilers

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2014

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.2	Der PI3K-AKT-Signalweg	4
1.3	Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg	10
1.4	Autophagie	11
1.5	Apoptose	13
1.6	Nekrose	15
1.7	Nekroptose	15
1.8	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	18
2.1.2	Inhibitoren	21
2.1.3	Medien und Puffer	23
2.1.4	Zelllinien	26
2.1.5	Antikörper	26
2.2	Methoden	29
2.2.1	Zellkultur	29
2.2.2	Färbungen	33
2.2.3	Western Blot	35
2.2.4	FACS-Messungen	39
3	Ergebnisse	43
3.1	Vitalitätsassay	43
3.1.1	Mittlere inhibitorische Konzentration	43
3.1.2	Effekte der Inhibitoren auf nicht proliferierende Zellen	57
3.1.3	Vitalitätsassay in Kombination mit zVAD-fmk, Necrostatin-1 und Necrox-2	62
3.2	Western-Blot	79

3.3	FACS	83
3.3.1	Zellzyklus-FACS	83
3.3.2	Apoptose-FACS	90
3.3.3	Natürliche Killer (NK)-Killing-FACS	96
4	Diskussion	100
5	Zusammenfassung und Ausblick	113
	Literaturverzeichnis	116
6	Anhang	133

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

Allgemein

Mit 4,8% der Krebserkrankungsfälle bei Frauen in Deutschland ist das Ovarialkarzinom am 5. häufigsten nach dem Mamma-, kolorektalen, Lungen- und Endometriumkarzinom. Jedes Jahr erkranken etwa 9600 Frauen in Deutschland neu an einem malignen Ovarialtumor [1]. In Deutschland nehmen die Erkrankungsfälle seit 1990 deutlich ab, aber die Sterberate liegt bei 5500 Frauen pro Jahr [1][2]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt mit 40% wesentlich höher als Anfang der 1980er-Jahre [3]. Die Prävalenz der Erkrankung nimmt vor allem in höheren Altersgruppen zu [2]. Da die Erkrankung keine spezifische Symptomatik aufweist, erfolgt die Erstdiagnose meist erst in fortgeschrittenen Stadien die gemäß der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) als Stadien IIB–IV bezeichnet werden [1]. Zu diesem Zeitpunkt hat der Tumor sich bereits im Becken ausgebreitet, Metastasen außerhalb des Beckens gebildet und/oder regionäre Lymphknoten befallen. Die FIGO-Klassifikation entspricht der Einteilung der Tumorstadien nach TNM [4].

Bei frühzeitiger Diagnose der Erkrankung mit Tumorstadien von FIGO I-IIA, bei denen der Tumor sich auf die Ovarien begrenzt, steigt die 5-Jahres-Überlebensrate auf über 80% [1][4]. Hieraus geht die Bedeutung der Früherkennung klar hervor. Eine Empfehlung für ein generelles Screening des Ovarialkarzinoms besteht derzeit aber nicht, da die Letalitätsreduktion durch ein solches Screening in bislang veröffentlichte Studien noch nicht nachgewiesen werden konnte [1]. Daher sollte auch von Nicht-Gynäkologen bei unspezifischen Symptomen, wie diffuse abdominale Beschwerden, neu aufgetretener Meteorismus, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten, unklare Gewichtsabnahme oder massive Bauchumfangszunahme, differenzialdiagnostisch das Ovarialkarzinom in Betracht gezogen werden [1]. Die Tumoren können in serös-papilläre, muzinöse (endozervix-ähnlich und intestinal), endometrioid, klarzellige, übergangszellige, plattenepitheliale sowie gemischte Karzinome eingeteilt werden [1][5].

Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms zählen das Alter, Adipositas und das polyzystische Ovarsyndrom [1]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren, wobei die Erkrankungsraten bis zum 75. Lebensjahr stetig ansteigen [2]. Eine vergleichsweise hohe Anzahl an ovulatorischen Zyklen stellen durch den Zusammenhang mit hormonellen Einflussfaktoren ein höheres Risiko für ein Ovarialkarzinom dar. Dies tritt auf bei Kinderlosigkeit, einer frühen ersten Regelblutung und einem späten Einsetzen der Menopause. Das höhere Erkrankungsrisiko bei polyzystischen Ovarien kann höchstwahrscheinlich auch auf die hormonellen Faktoren zurückgeführt werden [2].

Etwa 10% aller Ovarialkarzinome sind auf genetische Faktoren zurückzuführen. Hierbei liegen vor allem Keimbahnmutationen im BReast CAncer (BRCA)1- oder BRCA2-Gen vor [1]. Bei einer BRCA1-Mutation liegt das Erkrankungsrisiko für ein Ovarialkarzinom bei 36-46%, bei einer BRCA2-Mutation bei 10-27% [6].

Prävention

Um das Erkrankungsrisiko bei gesunden Mutationsträgerinnen zu reduzieren, kann nach abgeschlossener Familienplanung eine prophylaktische beidseitige Salpingo-Ovarektomie (PBSO) durchgeführt werden. Dies führt zu einer Risikoreduktion um 80%, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [1][6]. Nach erfolgreicher PBSO besteht jedoch weiterhin ein Risiko von etwa 4% für die Entwicklung eines primären Peritonealkarzinoms. Ontogenetisch sind die Epithelien des Peritoneums und des Ovars verwandt. Das Risiko einer malignen Entartung ist auch hier erhöht [1][7]. Eine protektive Wirkung zeigt die Einnahme von Ovulationshemmern (Reduktion der Inzidenz von 1,2 auf 0,8 pro 100 Anwender) [8]. Der Einfluss von Hormonersatztherapien auf das Risiko eines Ovarialkarzinomes wurde bisher kontrovers diskutiert [1].

Diagnostik

Zur Diagnostik und Beurteilung des Schweregrades des Ovarialkarzinoms steht als bildgebendes Verfahren die Transvaginalsonographie an erster Stelle [1]. Zur differentialdiagnostischen Abklärung eines gastrointestinalen Primärtumors können auch Computertomographie oder Kernspintomographie eingesetzt werden [9]. Ein operatives Staging ist zur Einschätzung der Operabilität allerdings unerlässlich [10].

Therapie

Entscheidend für das Überleben der Patientinnen ist eine leitliniengerechte Therapie mit dem Ziel der maximalen Tumorreduktion durch operative Maßnahmen und anschließende Chemotherapie. Voraussetzung für eine optimale Wirkung der Kombinationschemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel ist die vollständige Entfernung aller makroskopisch sichtbaren und palperten Tumorherde [1].

Prognose

Für die Prognose über den Therapieverlauf ist das Tumorstadium, das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin und der postoperative Tumorrest ausschlaggebend [1]. Patientinnen mit einem muzinösen Tumor haben eine ungünstigere Prognose als Patientinnen, die an einem serös-papillären oder endometrioiden Karzinom erkrankt sind, und sprechen schlechter auf eine konventionelle platinhaltige Kombinationschemotherapie an. Zusätzlich steigt das Risiko, an der Erkrankung zu versterben oder ein Rezidiv zu bilden, um mehr als das Doppelte [1][11].

1.2 Der PI3K-AKT-Signalweg

Allgemein

Fortgeschrittene rezidivierende maligne Tumoren in der Gynäkologie haben trotz systemischer Behandlung eine schlechte Prognose [1]. Die Antworten auf zytotoxische Chemotherapien sind meistens von kurzer Dauer, weshalb die Entwicklung wirksamerer, zielgerichteter Therapien benötigt wird [12]. Eine große Aufmerksamkeit wird in der aktuellen Forschung deshalb dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-AKT-Signalweg zuteil. Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von zellulärem Wachstum, Stoffwechselprozessen und Zellzyklusprogression von Krebszellen [13][14]. In einer Vielzahl von malignen Tumoren, einschließlich Ovarial-, Endometrium- und Gebärmutterhalskrebs, treten Abweichungen zum normalen Verlauf des PI3K-AKT-Signalweges auf, was zur Überaktivierung durch Wachstumsrezeptoren, zu Mutationen oder zur Verstärkung verschiedener Signalwege führen kann [12][15]. Zusätzlich kann es zum Funktionsverlust des Phosphatase-und-Tensin-Homologs (PTEN) kommen [16][17]. Dieses und andere wesentlich am PI3K-AKT-Signalweg beteiligte Proteine werden im Folgenden kurz dargestellt.

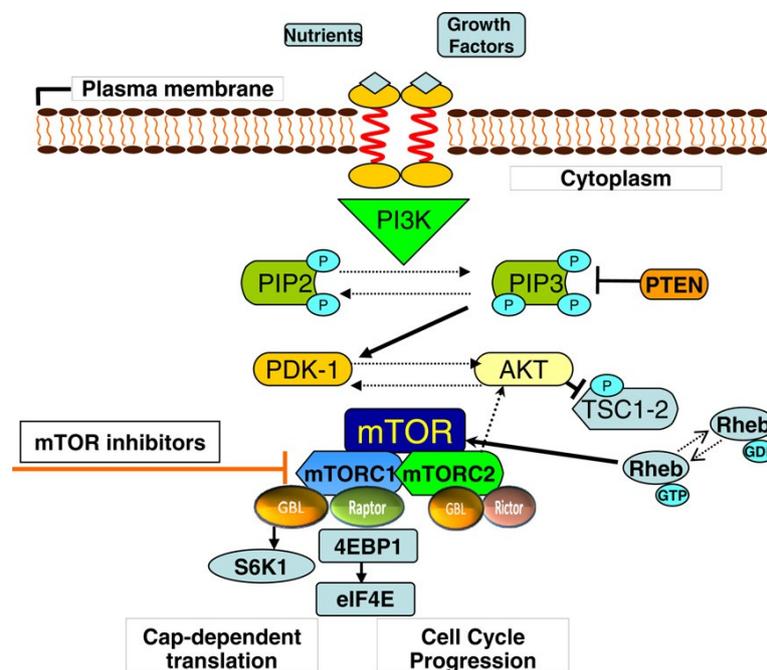


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der wesentlichen Komponenten des PI3K-AKT-Signalweges (modifiziert nach Diaz-Padilla, et al. [12])

Komponenten

PI3K gehört einer Lipid-Kinase-Familie an, die die Fähigkeit besitzt die 3'-OH-Gruppe von Inositolphospholipiden zu phosphorylieren und damit aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) den Second Messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) zu erzeugen [18]. PI3Ks sind in sämtlichen eukaryotischen Zellen vorhanden und spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Funktionen, wie Zellwachstum, Zellproliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion [19]. Die PI3Ks können in drei Klassen unterteilt werden, die sich in der Proteinstruktur der katalytischen Untereinheit unterscheiden. Klasse I-PI3Ks sind Heterodimere und bestehen aus der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110 [18][20][21].

Die Aktivierung erfolgt durch extrazelluläre Signaltransduktion über Rezeptoren mit einer intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität oder über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [15][22]. In Tumorzellen wird die Klasse I-PI3K durch Wachstumsfaktoren, die an den entsprechenden Rezeptoren gebunden haben, angeregt und hemmt auf diesem Weg den autophagischen Prozess [23]. Sie phosphorylieren Phosphatidylinositol (PtdIns), PtdIns-4-Phosphat und PtdIns-4,5-Bisphosphat [24]. Klasse II-PI3Ks haben *in vitro* eine Substrat-Spezifität für PtdIns und bilden die Produkte PtdIns-3-Phosphat und PtdIns-3,4-Bisphosphat, Klasse III-PI3Ks können hingegen Phosphatidylinositol nur zu dem Produkt PtdIns-3-Phosphat umsetzen [24]. Letzt genannte fördern im Gegensatz zu Klasse I-PI3Ks die Zytoplasma-Teilung während der Autophagie [23].

PIP₃ ist ein Inositolphospholipid, das in der Zelle in der inaktiven Form PIP₂ vorliegt. Durch Phosphorylierung wird es zu einem Second Messenger und kann so seine Funktionen ausführen. PIP₃ aktiviert nachgeschaltete Proteine, wie beispielsweise AKT im PI3K-AKT-Signalweg [18]. Reguliert wird PIP₃ durch verschiedene Phosphatasen (PTEN und SH2-enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP), welche als SHIP1 und SHIP2 vorliegen können), wobei in der Onkogenese meist PTEN beteiligt ist [18].

AKT ist die Bezeichnung der zugehörigen Gene der Proteinkinase B (PKB). So kodiert AKT1 für PKB α , AKT2 für PKB β und AKT3 für PKB γ [25]. PKB gehört in die Gruppe der Serin-Threonin-Kinasen und ist Bestandteil der eukaryotischen Zellen. PKB α und PKB γ werden in allen menschlichen Geweben gebildet, PKB β vor allem in Insulin-sensiblen Geweben [26]. AKT wechselwirkt mit den oben genannten Phospholipiden, indem es mit seiner N-terminalen Pleckstrin-Homolog-

Domäne (PH-Domäne) an PIP3 bindet und damit seine Translokation an die innere Zellmembran verursacht [25]. Hier wird es durch die Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (PDK1) an der Aminosäure Threonin(308) und durch PDK2 an Serin(473) phosphoryliert und damit aktiviert [18][25][27]. In diesem Zustand moduliert es die Funktion einer Vielzahl von Substraten, die an der Regulierung von Zellzyklusprogression, Zellwachstum und am Überleben der Zelle beteiligt sind [28]. Zusätzlich besitzt es eine zentrale Kinase-Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne [18][27]. Das Carboxy-terminale Modulator-Protein (CTMP) kann AKT binden und inaktivieren, indem es die Phosphorylierung verhindert. So können nachfolgende Signaltransduktionsschritte blockiert werden [18].

mTOR Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ist eine Serin-Threonin-Kinase, die aus 2549 Aminosäuren besteht [12][29]. Sie kann sowohl von Nährstoffen als auch von Wachstumsfaktoren stimuliert werden und ist an der Kontrolle von Zellwachstum und Zellzyklus beteiligt, indem es die Translation von Proteinen steuert [12][30]. Im PI3K-AKT-Signalweg wird mTOR direkt von AKT aktiviert und führt zur Hemmung der Autophagie [23]. Untersuchungen bei Hefen haben gezeigt, dass mTOR in den Signalwegen, die Autophagie auslösen, vor allen Autophagie-assoziierten Genen und Prozessen liegt und diese damit direkt regulieren kann [23][31][32]. Als Hemmstoff von mTOR wirkt Rapamycin. Dieses verringert nachweislich die Proliferation von malignen Gliomzellen, indem es autophagische Wege induziert [23]. In ersten klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Rapamycin eine wirksame, selektive Therapie für viele Tumorvarianten darstellt [33].

PTEN ist ein Tumor-Suppressor-Gen. Es dephosphoryliert PIP3 und hemmt damit die Klasse I-PI3K, die die Aktivität von AKT unterdrückt, und ermöglicht so das Einleiten der Autophagie [23]. Im normalen Zellzustand wird PTEN durch den Transforming Growth Factor (TGF)- β gehemmt, wodurch der Zelltod verhindert wird [34]. PTEN befindet sich auf dem Chromosom 10q23, das in verschiedenen Tumorarten fehlt oder mutiert vorliegt [23]. Mutationen führen zur durchgehenden Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges, indem mTOR als Reaktion auf Stickstoff oder Aminosäuren hochreguliert wird. Damit verhindern diese den Prozess der Autophagie, was zur unkontrollierten Zellvermehrung führt und zu Veränderungen der Transkription und Translation beiträgt [23].

Störungen

Auch in der Regulierung der Autophagie in Tumoren spielt der PI3K-AKT-Signalweg eine bedeutende Rolle [24]. AKT aktiviert die Kinase mTOR, die zur Unterdrückung der Autophagie führt [23]. Klasse I-PI3Ks, die in Tumorzellen durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden, hemmen die Autophagie, wo hingegen Klasse III-PI3Ks die Teilung des Zytoplasmas während der Autophagie fördern [24]. Auch verschiedene Rat sarcoma (Ras)-Formen sind durch Aktivierung von Klasse I-PI3Ks an der negativen Kontrolle der Autophagie beteiligt [35] und es besteht damit eine direkte Wechselwirkung zwischen den PI3K-AKT- und Ras-rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf)-MAPK/ERK-Kinase (MEK)-extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK)-Signalwegen in eukaryotischen Zellen [36].

Genomische Analysen von ovarialen Tumoren zeigen, dass gerade im PI3K-AKT-Signalweg häufig Veränderungen auftreten. Bei serösen Karzinomen liegt in 18% der Fälle PI3K mutiert vor, in 7% fehlt PTEN. Endometrioide und muzinöse Karzinome zeigen in 20% PI3K-Mutationen, klarzellige Karzinome sogar in bis zu 46%. Dies führt zur Phosphorylierung und damit zur Überaktivierung von AKT, was eine Hemmung der autophagischen Prozesse bewirkt und damit einen Wachstumsvorteil für die Tumorzellen nach sich zieht [12].

Tyrosin-Kinase-assoziierte Zelloberflächen-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln die Aktivierung der Klasse I-PI3Ks [37]. Deshalb führen dysregulierte, mutierte oder überexprimierte Zelloberflächenrezeptoren oft zu einer abweichenden PI3K-Aktivierung in einem breiten Spektrum von Krebserkrankungen [37]. Darüber hinaus werden genetische Veränderungen in der katalytischen Unter-einheit von PI3K α und PTEN und in Ras-Genen oft in menschlichen Tumoren beobachtet und führen zur Überaktivierung des PI3K-AKT-Signalweges [37]. Die Mitglieder der Klasse I-PI3Ks standen im Mittelpunkt der meisten PI3K-Untersuchungen und sind daher gut validierte therapeutische Ziele für die Intervention bei Krebs und Immunerkrankungen [37].

Zusätzlich ist bekannt, dass es bei einer Überexpression von AKT zu einer Unterdrückung der ERK-Aktivität kommt [25], was eine Hemmung der ERK-Funktionen, wie Zellzyklusprogression, Differenzierung und andere biologische Prozesse, bewirkt [38]. Erneut wird hier die direkte Wechselwirkung zwischen den PI3K-AKT- und Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegen deutlich.

Bei Ovarialkarzinomen wurden Mutationen an der PH-Domäne von AKT nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation, die einen Austausch der Aminosäure 17 Glutamin durch Lysin zeigt. Dies bewirkt eine Konformationsänderung der PH-Domäne, so dass AKT ohne das Vorhandensein von PIP3 an die

Membran binden kann und aktiviert wird [39]. Die Regulierung über die PI3K-Aktivität ist damit nicht mehr möglich. Daraus folgt eine vermehrte Aktivierung von Signalwegen, die eine anti-apoptotische Wirkung haben und die Proliferation von entarteten Zellen begünstigen.

Die Krebsbehandlung durch Chemotherapie und Gamma-Bestrahlung tötet Zielzellen in erster Linie durch die Induktion von Apoptose [28]. Gelingt es nicht, das apoptotische Programm zu aktivieren, liegt dies meistens an der Entwicklung von Resistenzen der Tumorzellen gegen die Therapie. Dies stellt ein wichtiges klinisches Problem in der Therapie von malignen Tumoren dar [28].

1.3 Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg

Die Aufklärung des Ras - Raf - MEK - ERK - Signalweges (= Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg) ist neben dem PI3K-AKT-Signalweg ein weiteres viel verfolgtes Ziel der Forschung, da auch dieser Weg in Tumorzellen häufig überaktiviert vorliegt [40]. Zudem bestehen, wie oben schon dargestellt, direkte Wechselwirkung zwischen den PI3K-AKT- und Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegen [36].

Die Aktivierung kann über verschiedene extrazelluläre Bestandteile, wie Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsmoleküle, eingeleitet werden, die über den Kontakt mit spezifischen Rezeptor-Tyrosinkinasen die Signalkaskade in Gang setzen [40].

Nach Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors [41]. Das Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundene Protein-2 (Grb2) lagert sich an und bewirkt über die Aktivierung eines Austauschfaktors die Umwandlung der Ras-GTPase vom inaktiven GDP-gebundenen in den aktiven GTP-gebundenen Zustand. Hierauf bindet Ras die Serin-Threonin-Kinase Raf und führt damit zur Aktivierung dieser Kinase, welche wiederum MEK phosphoryliert und aktiviert. Als letztes wird ERK von MEK aktiviert [40]. ERK1 und ERK2 phosphorylieren eine Reihe nukleäre und zytoplasmatische Substrate und initiieren so verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben oder Zelltod [41].

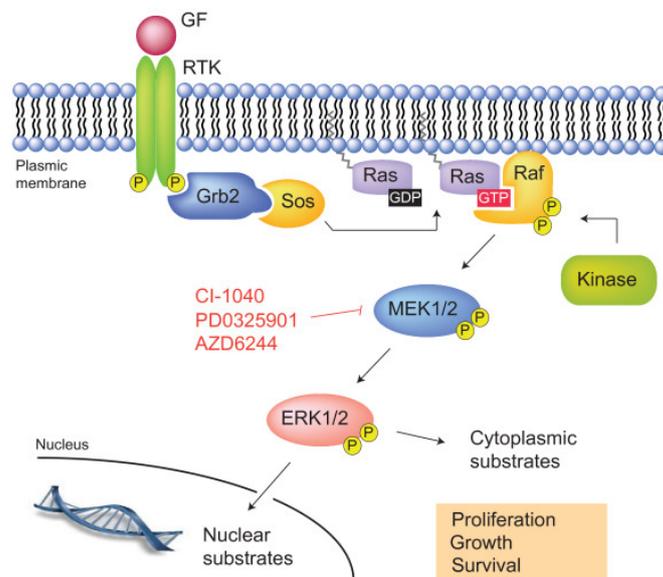


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der wesentlichen Komponenten des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges (modifiziert nach Frémin, et al. [41])

1.4 Autophagie

Autophagie ist eine Reaktion eukaryotischer Zellen auf Stress oder Nährstoffmangel, bei der es zum Abbau und Recycling von intrazellulären Organellen und Proteinen kommt [42][43]. Hierdurch entsteht ein Gleichgewicht zwischen der Produktion neuer und dem Abbau alter Zellbestandteile [44]. Zusätzlich dient die Autophagie der Immunabwehr, indem auch Viren, Bakterien und Fremdeiweiße, die sich in der Zelle anhäufen, abgebaut werden können [45][46]. Als Teil des programmierten Zelltodes kann es auch zum Absterben der Zelle führen, was der Regulierung des Wachstums vielzelliger Organismen dient [47].

Induziert wird Autophagie hauptsächlich durch den PI3K-AKT-Signalweg [23]. Zu Beginn des Prozesses werden Teile des Zytoplasmas mit intrazellulären Organellen durch eine Doppelmembranstruktur umschlossen, die sich aus verschiedenen Makromolekülen im Zytoplasma gebildet hat. Dieses so genannte Autophagosom fusioniert mit Lysosomen und bildet so ein Autolysosom, das die vorhandenen Zellbestandteile durch lysosomale Hydrolasen abbauen und wiederverwerten kann [42][43][48]. Autophagie erfolgt also entweder als Anpassungsprozess und sichert damit das Überleben der Zelle, oder es folgt der Zelltod, um übergeordneten Organismen zu dienen. Häufig tritt Autophagie auch unter pathologischen Bedingungen wie neurodegenerativen Erkrankungen oder erblichen Myopathien auf. Allerdings ist es noch nicht geklärt, ob Autophagie zu diesen Erkrankungen führt oder vor ihnen schützt [23][45].

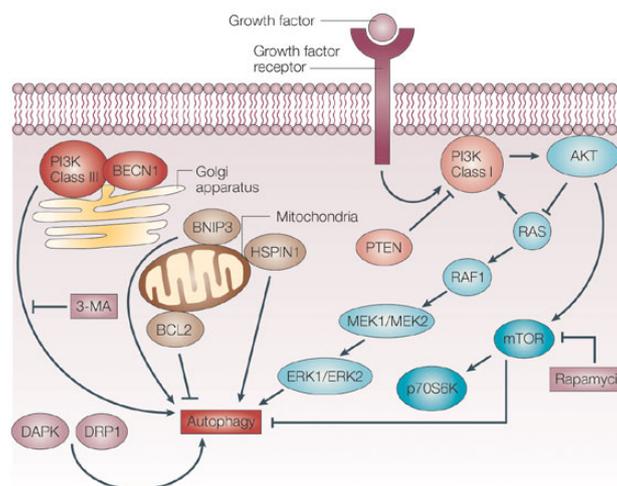


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung von Autophagie induzierenden und inhibierenden Faktoren (modifiziert nach Kondo, et al. [23])

Regulierung

Wachstumsfaktoren binden an entsprechende Rezeptoren in der Zellmembran und lösen durch Aktivierung der Klasse I-PI3K eine Signalkaskade aus, die die Zelle vor autophagischen Prozessen bewahrt. PI3K aktiviert die nachgeschaltete Kinase AKT, welche wiederum mTOR stimuliert. Dies bewirkt dann die Inhibition der Autophagie [23].

Die Überexpression von PTEN antagonisiert die Klasse I-PI3K und induziert damit den programmierten Zelltod [49]. Ras hat verschiedene Wirkungen auf die Autophagie. Stimuliert es die Klasse I-PI3K, wird sie gehemmt [50], aktiviert es aber die Raf1-MAPK, löst dies die ERK-Kaskade aus, die die Autophagie hervorruft [23][51]. Rapamycin wirkt auch Autophagie-induzierend, indem es mTOR inhibiert [23].

Ein weiterer Weg zur Induktion autophagischer Prozesse läuft am Trans-Golgi-Netzwerk über einen Klasse III-PI3K-Beclin-1 (BECN1)-Komplex. Dieser kann wiederum durch das 3-Methyladenin (3-MA) blockiert werden [23]. Auch durch das Herunterregulieren von B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) oder das Hochregulieren von Bcl-2-Adenovirus-E1B-19-kD-interagierendem Protein 3 (BNIP3) oder human homolog of the *Drosophila melanogaster* gene spinster 1 (HSpin1), die an Mitochondrien liegen, wird Autophagie eingeleitet [23][52]. Zusätzlich kann Autophagie auch durch die Zelltod-assoziierte Proteinkinase (DAPk) und das Todes-assoziiert-verwandte dynamin-related protein 1 (Drp1) induziert werden [53].

Wirkung der Autophagie in der Tumorentstehung und -progression

Bei normalem Zellzustand und in den frühen Stadien der Tumorentstehung wirkt der Prozess der Autophagie als Tumor-Suppressor. Die Mutationsrate wird verringert und beschädigte Organelle, die toxische Substanzen, wie freie Radikale, produzieren, werden entfernt [54]. Daher führt die Hemmung dieses Wirkmechanismus zu kontinuierlichem Tumorwachstum.

Nach Fortschreiten der Tumorentwicklung ist die Wirkung entgegengesetzt. Die Tumorprogression wird durch Autophagie gefördert. Dies geschieht, indem die Tumorzellen, die im Sauerstoff- und Nährstoff-armen Zentrum liegen, sich der Autophagie unterziehen, um das Überleben der umliegenden Tumorzellen zu sichern [54][55][56].

Die Expression des BECN1, das an Klasse III-PI3K bindet, führt zur Induktion der Autophagie, indem es die Bildung von Autophagosomen reguliert [23][57]. Damit kommt es zur Hemmung der Tumorentwicklung [43][58]. BECN1 fehlt nachweislich

in vielen Brustkrebs- und Ovarialkarzinomzellen [59]. In experimentellen Studien über Leberkarzinome konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Autophagie in Tumoren für Hepatozyten Entwicklungsvorteile schafft, da normale Zellen so vor dem Zelltod geschützt werden [60].

Wirkung der Autophagie in der Tumorthherapie

Durch verschiedene Tumorthapien gehen einige Krebszellen über den autophagischen Zelltod zu Grunde, andere schützen sich durch die Blockierung induzierender Signalwege vor der Therapiewirkung [23]. Dies ist ein Ansatzpunkt, um Krebstherapeutika zu verbessern. So kann auf der einen Seite die Hemmung der Autophagie, durch die gleichzeitige Aktivierung apoptotischer Prozesse, Tumorzellen auf die Behandlung sensibilisieren. Auf der anderen Seite kann die Therapie auch durch Induktion von autophagischem Zelltod wirksamer werden [23].

Tamoxifen, ein Chemotherapeutikum, das an Östrogenrezeptoren wirkt, induziert den autophagischen Zelltod bei Brustkrebszellen durch Herunterregulieren von AKT [23]. Temozolomid, ein Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Alkylierungsmittel, bewirkt die Einleitung der Autophagie, aber keine Apoptose bei malignen Gliomazellen [61]. Die Therapie mit γ -Bestrahlung führt in Krebszellen epithelialen Ursprungs zu autophagischem Zelltod [23]. In ovariellen Tumorzellen wirkt das Naturprodukt Resveratrol, ein Phytoalexin, das in Nüssen und Rotwein vorkommt, antineoplastisch und induziert hier Autophagie [23][62].

Hieraus geht die Bedeutung hervor zu erfahren, welche Krebszelltypen sich als Antwort auf die Therapie der Autophagie unterziehen und welche demgegenüber Resistenzen aufweisen. Außerdem soll klar werden, mit welchen Mechanismen die Inhibition der Autophagie auf die einzelnen Zellen wirkt: führt sie zum Zellwachstum oder zum Zelltod [23]?

1.5 Apoptose

Der apoptotische Zelltod ist im Gegensatz zum autophagischen mit der Aktivierung von Caspasen vergesellschaftet. Dies sind Enzyme mit proteolytischer Aktivität, die Cystein im aktiven Zentrum enthalten, Substrate hinter Aspartatresten spalten und eine zentrale Rolle während der Apoptose einnehmen [63][64].

Ein zusätzlicher Unterschied besteht darin, dass es bei der Autophagie zum Abbau von Golgi-Apparat, Polyribosomen und endoplasmatischem Retikulum kommt, während diese Zellbestandteile während der Apoptose verschont bleiben [23]. Über die Verbindung der beiden Prozesse ist noch nicht viel bekannt, es konnte aber ge-

zeigt werden, dass diese nicht immer getrennt voneinander ablaufen, sondern auch Überschneidungen möglich sind. So wurde beobachtet, dass die Hemmung der Apoptose autophagische Prozesse hervorruft und umgekehrt [23][65]. In Brustkrebszellen wurde beispielsweise nachgewiesen, dass bei Gabe des Chemotherapeutikums Tamoxifen einige Zellen durch Apoptose und andere durch Autophagie untergingen. Wieder andere Zellen zeigten Parameter beider Wege [23].

Die Apoptose ist eine energieverbrauchende Form des programmierten Zelltodes, die zur Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben und Organen, für immunologische Toleranz und zur Beseitigung defekter und infizierter Zellen unverzichtbar ist [66]. Sie wird durch Proteine der Bcl-2-Familie, die an den Mitochondrien wirken, streng reguliert und kann durch verschiedene Wege eingeleitet werden [67][68][69].

Der extrinsische Weg der Initiierung beginnt durch Bindung eines Liganden, wie des Tumornekrosefaktors (TNF) oder anderer Zytokine, an einen TNF-Rezeptor (= FAS/cluster of differentiation (CD)95). Dieser besitzt im zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne, an die das Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-Typ 1-assoziierte Todes-Domäne-Protein (TRADD) ankoppelt. Am TRADD bindet wiederum das Fas-assoziierte Protein mit Todes-Domäne (FADD), das mit seiner Todeseffektordomäne mit der Pro-Caspase8 einen Komplex bildet. Die Caspase8 aktiviert sich autokatalytisch und löst damit eine Caspase-Kaskade aus [63].

Der intrinsische Weg wird unabhängig von Rezeptoren durch intrazelluläre Signale, wie genotoxische Schäden der DNA oder oxidativen Stress, ausgelöst, was zur Freisetzung des Apoptose-Mediators Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma führt. Viele Chemotherapeutika können auch durch direkte Wirkung auf die Mitochondrien Cytochrom c freisetzen und so die Apoptose induzieren. Cytochrom c bindet mit deoxy-Adenosinetriphosphat (dATP) an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und löst so eine Konformationsänderung dieses Proteins aus. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und kann mit seiner Caspase-Rekrutierungs-Domäne an der Caspase 9 binden, welche sich ebenfalls autokatalytisch aktivieren kann. Dies erzeugt wiederum die Initiierung einer Caspase-Kaskade [63][66].

Nun folgt bei beiden Wegen die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die durch Proteolyse von Proteinen direkt am Abbau der Zellkernmembran und des Zytoskeletts beteiligt sind. Zusätzlich regen sie sekundäre Zielproteine, wie DNAsen an, die die genomische DNA in Fragmente zerlegen [70][71][64].

Ist der apoptotische Weg erst in Gang gesetzt, beginnt die Zelle zu schrumpfen. Anschließend zerfällt sie in kleine Vesikel, die von Makrophagen vernichtet werden

können, ohne dass eine Entzündung entsteht [68][71][72].

Nachzuweisende Merkmale der Apoptose sind die Schrumpfung der betroffenen Zelle bei anfangs intakter Zellmembran, die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung der DNA, eine erhöhte Aktivität von Endonukleasen, Bläschenbildung in der Zellmembran und schließlich die Abschnürung von apoptotic bodies. Dies sind membranbegrenzte Vesikel, die DNA-Fragmente und Teile der Zellmembran beinhalten [68][69].

1.6 Nekrose

Während sich bei der Apoptose ein vorprogrammierter Prozess abspielt, geht der nekrotische Zelltod aus einer akuten, irreversiblen Verletzung der Zelle hervor. Diese kann durch extreme thermische Veränderungen, Sauerstoffmangel, toxische Substanzen oder eine Virusinfektion der Zelle verursacht werden [69]. Die Plasmamembran kann ihre selektive Permeabilität zum extrazellulären Raum nicht mehr aufrecht erhalten, wodurch der osmotische Gradient zum Flüssigkeitseinstrom führt [69].

Durch das Anschwellen der Zelle kommt es zur Auflösung des Zellkerns und zur Zerstörung der Plasmamembran, was zum Austritt von Zytoplasma und Zellbestandteilen in den extrazellulären Raum führt. Hierauf kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die die Aktivität von Makrophagen initiiert [71][72].

1.7 Nekroptose

Die Nekroptose ist eine programmierte Form des Zelltodes, die sowohl nekrotische, als auch apoptotische Merkmale beinhaltet [73]. So konnte in Studien festgestellt werden, dass der nekrotische Zelltod entweder durch Bindung des TNF-Rezeptors ausgelöst werden kann, oder auch durch Caspase-Hemmung [74]. Die Nekroptose wird durch die Rezeptor-interagierende Serin-Threonin-Proteinkinase-1 (RIP1) ausgelöst und diese wiederum durch die Caspase 8 reguliert [73][75]. Die Aktivierung erfolgt wie bei der Apoptose über den Todesrezeptor. Anschließend schnüren sich Vesikel mit Zytosol und Zellbestandteilen vom Golgi-Apparat und vom Endoplasmatischen Retikulum ab und fusionieren mit Lysosomen, was zum Abbau der enthaltenen Proteine führt [72]. Da die Caspase8 die Aktivität von RIP1 hemmt, folgt daraus, dass sie als Nekroptose-Inhibitor und Apoptose-Initiator agiert. In Krebszellen wird häufig durch Inaktivierung dieser Caspase die Apoptose unterdrückt, woraufhin die gezielte Induktion der Nekroptose eine Behandlungsmöglichkeit für Apoptose-resistente Krebszellen darstellt [72]. Ein wichtiges Ziel besteht daher in der

Aufklärung der Signalwege und Wirkmechanismen der Nekroptose. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Schlüsselenzyme Einfluss auf den Ablauf des nekrotischen Prozesses haben. Dazu gehören die schon genannte Proteinkinase RIP1, Cyclophilin D, welches eine mitochondriale Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase ist, die zum sogenannten Permeabilitäts-Transitions-Poren-Komplex (PTPC) beiträgt, die Poly(-ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) und der Apoptose-induzierende Faktor (AIF). RIP1 ist verantwortlich für den Nekroptoseweg über den Todes-Rezeptor und den nekrotischen Zelltod nach Hemmung der Caspasen [73][76]. Mäuse ohne Cyclophilin D sind widerstandsfähiger gegen kardialen und zerebralen Zelltod durch Ischämien [77], PARP-1 ist ein DNA-Reparatur-Protein, das bei Überaktivierung die Initiierung der Nekrose durch Alkylierung von DNA-Schäden hervorruft [78] und AIF zeigt neuroprotektive Wirkung bei Ischämien [73]. Diese Proteine beeinflussen sich auch gegenseitig, so fördert RIP1 z.B. den PTPC-abhängigen mitochondrialen Übergang der Permeabilität [79], PARP-1 stimuliert die Freisetzung von AIF und der Abbau der DNA, der durch AIF induziert wird, stimuliert wiederum PARP-1 [73][80]. Es besteht die Möglichkeit, dass der Funktionsverlust der Mitochondrien durch einen intrazellulären Adenosintriphosphat (ATP)-Abfall, der zum Ausgleich zu einer Überaktivierung von PARP-1 führt, den letzten Schritt der programmierten Nekrose darstellt [73].

Das Protein Bcl-2-modifizierender Faktor (BMF), das in gesunden Zellen als Teil des Zytoskeletts vorliegt, wurde als Bestandteil des Nekroptose-Prozesses identifiziert. Bei zellulärem Stress, kann BMF freigesetzt werden und es kommt so zur Wechselwirkung mit den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) [73][81].

Die Klärung der genauen Wirkmechanismen der programmierten Nekrose und der Zusammenhänge zwischen Apoptose und Nekrose könnten große therapeutische Auswirkungen haben. So könnten Entzündungen und damit sekundäre Gewebeschäden durch die gezielte Hemmung von Nekrose vermindert werden. Andererseits könnten Apoptose-resistente Krebszellen durch Einleitung des nekrotischen Zelltodes vernichtet werden [73].

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Nach der oben dargestellten herausragenden Bedeutung des PI3K-AKT-Signalweges in Tumoren wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Effizienz eines neuen AKT-Inhibitors, AEZS-126 (freundlicherweise von AEterna Zentaris (Frankfurt) zur Verfügung gestellt), in verschiedenen Zellkulturmodellen des Ovarialkarzinoms untersucht. AEZS-126 zeigte in bisherigen Untersuchungen eine hohe Wirksamkeit in humanen Mammakarzinom- (MDA-MB468), Glioblastom- (U87), Kolonkarzinom- (Hct116), Prostatakarzinom- (PC-3) und Lungenkarzinom-Zelllinien (A549) [82]. Auf Grund dieser vielversprechenden Antitumor-Aktivität gegenüber den genannten Zelllinien sollte untersucht werden, inwiefern AEZS-126 auf Zelllinien des Ovarialkarzinoms antiproliferative Effekte zeigt. Der Inhibitor wurde sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin *in vitro* untersucht. Durch die Kombinationstherapie wurde eine erhöhte Wirksamkeit der Inhibitoren im Vergleich zur Monotherapie erwartet, da schon in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass durch einzelne Wirkstoffe, die an unterschiedlichen Stellen des PI3K-AKT-Signalweges angreifen, synergistische Effekte auftreten können, die die Zellproliferation in erhöhtem Maße beeinträchtigen können [83]. Dabei wurde insbesondere auch der durch AEZS-126 ausgelöste Zelltod in Ovarialkarzinom-Zelllinien mechanistisch untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

PBS ist eine phosphatgepufferte Salzlösung und wurde für die Zellkultur als sterile Lösung von PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen. Die Pufferlösung enthält 137mM Natriumchlorid, 2,7mM Kaliumchlorid und 12mM Gesamt-Phosphat [84]. Der pH-Wert der eingestellten Pufferlösung ist 7,4. Durch die verschiedenen Salze besitzt die Lösung den osmotischen Druck des menschlichen Organismus. Die Lösung wird zum Ablösen von toten Zellen und Zellresten und somit zur Reinigung von Zellkulturen verwendet.

Trypsin

Trypsin ist eine Protease, die als inaktive Zymogen-Vorstufe vom Pankreas abgesondert wird. In der Zellkultur wird es verwendet, um adhärenente Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Bei zellspezifischer Anwendungsdauer werden nur die extrazellulären Proteine gespalten, ohne die Zelle zu schädigen. Die sterile Trypsin-Lösung wurde von PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen.

Fetales Kälberserum (FCS)

FCS (von der englische Bezeichnung fetal calf serum) ist fetales Kälberserum. Dieses enthält eine Vielzahl von Proteinen, unter anderem Wachstumsfaktoren, die zur Zellkultivierung notwendig sind, und bietet Schutz vor Frostschäden beim Einfrieren von Zellen. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete FCS wurde von Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen.

Penicillin / Streptomycin (P/S)

Penicillin / Streptomycin ist ein Antibiotikagemisch, das Verunreinigungen von Zellkulturen mit Bakterien verhindert. Penicillin ist ein biosynthetisches Beta-Laktam-Antibiotikum aus *Penicillium chrysogenum*. Es wirkt vorwiegend auf Gram-positive Bakterien, indem es den letzten Schritt der Zellwandsynthese, die Verknüpfung von Peptidoglycansträngen durch irreversible Interaktion mit der Transpeptidase verhindert. Streptomycin-Sulfat ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum aus *Streptomyces griseus* und wirkt auf Gram-negative Bakterien und Mykobakterien, indem es die Initiation der Proteinbiosynthese blockiert [85]. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete sterile Penicillin/Streptomycin-Gemisch wurde von PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen.

Natriumpyruvat

Pyruvat ist das Anion der Brenztraubensäure und stellt ein wichtiges Zwischenprodukt im aeroben und anaeroben Stoffwechsel dar. In Zellkulturen wirkt es als leicht zugängliche Kohlenhydratquelle. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete sterile Natriumpyruvat-Lösung wurde von PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen.

Dimethylsulfoxid (DMSO)

DMSO (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ist ein organisches Lösungsmittel. Außerdem dient es als Gefrierschutzmittel, indem es während des Einfrierprozesses von Zellkulturen die Bildung von Eiskristallen verhindert, welche Zellorganellen zerstören und so zum Absterben der Zellen führen können.

Zellpermeabilitäts-Lösung A

0,1% (v/v) Triton x-100
0,5% (w/v) BSA Fraktion V
100µg/ml RNase
in PBS

Färbe-Lösung B

0,1% (v/v) Triton x-100
0,5% (w/v) BSA Fraktion V
50µg/ml Propidiumiodid
in PBS

Trypanblau

Trypanblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ist ein saurer Farbstoff mit einer molaren Masse von 960,83g/mol. Als Anion mit vier Sulfonatgruppen bindet es leicht an Proteine abgestorbener Zellen, da diese eine veränderte Membrandurchlässigkeit aufweisen. Vitale Zellen nehmen Trypanblau nicht auf, da die Zellmembran normalerweise für derartige Farbstoffe nicht durchlässig ist [86]. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 0,36% (w/v) Trypanblau mit 0,9% (w/v) Natriumchlorid in destilliertem Wasser gelöst.

Kristallviolett

Kristallviolett (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gehört in die Gruppe der Aminotriphenylmethanfarbstoffe. Zur Herstellung der Färbelösung werden 0,5g Kristallviolett in 20ml Methanol und 80ml destilliertem Wasser gelöst.

Annexin-V-FITC

Annexin-V (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) ist ein intrazelluläres Protein, welches Calcium-abhängig an Zellmembran-gebundenes Phosphatidylserin bindet.

5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)

CFSE ist ein Cytosolfarbstoff mit einem Molekulargewicht von 557,47g/mol, der intakte Zellmembranen leicht überquert. In der Zelle entsteht fluoreszierendes Carboxyfluorescein, indem intrazelluläre Esterasen die Acetatgruppen von CFSE spalten [87][88][89][90]. CFSE wurde in wasserfreiem DMSO gelöst, so dass man eine CFSE-Lösung mit einer Stockkonzentration von 5mM erhielt. CFSE wurde von eBioscience (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

eFLUOR

Cell Proliferation Dye eFluor® 670 (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) ist ein rot-fluoreszierender Farbstoff, welcher primäre Amine zellulärer Proteine bindet. Bei Zellteilungen verteilt er sich gleichmäßig auf die Tochterzellen. Das Molekulargewicht beträgt 792,6g/mol. Die gewünschte Stockkonzentration von 5mM wurde durch Lösung in DMSO hergestellt [91][92][93].

2.1.2 Inhibitoren

zVAD-fmk

Der Caspase-Inhibitor Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon (zVAD-fmk) (Bachem, Weil am Rhein, Deutschland) durchdringt die Zellmembran, bindet irreversibel an das katalytische Zentrum von Caspase-Proteasen und verhindert so die Induktion der Apoptose. Das Peptid wird in der P1-Position der Asparaginsäure methyliert, was zu verbesserter Stabilität und erhöhter Zellpermeabilität führt [94]. zVAD-fmk besitzt ein Molekulargewicht von 467,5g. Es lagen 5mg vor, die in 535 μ l DMSO gelöst wurden. Dies ergibt eine Stockkonzentration von 20mM. Im Versuch wurden die Zellkulturen mit einer Konzentration von 30 μ M zVAD-fmk inkubiert.

Necrostatin-1

Necrostatin-1 ist ein zellgängiger, wirksamer und selektiver Nekroptose-Inhibitor. Der nekrotische, nicht-apoptotische Zelltod wird durch den Todes-Rezeptor (DR) induziert [95]. Necrostatin-1 hat keinen Einfluss auf die apoptotische Morphologie. In einem Mausmodell mit ischämischer Hirnschädigung zeigte der Inhibitor eine ausgeprägte Schutzwirkung und er hemmt den myokardialen Zelltod [96][97]. Das Molekulargewicht beträgt 259,3g. In 800 μ l DMSO gelöste 20mg Necrostatin-1 ergeben eine Stockkonzentration von 96,4mM. Die Zellen wurden mit 48,2 μ M Necrostatin-1 inkubiert. Das Necrostatin-1 wurde von Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA) bezogen.

Necrox-2

Der zellpermeable Nekrose-Inhibitor Necrox-2 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA) besitzt ein Molekulargewicht von 516,67g. Nach Aufnahme in die Zellen ist die Substanz hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert und besitzt eine antioxidative Wirkung. Necrox-2 blockiert gezielt den durch oxidativen Stress induzierten nekrotischen Zelltod [98][99]. Zur Verwendung in den Versuchsreihen wurde 1mg Necrox-2 in 100 μ l DMSO gelöst. Dies ergab eine Stockkonzentration von 19,35mM. In der Experimenten wurden Konzentrationen von 10 μ M bis 40 μ M verwendet.

AEZS-126

Die niedermolekulare Pyridopyrazin-Verbindung AEZS-126 (freundlicherweise von AEterna Zentaris (Frankfurt, Deutschland) zur Verfügung gestellt) wurde als wirk-

samer Inhibitor der Klasse I-PI3Ks in biochemischen und zellulären Assays identifiziert und zeigte positive Eigenschaften in frühen *in vitro*-ADMET-Screenings, einschließlich mikrosomaler Stabilität und Plasma-Screenings [37]. Im Verlauf der *in vivo*-Pharmakokinetik-Experimente und Maus-Xenotransplantat-Antitumor-Studien wurde die orale Bioverfügbarkeit bei Mäusen auf etwa 60% bestimmt, was zu mikromolaren Plasmaspiegeln führt, die deutlich über den nanomolaren IC50-Werten aus *in vitro*-Studien liegen. Bei einer täglichen, oralen Verabreichung von 30mg/kg wurden signifikante Antitumor-Aktivitäten in HCT116- und A549-Modellen beobachtet [37]. AEZS-126 hemmt PI3K α mit einem IC50-Wert von 10nM und erwies sich als wirksamer Inhibitor der Phosphorylierung von AKT in zellulären Tests. Studien über den Wirkmechanismus zeigten, dass AEZS-126 als ATP-kompetitive Verbindung wirkt. Die antiproliferative Wirkung gegen verschiedene menschliche Tumorzelllinien (MDA-MB 468, U87, HCT116, PC-3, A549 und andere) wurde mit EC50-Werten im nanomolaren Bereich bestimmt [82].

Rapamycin

Rapamycin (= Sirolimus, SRL; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ist ein Immunsuppressivum mit Makrolidstruktur [12]. Der Bakterienstamm wird aus dem Streptomyzeten *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und wurde erstmals im Boden der Osterinsel Rapa Nui entdeckt [100]. Rapamycin inhibiert eine Reihe von Cytokin-vermittelten Signaltransduktionswegen durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR, einer 282kDa großen Phosphoinositid-3-Kinase [101]. Darauf bleibt die nachfolgende Aktivierung und anschließende Proteinsynthese der S6-Kinase (p70SK6) aus, und die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 unterbleibt [101]. Die Hemmung von mTOR verhindert die Aktivierung der p34cdc2-Kinase und somit die Komplexbildung mit Cyclin E [101]. Dieses hat zur Folge, dass das Voranschreiten der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert wird [101]. Bei T-Zellen wird auch die Aktivierung verhindert und somit die Immunantwort bereits in der Anfangsphase unterdrückt, indem die Reaktion auf Interleukin-2 (IL-2) gehemmt wird [102][103]. Rapamycin zeigt antibakterielle und antimykotische Eigenschaften [104][105] und blockiert die Produktion von Ribosomen, was zum Erliegen der Proteinsynthese und des Zellwachstums führt. Da schnell wachsende Gewebe wie z. B. Tumoren einen besonders hohen Bedarf an Ribosomen haben, werden sie durch Rapamycin besonders getroffen [102]. Zusätzlich wirkt Rapamycin als Apoptose-Verstärker und als Aktivator der Autophagie *in vitro* und *in vivo* [106]. Dies konnte bereits in malignen Gliomzellen nachgewiesen werden, in denen eine Hemmung der Tumorpheriferation durch Autophagie beobachtet werden konnte [23]. Einige Untersuchungen konnten

zeigen, dass mTOR-Inhibitoren in Verbindung mit Bestrahlung, Chemotherapie und Anti-Angionese-Therapie eine erhöhte Wirksamkeit erzielen kann [107]. Die Masse von Rapamycin beträgt 914,2g. 10mg der Substanz lagen vor und wurden in 1000µl DMSO gelöst. Dies führte zu einer Stockkonzentration von 10,94mM.

2.1.3 Medien und Puffer

Medium

Als Medium wurde das Bicarbonat-Puffersystem RPMI-1640 verwendet. Dieses Puffersystem wurde am Roswell Park Memorial Institut entwickelt und enthält einen Inhibitor für Trypsin. An Zusätzen wurden zu 500ml RPMI-1640 (PAA, Cölbe, Deutschland) jeweils 50ml FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland), 5ml Penicillin-Streptomycin-Gemisch (PAA, Cölbe, Deutschland) und 2,5ml Natriumpyruvat (PAA, Cölbe, Deutschland) beigefügt.

Medium - FCS-frei

Das oben genannte Puffer System RPMI-1640 wurde teilweise auch ohne den Zusatz von FCS verwendet. Dies bewirkt einen Proliferationsstopp der Zellen und führt zum Übergang in die Ruhephase des Zellzykluses (G0-Phase). Zum einen kann man eine Zellkultur auf diese Art synchronisieren, zum anderen die Effekte von Inhibitoren auf metabolisch inaktive Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, analysieren.

Einfriermedium

60% (v/v) Medium RPMI-1640

30% (v/v) FCS

10% (v/v) DMSO

FACS-Puffer

Lösung aus PBS mit 2% (v/v) FCS

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

PMSF ist ein Serin-Proteasen-Inhibitor, der beispielsweise Trypsin und Chemotrypsin hemmt.

Rinder-Serumalbumin (BSA)-Standard-Lösung

Die BSA-Standard-Lösung dient der Absättigung von freien Bindungsstellen von proteinbindenden Oberflächen zur Reduzierung von unspezifischen Bindungen und Verbesserung der Bindungseigenschaften [108].

SDS-Laufpuffer

30g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

10g Natriumdodecylsulfat (SDS)

143,75g Glycin/L

Towbin-Puffer

30,3g Tris

144g Glycin/L

Transferpuffer für semidry blotting

Towbin-Puffer mit Zusatz von

20% (v/v) Methanol/L

Stripping-Puffer

1M Glycin

1% (w/v) SDS

pH 2,5 (HCl)

PBS-Puffer

80g NaCl

2g KCl

14,4g Na₂HPO₄

2,4g KH₂PO₄/L

pH 7,4 (HCl)

Wasch-Puffer (Phosphat-Tween-Puffer (PBST))

PBS

0,1% (v/v) Tween-20

Lämmli-Puffer

70mM Tris pH 6,8
5% (v/v) β -Mercaptoethanol
40% (v/v) Glycerin
3% (w/v) SDS
0,05% (w/v) Bromphenolblau

Blocking-Puffer

5% (w/v) Magermilchpuffer in PBS
0,1% (v/v) Tween-20

Western Blot-Gele:

Trenngel 10%

5ml Acrylamid/Bisacrylamid 40%ige Lösung
12,1ml destilliertes Wasser
2,5ml 3M Tris pH 9,0
100 μ l SDS 20% (w/v)
20 μ l Tetramethylethyldiamin (TEMED)
200 μ l Ammoniumpersulfat (APS) 10% (w/v)

Sammelgel

1,1ml Acrylamid/Bisacrylamid 40%ige Lösung
7,55ml destilliertes Wasser
1,25ml 1M Tris pH 6,8
50 μ l SDS 20% (w/v)
10 μ l TEMED
100 μ l APS 10% (w/v)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den üblichen Herstellern in der größtmöglichen Reinheit bezogen. Für alle Medien und Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

2.1.4 Zelllinien

A2780

Die humane Ovarkarzinom-Zelllinie A2780 wurde aus dem epithelialen Tumorgewebe einer unbehandelten Patientin gewonnen [109]. Zur Kultivierung wurden die Zellen in Zellkulturflaschen der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland) in RPMI-1640-Medium (PAA, Cölbe, Deutschland), komplementiert mit 10% FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland), 1% Penicillin / Streptomycin (PAA, Cölbe, Deutschland) und 0,5 % Natriumpyruvat-Lösung (PAA, Cölbe, Deutschland), bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank (Heraeus, Fellbach, Deutschland) inkubiert.

Acis2780

Die Acis2780-Zelllinie ist eine Platin-resistente Zelllinie, welche aus der parentalen A2780-Zelllinie hergestellt wurde [110]. Um die Resistenz gegen Platin zu erhalten, wurden diese Zellen ein Mal pro Woche mit cis-Platin-Lösung versetzt. Ansonsten wurden die Acis2780-Zellen analog zu den A2780-Zellen kultiviert und inkubiert.

SKOV-3

Die Zelllinie SKOV-3 wurde aus Epithelzellen aus einem Ovar-Adenokarzinom gewonnen [111]. Diese Zellen sind gegenüber dem Tumor-Nekrose-Faktor und mehreren Zytostatika, einschließlich Diphtherie-Toxin, cis-Platin und Adriamycin, resistent [112]. Zur Kultivierung wurde die Zellen ebenfalls analog zur Zelllinie A2780 behandelt.

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper:

AKT1, pAKT1

AKT1 besitzt ein Molekulargewicht von 59kDa und ist eine Serin/Threoninkinase, die bei Prozessen wie Apoptose, Glykogensynthese und Zellwachstum eine große Rolle spielt. Die Phosphorylierung an Thr308, Ser473 und Tyr474 ist für die volle Funktion erforderlich [113]. Ein spezifischer anti-AKT1 monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, Burlingame, USA) wurde im Western-Blot in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) BSA/PBST verwendet, zur spezifischen Detektion von phosphoryliertem AKT1 (pAKT, 60kDa Molekulargewicht) wurde ein monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (anti-pAKT1; Epitomics, Burlingame, USA) in einer

Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) Magermilchpuffer (MM)/PBST verwendet.

ERK1/2, pERK1/2

ERK1 / ERK2 gehören der Unterfamilie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen an und sind an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung, und auch an Prozessen der Meiose und Mitose beteiligt. ERK1 besitzt ein Molekulargewicht von 44kDa. Aktiviert wird es durch Phosphorylierung an Thr202 und Tyr204 [114]. ERK1 und ERK2 wurden im Western-Blot ebenfalls mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (anti-ERK1/2; Epitomics, Burlingame, USA) detektiert. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) BSA/PBST verwendet. Die Detektion von pERK1 und pERK2 (42kDa Molekulargewicht) wurde mit spezifischen monoklonalen Antikörpern aus Kaninchen (pERK1/2, Epitomics, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) MM/PBST durchgeführt.

Anti- β -Actin-Antikörper - Ladekontrolle

Der anti- β -Actin-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) ist monoklonal und wird aus der Maus gewonnen. Er wurde in der Verdünnung 1:1000 in 5% (w/v) BSA/PBST verwendet.

Sekundärantikörper:

anti-Kaninchen HRP

Ein sekundärer Antikörper, der gegen Kaninchen-IgG gerichtet ist, und an den die Meerrettich-Peroxidase-HRP (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) gekoppelt ist, wurde als Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) MM/PBST verwendet.

anti-Maus HRP

Als weiterer sekundärer Antikörper wurde der HRP-verknüpfte Antikörper Anti-Maus-IgG (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) BSA/PBST verwendet.

Chemilumineszenz-Lösung

Immobilon Western Chemilumineszenz-HRP-Substrat (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) ermöglicht ein Nachweisverfahren mit Hilfe eines Enzyms, welches in

einer katalytischen Reaktion sichtbares Licht erzeugt. Diese Reaktion basiert auf der katalytischen Oxidation von Luminol durch Peroxide. Dieses Nachweisverfahren bietet eine hohe Empfindlichkeit und ermöglicht den Nachweis mehrerer Zielproteine auf dem gleichen Blot. Das HRP-Substrat besteht zu gleichen Teilen aus Luminol-Reagenz und Peroxidase-Lösung [115]. Durch Auflegen und Entwickeln eines Filmes kann die Chemielumineszenz nachgewiesen werden [116].

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zellen auftauen

Zum Auftauen und Anlegen einer Zellkultur wurden 10ml Medium in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) vorgelegt. Anschließend wurde die gewünschte, auf -80°C tiefgefrorene bzw. aus der Gasphase über flüssigem Stickstoff entnommene Zelllinie durch Erwärmen möglichst schnell angetaut. Hierauf wurde tropfenweise ca. 1,5ml Medium zugegeben, die Zellen wurden in dem Medium resuspendiert und die gelösten Zellen wurden in das 15ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Um die Adhärenz der Zellen zu verlangsamen, wurden die Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in der Zwischenzeit auf Eis gestellt. Waren alle Zellen überführt, folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt mit 1600 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei maximaler Beschleunigung und Abbremsen in einer Minifuge (Heraeus, Fellbach, Deutschland). Der Überstand wurde abgesaugt, das verbleibende Zellpellet in 10ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Fellbach, Deutschland) bei 37°C und 5% CO_2 .

Zellen einfrieren

Zur späteren Verwendung können überzählige Zellen eingefroren werden. Hierfür wurden diese Zellen mit 1600 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten lang in der Zentrifuge (Minifuge; Heraeus, Fellbach, Deutschland) pelletiert, darauf der Überstand verworfen, das Sediment in 1ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und zügig in ein Einfrieröhrchen (Kryoröhrchen; Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Dieses wurde auf -80°C tiefgefroren und dann in der Gasphase über flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Mediumwechsel

Nach drei bis vier Tagen sind die Nährstoffe des Mediums in der Zellkulturflasche größtenteils aufgebraucht, so dass ein Wechsel auf frisches Nährmedium erfolgen musste. Hierfür wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und anschließend durch 10ml frisches Medium ersetzt. Bei der Platin-resistenten Zelllinie Acis2780 wurde das verbrauchte Medium einmal pro Woche durch 4 μl cis-Platin-Stocklösung ($[\text{c}]=1\text{mg}/\text{ml}$) in 12ml Medium ersetzt, um die Resistenzen zu

erhalten. Anschließend wurden die Zellkulturen wieder bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Splitten von Zellen

Bei der Kultivierung adhärenter Zelllinien ist zu beachten, dass die Zellen eine dichtest mögliche Besiedelung der Oberfläche des Zellkulturgefäßes anstreben. Bei dieser Anordnung, die als Konfluenz bezeichnet wird, befinden sich die Zellen in sehr engem Kontakt und die meisten Zellen hören auf, sich zu teilen. Sobald die Oberfläche des Zellkulturgefäßes vollständig besiedelt ist, kommt es zu einer Kontaktinhibition. Um dies zu vermeiden wurden die Zellkulturen vor der vollständigen Konfluenz gesplittet und verdünnt wieder ausgesät [117].

Um den Besiedelungsgrad der vorliegenden Zellkultur zu bestimmen, wurde die Zelldichte unter dem Mikroskop beurteilt. Anschließend wurde das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gespült, um tote Zellen und Reste des Mediums zu entfernen. Hierauf wurden die Zellen mit 1ml Trypsin bedeckt, welches die Oberflächenproteine spaltet. Zum Loslösen der Zellen wurden die Zellkulturgefäße bei 37°C je nach Zelllinie drei bis fünfzehn Minuten inkubiert. Das Adhäsionsverhalten der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Waren die Zellen losgelöst, wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 6ml Medium beendet. Zum Entfernen des Trypsins wurde der Gefäßinhalt in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und mit 1600 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 5ml Medium resuspendiert. 1ml dieser Verdünnung wurde wieder in eine Zellkulturflasche (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt, mit 10ml Medium aufgefüllt und im Brutschrank (Heraeus, Fellbach, Deutschland) bei Standardbedingungen inkubiert. Die restlichen 4ml der Zellverdünnung wurden entweder für folgende Versuche auf Eis gestellt oder zur Konservierung der Zelllinie eingefroren.

Bestimmung der Zellzahl

Um den Anteil vitaler Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde ein Vitalitätstest mit Trypanblau durchgeführt. Dieser Farbstoff wird von intakten Zellen nicht aufgenommen [86]. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden 10µl Trypanblaulösung mit 10µl Zellsuspension in ein Well einer 96-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) zusammengegeben und gemischt. Die Zählkammer wurde angehaucht und mit einem Deckglas versehen. Das Erscheinen von soge-

nannten Newton'schen Ringen zeigte an, dass das Deckglas richtig fixiert worden war. 10µl der angefärbten Zellsuspension wurden nun in die Zählkammer eingebracht, wobei ein Über- oder Unterfüllen vermieden wurde. Zur Auswertung wurde die Zählkammer nach 1-2 Minuten, in denen die Zellen sich am Boden absetzen konnten, unter ein Mikroskop mit 10-40fach vergrößerndem Objektiv (Leitz; Leica, Heerbrugg, Schweiz) gelegt und die Einteilungslinien der Kammer ins Blickfeld geschoben. Dann wurde die Gesamtzahl der nicht angefärbten Zellen gezählt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1mm². Da die Höhe zwischen dem Deckglas und dem Objektträger genau 0,1mm beträgt, befindet sich ein Volumen von 1mm³ über jedem dieser Quadrate. Es sollten immer die vier großen Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert ($MW = (Z + Z_n) / n$) errechnet werden. Es musste darauf geachtet werden, dass Zellen, die auf den Linien lagen, nicht zweimal gezählt wurden. Dies wurde vermieden, indem nur solche Zellen gezählt wurden, die oben und links auf den Linien lagen. Die gemittelte Zellzahl wurde mit $2 \cdot 10^4$ multipliziert. Dies ergab die Zellzahl pro ml [86].

Zellen aussäen

Nachdem die Zellzahl pro ml bestimmt worden war, konnten daraufhin Zellkulturplatten, wie z.B. 96-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz), mit einer definierten Anzahl von Zellen befüllt werden. So enthielt eine 96-Well-Platte in der 1. Spalte je 100µl Medium als Hintergrundwert. Die restlichen Randfelder wurden mit je 100µl PBS befüllt, um die hier stärkere Verdunstung auszugleichen. In alle übrigen Wells wurden je 50µl Zellsuspension mit $1 \cdot 10^4$ Zellen eingebracht. Nachdem alle Wells befüllt waren, wurde das Ergebnis unter dem Mikroskop nachgeprüft.

Polyklonale NK-Zellkultur

Lymphozyten-Isolierung aus humanem Blut Ziel der Lymphozyten-Isolierung ist die Herstellung von Immunzellkulturen, z.B. polyklonale NK-Zell-Kulturen aus frischem Vollblut gesunder Spender. Der aus frischem Vollblut gewonnene Blutzapfen (wurde freundlicherweise von der Transfusionsmedizin der Uniklinik Würzburg zur Verfügung gestellt) wurde mit 80%igem Ethanol gesäubert und die Schläuche an beiden Enden abgeschnitten. Danach wurde der Inhalt des Zapfens durch Spülen mit einer Spritze (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) mit 20ml PBS (PAA, Cölbe, Deutschland) in eine Zellkulturflasche (Greiner, Frickenhausen,

Deutschland) überführt und mit 70ml PBS aufgefüllt. Als nächstes wurden vier 50ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit 15ml Ficoll (Biochrom, Berlin, Deutschland) versehen, auf welches je 25ml Blut-PBS-Gemisch aufgeschichtet wurde. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 600rpm (Heraeus, Fellbach, Deutschland) ohne Bremse und anschließendes Abnehmen von ca. 5ml Serum wurden die Thrombozyten größtenteils aus der Probe entfernt. Der restliche Gradient wurde weitere 30 Minuten lang bei 1400rpm ohne Bremse zentrifugiert, sodass sich eine Lymphozytenphase mit mononukleären Zellen ausbildete, die vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen werden konnte. Diese Lymphozytenringe wurden in einem Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gepoolt und dieses mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Nun folgten erneut zwei 8-minütige Zentrifugationsschritte bei 1800rpm mit Bremse, zwischen welchen das Zellpellet einmal mit 50ml PBS gewaschen wurde. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 15ml Medium aufgenommen.

Von diesen isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) (= einkernige Blutzellen des Immunsystems, wie Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) wurden je 2,5ml Pellet-Medium-Gemisch in ein Well einer 6-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) gegeben. Diese wurde bei 37°C eine Stunde inkubiert. Monozyten und Makrophagen setzten sich in dieser Zeit ab und wurden adhärend, so dass der Überstand mit den Lymphozyten abgenommen und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen vereinigt werden konnte. Zusätzlich wurde jedes Well zur Verbesserung der Ausbeute an Lymphozyten zweimal mit je 2ml PBS vorsichtig gespült und die erhaltene Zellsuspension auch in das Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mit PBS auf 50ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 20ml Medium aufgenommen.

Die nun entstandene Zellsuspension enthielt so genannte Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL). Die Zellen wurden gezählt und auf 10^6 Zellen pro ml eingestellt. 400µl der Zellsuspension wurden in jedes Well einer 24-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät, was einer Anzahl von 400000 Zellen pro Well entsprach.

Co-Kultur von Immunzellen mit Feederzellen Zeitgleich zur Lymphozyten-Isolierung wurden RPMI-8866-Feeder-Zellen geerntet. Diese Feeder-Zellen sekretieren Wachstumsfaktoren und Cytokinen, die zur Versorgung und Stimulation der Immunzellen beitragen. Das eigene Wachstum der RPMI-8866-Feeder-Zellen wurde durch Inaktivierung des Zellzykluses mittels Gamma-Bestrahlung verhindert. 40ml

der RPMI-8866-Feeder-Zellen wurden für die Bestrahlung geerntet, mit PBS auf 50ml aufgefüllt und durch Zentrifugation bei 1600rpm 5 Minuten lang pelletiert.

Das erhaltene Sediment wurde in 5ml Medium in einem 50ml-Zentrifugationsröhrchen resuspendiert und in eine Bestrahlungsanlage (Siemens, München, Deutschland) eingebracht. Innerhalb von 15 Minuten erfolgte eine Bestrahlung der Zellsuspension mit 30Gy. Nachdem die Probe entnommen worden war, wurden die Zellen zweimal gewaschen, indem das Zentrifugationsröhrchen mit PBS auf 50ml aufgefüllt wurde und 10 Minuten lang mit 1200rpm zentrifugiert wurde. Dies bewirkte die Entfernung freier Radikale, die bei der Bestrahlung der Zellen gebildet worden waren. Das Zellpellet wurde danach in 20ml Medium resuspendiert, die Zellen gezählt und auf 10^6 Zellen pro ml eingestellt.

Von dieser Zellsuspension wurden je 100 μ l pro Well zu den Lymphozyten in die 24-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) zugegeben.

NK-Zell-Kultur Durch Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ entstanden aus PBL mit RPMI-8866-Feeder-Zellen nach 8-11 Tagen Kultivierung eine polyklonale NK-Zell-Kultur. Andere Lymphozyten starben in dieser Zeit ab. Am 6. Tag nach der PBL-Isolation fügte man den Zellen je 500 μ l RPMI-Medium, komplementiert mit 500U IL-2 (Prokinase, Hamburg, Deutschland) pro ml, zu. IL-2 gehört zu den Wachstumsfaktoren für NK-Zellen und wirkt durch eine intrazelluläre Signalkaskade [118]. Es kam zur Aktivierung der isolierten primären Blutzellen und klonalen Teilung der natürlichen Killerzellen.

2.2.2 Färbungen

Kristallviolettassay

In 96-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) wurde die zu untersuchende Zelllinie ausgesät und nach 24 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Cytostatika versetzt. Die Färbung erfolgte nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation. Dann wurden die Platten vorsichtig auf Papier abgegossen und ausgeklopft. Mit Hilfe der Kristallviolett-Färbung lassen sich sowohl lebende als auch tote Zellen anfärben, weshalb die einzelnen Wells mit je 100 μ l PBS gewaschen und wieder sorgfältig ausgeklopft wurden, um tote Zellen und Zellreste zu entfernen. Die verbliebenen adhärennten Zellen wurden mit je 50 μ l Kristallviolett-Lösung pro Well bedeckt und 10-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Färbezeit wurde die überschüssige Farbe mit Leitungswasser bei Raumtemperatur ausgewaschen,

die Platten wiederum ausgeklopft und über Nacht bei Raumtemperatur und im Dunkeln getrocknet. Die nach Färben und Waschen der Zellen noch vorhandene Menge an Kristallviolett wurde durch den Zusatz von 100µl Methanol pro Well und 10- bis 20-minütiger Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur solubilisiert und beschrieb ein Maß für die Dichte der adhären (und somit vitalen) Zellen. Die Farbintensität in jedem Well wurde im Absorptionsmodus bei einer Wellenlänge von 540nm mit einem ELISA-Reader (Sunrise; Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Kristallviolettassay - FCS-frei

Das Vorgehen entsprach den Untersuchungen mit FCS-haltigem Medium (siehe 2.2.1 - Zellen aussäen, 2.2.2 - Kristallviolettassay). Der Unterschied bestand darin, dass die Zellsuspension vor dem Befüllen der 96-Well-Platten zentrifugiert wurde, der Überstand entfernt wurde und das Zellpellet anschließend mit der gleichen Menge an FCS-freiem Medium versetzt wurde. Zusätzlich wurden die Inhibitoren mit FCS-freiem Medium verdünnt.

Propidiumiodid-Färbung

Am Tag der FACS-Messung wurden die zu untersuchenden Proben 10 Minuten lang mit 300g zentrifugiert, danach mit 2ml PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet mit 300µl kalter Zellpermeabilitätslösung A versetzt und die Zellen permeabilisiert. Durch die in der Lösung A enthaltene RNase, kam es zu einer Degradation der RNA in der Probe. Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde zu jeder Probe 300µl Färbelösung B zugefügt. Diese enthielt den DNA-Farbstoff Propidiumiodid. Nach 2-stündiger Inkubation im Dunkeln bei 4°C konnte die FACS-Messung bei 488nm mit FL-2 erfolgen.

Annexin-V-FITC

Annexin-V bindet sich an Phosphatidylserin, welches beim apoptotischen Prozess auf die Außenseite der Zellmembran transloziert wird. So markierte Zellen können durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Die Markierung erfolgte durch Zugabe von Annexin-V-FITC und anschließende 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.

CFSE-Färbung

Für die CFSE-Färbung mussten $2 \cdot 10^6$ Tumorzellen mit 1500rpm 5 Minuten lang zentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde in 2 ml Medium ohne FCS resuspendiert und mit 1µl CFSE versetzt. Es folgte eine 3-minütige Inkubation bei 37°C im Dunkeln. Durch Zugabe von 2ml FCS und 10-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Färbung gestoppt. Anschließend wurde 4 Minuten lang bei 1500rpm zentrifugiert, einmal mit 4ml Medium ohne FCS gewaschen und nochmals 4 Minuten lang bei 1500rpm zentrifugiert. Die gefärbten Zellen wurden danach in 16ml Vollmedium aufgenommen. Die Zelldichte entsprach $1,25 \cdot 10^5$ Zellen pro ml, wovon je 800µl (= 100000 Zellen) in jedes Well einer 24-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) gegeben wurden. Diese wurde über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zum Zeitpunkt der Lyse sollten die Zellen im Well zu 50-60% konfluent sein.

eFLUOR-Färbung

eFLUOR ist ein Membranfarbstoff, der zur Färbung von NK-Zellen verwendet wurde. Hierfür wurden $1 \cdot 10^7$ NK-Zellen 7 Minuten lang mit 1200rpm pelletiert und anschließend in 500µl PBS resuspendiert. Daraus resultierte eine Zellzahl von $2 \cdot 10^7$ pro ml. Diese wurden mit 500µl Färbelösung versetzt, die sich aus 1µl e-FLUOR-670 Stocklösung und 499µl PBS zusammensetzte. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde die 4-5fache Menge von kaltem Medium zugeben und 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Es folgte ein 7-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1200rpm. Das entstandene Zellpellet wurde in 5ml Medium aufgenommen, was eine Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ NK-Zellen pro ml ergab.

2.2.3 Western Blot

Herstellung von Proteinlysaten

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren mit dem Ziel, Proteine in einem Zelllysate nachzuweisen und qualitativ aufzutrennen [119]. Im ersten Schritt wurde ein Proteinlysate hergestellt. Hierfür wurden $7 \cdot 10^5$ Tumorzellen pro Well in 2ml Medium in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Heraeus, Fellbach, Deutschland) erfolgte ein Mediumwechsel und der Zusatz von Cytostatika. AEZS-126 wurde entweder alleine in verschiedenen Konzentrationen oder aber in Kombination mit 5µM Rapamycin zu den Zellen zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit je 1ml PBS gewaschen, die adhären Zellen mit einem Zell-Schaber (Costar, Cambridge/MA, USA) abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen mit 1ml kaltem

PBS und 1mM Proteasecocktail (Roche, Mannheim, Deutschland) überführt. Anschließend wurde 10 Minuten lang bei 1800rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in je 100µl Lysepuffer P resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und 15 Minuten lang bei 13000g und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Das im Überstand enthaltene Proteinlysate wurde darauf in weitere Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 50µl destilliertes Wasser in einer 96-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) vorgelegt und anschließend laut dem Pipettierschema (Abb. 2.1) mit 1:10-verdünnter BSA-Standard-Lösung und den Proben als Triplets versetzt.

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

Abbildung 2.1: Pipettierschema nach Bradford

Im nächsten Schritt wurden pro Well je 150µl 1:4-verdünntes Bradford-Reagenz (Rotiquant; Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Platte mit Hilfe eines ELISA-Reader (Sunrise; Tecan, Männedorf, Schweiz) mit einem 595nm-Filter gemessen. Die jeweilige Proteinkonzentration in µg/µl wurde durch ein entsprechendes Programm (Magellan; Tecan, Männedorf, Schweiz) über die gemessene optische Dichte errechnet. Aus der Proteinkonzentration wurde dann das Probenvolumen bestimmt, welches einer Proteinmenge von jeweils 20µg entsprach.

Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde die SDS-PAGE-Methode (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) angewandt. Hierbei kam es zur Denaturierung der Proteine durch das anionische Detergens SDS mit Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur. Zusätzlich erfolgte die Anlagerung von SDS an die Proteine, wodurch es zu einer Überlagerung derer Eigenladung kam. Durch die somit erzielte gleichmäßige negative Ladung wanderten die Proteine im elektrischen Feld zur Anode und es war möglich, die Proteine nach ihrer relativen Größe der Polypeptidketten und ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

Zur Durchführung wurden 20ml Trenngel und 10ml Sammelgel angesetzt. Die einzelnen Komponenten Acrylamid, Tris und SDS wurden mit dem Reaktionsstarter TEMED und Ammoniumpersulfat versetzt, welches Radikale zur Polymerisation des Acrylamids bereitstellte. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten einer Gelkammer eingebracht. Zum Erreichen einer glatten Oberfläche wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel zu einer galertigen Masse polymerisiert war, konnte das Sammelgel aufgeschichtet werden. Zusätzlich wurde bei diesem Schritt ein Kamm eingesetzt, der nach der Polymerisation des zweiten Gels Taschen erzeugt hatte, in welche die Proben eingebracht werden konnten. Die Proteinproben wurden vor dem Einbringen in die Geltaschen auf Eis aufgetaut, mit Lämmli-Puffer versetzt und auf 95°C erhitzt, um die Denaturierung und Entfaltung der Proteine zu erreichen. Das im Lämmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol dient dabei als Reduktionsmittel, welches die Disulfid-Brücken zwischen den Protein-Untereinheiten spaltete und damit die Quartärstruktur auflöste. Bromphenolblau zeigte durch seine physikalischen Wander-Eigenschaften den Fortlauf der Elektrophorese an und Glycerin ermöglichte das Sinken der Proben im Gel durch seine hohe Dichte. Zusätzlich wurde in einer Geltasche ein gefärbter Protein-Marker (ColorPlus Prestained Protein Ladder, New England Biolabs, Massachusetts, USA) aufgetragen. Dieser besteht aus gereinigten rekombinanten Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht, welche kovalent an den blauen Farbstoff Remazol gebunden sind. Dies ermöglichte die kontinuierliche Überwachung der Proteintrennung während der Elektrophorese und eine schnelle und einfache Beurteilung der Blot-Effizienz.

Es erfolgte der Einbau in eine Vertikalelektrophorese-Apparatur, die mit Laufpuffer befüllt wurde, um Anode und Kathode über eine Pufferbrücke miteinander zu verbinden. Als Nächstes wurden die Proben in die Geltaschen eingefüllt. Trenn- und Sammelgel unterscheiden sich vor allem im pH-Wert, was wiederum ermöglichte, dass die Proben sich am Übergang vom Trenn- ins Sammelgel sammelten und anschließend mit einer Geschwindigkeit, die abhängig von ihrer Größe war,

das Trenngel passierten. Zunächst wurde eine Spannung von 80V an die Elektrophoresekammer angelegt, um die Passage der Proteine durch das Polyacrylamid-Sammelgel herbeizuführen, anschließend wurde die Spannung für die Proteinwanderung im Trenngel auf 130V erhöht. Die Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese mittels Semi-Dry-Blotting auf eine Membran übertragen.

Semi-dry-Blot

Als Trägermembran wurde eine Nitrozellulosemembran verwendet. Diese hat eine hohe Proteinbindungskapazität über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen und wurde auf mehrere Lagen mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere positioniert. Das Gel wurde aus den Glasplatten der Apparatur entnommen und auf der Membran platziert. Anschließend wurde dieses wieder von mit Transferpuffer getränktem Filterpapier bedeckt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen entstanden, um zu erreichen, dass der Proteintransfer ungestört ablaufen konnte. Der Transfer erfolgte 105 Minuten lang bei einer Spannung von 25V.

Immundetektion

Vor der Inkubation des Blots mit Antikörpern wurden die restlichen unspezifischen Bindungsstellen mit Blocking-Puffer abgeblockt. Der Nachweis der Proteine erfolgte über eine enzymatische Reaktion, wobei das Reaktionsprodukt unlöslich wurde und an seiner Entstehungsstelle präzipitierte.

Als Erstes wurden die monoklonalen Primärantikörper, welche pAKT, pERK1 und pERK2 spezifisch detektieren, in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) MM/PBST gelöst. Die Membran wurde in dieser Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit hatten die Antikörper die entsprechenden Proteine spezifisch gebunden. Anschließend erfolgten fünf 5-minütige Waschgänge mit PBST, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde der Sekundärantikörper anti-Kaninchen-HRP, welcher ebenfalls in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) MM/PBST gelöst worden war, für eine Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Dieser band wiederum an die Primärantikörper, was in einem weiteren Schritt über die enzymatische Aktivität der Peroxidase nachgewiesen werden konnte. Zur Detektion wurde die Membran erneut fünf mal für 5 Minuten mit PBST gewaschen und anschließend mit einer Chemilumineszenz-Lösung versetzt und weitere fünf Minuten lang inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde entfernt, die Membran in eine Röntgenkassette eingebracht und mit einem Röntgenfilm versehen. Die Entwicklung erfolgte in dem Gerät Intas ChemoStar Imager (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Uni-

versität Würzburg, Deutschland). Das Chemilumineszenz-HRP-Substrat besteht zu gleichen Teilen aus Luminol-Reagenz und Peroxidase-Lösung.

Antikörper-Stripping

Zur weiteren Verwendung der Membran wurden die gebundenen Antikörper mit Stripping-Puffer abgelöst. Hierfür wurde die Membran zwei mal für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer inkubiert. Darauf folgten fünf 5-minütige Waschschrte in PBST und anschließende Inkubation in Blocking-Puffer.

weitere Immundetektion

Als Nächstes wurde die Membran mit den aus Kaninchen gewonnen Primärantikörpern anti-AKT und anti-ERK1/2 in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) BSA/PBST über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Waschen in PBST, die anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen-HRP und die Detektion erfolgte, wie im Punkt 2.2.3 Immundetektion beschrieben.

Nach einem erneuten Vorbereiten der Membran durch Antikörper-Stripping konnte der letzte Western-Blot-Schritt erfolgen. Hier wurde eine β -Aktin-Ladekontrolle durchgeführt, indem die Membran mit dem Primärantikörper anti- β -Aktin-Maus in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% (w/v) BSA/PBST über Nacht bei 4°C versetzt wurde. Anschließend wurde die Membran wieder fünf mal 5 Minuten lang mit PBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-HRP in der Verdünnung 1:1000 in 5% (w/v) BSA/PBST eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion mit Chemilumineszenz-Lösung erfolgte wieder wie im Punkt 2.2.3 Immundetektion beschrieben.

2.2.4 FACS-Messungen

Mit der Durchflusszytometrie, auch FACS (engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting)-Analyse genannt, können verschiedenen Eigenschaften und zelluläre Komponenten einzelner Zellen untersucht werden. Die Zellen, die für die Untersuchung mit fluoreszierenden Farbstoffen behandelt wurden, fließen hintereinander durch eine schmale Flusszelle und werden hier von einem senkrecht auf die Flusszelle angebrachten Laser bestrahlt. Meistens handelt es sich hierbei um einen luftgekühlten Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488nm [120].

Jede Zelle, auf die der Laserstrahl trifft, erzeugt Streulicht, das je nach Größe und Struktur der Zelle unterschiedlich stark abgelenkt wird. Dieses Streulicht wird durch

verschiedene Detektoren gemessen, die im Winkel von 10° zum einfallenden Laserstrahl (= Vorwärtsstreulicht, forward scatter, FSC) und im rechten Winkel dazu (= Seitwärtsstreulicht, side scatter, SSC) angebracht sind. Das Vorwärtsstreulicht ist abhängig von der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht vor allem vom Zellinhalt. Je größer eine Zelle und je mehr Granula die Zelle enthält, um so größer ist auch das erzeugte Streulicht [121].

Zusätzlich kann die Fluoreszenzemission jeder einzelnen Zelle quantifiziert werden. Mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Zellen können Lichtenergie über einen bestimmten Wellenlängenbereich absorbieren, wodurch Elektronen einen höheren Energiezustand einnehmen können. Beim Rücksprung zum Grundniveau wird ein Photon emittiert, was als Fluoreszenzlicht sichtbar wird. Ein Teil der Energie geht als Wärme verloren. So kann beispielshalber über den DNA- bzw. RNA-Gehalt einer Zelle auf Eigenschaften bezüglich Zellzyklus- und Apoptose-Verhalten geschlossen werden. Die Zellsortierung erfolgt über Ablenkplatten und Sammelröhrchen je nach zellspezifischen Signalen [120].

Zur Auswertung wird das Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht in einem Graphen aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle. Diese Darstellung bezeichnet man als Dot-Plot [121].

Zellzyklus-FACS

Für diesen Versuch ließ man $7 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in 2ml Medium in 6-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) anwachsen. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel vom Vollmedium auf ein Mangelmedium ohne FCS zur Synchronisation der Zellen. Die Inkubationszeit betrug 24 bis 48 Stunden. Nun befanden sich alle Zellen in der gleichen Zellzyklusphase. Zu diesem Zeitpunkt wurde wieder auf Vollmedium umgestellt und die Zellen für weitere 24 Stunden zusätzlich mit Lösungsmittel oder Cytostatika in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Danach wurde der Überstand mit den abgelösten Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Zum Lösen der restlichen adhären Zellen, wurden die Wells mit je 500 μ l PBS gewaschen, mit 500 μ l Trypsin 3 Minuten lang im Brutschrank inkubiert und nochmal mit 500 μ l PBS gespült. Die Suspensionen mit den gelösten Zellen wurden in die zugehörigen FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt, 10 Minuten lang bei 200g. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet mit 2ml PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut entfernt worden war, wurde das Zellpellet in 500 μ l PBS gelöst und mit 1,5ml kaltem 100%igem EtOH vermischt. Um die Bildung von Verklumpungen zu vermeiden, wurden die Ansätze vorsichtig gemischt. Die Proben wurden dann mit Parafilm verschlossen und

bei -20°C für mindestens 24 Stunden inkubiert. Am Tag der FACS-Analyse wurde die Propidiumiodid-Färbung, wie in Punkt 2.2.2 beschrieben, durchgeführt und die Proben bei 488nm mit FL-2 gemessen.

Apoptose-FACS

Zur Untersuchung des Apoptose-Verhaltens wurden die zu untersuchenden Zellen ausgesät, inkubiert und mit Cytostatika versetzt. Das Vorgehen entspricht, vom Aussäen der Zellen bis zum Zusatz der Lösungsmittel bzw. der verschiedenen Cytostatikallösungen, dem des vorher beschriebenen Zellzyklus-FACS. Nach der 24-stündigen Inkubation mit den verschiedenen Zusätzen wurde die Flüssigkeit aus den 6-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) abgesaugt, die Zellen wurden abgelöst und in PBS aufgenommen. Hierfür wurden die adhärennten Zellen mit je 500µl PBS gewaschen, mit 500µl Trypsin 3 Minuten lang im Brutschrank inkubiert und mit weiteren 500µl PBS gelöst. Die losgelösten Zellen wurden in 15ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 Minuten lang mit 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entfernt und die Pellets mit jeweils 500µl 1:10-mit-destilliertem-Wasser-verdünntem Annexin-Bindepuffer resuspendiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation, wurden die entstandenen Zellpellets in je 200µl 1:10-mit-destilliertem-Wasser-verdünntem Bindepuffer resuspendiert und mit jeweils 5µl Annexin-V-FITC versetzt. Die Färbung erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde je 300µl 1:10-mit-destilliertem-Wasser-verdünnter Bindepuffer zugefügt und die Zellen erneut 10 Minuten lang durch Zentrifugation bei 1800rpm pelletiert. Die Resuspension erfolgte in je 200µl 1:10-mit-destilliertem-Wasser-verdünntem Bindepuffer mit 5µl Propidiumiodid-Lösung ($[c] = 2\mu\text{g pro ml}$). Die FACS-Messung wurde innerhalb von 1 Stunde nach Färbung durchgeführt.

NK-Killing-FACS

Für das NK-Killing-FACS wurden 6 Tage nach der Lymphozyten-Isolation Tumorzellen der Zelllinien A2780 und Acis2780 mit CFSE, wie in Punkt 2.2.2 CFSE-Färbung beschrieben, gefärbt und in 24-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Zum Zeitpunkt der Lyse sollten 50-60% der Zellen im Well konfluent sein. Nach 24 Stunden erfolgte der Zusatz von Cytostatika oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle zu den Tumorzellen. Hierfür wurde das Medium aus den Wells abgesaugt, je 400µl Medium und 100µl 5fach-konzentrierte Cytostatika-Lösung in jedes Well gegeben und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am 8. Tag nach Isolation wurden die NK-Zellen geerntet. Der Inhalt der Wells der 24-Well-Platten

(TPP, Trasadingen, Schweiz) mit NK-Zellen wurde vorsichtig abgenommen und in einem Zentrifugationsröhrchen vereinigt. Jedes Well wurde mit Medium nachgespült. Es folgte eine 10 Minuten lange Zentrifugation bei 1200rpm. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 20ml Medium aufgenommen und gezählt. Wie in Punkt 2.2.2 eFLUOR-Färbung beschrieben, wurden $1 \cdot 10^7$ NK-Zellen mit eFLUOR gefärbt. Nun erfolgte der Zusatz von entsprechenden Mengen an NK-Zellen zu den Tumorzellen. Das Medium mit den Cytostatika bzw. der Lösungsmittelkontrolle wurde von den Tumorzellen abgesaugt. Dann wurden die NK-Zellen in verschiedenen Verhältnissen zu den Tumorzellen zugefügt. Die erste Zeile der 24-Well-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) diente der Kontrolle. Das bedeutet, dass die vorhandenen Tumorzellen lediglich mit Medium ohne NK-Zellen versetzt wurden. In den folgenden Zeilen wurden Tumorzellen zu NK-Zellen im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:5 eingesetzt. Zusätzlich wurde in einer weiteren Platte ein Kontrollwell mit ausschließlich NK-Zellen angelegt. Die Killing-Zeit betrug 4 Stunden bei 37°C. Nach erfolgtem Killing wurde der Inhalt der Wells in FACS-Röhrchen überführt. Jedes Well wurde mit 100µl PBS gewaschen, die adhärenen Zellen mit 100µl Trypsin 5 Minuten lang bei 37°C inkubiert, mit 100µl Medium losgelöst und in das entsprechende FACS-Röhrchen gegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation mit 1800rpm bei 4°C wurde der Überstand abgegossen und jedes Zellpellet in 200µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die FACS-Messung.

3 Ergebnisse

AEZS-126 zeigte bereits eine gute antiproliferative Wirkung bei verschiedenen humanen Tumorzelllinien. So konnte eine Inhibition der Tumorprogression bei Mammakarzinom-, Glioblastom-, Kolonkarzinom-, Prostatakarzinom- und Lungenkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden [82]. Bisher war die Wirkung von AEZS-126 auf Ovarialkarzinome nicht untersucht. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Reaktion der parentalen Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 und der daraus abgeleiteten cis-Platin-resistenten Tochterzelllinie Acis2780 auf den Inhibitor AEZS-126 alleine und in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin analysiert.

3.1 Vitalitätsassay

3.1.1 Mittlere inhibitorische Konzentration

Der IC₅₀-Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) ist die Konzentration eines Inhibitors, bei der die Vitalität einer Zellpopulation auf die Hälfte ihres Ausgangswertes reduziert wurde. Dieser Wert wurde für die verwendeten Inhibitoren mit Hilfe von Vitalitätsassays individuell für jede Zelllinie bestimmt. Mit den gewonnenen Ergebnissen konnte die Wirksamkeit der einzelnen Inhibitoren auf die vorliegenden Ovarialkarzinom-Zelllinien ermittelt werden und die einzusetzenden Konzentrationsbereiche für die folgenden Versuche festgelegt werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse und Ermittlung von Mittelwerten wurden die Versuchsreihen unabhängig voneinander jeweils in Triplikaten bis zu zehn mal wiederholt.

Wirkung von Rapamycin auf die Vitalität der Zelllinien A2780 und Acis2780

Zunächst wurde untersucht, in wie weit sich das Immunsuppressivum Rapamycin auf die Vitalität der untersuchten Zelllinien A2780 und Acis2780 auswirkt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät (10^2 Zellen/Well), nach 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Rapamycin, zwischen $0,1\mu\text{M}$ und $20\mu\text{M}$, versetzt und nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden mit Kristallviolett angefärbt. Die Messung der vorhandenen Menge an Kristallviolett in den einzelnen Wells, die mit der Zellvita-

lität korreliert, erfolgte mit einem ELISA-Reader, die Auswertung und Darstellung mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel. Die Vitalität wurde in Prozent angegeben und bezieht sich auf einen unbehandelten Zell-Kontrollansatz, der in jedem Experiment mitgeführt wurde. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und in Mittelwerten mit entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

Es stellte sich heraus, dass Rapamycin bei beiden untersuchten Zelllinien zur konzentrationsabhängigen Minderung der Vitalität führte. Nach 24 Stunden Inkubation mit Rapamycin konnte ein IC₅₀-Wert von 12µM für die Zellen der Zelllinie A2780 (Abb. 3.1) und von 14µM für die Platin-resistenten Acis2780-Zellen (Abb. 3.2) ermittelt werden.

Zusätzlich zeigte sich, wie zu erwarten, eine zeitabhängige Verminderung der Zellzahl. Nach 48-stündiger Inkubation mit Rapamycin war eine geringere Konzentration von 2µM bei den A2780-Zellen und 0,5µM bei den Acis2780-Zellen als mittlere inhibitorische Konzentration ausreichend.

Nach 72 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor konnte ein weiteres Abnehmen der IC₅₀-Werte auf 0,08µM bei A2780 und 0,1µM bei Acis2780 beobachtet werden.

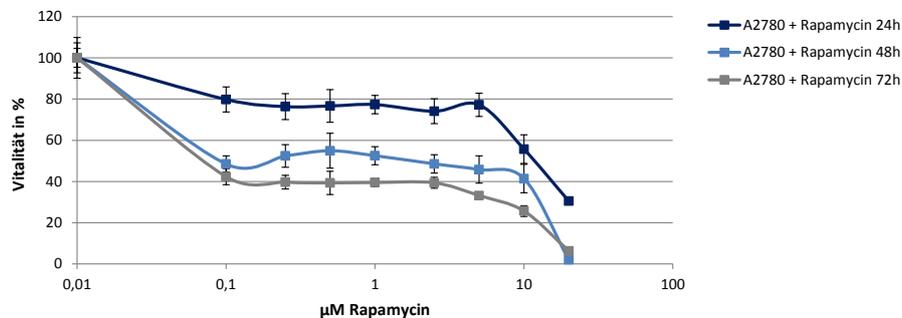


Abbildung 3.1: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie.

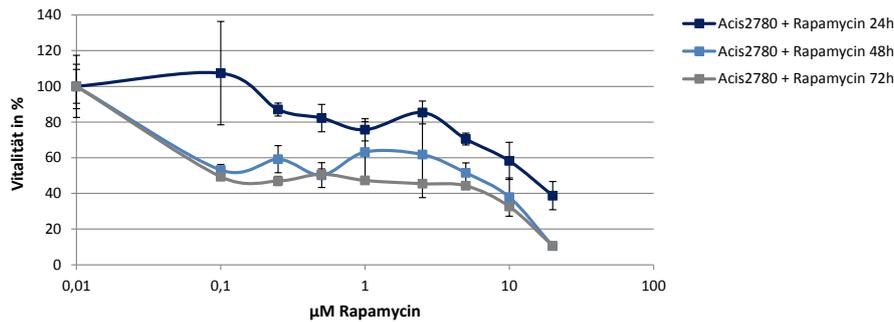


Abbildung 3.2: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie.

Abb. 3.1 - 3.2: Die Zellen wurden für jeweils 24h, 48h und 72h mit den angegebenen Konzentrationen von Rapamycin inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Wirkung von AEZS-126 auf die Vitalität der Zelllinien A2780, Acis2780 und SKOV-3

Der Wirkstoff AEZS-126 wurde zur Ermittlung der IC₅₀-Werte in Konzentrationen zwischen 0,2µM und 200µM eingesetzt. Der Versuchsablauf erfolgte identisch zu dem oben geschilderten Versuch mit Rapamycin.

Auch hier konnte festgestellt werden, dass AEZS-126 bei allen untersuchten Zelllinien (A2780, Acis2780, SKOV-3) zu einer konzentrationsabhängigen Vitalitätsreduktion führte. Der IC₅₀-Wert nach 24 Stunden Inkubation der A2780-Zellen (Abb. 3.3) konnte auf 5µM festgelegt werden. Dieser senkte sich nach 48 Stunden auf 0,5µM und nach 72 Stunden stieg er wiederum leicht an auf 0,75µM.

Bei der Acis2780-Zelllinie (Abb. 3.4) betragen die IC₅₀-Werte nach 24 Stunden 5µM und nach 48 Stunden 1µM. Nach 72 Stunden fiel die mittlere inhibitorische Konzentration geringfügig auf 0,9µM.

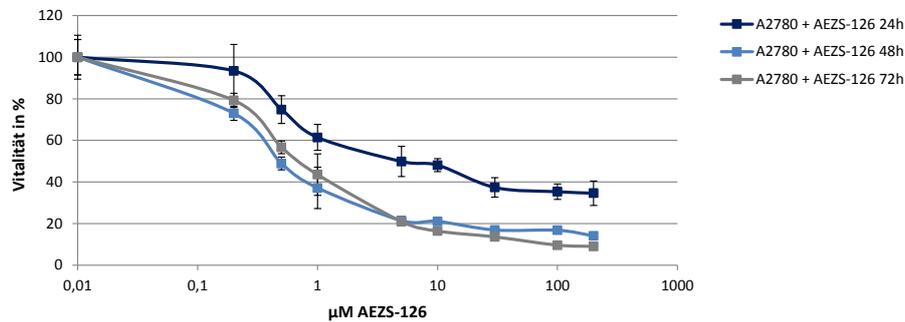


Abbildung 3.3: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie.

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 entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von zehn unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

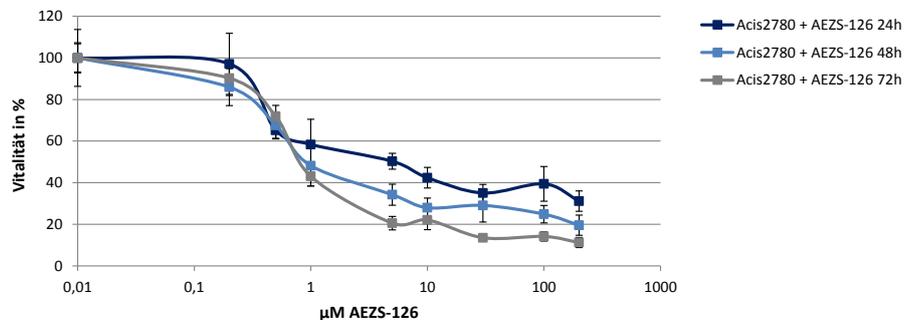


Abbildung 3.4: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie.

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 entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von neun unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Zum Vergleich der Ergebnisse wurde parallel zu den Zelllinien A2780 und Acis2780 auch die epitheliale Ovar-Adenokarzinom-Zelllinie SKOV-3 (Abb. 3.5) untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation mit AEZS-126 zeigte sich ein IC50-Wert von 170µM, nach 48 Stunden von 6,5µM und nach 72 Stunden von 1µM. Damit konnte eine zu erwartende konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von AEZS-126 gezeigt werden.

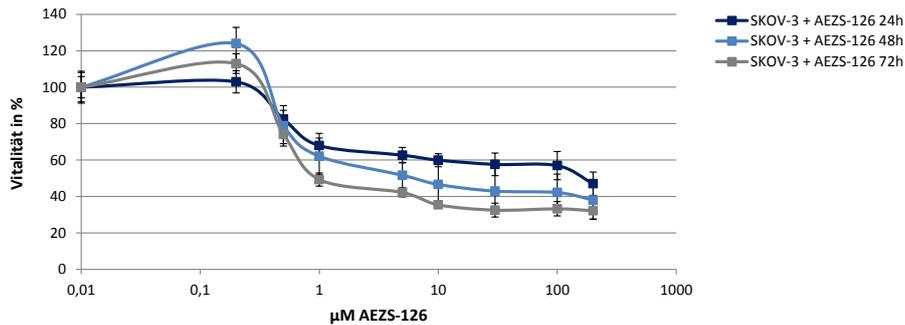


Abbildung 3.5: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der SKOV-3-Zelllinie.

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 entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

In folgender Tabelle findet sich ein Überblick über alle IC50-Werte, die in dieser Arbeit ermittelt werden konnten.

Tabelle 3.6: Zusammenstellung aller im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC50-Werte

		A2780	Acis2780	SKOV-3
Rapamycin	24 h	12 µM	14 µM	
	48 h	2 µM	0,5 µM	
	72 h	0,08 µM	0,1 µM	
AEZS-126	24 h	5 µM	5 µM	170 µM
	48 h	0,5 µM	1 µM	6,5 µM
	72 h	0,75 µM	0,9 µM	1 µM

Wirkung von AEZS-126 in Kombination mit Rapamycin auf die Vitalität der Zelllinien A2780 und Acis2780

In den folgenden Experimenten wurde ermittelt, in wieweit sich die Wirksamkeit von AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der Zellen auswirkt, wenn diese beiden Inhibitoren in Kombination verabreicht werden (Abb. 3.7 - 3.12). Nach Aussäen und 24-stündigem Inkubieren der Zellen wurden diese mit Kombinationen verschiedener Konzentrationen von AEZS-126 (0,2 μ M bis 10 μ M) und Rapamycin (1 μ M bis 20 μ M) versetzt.

Diese Kombinationsversuche mussten mit einer anderen Charge von Zellen durchgeführt werden als die zuvor dargestellten Untersuchungen zur Ermittlung der IC50-Werte. Dadurch ergaben sich bei kleinen Konzentrationen von AEZS-126 Differenzen in den absoluten Werten der vitalen Zellen nach Behandlung mit diesem Inhibitor im Vergleich zu den zuvor dargestellten Versuchen. Da aber in jedem dieser Kombinationsversuche die nötigen Kontrollen enthalten waren und die erhaltenen Ergebnisse stets mit diesen mitgeführten Kontrollen in Bezug gesetzt wurden, sind auch die nachfolgend dargestellten Ergebnisse valide.

Bereits nach 24-stündiger Inkubation bewirkte die Kombination der beiden Inhibitoren einen starken synergistischen Effekt, der die Vitalität sowohl in den parentalen A2780-Zellen als auch in den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen bereits bei kleinsten Konzentrationen von 0,2 μ M AEZS-126 mit 1 μ M Rapamycin stark herabsetzte. Nach 48 und 72 Stunden konnte ebenfalls eine gegenseitige Wirkverstärkung gezeigt werden.

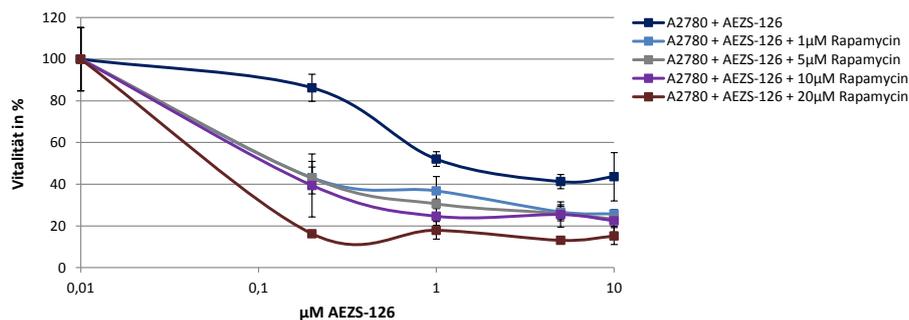


Abbildung 3.7: Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der A2780-Zelllinie nach 24 Stunden.

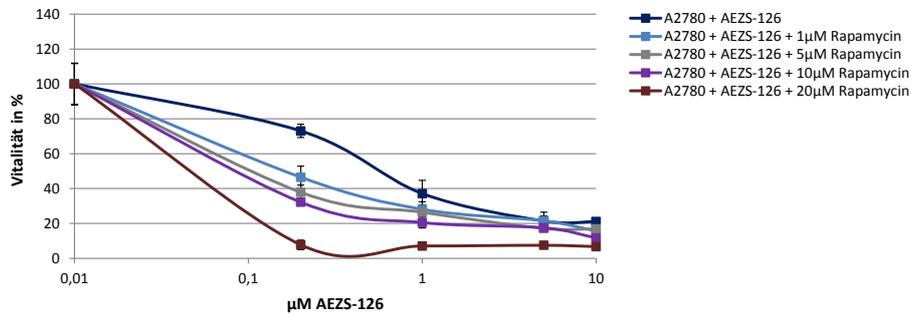


Abbildung 3.8: Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der A2780-Zelllinie nach 48 Stunden.

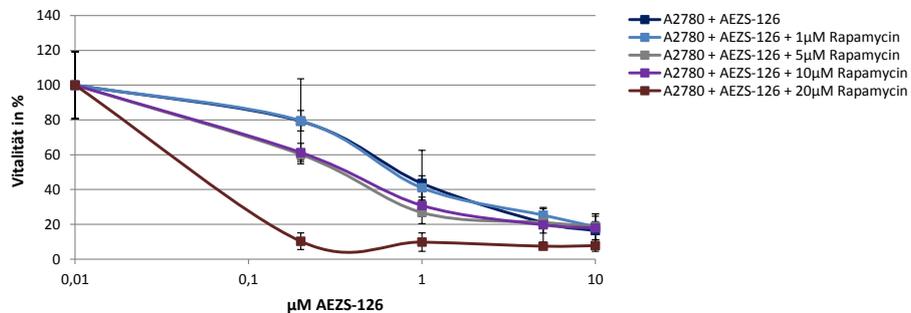


Abbildung 3.9: Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der A2780-Zelllinie nach 72 Stunden.

Abb. 3.7 - 3.9: Die Zellen wurden für jeweils 24h, 48h und 72h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 und Rapamycin inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Der starke Anstieg der Vitalität der Acis2780-Zellen bei kleinen Konzentrationen der alleinigen AEZS-126-Behandlung ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich nach anfänglicher Verminderung der Vitalität innerhalb des längeren Beobachtungszeitraums ein Wachstumsvorteil für gegen den Wirkstoff resistente Zellen ergab, der zu einer verstärkten Vermehrung dieser Zellen führte.

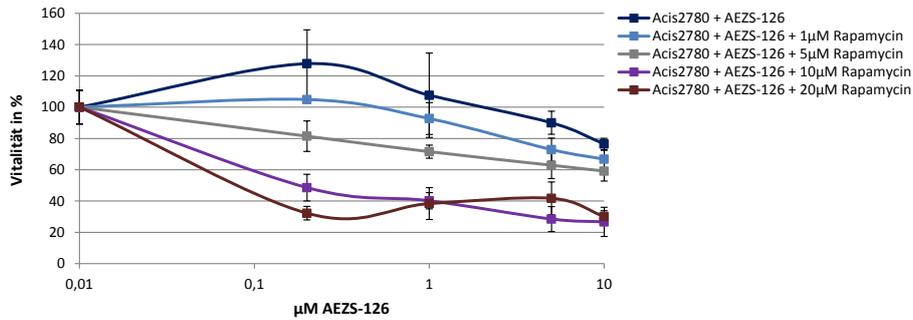


Abbildung 3.10: Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie nach 24 Stunden.

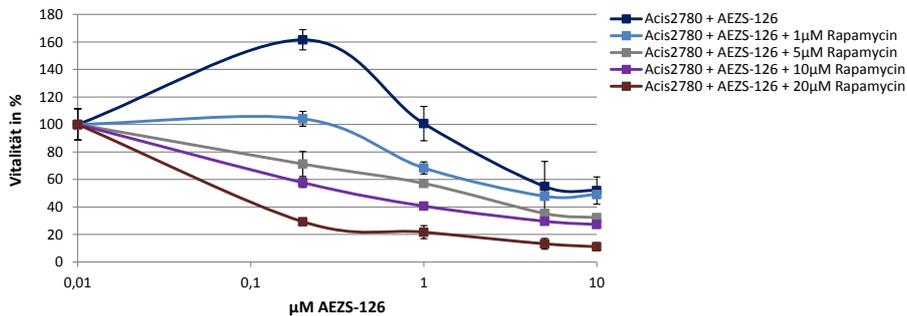


Abbildung 3.11: Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie nach 48 Stunden.

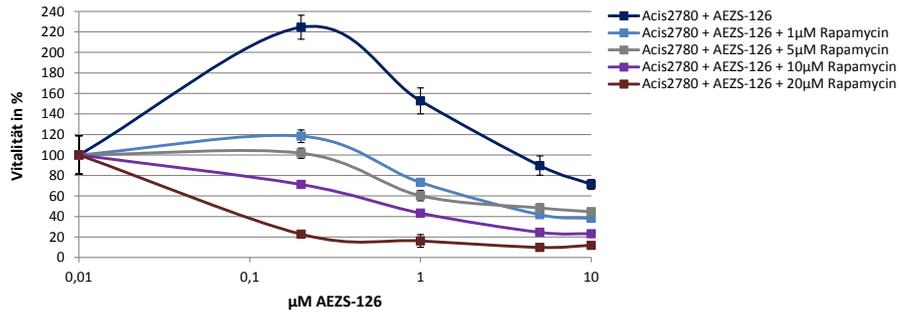


Abbildung 3.12: Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie nach 72 Stunden.

Abb. 3.10 - 3.12: Die Zellen wurden für jeweils 24h, 48h und 72h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 und Rapamycin inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.1.2 Effekte der Inhibitoren auf nicht proliferierende Zellen

Um die Effekte der beiden Inhibitoren, Rapamycin und AEZS-126, auf nicht proliferierende Zellen zu untersuchen, wurden die Zelllinien A2780 und Acis2780 in FCS-freiem Medium kultiviert. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte in den bereits verwendeten Konzentrationen (Rapamycin zwischen 0,1 μ M und 20 μ M, AEZS-126 zwischen 0,2 μ M und 200 μ M). Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Vitalität in den Zellkulturen bestimmt.

Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Zelllinien A2780 (Abb. 3.13, 3.15) und Acis2780 (Abb. 3.14, 3.16) nach Behandlung mit Rapamycin bzw. AEZS-126 in FCS-freiem Medium nach 24-stündiger Inkubation. Die Auswertungen nach 48 und 72 Stunden ergaben vergleichbare Ergebnisse.

Bei der Behandlung mit Rapamycin und FCS-freiem Medium konnte festgestellt werden, dass die Vitalität der Zellen weniger vermindert wurde als durch die alleinige Behandlung von Zellen mit Rapamycin, die in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. Dennoch konnte auch bei nicht proliferierenden Zellen eine konzentrationsabhängige Verminderung der Vitalität festgestellt werden, die bei Rapamycin-Konzentrationen von weniger als 5 μ M um 16% bei A2780-Zellen und um 38% bei Acis2780-Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe sank. Höhere Rapamycin-Konzentrationen von mehr als 5 μ M bewirkten bei A2780-Zellen eine Verminderung der Vitalität bis zu 38% im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen, bei Acis2780-Zellen stellten sich Vitalitätsunterschiede in ähnlicher Größenordnung dar wie bei Konzentrationen unter 5 μ M (bis zu 38%).

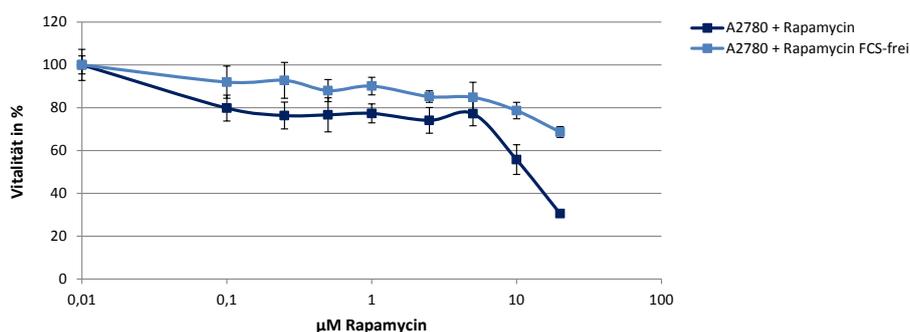


Abbildung 3.13: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden A2780-Zellen (A2780 + Rapamycin FCS-frei) im Vergleich zu proliferierenden A2780-Zellen (A2780 + Rapamycin).

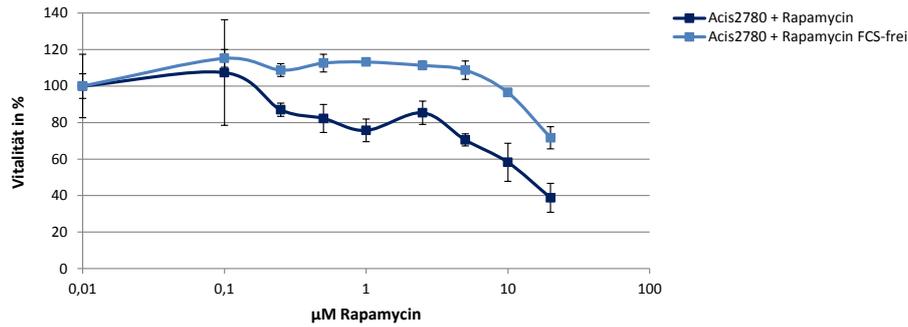


Abbildung 3.14: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden Acis2780-Zellen (Acis2780 + Rapamycin FCS-frei) im Vergleich zu proliferierenden Acis2780-Zellen (Acis2780 + Rapamycin).

Abb. 3.13 - 3.14: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von Rapamycin in FCS-freiem Medium inkubiert (+ Rapamycin FCS-frei). Im Vergleich dazu ist die Wirkung von Rapamycin auf proliferierende Zellen in FCS-haltigem Medium dargestellt (+ Rapamycin). Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

Im Vergleich dazu wurden die Zellen der Zelllinien A2780 und Acis2780 vor der Wirkung von AEZS-126 bei gleichzeitiger Behandlung mit FCS-freiem Medium eindeutig geschützt, wie in den Abbildungen 3.15 und 3.16 dargestellt. Dies zeigt, dass AEZS-126 keinen Effekt auf Zellen hat, die sich in der G0-Phase befinden.

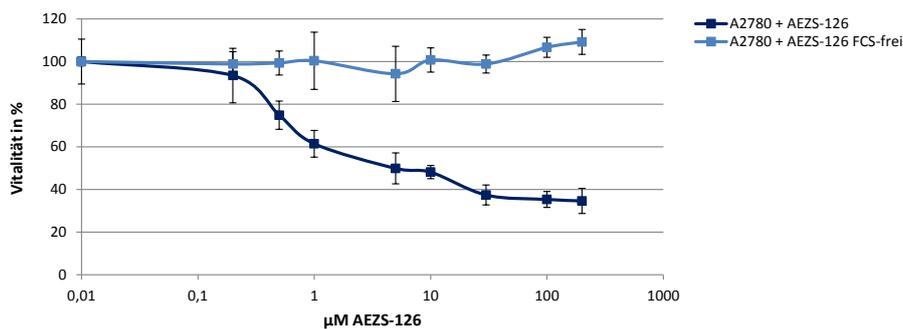


Abbildung 3.15: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden A2780-Zellen (A2780 + AEZS-126 FCS-frei) im Vergleich zu proliferierenden A2780-Zellen (A2780 + AEZS-126).

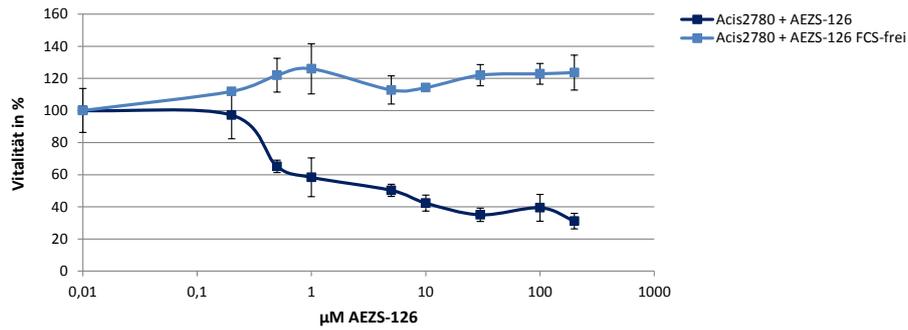


Abbildung 3.16: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden Acis2780-Zellen (Acis2780 + AEZS-126 FCS-frei) im Vergleich zu proliferierenden Acis2780-Zellen (Acis2780 + AEZS-126).

Abb. 3.15 - 3.16: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 in FCS-freiem Medium inkubiert (+ AEZS-126 FCS-frei). Im Vergleich dazu ist die Wirkung von AEZS-126 auf proliferierende Zellen in FCS-haltigem Medium dargestellt (+ AEZS-126). Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

3.1.3 Vitalitätsassay in Kombination mit zVAD-fmk, Necrostatin-1 und Necrox-2

Nachdem die Wirksamkeit der Inhibitoren Rapamycin und AEZS-126 auf die untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und Acis2780 nachgewiesen und die optimalen Wirkstoffkonzentrationen festgelegt werden konnten, stellte sich die Frage, durch welchen Mechanismus der Zelltod hervorgerufen worden war. Zu diesem Zweck erfolgten weiterführende Untersuchungen dieser Inhibitoren in Kombination mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, welcher die Induktion von apoptotischen Prozessen verhindert, mit dem selektiven Nekroptose-Inhibitor Necrostatin-1 und mit Necrox-2, welcher den nekrotischen Zelltod blockiert.

Für diese mechanistischen Untersuchungen zu der Art des Zelltodes wurden die Zellen in 96-Well-Platten kultiviert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Inhibitoren zugesetzt. Zunächst wurden zVAD-fmk, Necrostatin-1 oder Necrox-2 in die entsprechenden Wells pipettiert, um den Substanzen die Möglichkeit zu geben, ihre Wirkung zu entfalten. Direkt danach erfolgte der Zusatz der Inhibitoren in den jeweils angegebenen Konzentrationen (Abb. 3.17 - Abb. 3.32).

Die im folgenden eingesetzten Konzentrationen von zVAD-fmk, Necrostatin-1 und Necrox-2 wurden in Vorversuchen ermittelt und hatten in den hier verwendeten Konzentrationen alleine keinen Einfluß auf die Vitalität und das Wachstumsverhalten von A2780- bzw. Acis2780-Zellen (Daten nicht gezeigt) [122]. So wurde zVAD-fmk mit einer Konzentration von 30µM, Necrostatin-1 mit Konzentrationen von 48,2µM bis 100µM und Necrox-2 im Konzentrationsbereich von 10µM bis 40µM im Well eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen, wie in den vorherigen Versuchen, mit Konzentrationen von 0,1µM bis 20µM Rapamycin bzw. 0,2µM bis 200µM AEZS-126 versetzt. Zur Kontrolle und besseren Vergleichbarkeit der Experimente untereinander wurden in jedem Versuch Wells angelegt, in denen die ausgesäten Zellen alleine mit Rapamycin bzw. AEZS-126 behandelt wurden. Die Inkubation erfolgte 24, 48 und 72 Stunden lang. Die Experimente wurden erneut jeweils in Triplikaten durchgeführt und in Mittelwerten mit entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

Wirkung von Rapamycin in Kombination mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 auf die Vitalität der Zelllinien A2780 und Acis2780

Nach 24-stündiger Inkubation mit Rapamycin konnte bei den Ovarialkarzinomzellen A2780 (Abb. 3.17) eine leichte Steigerung der Vitalität festgestellt werden, wenn die Zellen zugleich mit zVAD-fmk inkubiert worden waren; insbesondere bei Rapamycin-Konzentrationen oberhalb von 10µM. Dies weist auf einen partiellen Schutz durch

zVAD-fmk vor toxischen Einflüssen des mTOR-Inhibitors Rapamycin hin. Nach einer Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden mit Rapamycin in Kombination mit zVAD-fmk konnten, im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit Rapamycin, keine schützenden Effekte des Caspaseinhibitors auf die Vitalität der A2780-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.18 und 3.19). Necrostatin-1 konnte zu keiner Zeit signifikante Effekte auf die Vitalität der mit Rapamycin behandelten Zellen erzeugen.

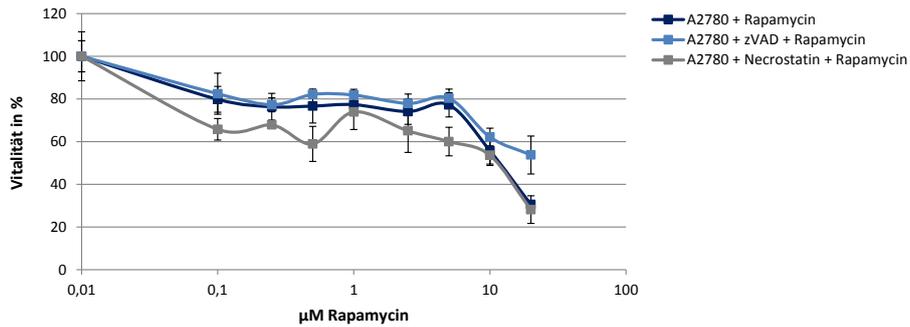


Abbildung 3.17: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden.

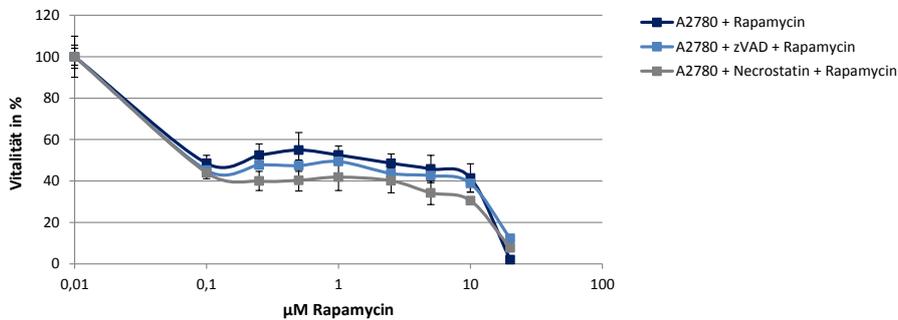


Abbildung 3.18: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden.

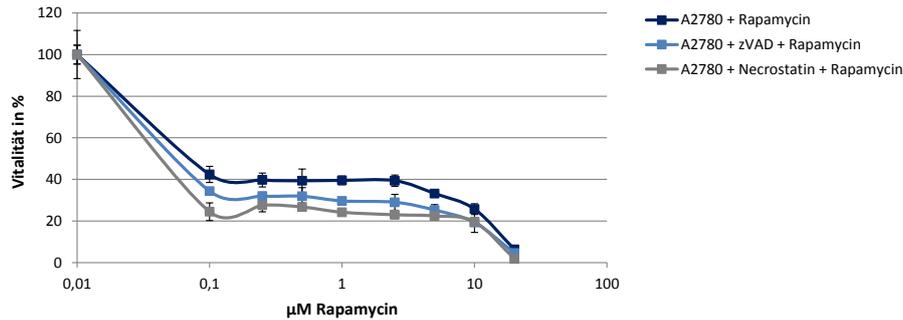


Abbildung 3.19: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden.

Abb. 3.17 - 3.19: Die Zellen wurden für jeweils 24h, 48h und 72h mit den angegebenen Konzentrationen von Rapamycin in Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

Bei den Platin-resistenten Zellen der Zelllinie Acis2780 hingegen konnte ein deutlicher Schutz vor den toxischen Effekten von Rapamycin durch die Koinkubation mit zVAD-fmk erreicht werden (Abb. 3.20 - 3.22). Die Steigerung der Vitalität betrug nach 24 Stunden Inkubation zwischen 10% und 30% und nach 72 Stunden bis zu 20%. Bei höheren Rapamycin-Konzentrationen ab 5μM nach 24 Stunden und 2,5μM nach 72 Stunden, näherten die Kurven sich einander wieder an. Die Kombination von Necrostatin-1 mit Rapamycin zeigte erst nach 72 Stunden eine geringe Hemmung des nekroptotischen Zelltodes bei Rapamycin-Konzentrationen zwischen 0,1μM und 1μM (Abb. 3.22).

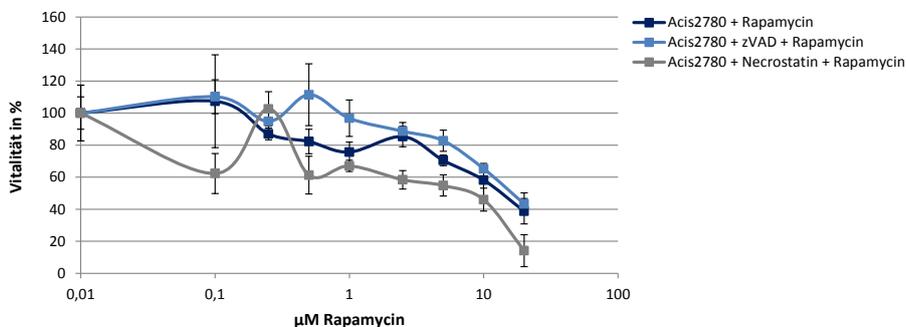


Abbildung 3.20: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden.

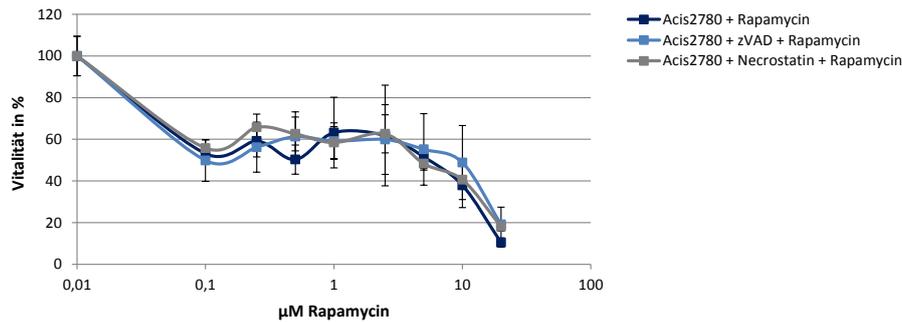


Abbildung 3.21: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden.

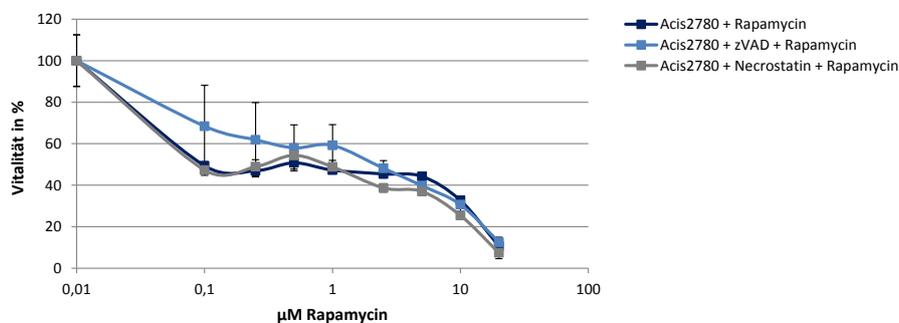


Abbildung 3.22: Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden.

Abb. 3.20 - 3.22: Die Zellen wurden für jeweils 24h, 48h und 72h mit den angegebenen Konzentrationen von Rapamycin in Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

Wirkung von AEZS-126 in Kombination mit zVAD-fmk bzw. Necrostatin-1 bzw. Necrox-2 auf die Vitalität der Zelllinien A2780 und Acis2780

In den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen zeigten weder zVAD-fmk noch Necrostatin-1 in Kombination mit AEZS-126 einen signifikanten protektiven Effekt auf die beiden Zelllinien A2780 und Acis2780 (Abb. 3.23 - 3.28).

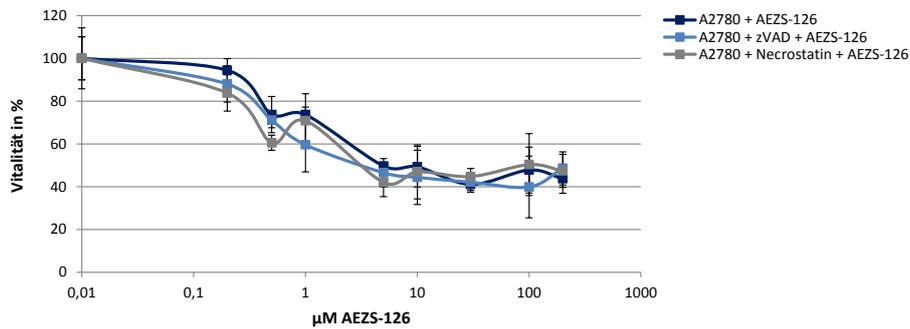


Abbildung 3.23: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden.

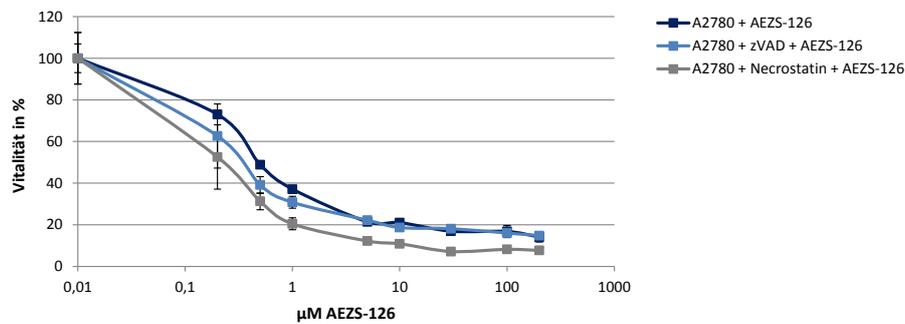


Abbildung 3.24: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden.

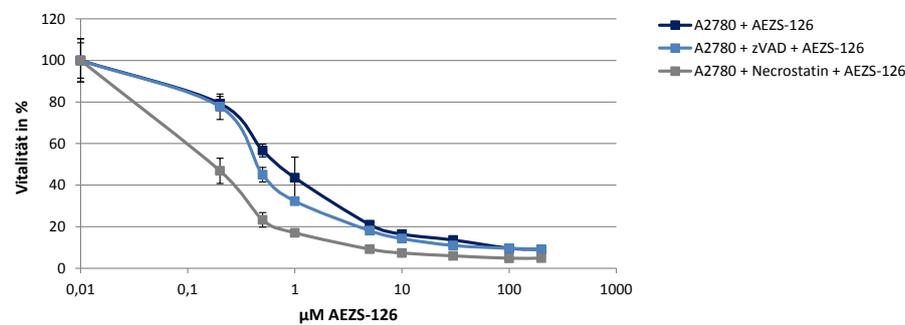


Abbildung 3.25: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden.

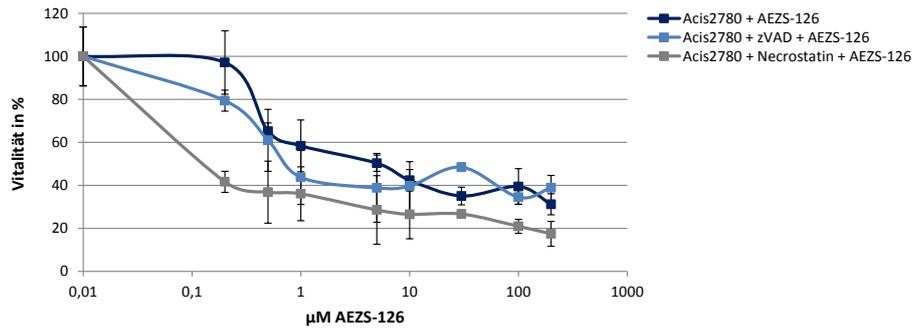


Abbildung 3.26: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden.

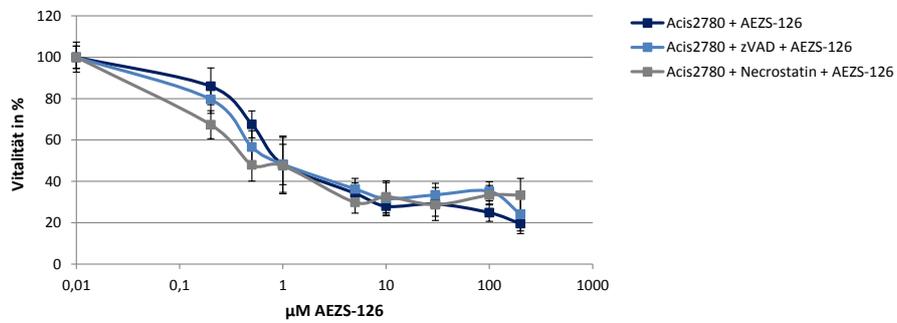


Abbildung 3.27: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden.

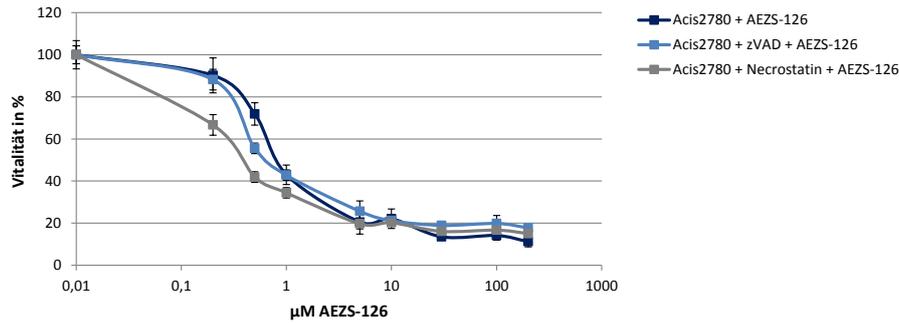


Abbildung 3.28: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden.

Abb. 3.23 - 3.28: Die Zellen wurden für jeweils 24h, 48h und 72h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 in Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

Aus diesem Grund wurde parallel eine Versuchsreihe angesetzt, in der sowohl A2780- als auch Acis2780-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Necrostatin-1 versetzt wurden. In Vorversuchen war gezeigt worden, dass auch diese höheren Konzentrationen von Necrostatin-1 keinen Einfluß auf die Vitalität der parentalen A2780-Zellen sowie der cis-Platin-resistenten Tochterzellen Acis2780 hatten, wenn die Inkubation nicht länger als 24 Stunden dauerte (Daten nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass es bei höheren Konzentration von 75μM und 100μM Necrostatin-1 zu steigenden Vitalitätswerten kam, die 20% bis zu 50% höher lagen als die Vitalität in den Ansätzen, die nur mit AEZS-126 inkubiert worden waren (Abb. 3.29 und 3.30).

Die Vitalitätskurve der A2780-Zellen mit alleinigem Zusatz von AEZS-126 unterscheidet sich von den entsprechenden Kurven in Abb. 3.23 bzw. der zur IC50-Ermittlung verwendeten Kurven. Dies könnte dadurch hervorgerufen worden sein, dass in die Kontroll-Ansätze mit A2780-Zellen und AEZS-126 zusätzlich auch (im Gegensatz zu den obigen Kurven) eine größere Menge an Lösungsmittel gegeben werden musste, da höhere Konzentrationen von Necrostatin-1 eingesetzt worden sind. Diese größere Menge von Lösungsmittel könnte im Wechselspiel mit AEZS-126 die Zellen dann auch stärker geschädigt haben.

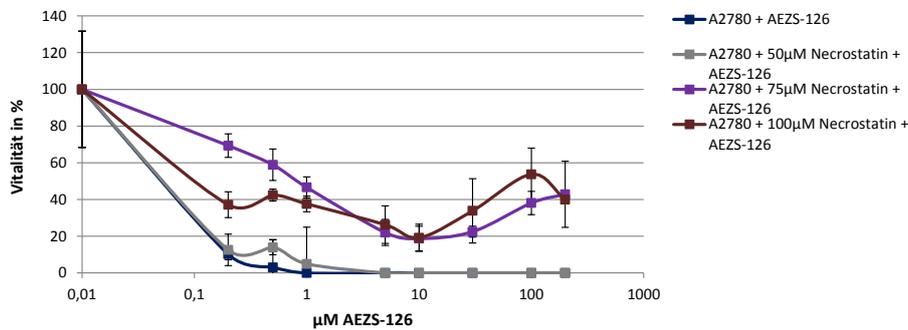


Abbildung 3.29: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Necrostatin-1.

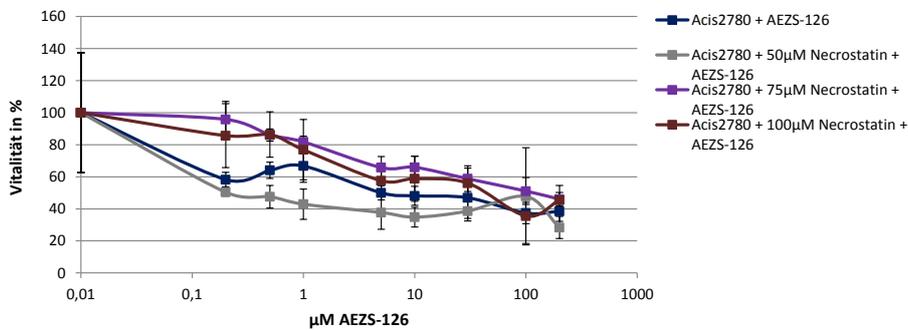


Abbildung 3.30: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Necrostatin-1.

Abb. 3.29, 3.30: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Necrostatin-1 inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

In weitergehenden Untersuchungen wurde zusätzlich der Weg über den nekrotischen Zelltod mit dem spezifischen Inhibitor Necrox-2 untersucht. Hierbei konnte in keiner der beiden Zelllinien A2780 und Acis2780 eindeutige Veränderungen der Vitalität festgestellt werden (Abb. 3.31 und 3.32).

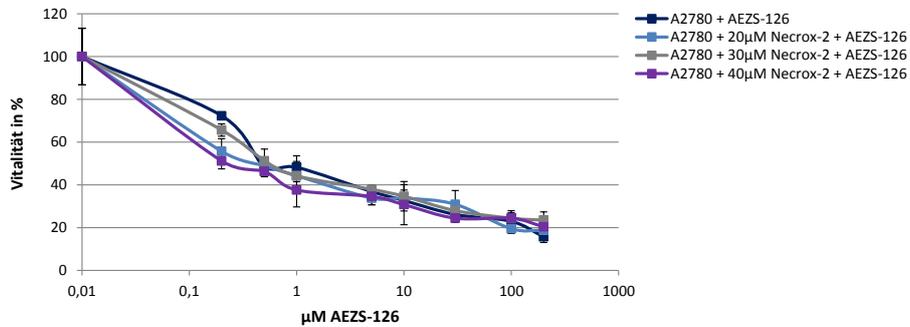


Abbildung 3.31: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit Necrox-2.

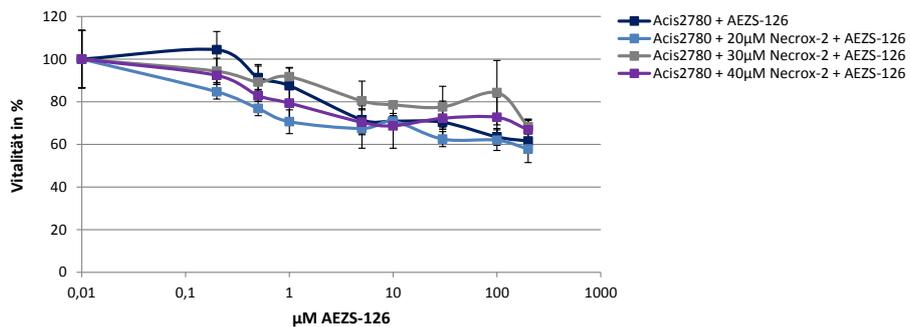


Abbildung 3.32: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit Necrox-2.

Abb. 3.31 und 3.32: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Necrox-2 inkubiert. Die Vitalität wurde mittels Kristallviolettassay ermittelt und prozentual dargestellt. Der 100%-Wert entspricht jeweils der Vitalität unbehandelter Kontrollansätze, die bei jedem Experiment mitgeführt wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

3.2 Western-Blot

AEZS-126 ist ein Inhibitor des PI3K-AKT-Signalweges, der bisher noch nicht eingehend in Ovarialkarzinomen untersucht worden war. Da bisher jegliche Untersuchungen zur Wirkung von AEZS-126 auf molekularer Ebene in Ovarialkarzinomen fehlten, wurden die Effekte von AEZS-126 auf die Proteinexpression in A2780- und Acis2780-Zellen anhand einiger ausgewählter Schlüsselproteine mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens analysiert.

Um die Effekte von AEZS-126 in den beiden Zelllinien vergleichen zu können, wurden mit den für die folgenden Versuche verwendeten Zellchargen eine erneute IC₅₀-Bestimmung nach 24-stündiger Inkubation durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Für Acis2780 wurde der IC₅₀-Wert erneut mit 5 μ M für AEZS-126 ermittelt, bei A2780 wurde ein geringfügig veränderter IC₅₀-Wert von 3,5 μ M AEZS-126 nach 24-stündiger Inkubation ermittelt (vgl. Tabelle 3.6). Diese Konzentrationen waren die Basis für die folgenden Versuche.

Die A2780-Zellen wurden mit 3,5 μ M und 7 μ M AEZS-126 und zusätzlich mit einer Kombination aus 3,5 μ M AEZS-126 mit 5 μ M Rapamycin inkubiert. Die Zellen der Zelllinie Acis2780 mit 2,5 μ M, 5 μ M und 10 μ M AEZS-126 und einer Kombination aus 5 μ M AEZS-126 mit 5 μ M Rapamycin.

Zur Immundetektion wichtiger Signaltransduktionsproteine wurden die monoklonalen Primärantikörper, welche spezifisch pAKT, pERK1 und pERK2, AKT, ERK1 und ERK2 detektieren, zusammen mit einem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-HRP) verwendet. Zusätzlich wurde eine β -Aktin-Ladekontrolle mit Hilfe eines spezifischen anti- β -Aktin-Primärantikörpers aus der Maus und des Sekundärantikörpers anti-Maus-HRP durchgeführt. Das Protein β -Aktin wurde zur Kontrolle herangezogen, da es ubiquitär vorhanden ist und in allen Zellen gleichstark exprimiert wird.

Nach 24-stündiger Inkubation mit dem Inhibitor AEZS-126 bzw. der Kombination von AEZS-126 mit Rapamycin, zeigte sich bei der parentalen Zelllinie A2780 (Abb. 3.33) eine verminderte pAKT-Expression, die jedoch mit steigender Konzentration des Inhibitors zu einer geringfügigen Zunahme der Expression von pAKT führte. Die Kombination von 3,5 μ M AEZS-126 mit 5 μ M Rapamycin bewirkte eine weitere Zunahme der Expression im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit 7 μ M AEZS-126, allerdings auch eine Schwächung im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle. Die Gesamtmenge an AKT in den Zellen zeigte relativ konstante Banden.

pERK1 und pERK2 wurden bei der kleineren AEZS-126-Konzentration von 3,5 μ M deutlich stärker exprimiert als die unbehandelte Kontrolle, zeigten aber eine Abschwächung bei steigender Konzentration und Kombinationsbehandlung. pERK2

wurde jeweils stärker exprimiert als pERK1. Die Gesamtmenge an ERK1 bzw. ERK2 zeigte vergleichbare Intensitätsunterschiede wie die zugehörigen phosphorylierten Proteine.

Die β -Aktin-Ladekontrolle zeigte durchgehend konstante Werte, so dass die beobachteten Expressionsunterschiede nicht durch unterschiedlich große Proteinmengen bedingt waren.

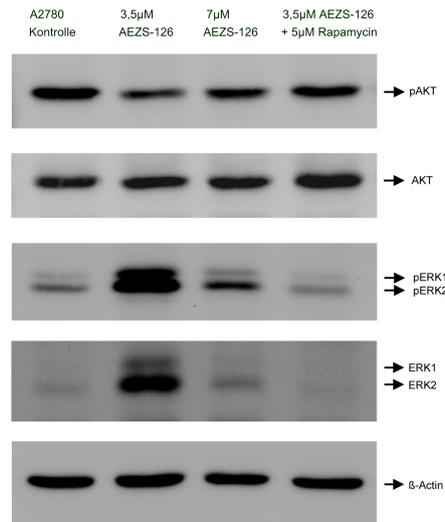


Abbildung 3.33: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Expression verschiedener Signaltransduktionsproteine bei der Zelllinie A2780.

Die Tumorzellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 und Rapamycin inkubiert. In jede Spur des Gels wurden 20µg Protein aufgetragen, durch SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit spezifischen Primärantikörpern und anschließend mit spezifischen Sekundärantikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden mit Chemilumineszenz-HRP-Substrat detektiert. Zur internen Kontrolle wurde das ubiquitär vorhandene Protein β -Aktin verwendet.

Die Zellen der Zelllinie Acis2780 (Abb. 3.34) wurden ebenfalls für 24 Stunden mit den Cytostatika inkubiert. Hier kam es zu einer eindeutigen Abschwächung der pAKT-spezifischen Bande bei der kleinsten eingesetzten Konzentration von 2,5µM AEZS-126 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bei Erhöhung der AEZS-126-Konzentration auf 5µM und 10µM konnte keine signifikante Zunahme der Auswirkungen mehr erkannt werden. Dagegen zeigte sich allerdings bei der Kombination von 5µM AEZS-126 mit 5µM Rapamycin eine starke Verminderung der Expression von pAKT. Die Intensität der AKT-Protein-spezifischen Banden zeigten im Vergleich zu pAKT ähnliche Stärken, mit Ausnahme der Bande der Kombinationsbehandlung.

Hier zeigte sich überraschenderweise eine sehr viel stärkere Expression von AKT.

pERK1 und pERK2 (sowie ERK1 und ERK2) wurden in der Kontrollprobe mit unbehandelten Acis2780-Zellen nur sehr schwach exprimiert, während die Expression bei Zusatz von 2,5µM AEZS-126 bzw. bei der Kombinationsbehandlung mit 5µM AEZS-126 und 5µM Rapamycin deutlich induziert wurde. Bei höheren Konzentrationen von AEZS-126 (5µM, 10µM) fiel die Expression von pERK1, pERK2 sowie ERK1 und ERK2 allerdings wieder weniger stark aus. pERK1 wurde wie zuvor schon bei den A2780-Zellen auch hier unter allen Bedingungen wieder jeweils schwächer exprimiert als pERK2.

β -Aktin zeigte auch bei Acis2780 durchgehend konstante Werte, so dass die beobachteten Expressionsunterschiede auch hier nicht durch unterschiedlich große Proteinmengen bedingt waren.

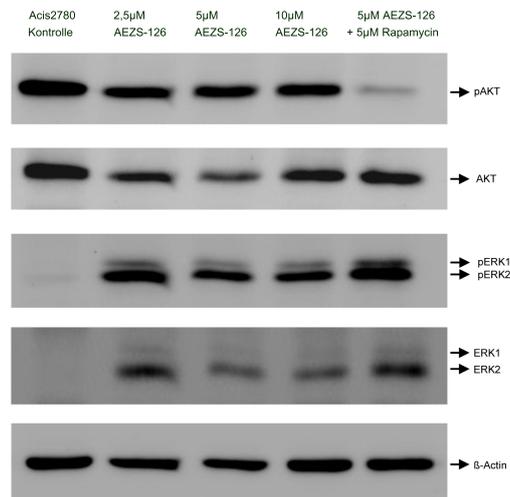


Abbildung 3.34: AEZS-126-abhängige Effekte auf die Expression verschiedener Signaltransduktionsproteine bei der Zelllinie Acis2780.

Die Tumorzellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 und Rapamycin inkubiert. In jede Spur des Gels wurden 20µg Protein aufgetragen, durch SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit spezifischen Primärantikörpern und anschließend mit spezifischen Sekundärantikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden mit Chemilumineszenz-HRP-Substrat detektiert. Zur internen Kontrolle wurde das ubiquitär vorhandene Protein β -Aktin verwendet.

Im Vergleich der beiden Zelllinien (Abb. 3.35) zueinander ist auffällig, dass AKT und pAKT bei Acis2780 sehr viel stärker exprimiert wurde als bei A2780. Bei der Expression von pERK1/2 bzw. ERK1/2 scheint dieser Effekt entgegengesetzt zu sein.

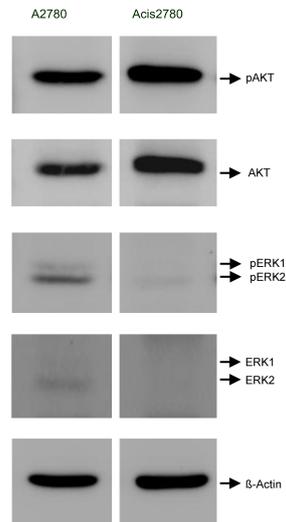


Abbildung 3.35: Vergleich der Expression verschiedener Signaltransduktionsproteine bei den Zelllinien A2780 und Acis2780.

In jede Spur des Gels wurden 20 μ g Protein aufgetragen, durch SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde über Nacht mit spezifischen Primärantikörpern und anschließend mit spezifischen Sekundärantikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden mit Chemilumineszenz-HRP-Substrat detektiert. Zur internen Kontrolle wurde das ubiquitär vorhandene Protein β -Aktin verwendet.

3.3 FACS

3.3.1 Zellzyklus-FACS

Der Zellzyklus kernhaltiger Zellen kann unterteilt werden in Mitosen und Interphasen. Während es bei der Mitose (M-Phase) zur Zellteilung und damit zur Bildung zweier Tochterzellen kommt, kann man die Interphase, welche der Wachstumsphase zwischen den Mitosen entspricht, nochmals unterteilen in eine S-Phase, in welcher die DNA verdoppelt wird und G-Phasen (G1-Phase, G2-Phase), in welchen RNA und Proteine synthetisiert werden [123]. In der G1-Phase liegen die Chromosomen als einzelnes Chromatid vor, in der G2-Phase, die sich zwischen der DNA-Synthese und der Zellteilung befindet, bestehen die Chromosomen aus zwei identischen Chromatiden. Die G0-Phase ist eine Bezeichnung für Zellen, die ausdifferenziert sind und sich in einer Ruhephase befinden, in der keine Zellteilung stattfindet. Der Zustand ist reversibel, so dass die Zellen jederzeit wieder in die G1-Phase zurückkehren können [123].

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können die Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus nachgewiesen werden. Diese Technik wurde angewendet, um die Frage zu beantworten, in wieweit die Inhibitoren AEZS-126 und Rapamycin Einfluss auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus haben und welche Veränderungen eine Konzentrationssteigerung bzw. eine Kombinationsbehandlung mit sich bringen.

Nach Synchronisierung der Zellen durch Behandlung mit einem FCS-freien Medium wurden diese jeweils 24 Stunden mit den Cytostatika inkubiert. Die A2780-Zellen wurden mit den Konzentrationen von 1,75 μ M, 3,5 μ M und 17,5 μ M AEZS-126, 6,5 μ M, 13 μ M und 65 μ M Rapamycin bzw. der Kombination aus 3,5 μ M AEZS-126 mit Rapamycin in den Konzentrationen von 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M versetzt, die Acis2780-Zellen mit 2,5 μ M, 5 μ M und 25 μ M AEZS-126, 9 μ M, 18 μ M und 90 μ M Rapamycin bzw. der Kombination aus 5 μ M AEZS-126 mit 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M Rapamycin. Als Kontrollwerte wurden jeweils unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO mitgeführt. Am Tag der FACS-Messung wurden die Zellen mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid angefärbt. Es erfolgte die Messung von je 20000 Zellen, die als Dot-Plots und Histogramme dargestellt wurden. Bei einem Dot-Plot entspricht jeder Punkt einer gemessenen Zelle. Der gemessene Wert der Fluoreszenz ist direkt proportional zur enthaltenen Menge an DNA. Die Ergebnisse konnten in jeweils drei unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

Die sub-G0-Population stellt tote Zellen dar. Eine Unterscheidung zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod kann in dieser Untersuchung nicht erfolgen.

Die sub-G0-Population nimmt sowohl bei A2780 (Abb. 3.36), als auch bei Acis2780

(Abb. 3.37) mit Zugabe von Rapamycin erkennbar zu. Vor allem bei den höheren Konzentrationen von 65µM (A2780) und 90µM (Acis2780) Rapamycin ist ein starker Anstieg der Anzahl an toten Zellen festzustellen. Die Verteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen ändert sich bei beiden Zelllinien, indem sich die Zellen aus allen Phasen in die sub-G0-Population verschieben, wobei der größte Anteil aus der G0/G1-Phase zu stammen scheint.

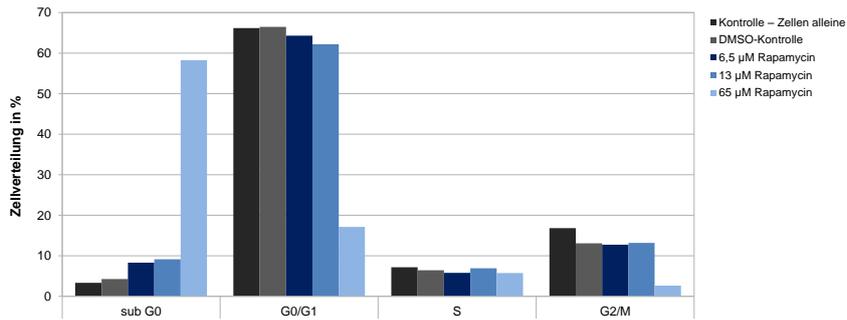


Abbildung 3.36: Rapamycin-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der A2780-Zellen.

Bei den Acis2780-Zellen fällt auf, dass der Zusatz von 18µM Rapamycin zu einem starken Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase führt (Abb. 3.37). Somit führt diese Konzentration von Rapamycin sehr wahrscheinlich zu einem Zellzyklus-Stopp, bei dem die Zellen in der G0/G1-Phase arretiert werden. Erst die höhere Konzentration von 90µM Rapamycin führt zu einem drastischen Anstieg der Zellen in der sub-G0-Population, d.h. einem apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltod.

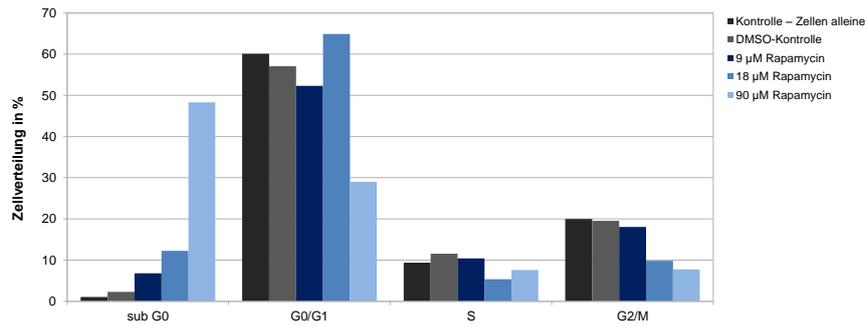


Abbildung 3.37: Rapamycin-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der Acis2780-Zellen.

Abb. 3.36 und 3.37: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von Rapamycin inkubiert, am Tag der Messung mit Propidiumiodid gefärbt und die Verteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen mit Hilfe einer FACS-Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. Unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) wurden zur Vergleichbarkeit mitgeführt. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Ähnliches Verhalten der Zellen wie bei Zugabe von Rapamycin ist bei der Inkubation mit AEZS-126 zu beobachten. Wiederum ist durch die 24-stündige Inkubation mit AEZS-126 in beiden Zelllinien A2780 (Abb. 3.38) und Acis2780 (Abb. 3.39) eine konzentrationsabhängige Zunahme der sub-G0-Population festzustellen. Dieser Zellanteil scheint auch hier größtenteils aus der G0/G1-Phase des Zellzyklus zu stammen.

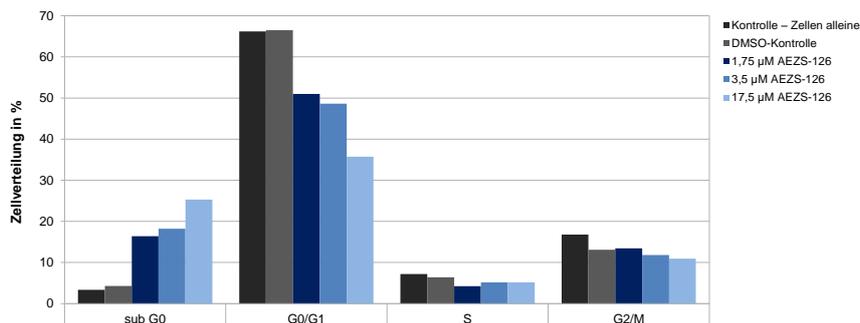


Abbildung 3.38: AEZS-126-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der A2780-Zellen.

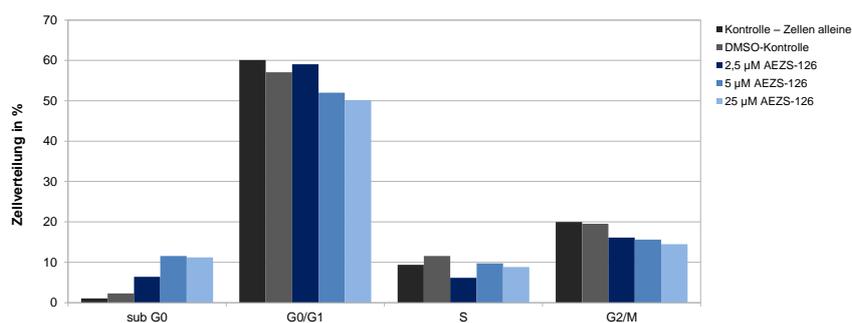


Abbildung 3.39: AEZS-126-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der Acis2780-Zellen.

Abb. 3.38 und 3.39: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 inkubiert, am Tag der Messung mit Propidiumiodid gefärbt und die Verteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen mit Hilfe einer FACS-Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. Unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) wurden zur Vergleichbarkeit mitgeführt. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Erwartungsgemäß konnte bei der Kombinationsbehandlung der Zellen mit Rapamycin und AEZS-126 (Abb. 3.40 und 3.41) ein synergistischer Effekt der Inhibitoren festgestellt werden. Schon bei geringen Konzentrationen der Inhibitoren findet sich nach einer 24-stündigen Kombinationsbehandlung ein Großteil der Zellen in der sub-G0-Phase wieder. Diese Zellen scheinen wiederum hauptsächlich aus der G0/G1-Phase zu stammen.

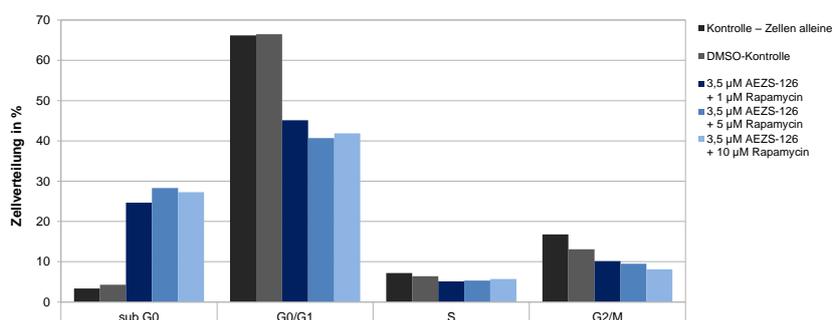


Abbildung 3.40: Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf den Zellzyklus der A2780-Zellen.

Wie schon zuvor bei der Monotherapie von Acis2780 mit Rapamycin (Abb. 3.37), wurde in den cis-Platin-resistenten Zellen auch bei der Kombinationsbehandlung mit 5µM AEZS-126 und 5µM Rapamycin ein Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase beobachtet (Abb. 3.41). Bei dieser Kombination der Inhibitoren kommt es sehr wahrscheinlich ebenfalls zu einem Zellzyklus-Stopp, bei dem die Zellen in der G0/G1-Phase arretiert werden. Erst bei höherer Rapamycin-Konzentration (10µM Rapamycin kombiniert mit 5µM AEZS-126) kann ein Anstieg der toten Zellen in der sub-G0-Population beobachtet werden.

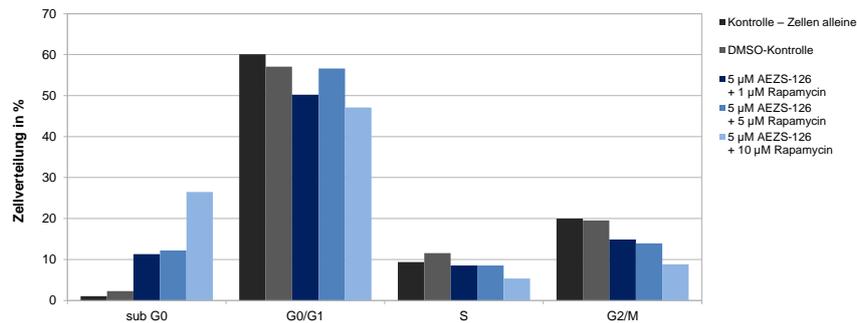


Abbildung 3.41: Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf den Zellzyklus der Acis2780-Zellen.

Abb. 3.40 und 3.41: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 und Rapamycin inkubiert, am Tag der Messung mit Propidiumiodid gefärbt und die Verteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen mit Hilfe einer FACS-Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. Unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) wurden zur Vergleichbarkeit mitgeführt. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.3.2 Apoptose-FACS

Als nächster Schritt wurden die durch programmierten Zelltod abgestorbenen Zellen nachgewiesen. Dies wurde mit Hilfe einer Markierung der Zellen mit Annexin-V in Kombination mit einer FACS-Analyse durchgeführt. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, welches sich bei lebenden Zellen an der Membraninnenseite befindet. Kommt es zur Apoptose, wird Phosphatidylserin an die Außenseite der Membran transloziert und kann nun von den zugegebenen Antikörpern gegen Annexin-V gebunden werden. Zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Prozessen wurde die Annexin-V-FITC-Markierung mit einer Propidiumiodid-Färbung kombiniert, da Annexin-V sowohl an die Außenseite der Membran apoptotischer Zellen binden kann als auch in nekrotische Zellen eindringen kann, deren Membran durchlässig geworden sind. Propidiumiodid dagegen dringt nur in nekrotische Zellen ein. Dies ermöglicht die Unterscheidung zu apoptotischen Zellen [124].

Die Zelllinien A2780, Acis2780 und SKOV-3 wurden wie im zuvor beschriebenen Zellzyklus-FACS nach Synchronisierung der Zellen durch Inkubation mit einem FCS-freien Medium für 24 Stunden mit Cytostatika versetzt. Es wurden erneut die Konzentrationen von 1,75 μ M, 3,5 μ M und 17,5 μ M (A2780), 2,5 μ M, 5 μ M und 25 μ M (Acis2780) und 85 μ M, 170 μ M und 850 μ M (SKOV-3) AEZS-126 verwendet. Zusätzlich wurde eine Versuchsreihe mit Rapamycin in den Konzentrationen 13 μ M (A2780) und 18 μ M (Acis2780) angelegt und wiederum eine Kombination aus AEZS-126 (3,5 μ M bzw. 5 μ M) mit Rapamycin in den Konzentrationen von 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M. Unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO wurden zur Kontrolle mitgeführt. Die Markierung mit Annexin-V-FITC und die Färbung mit Propidiumiodid wurden am Tag der FACS-Messung vorgenommen. Es erfolgte die FACS-Messung von je 20000 Zellen.

Aus den Ergebnissen konnte ermittelt werden, dass in allen drei untersuchten Zelllinien (Abb. 3.42 - 3.44) eine konzentrationsabhängige Abnahme der vitalen Zellen bei Behandlung mit AEZS-126 stattfand. Gleichzeitig kam es zu einem proportionalen Anstieg des nekrotischen Zelltodes. Die Anzahl der Zellen, die durch Apoptose zugrunde gingen, war vernachlässigbar klein. Bei den SKOV-3-Zellen konnte eine sehr starke Wirksamkeit des Inhibitors festgestellt werden.

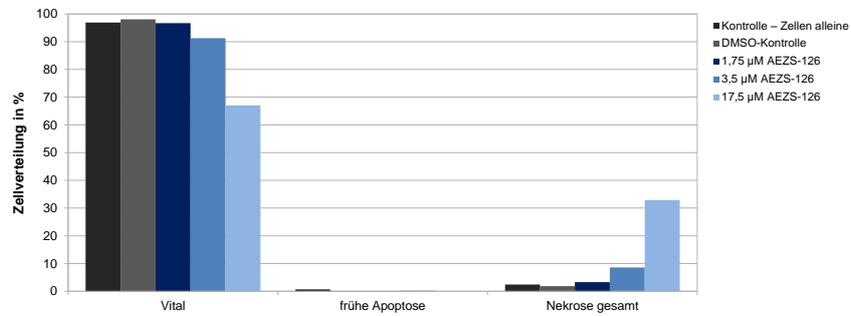


Abbildung 3.42: AEZS-126-abhängige Effekte auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie A2780.

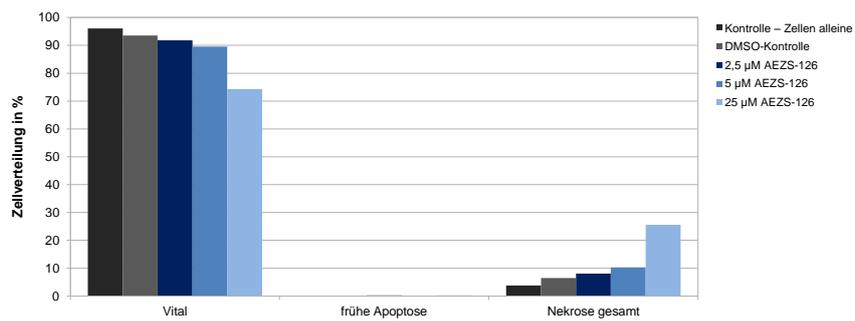


Abbildung 3.43: AEZS-126-abhängige Effekte auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie Acis2780.

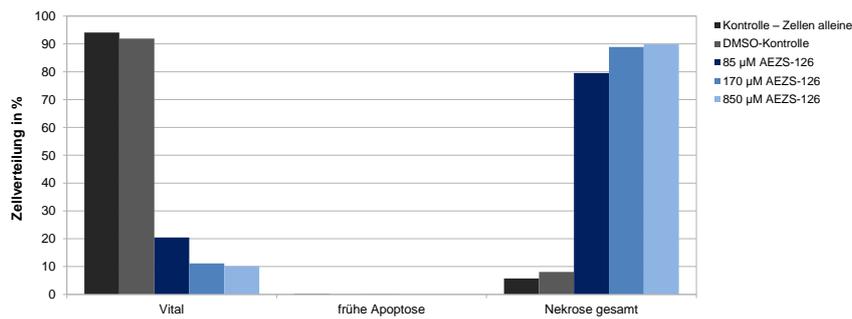


Abbildung 3.44: AEZS-126-abhängige Effekte auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie SKOV-3.

Abb. 3.42 und 3.44: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 inkubiert, am Tag der Messung mit Annexin-V-FITC markiert und mit Propidiumiodid gefärbt und die Verteilung auf die verschiedenen Mechanismen des Zelltodes mit Hilfe einer FACS-Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. Unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) wurden zur Vergleichbarkeit mitgeführt. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Erneut zeigte eine Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin sowohl in den parentalen A2780-Zellen (Abb. 3.45) als auch in den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen (Abb. 3.46) deutliche Effekte auf die Vitalität der Zellen. Durch die gegenseitige Wirkverstärkung zeigte sich eine erhöhte Abnahme der Vitalität bei bereits geringen Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe. Der Mechanismus des Zelltodes beschränkt sich wiederum fast ausschließlich auf Nekrose.

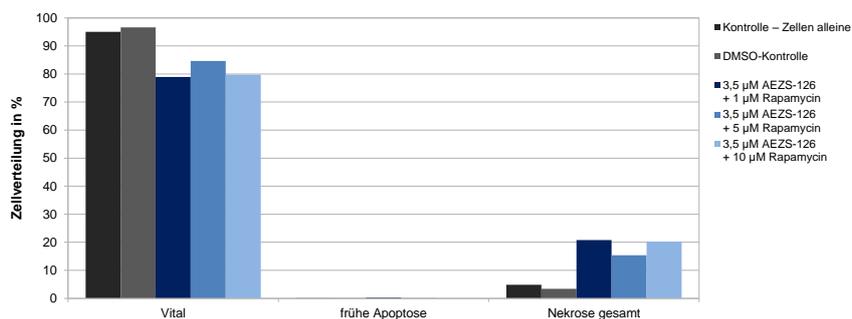


Abbildung 3.45: Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie A2780.

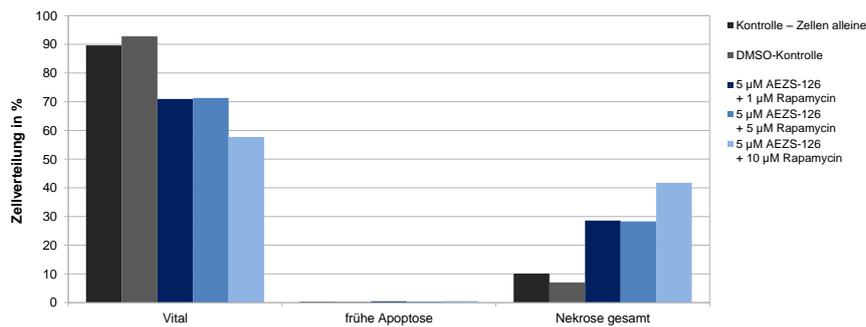


Abbildung 3.46: Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie Acis2780.

Abb. 3.45 und 3.46: Die Zellen wurden für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 und Rapamycin inkubiert, am Tag der Messung mit Annexin-V-FITC markiert und mit Propidiumiodid gefärbt und die Verteilung auf die verschiedenen Mechanismen des Zelltodes mit Hilfe einer FACS-Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. Unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) wurden zur Vergleichbarkeit mitgeführt. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.3.3 NK-Killing-FACS

Die NK-Zellen sind Teil des zellulären Abwehrsystems im Blut und den lymphatischen Geweben. In der Tumorabwehr haben sie besondere Bedeutung bei der Bekämpfung sich entwickelnder Tumorzellen. Sie sind fähig, neoplastische und virusinfizierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Dabei arbeiten sie unspezifisch und sind unabhängig von major-histocompatibility-complex (MHC)-Molekülen. NK-Zellen werden vorwiegend durch Zytokine von CD4-T-Lymphozyten aktiviert und reagieren vor allem in sehr frühen Phasen der Tumorentstehung und Metastasierung. Eine niedrige oder fehlende NK-Zellaktivität kann Tumorentstehung und -wachstum begünstigen. Über die Oberflächenmarker CD16 und CD56 können NK-Zellen identifiziert werden [125].

Zur Untersuchung der lytischen Aktivität wurde eine polyklonale NK-Zellkultur aus PBL und RPMI8866-Feeder-Zellen hergestellt. Die Lymphozyten des peripheren Blutes wurden aus frischem Vollblut eines gesunden Spenders gewonnen. Die Feeder-Zellen dienen der Versorgung und Stimulation der Immunzellen durch Bildung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen. Das eigene Wachstum der RPMI8866-Feeder-Zellen wurde durch Bestrahlung mit Gamma-Strahlen ausgeschaltet. Nach sechs Tagen wurden die isolierten primären Blutzellen mit Interleukin-2 versetzt und damit aktiviert. Dies führte zur klonalen Teilung der NK-Zellen. Tumorzellen der zu untersuchenden Zelllinien A2780 und Acis2780 wurden mit CFSE gefärbt und für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von AEZS-126 versetzt. Am Tag der FACS-Messung wurden die gewonnenen NK-Zellen mit eFLUOR-670 gefärbt und im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:5 (Tumorzellen:NK-Zellen) den Tumorzellen zugefügt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Wells mit Tumorzellen bzw. NK-Zellen alleine angelegt. Nach einer Koinkubation (Killing-Zeit) von 4 Stunden bei 37°C erfolgte die FACS-Messung mit je 20000 Zellen.

Abbildung 3.47 zeigt die Wirkung der NK-Zellen auf die Vitalität der Tumorzellen. In beiden Zelllinien A2780 und Acis2780 zeigte sich ein dem NK-Zell-Anteil entsprechender Anstieg der lysierten Zellen. Auffallend ist eine deutlich geringere Wirksamkeit der NK-Zell-Aktivität auf die Vitalität der cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen im Vergleich zu den parentalen A2780-Zellen. Der Anteil an lysierten Zellen bleibt bei Acis2780 bei kleineren Anteilen an NK-Zellen (Verhältnis Tumorzellen:NK-Zellen 1:1 und 1:2) bei ca. 50% im Vergleich zu A2780. Bei höheren Anteilen an NK-Zellen (Verhältnis Tumorzellen:NK-Zellen 1:5) erhöht sich der Anteil an lysierten Acis2780-Zellen deutlich, bleibt aber nach wie vor weit hinter der Lyserate der parentalen A2780-Zellen zurück.

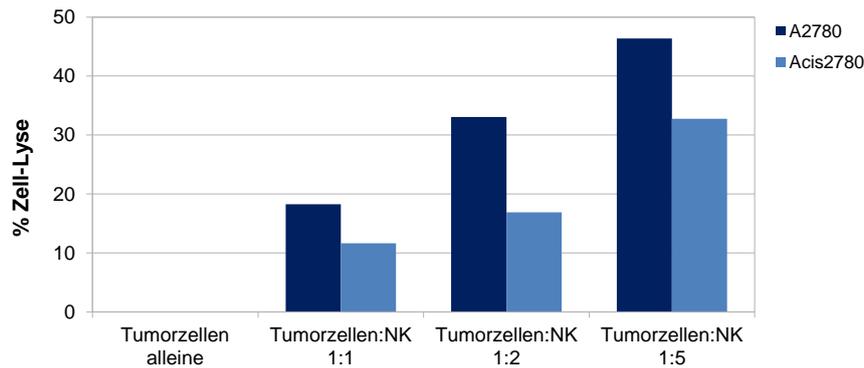


Abbildung 3.47: Lytische Aktivität polyklonaler NK-Zellen auf die Zellen der Zelllinien A2780 und Acis2780.

Die Tumorzellen wurden mit CFSE gefärbt und nach 48h mit eFLUOR-670-gefärbten NK-Zellen für jeweils 4h in den angegebenen Tumorzellen:NK-Zellen-Verhältnissen inkubiert. Die Zell-Lyse wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. Der Prozentsatz bezieht sich auf eine mitgeführte Kontrollprobe von Tumorzellen, die alleine mit Medium inkubiert wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Da die parentalen A2780-Zellen und die daraus hergestellten cis-Platin-resistenten Acis2780-Tochterzellen genetisch identisch sind, sich jedoch durch das Expressionsniveau von AKT unterscheiden, wurde untersucht, welchen Effekt eine AKT-Inhibition durch AEZS-126 auf die Lyse der Tumorzellen durch NK-Zellen hat.

Im Folgenden zeigte sich, dass der Zusatz von AEZS-126 in beiden Zelllinien (Abb. 3.48 und 3.49) die Zelllyse vor allem in hohen Konzentrationen noch steigerte. So konnten mit kleineren AEZS-126-Konzentrationen von 200nM und 400nM vorinkubierte Zellen im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit NK-Zellen behandelt wurden, nur eine geringe Verstärkung der lytischen Aktivität bewirken. Bei Konzentrationen ab 600nM AEZS-126 kam es bei A2780-Zellen zu einer Steigerung der Zelllyse um 10% bis über 20% gegenüber den Tumorzellen ohne AEZS-126. Bei den Acis2780-Zellen stellte sich dieser Effekt ab einer Konzentration von 800nM AEZS-126 ein. Hier kam es zu einer Steigerung der Lyse um 20% bis beinahe 40%.

Zusätzlich zeigte sich ein Angleichen der Lyse-Raten zwischen den beiden Zelllinien ab Konzentrationen von 800nM AEZS-126, was zu der Annahme führt, dass es möglich ist, durch Vorbehandlung der cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen mit dem spezifischen AKT-Inhibitor AEZS-126 das Killing so weit zu verstärken, dass auch die Acis2780-Zellen in etwa so gut von NK-Zellen lysiert werden wie die parentalen

A2780-Zellen.

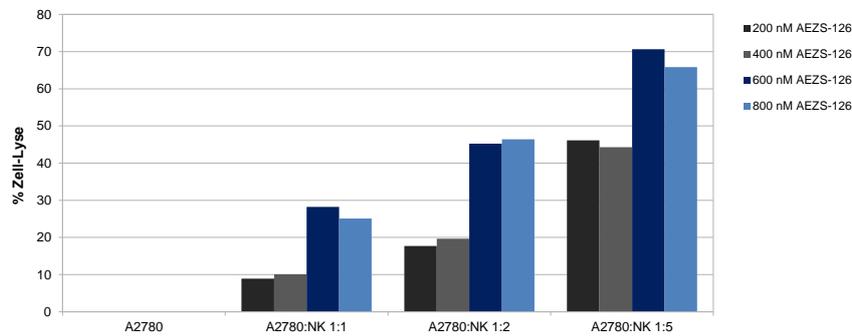


Abbildung 3.48: AEZS-126-abhängige Effekte auf die lytische Aktivität polyklonaler NK-Zellen auf die Zellen der Zelllinie A2780.

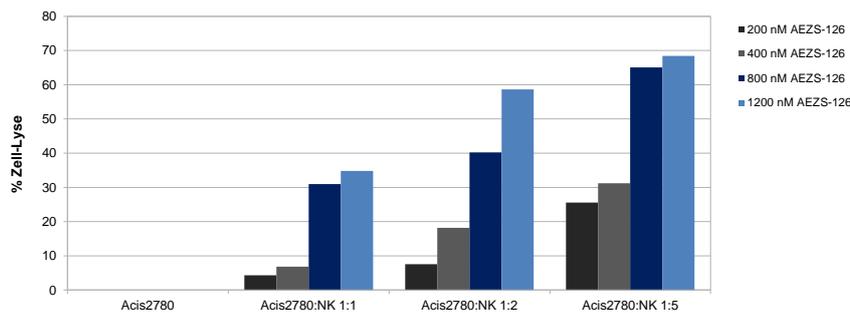


Abbildung 3.49: AEZS-126-abhängige Effekte auf die lytische Aktivität polyklonaler NK-Zellen auf die Zellen der Zelllinie Acis2780.

Abb. 3.48 und 3.49: Die Tumorzellen wurden mit CFSE gefärbt, für jeweils 24h mit den angegebenen Konzentrationen von AEZS-126 inkubiert und mit eFLUOR-670-gefärbten NK-Zellen für jeweils 4h mit den angegebenen Tumorzellen:NK-Zellen-Verhältnissen versetzt. Die Zell-Lyse wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse ermittelt und prozentual dargestellt. Der Prozentsatz bezieht sich auf eine mitgeführte Kontrollprobe von Tumorzellen, die alleine mit Medium inkubiert wurden. Die dargestellten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4 Diskussion

Die wichtige Rolle des PI3K-Signalweges in der Tumorentstehung und -progression wird seit Jahren mit großem Interesse verfolgt und weiter untersucht. Bedeutend ist vor allem die große Anzahl an Störungen dieses Signalweges in vielen Karzinomen, wie die Aktivierung vorgeschalteter Rezeptortyrosinkinasen, Überexpression oder Mutationen in der Aktivierung von PI3K, die Inaktivierung auf Grund von Mutationen oder der gänzliche Verlust von PTEN [126]. Daraus resultiert eine Deregulation des PI3K-Signalweges in vielen humanen Tumoren, welcher an der Regulation der Zellproliferation, der Apoptose- und Chemotherapieresistenz und des Zellmetabolismus beteiligt ist und so direkt auf die maligne Transformation einwirkt [127].

Auch bei der Ausbildung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika, wie z.B. gegen cis-Platin kommt unter anderem eine verstärkte Aktivität des PI3K-Signalweges in Tumorzellen als Ursache der Resistenz in Frage [128]. Insbesondere bei Tumorzellen, in denen sowohl p53 als auch K-Ras nicht mutiert sind, scheint eine Überexpression von pAKT eine essentielle Bedeutung für die Resistenz gegen cis-Platin zu haben, wie kürzlich am Beispiel der Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und Acis2780 gezeigt werden konnte [128].

Die Erforschung der intrazellulären Vorgänge und Komponenten des PI3K-Signalweges, sowie die Erkenntnis, dass dieser Signalweg oftmals für die maligne Entartung der Zellen verantwortlich ist, führte bereits zur Entwicklung vielversprechender Substanzen zur Behandlung von Tumorzellen, indem dieser Signalweg gehemmt wurde [129]. Im Gegensatz zu Zytostatika, welche nicht zwischen der Proliferation von Tumorzellen und gesunden Zellen unterscheiden können, stellen Inhibitoren des PI3K-Signalweges eine Möglichkeit dar, Tumorzellen gezielt anzugreifen und den in Tumorzellen oftmals deregulierten PI3K-AKT-Signalweg zu blockieren. Dies ermöglicht völlig neue Wege der Behandlung von Tumorpatienten [130].

Die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) hatten eine entscheidende Bedeutung in der Entschlüsselung der Rolle von PI3K in zellulären Prozessen [131]. Neben diesem wichtigen

Beitrag zur Grundlagenforschung konnten mit diesen beiden Inhibitoren auch die ersten Erfolge in der Wirkung gegen Ovarial-, Colon-, Hirn-, Lungen-, Prostata- und Brustkrebs gezeigt werden [130]. Wortmannin und LY294002 hemmen nachweislich die Bildung von PtdIns-3-P durch ihre Wirkung auf die PtdIns-3-Kinase [132][133]. Der Unterschied in der Wirkungsweise besteht in der Enzymbindung. Während Wortmannin eine kovalente Bindung eingeht, welche die Enzymaktivität irreversibel hemmt, bindet LY294002 die Kinase reversibel. LY294002 kann auf Grund des strukturell ähnlichen Aufbaus kompetitiv von ATP wieder aus der ATP-Bindungstasche der Kinase verdrängt werden [133]. Beide PI3K-Inhibitoren zeigen zusätzlich inhibierende Wirkung auf die Kinase-Aktivität von mTOR [134] und hemmen autophagische Prozesse in Hepatozyten [133]. LY294002 wurde *in vivo* und *in vitro* in morphologischen Untersuchungen von Ovarialkarzinomzellen eingesetzt und zeigte eine Zellkerndegeneration und ein vermindertes zytoplasmatisches Volumen, was auf die Einleitung apoptotischer Prozesse schließen lässt. Somit hemmt LY294002 nachweislich das Wachstum (*in vivo*) und die Zellproliferation (*in vitro*) von Ovarialkarzinomen [135].

Neuere Studien zeigen eine Antitumoraktivität in Ovarialkarzinomzellen durch Hemmung der Zellproliferation durch den AKT-Inhibitor Perifosin [136]. Hervorzuheben ist die Wirksamkeit von Perifosin auf die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien A2780, Acis2780 und SKOV-3. So konnte *in vitro* in allen Zelllinien eine antiproliferative Wirkung durch die Behandlung mit diesem AKT-Inhibitor nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Verstärkung der Effekte durch eine Kombination des Wirkstoffes mit cis-Platin nachgewiesen werden [137].

Ein weiterer guter Angriffspunkt im PI3K-Signalweg ist die Kinase mTOR. mTOR ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche durch Nährstoffe und Wachstumsfaktoren stimuliert werden kann und in diesem Signalweg unterhalb von AKT liegt [12]. Rückwirkend kann mTOR durch Komplexbildung die Kinase AKT aktivieren und führt so zur Hemmung der Autophagie. mTOR ist für die Regulation von Zellwachstum und Zellzyklus-Progression zuständig [12].

Zusätzlich zum PI3K-Signalweg reguliert mTOR auch die Aktivität anderer Signalkaskaden wie den MAPK-Signalweg [12], welcher an der Regulation von Zellproliferation, -differenzierung, -überleben und Zelltod beteiligt ist [40]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Störungen der beiden genannten Signalwege, PI3K- und MAPK-Signalweg, in Tumoren häufig gleichzeitig auftreten. Durch die Inhibition von mTOR können beide Signalkaskaden reguliert werden und es kommt zur Induktion der Autophagie und damit zur Hemmung des Tumorwachstums [12].

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin bewies bereits eine antiproliferative Wirkung

bei Tumorzellen *in vitro* und in Xenograft-Modellen durch Hemmung des PI3K-Signalweges [138]. Rapamycin bildet einen Komplex mit mTOR, was zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt und im PI3K-Signalweg zu einer Hemmung der Kinase AKT führt. Dies bewirkt wiederum die Induktion autophagischer Prozesse und wirkt damit dem Tumorwachstum entgegen [12].

AEZS-126 gehört zur Gruppe der niedermolekularen Pyridopyrazin-Verbindungen. Diese neue Generation von Klasse-I-PI3K-Inhibitoren zeigt eine hohe Wirksamkeit und Selektivität, was bereits für einige Tumorentitäten durch *in vitro*-Untersuchungen und *in vivo*-Xenograft-Modelle belegt werden konnte [37]. AEZS-126 hemmt PI3K- α in humanen Mammakarzinom- (MDA-MB468), Glioblastom- (U87), Kolonkarzinom- (Hct116), Prostatakarzinom- (PC-3) und Lungenkarzinom-Zelllinien (A549) im nanomolaren Bereich [82] und inhibiert damit AKT und die nachgeschalteten Substratphosphorylierungen [37]. Auf Grund der signifikanten Antitumoraktivität stellt AEZS-126 einen vielversprechenden Inhibitor für klinische Studien von humanen Tumoren dar [37].

Da bisher jegliche Untersuchungen zur Wirksamkeit von AEZS-126 in Ovarialkarzinomen fehlte, wurde in dieser Arbeit die Wirksamkeit und die Wirkungsweise von AEZS-126 auf verschiedene Zelllinien des Ovarialkarzinoms analysiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Kombination von AEZS-126 mit Rapamycin im Kontext von Ovarialkarzinomen eine potentielle Option für eine Kombinationstherapie darstellt. Da es gerade bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen sehr oft zur Ausbildung einer cis-Platin-Resistenz kommt, bei der es wie oben dargelegt zu einer Aktivierung des PI3K-Signalweges kommt, wurden diese Untersuchungen schwerpunktmäßig anhand der parentalen Zelllinie A2780 und deren cis-Platin-resistenten Tochterzelllinie Acis2780 durchgeführt.

Antiproliferative Effekte

In den durchgeführten Experimenten konnte eine Wirkung von AEZS-126 auch in Modellen für das Ovarialkarzinom nachgewiesen werden. Eine Behandlung der Zelllinien A2780 und Acis2780 mit AEZS-126 zeigte einen konzentrationsabhängigen antiproliferativen Effekt. Innerhalb von 24 Stunden konnte die Vitalität der Zellpopulationen mit AEZS-126 in einem Konzentrationsbereich von 5 μ M auf die Hälfte ihres Ausgangswertes reduziert werden. Bei längeren Inkubationszeiten mit AEZS-126 lagen die IC50-Werte sowohl bei den parentalen A2780-Zellen als auch bei der cis-Platin-resistenten Tochterzelllinie Acis2780 in einer zeitabhängig verringerten Größenordnung. Die IC50-Werte für AEZS-126 bewegten sich nach 48 und

72 Stunden Inkubation im Bereich zwischen 0,5 μ M und 1 μ M. Im Vergleich zu den meisten bislang veröffentlichten Studien liegen die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC50-Werte höher als bei anderen humanen Tumorzelllinien (MDA-MB468, U87, Hct116, PC-3, A549 und andere), bei welchen AEZS-126 schon im nanomolaren Bereich antiproliferative Aktivität zeigte [82]. Jedoch liegen die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC50-Werte von AEZS-126 bei Ovarialkarzinomen in derselben Größenordnung wie die IC50-Werte von AEZS-126 in diversen Brustkrebszelllinien [122].

Bei den Untersuchungen zur Wirkung von AEZS-126 fiel auf, dass es insbesondere bei längeren Inkubationszeiten bei kleinen Konzentrationen bis 1 μ M AEZS-126 zu einer Vitalitätssteigerung in der Zelllinie Acis2780 kam. Diese verstärkte Proliferation von Zellen bei geringen AEZS-126-Konzentrationen könnte eventuell durch einen Wachstumsvorteil von gegen den Wirkstoff resistente Zellen bedingt sein. Eine verstärkte Proliferation von Zellen unter geringen AEZS-126-Konzentrationen wurde zuvor auch schon bei anderen Tumorzelllinien beobachtet, so zum Beispiel bei *in vitro*-Versuchen mit den Mammakarzinom-Zelllinien HCC-1937 und MCF-7 [122]. Daher wird es in weiterführenden Versuchen, sei es *in vitro* oder auch *in vivo*, sehr wichtig sein, von Anfang an eine entsprechend hohe Konzentration von AEZS-126 einzusetzen, um die Ausbildung von resistenten Zellen zu vermeiden. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen deutlich, dass in beiden Zelllinien ab Zusätzen von 5 μ M AEZS-126 keine verstärkte Proliferation der Zellen mehr auftrat.

Bei der Zelllinie SKOV-3, die im Rahmen dieser Arbeit gelegentlich als weitere Ovarialkarzinomzelllinie zur Kontrolle eingesetzt wurde, ergab sich durch die Behandlung mit AEZS-126 ein klarer konzentrations- und zeitabhängiger Antitumor-Effekt. Die IC50-Werte lagen nach 24 Stunden bei 170 μ M und sanken nach längerer Inkubation mit AEZS-126 auf 6,5 μ M nach 48 Stunden und 1 μ M nach 72 Stunden. Geringe Konzentrationen von AEZS-126 bewirkten über eine längere Zeit bei den SKOV-3-Zellen nur eine sehr leicht erhöhte Proliferation, die sich jedoch im Bereich der Messschwankungen von zellulären Assays bewegte. Bereits ab einer Konzentration von 0,5 μ M AEZS-126 konnte ein klarer dosisabhängiger antiproliferativer Effekt von AEZS-126 auf SKOV-3 Zellen festgestellt werden. Durch diese Daten zur Wirkung von AEZS-126 in der epithelialen Ovar-Adenokarzinom-Zelllinie SKOV-3 wird deutlich, dass die in der Zelllinie Acis2780 beobachtete mögliche Resistenzentwicklung keine generelle Eigenschaft des Inhibitors bei Ovarialkarzinomzellen sein kann, sondern vielmehr eine charakteristische Eigenschaft der Acis2780-Zellen darstellt.

Im Vergleich zu den AEZS-126-abhängigen Effekten kam es beim Einsatz des Inhibitors Rapamycin ebenfalls zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Senkung der Vitalität bei den A2780-Zellen und den daraus abgeleiteten Acis2780-Zellen. Die IC50-Werte für Rapamycin lagen nach 24-stündiger Inkubation mit 12 μ M für die parentalen A2780-Zellen und mit 14 μ M für die cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen etwas höher als die IC50-Werte für AEZS-126. Vergleichbar zu den AEZS-126-abhängigen Effekten konnte auch für Rapamycin eine zeitabhängige Wirkung festgestellt werden, so dass die IC50-Werte bei den A2780-Zellen für Rapamycin nach längerer Inkubationszeit auf Werte zwischen 0,08 μ M und 2 μ M sanken. Bei der Platin-resistenten Zelllinie Acis2780 konnte nach 48-stündigem Behandlungszeitraum mit Rapamycin ein IC50-Wert von 0,5 μ M erzielt werden, der nach 72 Stunden auf 0,1 μ M sank.

Durch die Kombination der Wirkstoffe AEZS-126 und Rapamycin konnte ein synergistischer Effekt erzielt werden. So zeigten bereits Konzentrationen von 1 μ M Rapamycin mit 0,2 μ M AEZS-126 eine starke antiproliferative Wirkung. Dies könnte sich als ein neuer sinnvoller Ansatz zur Behandlung von Ovarialkarzinomen erweisen, zumal durch die Kombination von AEZS-126 und Rapamycin eine Proliferationsverstärkung auch bei kleinen Konzentrationen der Inhibitoren über den gesamten Beobachtungszeitraum verhindert werden konnte. Somit scheint auch die Ausbildung von Resistenzen durch den kombinierten Einsatz dieser beiden Inhibitoren verhindert zu werden. Die Ergebnisse dieser hier durchgeführten Kombinationstherapie von AEZS-126 mit Rapamycin stehen in guter Übereinstimmung mit anderen, bereits veröffentlichten Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Kombinationstherapien, deren einzelne Wirkstoffe an verschiedenen Stellen des PI3K-Signalweges angreifen, eine höhere Wirksamkeit zeigen als die einzelnen Wirkstoffe alleine. So bewirkte beispielsweise eine Kombination von LY294002 mit Rapamycin eine signifikant höhere Inhibition der Zellproliferation bei T-Zellen im Vergleich zu einer Monotherapie [83].

Desweiteren gibt es auch Beispiele für Kombinationstherapien, bei denen Inhibitoren, die auf Komponenten des PI3K-Signalweges wirken, mit Inhibitoren kombiniert wurden, deren Zielproteine ausserhalb des PI3K-Signalweges liegen. Es konnten in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen des Ovarialkarzinoms durch die Kombination des PI3K-Inhibitors LY294002 mit dem Mitoseinhibitor Paclitaxel, welcher an β -Tubulin bindet und so die Zellteilung stört [139], eine erhöhte Wirksamkeit der Chemotherapie auf Tumorwachstum und -verbreitung nachgewiesen werden [12]. Ebenso ergab die Kombination von Carboplatin mit Paclitaxel bessere Ergebnisse im Vergleich zu den

jeweiligen Monotherapien [1]. Beachtet werden muss bei solchen Therapieansätzen aber, dass es dadurch auch zu verstärkten unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann [140]. Diese Punkte sollten in weiterführenden Untersuchungen bei der Kombination von AEZS-126 mit Rapamycin genauestens gegeneinander abgewogen werden.

AKT / ERK - Expression

In vorausgegangenen Studien zur Wirkung von AEZS-126 beim Mammakarzinom wurde gezeigt, dass eine antiproliferative Wirkung von AEZS-126 nicht zwingend mit einer verminderten Expression von pAKT einhergehen muss [122]. So konnte bei HCC1806-Zellen nur durch eine sehr hohe Konzentration von AEZS-126 die pAKT-Expression deutlich verringert werden [122]. Bei MCF-7- sowie MDA-MB468-Zellen wurden auf Grund von verschiedenen Mutationen im PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg nach Inkubation der Zellen mit AEZS-126 sogar eine deutlich erhöhte Expression von pAKT beobachtet [122]. Im Gegensatz dazu wurde durch AEZS-126 in den HCC1937-Zellen eine dosisabhängige Reduktion der pAKT-Expression detektiert [122]. In all diesen vier Modellzelllinien für das Mammakarzinom lagen die ermittelten IC50-Werte in derselben Größenordnung wie die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC50-Werte für die Modellzelllinien des Ovarialkarzinoms. Da auch bei Ovarialkarzinomen bekannterweise verschiedene Veränderungen und Mutationen im PI3K-AKT-Signalweg auftreten [141], wurde der Einfluss von AEZS-126 alleine und in Kombination mit Rapamycin auf die pAKT-Expression in parentalen A2780-Zellen und den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen auf Proteinebene untersucht. Bei unbehandelten Zellen war sowohl die Expression von pAKT als auch die inaktive Proteinform AKT bei den Platin-resistenten Zellen Acis2780 sehr viel stärker exprimiert als in den parentalen A2780 Zellen. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Studien [141].

Bei pERK1/2 bzw. ERK1/2 konnte in unbehandelten Zellen eine verstärkte Expression in den A2780-Zellen im Vergleich zu den Acis2780-Zellen beobachtet werden. Diese gegenläufige Regulation der Expression von pAKT und pERK1/pERK2 bzw. von AKT und ERK1/ERK2 steht in Einklang mit anderen bereits publizierten Arbeiten [142][143]. Es ist mittlerweile anerkannt, dass der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg und der PI3K-AKT-Signalweg in direktem Zusammenhang stehen. Beide Signalwege werden über Rezeptoren für Wachstumsfaktoren aktiviert und spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der Genexpression und der Apoptose [144].

In humanen Tumoren liegen häufig Mutationen oder Veränderungen der Exprimie-

rung von Proteinen vor, die Bestandteile der genannten Signalwege sind. Beispielsweise konnten Mutationen von Ras, Raf, PI3K, PTEN und AKT in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen werden [144]. So sind sowohl der Ras-Raf-MEK-ERK- als auch der PI3K-AKT-Signalweg maßgeblich an Tumorgenese und -progression beteiligt. Bei einer PTEN-Mutation kann es durch erhöhte Expression von pAKT zur Inaktivierung von Raf kommen und damit zu einer Hemmung der weiteren Signalkaskade [144]. Daraus zeigt sich, dass die Inaktivierung des einen Signalweges zur Aktivierung des anderen Signalweges führt [143]. Beide Signalwege zeigen antiapoptotische Effekte und können zu Resistenzbildungen von Zellen gegen Medikamente (z.B. Paclitaxel, Tamoxifen, u.a.) beitragen. Die Auswirkungen zeigen sich in verschiedenen Zelllinien auf unterschiedliche Weise [144]. Das Protein p70S6K ist das Schlüsselmolekül, durch das es zu Wechselwirkungen und Interaktionen zwischen dem Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg und dem PI3K-AKT-Signalweg kommt [143]. p70S6K ist mTOR nachgeschaltet und führt nach Phosphorylierung rückwirkend zur Hemmung des PI3K-AKT-Signalweges [143]. Bei einer Hemmung von p70S6K in Glioblastomzellen konnten erhöhte Konzentrationen sowohl von pAKT als auch von pERK nachgewiesen werden. Ebenso konnte durch eine Inhibition von mTOR durch den auch in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitor Rapamycin eine verminderte Phosphorylierung von p70S6K und eine erhöhte Aktivierung von AKT und ERK nachgewiesen werden [143].

Durch Inkubation der Zellen mit AEZS-126 konnte die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von AKT in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und Acis2780 inhibiert werden. Eine konzentrationsabhängige Hemmung konnte dabei nicht festgestellt werden. Eine auffällig starke Inhibition der Phosphorylierung zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung der cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen mit AEZS-126 und Rapamycin. Die Kombination von 5 μ M AEZS-126 und 5 μ M Rapamycin verhinderte bei den Acis2780-Zellen fast vollständig die Phosphorylierung von AKT, obwohl die Expression von AKT in den Acis2780-Zellen unter dieser Kombinationstherapie im Vergleich zu der Monotherapie mit 5 μ M AEZS-126 erhöht wurde, aber im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nach wie vor verringert war. Im Gegensatz dazu führte die Kombinationstherapie von AEZS-126 und Rapamycin in den parental A2780-Zellen zu einer leicht verstärkten Expression von pAKT im Vergleich zu dem pAKT-Expressionsniveau unter AEZS-126-Monotherapie. Auch die AKT-Expression wurde durch die Kombinationstherapie von AEZS-126 und Rapamycin in A2780-Zellen induziert und lag sogar leicht über dem AKT-Expressionsniveau von unbehandelten Zellen. In den beiden gene-

tisch identischen Zelllinien A2780 und Acis2780, die sich lediglich hinsichtlich der Resistenz gegenüber cis-Platin und dem Expressionsniveau von Komponenten des PI3K-AKT-Signaltransduktionsweges unterscheiden, konnten deutliche Unterschiede bei der Wirkung des Inhibitors AEZS-126 in Kombination mit Rapamycin festgestellt werden. Diese Unterschiede sind von großer Bedeutung, da phosphoryliertes und aktiviertes AKT durch die Inaktivierung mehrerer proapoptotischer Proteine (BAD, BAX, Caspase 9) und verstärkte Expression von antiapoptotischen Proteinen (BCL2, BCLXL, FLIP, cIAP2, XIAP) zu einer Apoptose-Hemmung führt [145]. In Einklang damit steht die Beobachtung, dass Ovarialkarzinomzellen eine erhöhte cis-Platin-induzierte Apoptoserate zeigen, wenn sie vorher mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 vorbehandelt wurden [146].

Durch die Inkubation mit AEZS-126 wurde sowohl in A2780- als auch in Acis2780-Zellen die Expression von ERK1/2 und deren phosphorylierten Formen pERK1/2 induziert. Bei den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen blieb das Expressionsniveau von ERK1/2 und pERK1/2 auch bei steigenden AEZS-126-Konzentrationen unverändert hoch und wurde durch die Kombinationstherapie von AEZS-126 mit Rapamycin noch weiter verstärkt. Im Gegensatz dazu führte bei den parentalen A2780-Zellen eine erhöhte AEZS-126-Konzentration zu einer reduzierten ERK1/2- und pERK1/2-Expression, die durch die Kombinationstherapie von AEZS-126 mit Rapamycin weiter gesenkt werden konnte. Unter der AEZS-126-Rapamycin-Kombinationstherapie war in den A2780-Zellen die Expression von ERK1/2 und pERK1/2 sogar deutlich geringer als in den unbehandelten Zellen.

Zusammenfassend geht aus den Ergebnissen der Untersuchungen zur Proteinexpression hervor, dass AEZS-126 das Expressionsniveau von pAKT in *in vitro*-Modellen sowohl für cis-Platin-sensible als auch für cis-Platin-resistente Ovarialkarzinome deutlich reduziert. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen konnte in Übereinstimmung mit der Literatur eine gegenläufige Regulation der Expression von pAKT und pERK1/pERK2 bzw. von AKT und ERK1/ERK2 nachgewiesen werden [142][143]. Zudem wurden bei Untersuchungen zur Wirksamkeit von AEZS-126 in Brustkrebszellen vergleichbare Ergebnisse gezeigt [122].

Beeinflussung des Zellzyklus

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Behandlung von A2780- und Acis2780-Zellen mit Rapamycin bzw. AEZS-126 konnte eine Veränderung der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus festgestellt werden. So kam es bei steigenden Konzentrationen der Inhibitoren zu einer zunehmenden Anzahl an toten Zellen, welche in der so

genannten sub-G0-Population nachgewiesen werden konnten. Eine Unterscheidung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod kann in dieser Untersuchung nicht erfolgen. Diese Zellen scheinen zu einem kleineren Teil aus der G2/M-Phase und zum größten Teil aus der G0/G1-Phase zu stammen. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen einer Untersuchung über die Wirkung von AEZS-126 auf die tripel-negativen humanen Brustkrebszelllinien HCC1937, HCC1806 und MDA-MB468, in welchen es ebenfalls zu einer vergleichbaren konzentrationsabhängigen Steigerung der Apoptose- bzw. Nekroseinduktion kam [147].

Auch bei der Zellzyklusanalyse konnte durch die Kombination der Wirkstoffe AEZS-126 und Rapamycin eine gesteigerte Effizienz der Inhibitoren durch gegenseitige Verstärkung der Effekte gezeigt werden, wie zuvor schon bei den Proliferationsversuchen. Bei der Kombination von AEZS-126 mit Rapamycin konnte in den Zellzyklusanalysen ein verstärktes Absterben der Zellen im Vergleich zu den entsprechenden AEZS-126-Monotherapien nachgewiesen werden. Wie bei den Monotherapien stammten auch bei der Kombinationstherapie von AEZS-126 mit Rapamycin die toten Zellen zum kleineren Teil aus der G2/M-Phase und zum größten Teil aus der G0/G1-Phase.

Daraus kann geschlossen werden, dass AEZS-126 bei Ovarialkarzinomzellen, vergleichbar zum Verhalten bei den Brustkrebszellen MDA-MB468 [122], nicht nur das Wachstum hemmt, sondern bei den A2780- und Acis2780-Zellen auch unabhängig von ihrer Zellzyklusphase den Zelltod induziert.

Mechanismus des Zelltodes

Um die Art und Weise zu beleuchten, über welche Mechanismen die Zellen getötet wurden, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurde eine Apoptose-Detektion mit Hilfe einer Annexin-V-FITC-Markierung mit einer Propidiumiodid-Färbung kombiniert und über eine FACS-Analyse ausgewertet, zum anderen wurden Vitalitätsassays durchgeführt, in welchen die Inhibitoren in Kombination mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, dem Nekroptose-Inhibitor Necrostatin-1 und dem Nekrose-Inhibitor Necrox-2 inkubiert wurden. So konnten durch verschiedene experimentelle Ansätze Daten erhoben werden, die zur Klärung des Todesmechanismus der Zellen und somit zur Wirkungsweise der Inhibitoren beitragen.

Durch die Apoptose-FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Abnahme an vitalen Zellen durch die Behandlung der Zelllinien A2780, Acis2780 und SKOV-3 mit AEZS-126 durch Induktion des nekrotischen Zelltodes hervorgerufen wurde. Die Spezifität des beobachteten nekrotischen Zelltodes der Zellen wurde durch die

beobachtete Dosisabhängigkeit noch verstärkt. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien trat jedoch auch eine vernachlässigbar kleine Anzahl von apoptotischen Zellen auf. In gutem Einklang mit diesen durch FACS-Messungen erhobenen Daten stehen die Ergebnisse der Proliferationsversuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. In diesen konnte durch den Zusatz von zVAD-fmk die Wirkung von AEZS-126 nicht beeinträchtigt werden. zVAD-fmk ist ein Caspase-Inhibitor, der in der Lage ist, Zellen vor dem apoptotischen Zelltod zu schützen [148]. In Vorversuchen waren für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien die maximale Konzentration von zVAD-fmk ermittelt worden, die die Zellen nicht schädigt. Da diese Konzentration von 30 μ M zVAD-fmk die durch AEZS-126 vermittelten toxischen Effekte in den Zellen nicht inhibieren konnte, scheint Apoptose wenn überhaupt nur eine sehr untergeordnete Rolle bei dem durch AEZS-126 ausgelösten Zelltod in Ovarialkarzinomen zu spielen.

Im Gegensatz dazu stehen die durch Zusatz von Necrostatin-1 beobachteten Effekte. Necrostatin-1 ist ein Nekroptose-Inhibitor [149]. Auch hier wurde in Vorversuchen die maximale Konzentration von Necrostatin-1 ermittelt, die in den Ovarialkarzinomzellen alleine keine toxischen Effekte zeigt. Durch Zusatz von Necrostatin-1 in diesen Konzentrationen (75 μ M - 100 μ M) konnte ein deutlicher protektiver Effekt vor den toxischen Effekten von AEZS-126 erzielt werden. Somit konnte auch in den Proliferationsversuchen wie schon zuvor in den FACS-basierten Untersuchungen gezeigt werden, dass in den Ovarialkarzinomzellen durch AEZS-126 Nekroptose induziert wird.

Bei der Nekroptose, der programmierten Form der Nekrose, wird der Zelltod durch Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase RIP1 ausgelöst und reguliert [73]. Diese wird wiederum durch Bindung von TNF α an einen spezifischen Rezeptor initiiert [150]. Der nekroptotische Zelluntergang enthält sowohl apoptotische, als auch nekrotische Eigenschaften. Er wird charakterisiert durch den Verlust der Membranintegrität und den aktiven Zerfall von Mitochondrien und Lysosomen [151]. Nekroptose führt so zum Zelluntergang und einer lokalen Entzündungsreaktion, während die Apoptose wichtig für die Gewebshomöostase ist [152], die durch organisierte Kondensation des Chromatins und DNA-Fragmentierung gekennzeichnet ist [68]. Beide Arten des Zelltodes können durch den gleichen Stimulus ausgelöst werden [152].

Die Beobachtung, dass AEZS-126 in Modellzelllinien des Ovarialkarzinoms Nekroptose auslöst, steht in Einklang mit den Untersuchungen zur Wirkung von AEZS-126 auf Mammakarzinomzellen (HCC1937, HCC1806) [122]. In Mammakarzi-

men konnte auch gezeigt werden, dass AEZS-126 zelllinienspezifisch unterschiedliche zytotoxische Effekte hervorruft. So wurden HCC1937-Zellen sowohl durch zVAD-fmk als auch durch Necrostatin-1 vor der zytotoxischen Wirkung von AEZS-126 geschützt, die Zellen der Zelllinie HCC1806 nur durch Necrostatin-1, MDA-MB468- und MCF-7-Zellen nur durch zVAD-fmk [122]. Diese Untersuchungen zeigen, dass ein und derselbe Inhibitor im Kontext von verschiedenen Zellen unterschiedliche Mechanismen des Zelltodes initiieren kann. Daher ist für jede verwendete Zelllinie eine genaue Untersuchung der Mechanismen, die zum Zelltod führen, notwendig.

Um den Mechanismus des Zelltodes noch genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich Untersuchungen mit dem Nekrose-Inhibitor Necrox-2 durchgeführt. Nekrose ist eine weitere Möglichkeit des Zelltodes, die durch eine bioenergetische Katastrophe in der Zelle eingeleitet wird. Durch toxische oder physikalische Schäden kommt es zu einem unzureichenden Angebot an ATP, was mit dem Überleben der Zelle nicht mehr vereinbar ist [68]. Nekrose ist morphologisch durch eine veränderte Kernmorphologie, Vakuolenbildung des Zytoplasmas, Zusammenbruch der Plasmamembran und eine Entzündungsreaktion charakterisiert, welche durch das Freisetzen von zellulären Bestandteilen und proinflammatorischer Moleküle ausgelöst wird [68]. Durch den Zusatz von Necrox-2 zu den parentalen A2780-Zellen und den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen (20µM bis 40µM) eine signifikante Veränderung der Vitalität der Zellkulturen festgestellt werden. Somit bewirkt AEZS-126 bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *in vitro*-Modellen des Ovarialkarzinoms die Induktion von Nekroptose, apoptotische Prozesse laufen nur in sehr geringem Ausmaß ab und Nekrose kann ausgeschlossen werden.

Bei der alleinigen Behandlung der A2780- und Acis2780-Zellen mit Rapamycin scheinen sowohl apoptotische, als auch nekrotische Effekte eine Rolle zu spielen. Rapamycin wirkt als Inhibitor des Proteins mTOR und hemmt so verschiedene Vorgänge in Cytokin-vermittelten Signaltransduktionswegen [101]. Dadurch führt es zu einem Zellzyklusarrest und zur Einleitung apoptotischer und autophagischer Prozesse [106].

So konnte nach 24-stündiger Inkubation mit dem Inhibitor zusammen mit zVAD-fmk, insbesondere bei hohen Rapamycinkonzentrationen, eine leichte Vitalitätssteigerung bei den A2780-Zellen festgestellt werden. Bei den Acis2780-Zellen konnte ein eindeutiger Schutz vor den Rapamycin-abhängigen Effekten durch die Koinkubation mit zVAD-fmk gezeigt werden. Auch Necrostatin-1 bewirkte in Acis2780-Zellen eine vitalitätssteigernde Wirkung. Nach 72-stündiger Inkubation zeigte sich

bei der Zelllinie Acis2780 eine deutliche Hemmung des nekroptotischen Zelltodes. Bei den parentalen A2780-Zellen zeigte Necrostatin-1 keine protektive Wirkung. Somit erscheint es sehr wahrscheinlich, dass Rapamycin bei A2780-Zellen den Zelltod nur über apoptotische Prozesse auslöst und im Gegensatz dazu bei den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen sowohl apoptotische als auch nekroptotische Prozesse zum Zelltod beitragen.

Nach Behandlung der Zellen A2780 und Acis2780 mit AEZS-126 in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin zeigte die FACS-Analyse erneut eine konzentrationsabhängige Verringerung der Vitalität. Schon bei geringen Konzentrationen der Wirkstoffe kam es zu einer synergistischen Wirkverstärkung, die im Vergleich zu einer Monotherapie zu einer höheren Abnahme der Vitalität der Zellen führte. Der Wirkmechanismus, über welchen die Zellen in den Zelltod geführt wurden, beschränkt sich dabei erneut so gut wie ausschliesslich auf nekrotische Prozesse.

Interaktion mit NK-Zellen

Auf Grund der starken Beeinflussung der Zellvitalität durch immunologische Faktoren, ist es von Interesse, die Wechselwirkungen der in dieser Arbeit untersuchten Ovarialkarzinomzellen mit Zellen des Immunsystems zu untersuchen und zu verstehen. Ein besonderes Interesse liegt in diesem Zusammenhang auf der Wirkungsweise von NK-Zellen und der Interaktion mit den Zellen der untersuchten parental Platin-sensitiven Zelllinie A2780 und der Platin-resistenten Zelllinie Acis2780.

NK-Zellen gehören der angeborenen Immunabwehr an und spielen eine bedeutende Rolle in der Koordination vieler Immunzell-Reaktionen. Sie sind in der Lage, Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu lysieren [153]. Die NK-Zellaktivität steht in direktem Zusammenhang mit Tumorwachstum und Metastasenanzahl [154]. So konnte bei Patienten mit Melanomen, Lungen-, Ovarial-, Leber-, Brustkrebs und anderen malignen Entartungen eine signifikant verringerte NK-Zellaktivität nachgewiesen werden [153]. Tumorzellen scheinen Mechanismen entwickelt zu haben, die Aktivierung von NK-Zellen zu unterdrücken und damit den darüber ausgelösten Lyse-Prozessen zu entgehen [141][155].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass cis-Platin-resistente Zellen für die NK-Zell-vermittelte Zellyse weniger zugänglich sind [141]. Dies stellt ein Problem in der Behandlung von Ovarialkarzinomen dar, da auf Platin basierende Wirkstoffe seit Jahren die Basis dieser Therapiekonzepte darstellen [156]. Eine verringerte Lyse der cis-Platin-resistenten Zellen durch NK-Zellen konnte auch in den Untersuchungen dieser Arbeit festgestellt werden. Die Vitalität der Tumorzellen nahm entsprechend

dem Anteil an zugesetzten NK-Zellen in beiden untersuchten Zelllinien ab. Die lytische Aktivität der NK-Zellen auf die Platin-resistenten Zellen blieb dabei immer hinter der auf die Platin-sensitiven Zellen zurück. In aktuellen Untersuchungen konnte diese Beobachtung auf das erhöhte pAKT-Niveau in den cis-Platin-resistenten Zellen zurückgeführt werden [128][141].

Basierend auf dieser Studie wurde als Nächstes untersucht, ob durch eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit dem PI3K-Inhibitor AEZS-126 eine verbesserte Zelllyse der Tumorzellen durch NK-Zellen möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit der NK-Zellen durch die zusätzliche Inkubation der parentalen A2780-Zellen mit AEZS-126 ab Konzentrationen von 600nM zu einer erhöhten Lyse-Rate der Tumorzellen durch NK-Zellen führte. Durch eine Vorbehandlung der Acis2780-Zellen mit AEZS-126 (ab einer Konzentration von 800nM) wurde erreicht, dass selbst diese cis-Platin-resistenten Zellen in vergleichbarem Ausmaß wie die parentalen A2780-Zellen von NK-Zellen lysiert wurden. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der PI3K-Inhibitor AEZS-126 in der Lage ist, Tumorzellen einer Lyse durch NK-Zellen besser zugänglich zu machen. Besonders deutlich war dieser Effekt bei den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen, die auf Grund des hohen pAKT-Expressionsniveaus auch vor einer Lyse durch NK-Zellen geschützt sind [141]. Der erhöhte pAKT-Spiegel in den Acis2780-Zellen bewirkt zum einen eine verstärkte Expression von anti-apoptotischen Genen (insbesondere CIAP-1 und -2) in der Zelle und zum anderen eine erhöhte Menge von sekretierten MICA/B-Rezeptoren, die einen Schutz vor NK-Zell-vermittelter Lyse darstellen [141]. Durch die Inkubation der Acis2780-Zellen mit AEZS-126 wird die Expression von pAKT verringert und somit eine effizientere Lyse der Zellen durch NK-Zellen ermöglicht. Dieser Befund stellt einen guten Ausgangspunkt für weiterführende *in vivo*-Untersuchungen dar.

Es war zuvor schon vermutet worden, dass gemeinsame Signalwege die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber den Effekten von immunologischen Effektorzellen beeinflussen könnten und so Inhibitoren von Kinasen dieser Signalwege auch *in vivo* wichtige immunologische Wirkungen erzielen könnten [155].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieses Postulat zum ersten Mal für den PI3K-AKT-Signalweg verifiziert werden und somit auch die Bedeutung dieses Signalweges für Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Zellen des Immunsystems belegt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Störungen des PI3K-AKT-Signalweges treten besonders häufig in Endometrium- und Ovarialkarzinomen auf. Ursache kann eine Überaktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Mutationen oder der Funktionsverlust von PTEN sein, was zu einer Störung der Regulation und damit zu einer Überaktivierung des PI3K-AKT-Signalweges führt und so das Einleiten autophagischer Prozesse verhindert. Hierauf kommt es zu unkontrollierter Zellvermehrung, welche zur Tumorentstehung und Tumorprogression beiträgt [12][23].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass die Hemmung des PI3K-AKT-Signalweges durch den PI3K-Inhibitor AEZS-126 erfolgversprechende antiproliferative Effekte in *in vitro*-Modellen des Ovarialkarzinoms zeigte. *In vitro* konnte die niedermolekulare Pyridopyrazin-Verbindung AEZS-126 das Wachstum und die Progression von Zellen der parentalen Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780, der daraus abgeleiteten cis-Platin-resistenten Tochterzelllinie Acis2780 und der aus einem Ovar-Adenokarzinom gewonnenen Zelllinie SKOV-3 signifikant hemmen. In Vitalitätsassays ermittelte IC50-Werte lagen im mikromolaren Bereich und zeigten konzentrationsabhängige Antitumor-Effekte. Neben den AEZS-126-abhängigen Effekten wurde auch die Wirksamkeit des mTOR-Inhibitors Rapamycin auf die Zelllinien A2780 und Acis2780 untersucht. Es zeigten sich ebenfalls konzentrationsabhängige antiproliferative Effekte. Durch die Kombination der beiden Inhibitoren AEZS-126 und Rapamycin konnte zusätzlich eine gesteigerte Wirksamkeit gegen die Tumorzellen erzielt werden und synergistische Effekte traten auf.

Im Western-Blot konnte nach Inkubation der Ovarialkarzinomzelllinien mit AEZS-126 durch den Einsatz von AEZS-126 eine verminderte Expression von pAKT nachgewiesen werden, welche insbesondere bei den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen durch die Kombination mit Rapamycin noch verstärkt wurde.

Durch FACS-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Ovarialkarzinomzellen durch die Behandlung mit AEZS-126 im Wachstum gehemmt werden und unabhängig von ihrer Zellzyklusphase in den Zelltod geführt werden können. So zeigte sich in den Zellzyklusanalysen eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Zellzahl von der G0/G1-Phase in die sub-G0-Phase, welche die Population der toten

Zellen darstellt.

Eine Spezifizierung des Zelltod-Mechanismuses erfolgte einerseits durch Annexin-V-FITC-FACS-Analysen und andererseits durch Vitalitätsassays mit Koinkubation von AEZS-126 mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, dem Nekroptose-Inhibitor Necrostatin-1 und dem Nekrose-Inhibitor Necrox-2. Aus diesen Untersuchungen ging klar hervor, dass AEZS-126 in den Zelllinien A2780, Acis2780 und SKOV-3 Nekroptose induziert. Rapamycin alleine zeigte sowohl apoptotische als auch nekrotische Wirkmechanismen. Die Kombination der beiden Inhibitoren AEZS-126 und Rapamycin führte zu einer synergistischen Wirkverstärkung, was sich in einem verstärkten Absterben der Zellen schon bei geringeren eingesetzten Konzentrationen der beiden Inhibitoren zeigte. Auch hier traten hauptsächlich nekrotische Effekte auf.

Von besonderem Interesse war die Interaktion von Ovarialkarzinomzellen (A2780, Acis2780), die mit AEZS-126 vorbehandelt worden waren, mit Zellen des Immunsystems. So konnte gezeigt werden, dass AEZS-126 eine verbesserte Zelllyse der Tumorzellen durch NK-Zellen ermöglicht. Zusätzlich konnten die cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen durch Vorbehandlung mit entsprechende Konzentrationen des PI3K-Inhibitors in vergleichbarem Ausmaß wie die parentalen A2780-Zellen für die Lyse durch NK-Zellen zugänglich gemacht werden.

AEZS-126 scheint auf Grund dieser Ergebnisse und der schon nachgewiesenen guten antiproliferativen Wirkung von AEZS-126 auf verschiedene Zelllinien ein geeigneter Kandidat für weiterführende *in vivo*-Versuche zu sein.

Zusätzlich sollte erwogen werden, neben der Inhibition des PI3K-AKT-Signalweges eine zeitgleiche Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges in Betracht zu ziehen. Durch die Interaktionen der beiden Signalwege könnte es sonst bei der Inaktivierung des einen zur Aktivierung des anderen Signalweges kommen [143]. Durch eine Überexpression von pAKT durch eine PTEN-Mutation kommt es beispielsweise zur Inaktivierung von Ras und der darauf folgenden Signalkaskade, während ein erhöhtes Expressionsniveau an pAKT im PI3K-AKT-Signalweg zu einer Aktivierung von mTOR und damit zur Hemmung autophagischer Prozesse führt [23]. So kann die Phosphorylierung des Proteins p70S6K, dem Schlüsselmolekül zwischen den beiden Signalwegen, welches mTOR nachgeschaltet ist, durch Rapamycin gehemmt werden und damit zu einer erhöhten Aktivierung von AKT und ERK führen [143]. Durch die Kombinationsbehandlung mit Inhibitoren des PI3K-AKT-Signalweges, die an verschiedenen Stellen der Signalkaskade angreifen, kann, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die Antitumorwirkung verstärkt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren AEZS-126 und Rapamycin zeigten bei den parentalen Ovarialkarzinom-

zellen A2780 und den cis-Platin-resistenten Acis2780-Zellen in der Kombinationsbehandlung synergistische Effekte und führten schon bei geringen Konzentrationen zu verstärkter antiproliferativer Wirksamkeit.

Aus den erzielten Ergebnissen geht hervor, dass die Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin geeignet wäre, in *in vivo*-Experimenten weiter untersucht zu werden.

Wesentliche Teile dieser Arbeit werden publiziert in:

Antje Kurz*, Jens C. Hahne*, Susanne R. Meyer, Jörg B. Engel, Johannes Dietl and Arnd Honig. Anti-tumour activity of phosphoinositide-3-kinase antagonist AEZS-126 in models of ovarian cancer.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Burges and B. Schmalfeldt. Ovarian cancer: Diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108(38):635–641, 2011.
- [2] P. Kaatsch, C. Spix, A. Katalinic, and S. Hentschel. Krebs in Deutschland 2007/2008. In *Gesundheitsberichterstattung-Hefte-(GBE-Hefte)*. Robert Koch-Institut, 2012.
- [3] R. Kreienberg and H. Ludwig. *125 Jahre Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer, 1 edition, 2011.
- [4] J. Bereka, C. Crumb, and M. Friedlander. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 119: S118–S129, 2012.
- [5] Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie. *Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren*. Zuckschwerdt, 2007.
- [6] T.R. Rebbeck, N.D. Kauff, and S.M. Domchek. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(2): 80–87, 2009.
- [7] M.J. Casey, C. Synder, C. Bewtra, S.A. Narod, P. Watson, and H.T. Lynch. Intra-abdominal carcinomatosis after prophylactic oophorectomy in women of hereditary breast ovarian cancer syndrome kindreds associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Gynecologic oncology*, 97(2):457–467, 2005.
- [8] E.L. Franco and E. Duarte-Franco. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls. commentary. *Lancet*, 371 (9609):303–314, 2008.

- [9] K. Kinkel, Y. Lu, A. Mehdizade, M.F. Pelte, and H. Hricak. Indeterminate ovarian mass at US: Incremental value of second imaging test for characterization—meta-analysis and bayesian analysis1. *Radiology*, 236(1): 85–94, 2005.
- [10] R. Salani, A. Axtell, M. Gerardi, C. Holschneider, and R.E. Bristow. Limited utility of conventional criteria for predicting unresectable disease in patients with advanced stage epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 108(2): 271–275, 2008.
- [11] A. du Bois, A. Reuss, E. Pujade-Lauraine, P. Harter, I. Ray-Coquard, and J. Pfisterer. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer*, 115(6):1234–1244, 2009.
- [12] I. Diaz-Padilla, I. Duran, B.A. Clarke, and A.M. Oza. Biologic rationale and clinical activity of mTOR inhibitors in gynecological cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 2012.
- [13] C. Santiskulvong, G.E. Konecny, M. Fekete, K.-Y.M. Chen, A. Karam, D. Mulholland, C. Eng, H. Wu, M. Song, and O. Dorigo. Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 17(8):2373–2384, 2011.
- [14] L. Shayesteh, Y. Lu, W.L. Kuo, R. Baldocchi, T. Godfrey, C. Collins, D. Pinkel, B. Powell, G.B. Mills, J.W. Gray, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature genetics*, 21:99–102, 1999.
- [15] L.H. Saal, K. Holm, M. Maurer, L. Memeo, T. Su, X. Wang, J.S. Yu, P.O. Malmström, M. Mansukhani, J. Enoksson, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer research*, 65(7): 2554–2559, 2005.
- [16] D. Kong, A. Suzuki, T.T. Zou, A. Sakurada, L.W. Kemp, S. Wakatsuki, T. Yokoyama, H. Yamakawa, T. Furukawa, M. Sato, et al. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nature genetics*, 17(2):143–144, 1997.
- [17] T. Minaguchi, H. Yoshikawa, K. Oda, T. Ishino, T. Yasugi, T. Onda, S. Nakagawa, K. Matsumoto, K. Kawana, and Y. Taketani. PTEN mutation located

- only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clinical cancer research*, 7(9):2636–2642, 2001.
- [18] I. Vivanco, C.L. Sawyers, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(7):489–501, 2002.
- [19] K. Klasen. Phosphatidylinositolphosphat-vermittelte Modulation chemosensitiver Signaltransduktionssysteme. pages 19–21, 2011.
- [20] J. Domin, F. Pages, S. Volinia, S.E. Rittenhouse, M.J. Zvelebil, R.C. Stein, and M.D. Waterfield. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochemical Journal*, 326(Pt 1):139, 1997.
- [21] D.A. Fruman. Phosphoinositide 3-kinases. *Transduction Mechanisms in Cellular Signaling: Cell Signaling Collection*, page 275, 2011.
- [22] M. Esselen. Grundlagen und Biochemie der Ernährung - Signaltransduktion. pages 1–29, 2012. URL <http://www.chemie.uni-kl.de/uploads/media/Signaltransduktion.pdf>.
- [23] Y. Kondo, T. Kanzawa, R. Sawaya, and S. Kondo. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer*, 5(9):726–734, 2005.
- [24] A. Petiot, E. Ogier-Denis, E.F.C. Blommaert, A.J. Meijer, and P. Codogno. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2):992–998, 2000.
- [25] A. Toker and M. Yoeli-Lerner. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer research*, 66(8):3963–3966, 2006.
- [26] A. Bellacosa, J.R. Testa, L. Larue, et al. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer biology & therapy*, 3(3):268–275, 2004.
- [27] G. Künstle, J. Laine, G. Pierron, S. Kagami, H. Nakajima, F. Hoh, C. Roumestand, M.H. Stern, and M. Noguchi. Identification of Akt association and oligomerization domains of the Akt kinase coactivator TCL1. *Molecular and cellular biology*, 22(5):1513–1525, 2002.

- [28] J.Á.F. Vara, E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta, and M. González-Barón. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*, 30(2):193–204, 2004.
- [29] H. Brunsch. *Einfluß von Rapamycin auf die Akkumulation glattmuskulärer Progenitorzellen in der Neointima*. PhD thesis, Universitätsbibliothek Giessen, 2009.
- [30] R.J. Shaw and L.C. Cantley. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 441(7092):424–430, 2006.
- [31] C.H. Jung, S.-H. Ro, J. Cao, N.M. Otto, and D.-H. Kim. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7):1287–1295, 2010.
- [32] C.W. Wang and D.J. Klionsky. The molecular mechanism of autophagy. *Molecular Medicine*, 9(3-4):65, 2003.
- [33] S. Hipp, I. Ringshausen, M. Oelsner, C. Bogner, C. Peschel, and T. Decker. Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells. *haematologica*, 90(10):1433–1434, 2005.
- [34] M. Kato, S. Putta, M. Wang, H. Yuan, L. Lanting, I. Nair, A. Gunn, Y. Nakagawa, H. Shimano, I. Todorov, et al. TGF- β activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nature cell biology*, 11(7):881–889, 2009.
- [35] S. Furuta, E. Hidaka, A. Ogata, S. Yokota, and T. Kamata. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class i PI3-kinase. *Oncogene*, 23(22):3898–3904, 2004.
- [36] L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, C.R. Kempf, J. Long, P. Laidler, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, F. Stivala, M.C. Mazzarino, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*, 3(3):192, 2011.
- [37] I. Seipelt, M. Gerlach, S. Baasner, M. Teifel, J. Fensterle, L. Blumenstein, G. Mueller, E. Polymeropoulos, and E. Guenther. AEZS-126, a new orally bioavailable PI3K inhibitor with antitumor effects. 2009. AEterna Zentaris Presents Two Posters on its PI3K Inhibitor Compound, AEZS-126, at AACR Annual Meeting.

- [38] M. Ebisuya, K. Kondoh, and E. Nishida. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science*, 118(14):2997–3002, 2005.
- [39] J.D. Carpten, A.L. Faber, C. Horn, G.P. Donoho, S.L. Briggs, C.M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T.Y. Moses, S. Savage, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448(7152):439–444, 2007.
- [40] F. Meier, B. Schitteck, S. Busch, C. Garbe, K. Smalley, K. and Satyamoorthy, G. Li, M. Herlyn, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 10:2986–2997, 2005.
- [41] C. Frémin and S. Meloche. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, 3(1):8, 2010.
- [42] B. Levine and D.J. Klionsky. Development by self-digestion:: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6(4):463–477, 2004.
- [43] A.J. Meijer and P. Codogno. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12):2445–2462, 2004.
- [44] C. Richter-Landsberg. Autophagie als Überlebensstrategie. *Biologie in unserer Zeit*, 42(6):374–379, 2012.
- [45] K.E. Larsen and D. Sulzer. Autophagy in neurons a review. *Histol Histopathol*, 17:897–908, 2002.
- [46] H.D. Lenz. Die Rolle Autophagie-assoziiierter Proteine in der pflanzlichen Immunantwort. 2011.
- [47] K. Meuer. *Regulation des mitochondrialen Zerfalls innerhalb der neuronalen Apoptose*. PhD thesis, Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen, 2007.
- [48] D.J. Klionsky and S.D. Emr. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497):1717–1721, 2000.

- [49] S. Arico, A. Petiot, C. Bauvy, P.F. Dubbelhuis, A.J. Meijer, P. Codogno, and E. Ogier-Denis. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38):35243–35246, 2001.
- [50] A.B. Vojtek and C.J. Der. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32):19925–19928, 1998.
- [51] E. Ogier-Denis, S. Pattingre, J. El Benna, and P. Codogno. Erk1/2-dependent phosphorylation of G α -interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50):39090–39095, 2000.
- [52] K. Saeki, A. Yuo, E. Okuma, Y. Yazaki, SA Susin, G. Kroemer, F. Takaku, et al. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell death and differentiation*, 7(12):1263–1269, 2000.
- [53] B. Inbal, S. Bialik, I. Sabanay, G. Shani, and A. Kimchi. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 157(3):455–468, 2002.
- [54] A.L. Edinger and C.B. Thompson. Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 4(6):422–424, 2003.
- [55] E. Ogier-Denis and P. Codogno. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1603(2):113–128, 2003.
- [56] D. Gozuacik and A. Kimchi. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16):2891–2906, 2004.
- [57] F. Scarlatti, C. Bauvy, A. Ventruti, G. Sala, F. Cluzeaud, A. Vandewalle, R. Ghidoni, and P. Codogno. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18):18384–18391, 2004.
- [58] R.C. Wang, Y. Wei, Z. An, Z. Zou, G. Xiao, G. Bhagat, M. White, J. Reichelt, and B. Levine. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*, 338(6109):956–959, 2012.

- [59] X.H. Liang, S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, B. Levine, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762):672–675, 1999.
- [60] P.E. Schwarze and P.O. Seglen. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Experimental cell research*, 157(1):15–28, 1985.
- [61] T. Kanzawa, I.M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo, and S. Kondo. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death & Differentiation*, 11(4):448–457, 2004.
- [62] A.W. Opipari, L. Tan, A.E. Boitano, D.R. Sorenson, A. Aurora, and J.R. Liu. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer research*, 64(2):696–703, 2004.
- [63] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, and R. Deutzmann. *Duale Reihe Biochemie*. Thieme, 2 edition, 2008.
- [64] Universität Düsseldorf. Grundlagen der Apoptose. URL http://www.uniklinik-duesseldorf.de/img/ejbfile/Apoptose_web.pdf?id=9907.
- [65] S. Shimizu, T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C.B. Thompson, and Y. Tsujimoto. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology*, 6(12):1221–1228, 2004.
- [66] Lehrstuhl für Tierphysiologie Universität Rostock Dr. R. Kriehuber, Institut für Zellbiologie und Biosystemtechnik. Apoptose - der genetisch kontrollierte Zelltod.
- [67] A. Gross, J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15):1899–1911, 1999.
- [68] A.L. Edinger and C.B. Thompson. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*, 16(6):663–669, 2004.
- [69] M. Mihi. Zelltod | Nekrose | Apoptose. *ZYTOLOGIE-ONLINE*. URL <http://www.zytologie-online.net/zelltod-apoptose.php>.
- [70] E.A. Slee, C. Adrain, and S.J. Martin. Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of biological Chemistry*, 276(10):7320–7326, 2001.

- [71] Universität Potsdam. Apoptose - Einleitung. 2003. URL http://www.uni-potsdam.de/u/ewi/Etox/e-tox-scripts/apoptose_2003.pdf.
- [72] Thorsten L. Nekroptose. *Laborjournal*, 11(11), 2011.
- [73] L. Galluzzi and G. Kroemer. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135(7):1161–1163, 2008.
- [74] J. Hitomi, D.E. Christofferson, A. Ng, J. Yao, A. Degterev, R.J. Xavier, and J. Yuan. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, 135(7):1311–1323, 2008.
- [75] G. Gdynia and W. Roth. Neue Aspekte der Regulation von Zelltod in Tumoren. *BIOspektrum*, 17(4):415–417, 2011.
- [76] N. Holler, R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J.L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology*, 1(6):489–495, 2000.
- [77] T. Nakagawa, S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo, and Y. Tsujimoto. Cyclophilin d-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434(7033):652–658, 2005.
- [78] W.X. Zong, D. Ditsworth, D.E. Bauer, Z.Q. Wang, and C.B. Thompson. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development*, 18(11):1272, 2004.
- [79] P. Golstein and G. Kroemer. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1):37–43, 2007.
- [80] S.W. Yu, H. Wang, M.F. Poitras, C. Coombs, W.J. Bowers, H.J. Federoff, G.G. Poirier, T.M. Dawson, and V.L. Dawson. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science's STKE*, 297(5579):259, 2002.
- [81] H. Puthalakath, A. Villunger, L.A. O'Reilly, J.G. Beaumont, L. Coultas, R.E. Cheney, D. Huang, and A. Strasser. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science's STKE*, 293(5536):1829, 2001.

- [82] I. Seipelt, M. Gerlach, L. Blumenstein, G. Mueller, M. Teifel, E. Polymeropoulos, and E. Guenther. In vitro profiling of the potent and selective PI3K inhibitor, AEZS-126. 2009. AEterna Zentaris Presents Two Posters on its PI3K Inhibitor Compound, AEZS-126, at AACR Annual Meeting.
- [83] E.M. Breslin, P.C. White, A.M. Shore, and P. Clement, M. and Brennan. LY294002 and rapamycin co-operate to inhibit t-cell proliferation. *British journal of pharmacology*, 144(6):791–800, 2005.
- [84] T. Doedt and D. Heckel. Method for selective enrichment and isolation of microbial and optional additionally of viral nucleic acids, 2011. EP Patent 2,325,312.
- [85] Biochrom AG. Penicillin/Streptomycin, . URL <http://www.biochrom.de/produkte/antibiotika/penicillinstreptomycin/>.
- [86] Chemieberufe; Media; BL-Zellkultur. Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau.
- [87] C.R. Parish, M.H. Glidden, B.J.C. Quah, and H.S. Warren. Use of the intracellular fluorescent dye cfse to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current protocols in immunology*, pages 4–9, 2009.
- [88] E. Ingulli. Tracing tolerance and immunity in vivo by cfse-labeling of administered cells. In *Immunological Tolerance*, pages 365–376. Springer, 2007.
- [89] M.J. Miller, S.H. Wei, I. Parker, and M.D. Cahalan. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science Signaling*, 296(5574):1869, 2002.
- [90] A.B. Lyons and C.R. Parish. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 171(1):131–137, 1994.
- [91] F. Baeke, H. Korf, L. Overbergh, A. Verstuyf, L. Thorrez, L. Van Lommel, M. Waer, F. Schuit, C. Gysemans, and C. Mathieu. The vitamin d analog, tx527, promotes a human cd4+ cd25highcd127low regulatory t cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation. *The Journal of Immunology*, 186(1):132–142, 2011.
- [92] S. Shen, M.I. Chuck, M. Zhu, D.M. Fuller, C.-w.O. Yang, and W. Zhang. The importance of lat in the activation, homeostasis, and regulatory function of t cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46):35393–35405, 2010.

- [93] M. Swiecki, S. Gilfillan, W. Vermi, Y. Wang, and M. Colonna. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral nk and cd8⁺ t cell accrual. *Immunity*, 33(6):955–966, 2010.
- [94] Promega. Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK.
- [95] Merck Millipore. Necrostatin-1.
- [96] C.C.T. Smith, S.M. Davidson, S.Y. Lim, J.C. Simpkin, J.S. Hothersall, and D.M. Yellon. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 21(4):227–233, 2007.
- [97] A. Degtarev, Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G.D. Cuny, T.J. Mitchison, M.A. Moskowitz, and J. Yuan. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*, 1(2):112–119, 2005.
- [98] W. Martinet, D.M. Schrijvers, and G.R.Y. De Meyer. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic research in cardiology*, 106(5):749–760, 2011.
- [99] H.J. Kim, S.Y. Koo, B.-H. Ahn, O. Park, D.H. Park, D.O. Seo, J.H. Won, H.J. Yim, H.-S. Kwak, H.S. Park, et al. Necrox as a novel class of mitochondrial reactive oxygen species and onoo- scavenger. *Archives of pharmacal research*, 33(11):1813–1823, 2010.
- [100] Anti-Aging-Wirkstoff: Osterinsel-Medizin lässt Mäuse älter werden. *SPIEGEL-Online*, (9), 2009.
- [101] Charite Universitätsmedizin Berlin; Transplantationszentrum Campus Benjamin Franklin. Sirolimus (Rapamune). 2013.
- [102] Rautenstrauch J. Der Rapamycin-Wirkung auf der Spur. *Deutsches Krebsforschungszentrum*, 2004.
- [103] N. Feuerstein, D. Huang, and M.B. Prystowsky. Rapamycin selectively blocks interleukin-2-induced proliferating cell nuclear antigen gene expression in t lymphocyte. *Journal of Biological Chemistry*, 270(16):9454–9458, 1995.
- [104] C. Vezina, A. Kudelski, S.N. Sehgal, et al. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. i. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics*, 28(10):721, 1975.

- [105] S.N. Sehgal, H. Baker, C. Vézina, et al. Rapamycin (ay-22,989), a new anti-fungal antibiotic. ii. fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics*, 28(10):727, 1975.
- [106] Adipogen AG. Rapamycin. . URL http://www.biomol.de/product_Rapamycin.html?aRelated=AG-CN2-0025-C100&Suchbegriff=sirrolimus&suchWeise=produkte&sort_direction=ASC.
- [107] J.S. Eshleman, B.L. Carlson, A.C. Mladek, B.D. Kastner, K.L. Shide, and J.N. Sarkaria. Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer research*, 62(24):7291–7297, 2002.
- [108] CANDOR Bioscience GmbH. BSA-Block. URL <http://www.candor-bioscience.de/de/produkte/bsa-block/anwendung.php>.
- [109] Public Health England. General Cell Collection: A2780. URL http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112519&collection=ecacc_gc.
- [110] B.C. Behrens, T.C. Hamilton, H. Masuda, K.R. Grotzinger, J. Whang-Peng, K.G. Louie, T. Knutsen, W.M. McKoy, R.C. Young, and R.F. Ozols. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum (ii)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Research*, 47(2):414–418, 1987.
- [111] O.Y. Abakumova, O. Podobed, P. Karalkin, L. Kondakova, and N. Sokolov. Antitumor activity of L-asparaginase from erwinia carotovora against different human and animal leukemic and solid tumor cell lines. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 6(4):307–316, 2012.
- [112] ATCC. Sk-ov-3 [skov-3] (atcc® htb-77™). URL <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-77&Template=cellBiology>.
- [113] Epitomics. Akt1 phospho (ps473) (akt1) antibody rabmab®. . URL http://www.epitomics.com/products/product_info/772/Akt1-antibody-2118-1.html.
- [114] Epitomics. Erk1 phospho (py204) / erk2 phospho (py187) (mapk3) antibody rabmab®. . URL http://www.epitomics.com/products/product_info/865/Erk1-antibody-2219-1.html.

- [115] Millipore Corporation. User guide for immobilon western chemiluminescent hrp substrate.
- [116] Universität Karlsruhe. Versuch Western Blotting und Immundetektion. URL http://www.rz.uni-karlsruhe.de/~db45/Studiendekanat/Lehre/Bachelor/Modul_04B/Skript/Western_ITG.pdf.
- [117] S. Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*, volume 37. Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [118] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, and R. Deutzmann. *Duale Reihe Biochemie*. Thieme, 2 edition, 2008.
- [119] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9):4350–4354, 1979.
- [120] Biotechnologie Institut Thurgau; Universität Konstanz. Einführung in die Durchflusszytometrie. URL <http://www.uni-konstanz.de/FuF/Bio/research/Arbeitsgruppen/Groettrup/Homepage/Skripte/Teaching/Flow%20cytometry.pdf>.
- [121] W. Hübl and M. Zeilinger. Durchflusszytometrie - eine Einführung. *MED4YOU - Laborbefunde*, 2006.
- [122] J.C. Hahne, H. Schmidt, S.R. Meyer, J.B. Engel, J. Dietl, and A. Honig. Antitumour activity of phosphoinositide-3-kinase antagonist AEZS 126 in models of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, pages 1–10, 2013.
- [123] B.M. Jockusch. Neuere Forschungen über Zellzyklus und Kernteilung. *Naturwissenschaften*, 62(6):283–289, 1975.
- [124] B. Tomasits. Apoptosedetektion mittels Annexin V - Markierung. *MED4YOU - Laborbefunde*, 2012.
- [125] Dr. E. Walraph. Die Rolle der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der Abwehr von Tumoren und der Nachweis der NK-Zell-Aktivität zur Früherkennung maligner Tumoren. 2001. URL <http://www.ns-eugenik.de/labor/nk-zellen.htm>. Innovationsforum Senftenberg.

- [126] T. Spicakova. PI3K inhibitors: A promising new class of cancer therapeutics? *Oncology Business Review*, pages 1–10, 2011.
- [127] J. Engel and A. Hönig. Der AKT-Signaltransduktionsweg als therapeutisches Target in gynäkologischen Malignomen und dem Mammakarzinom. *Universität Würzburg Medizinische Fakultät: Forschungsbericht 2012*, page 73, 2012.
- [128] J.C. Hahne, A. Honig, S.R. Meyer, S. Gambaryan, U. Walter, J. Wischhusen, S.F.M. Häussler, S.E. Segerer, N. Fujita, J. Dietl, et al. Downregulation of AKT reverses platinum resistance of human ovarian cancers in vitro. *Oncology reports*, 28(6):2023–2028, 2012.
- [129] S.-M. Maira, P. Finan, and C. Garcia-Echeverria. From the bench to the bed side: PI3K pathway inhibitors in clinical development. *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*, pages 209–239, 2011.
- [130] S.-M. Maira, F. Stauffer, C. Schnell, and C. García-Echeverría. PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand? *Biochemical Society Transactions*, 37(1):265, 2009.
- [131] E.H. Walker, M.E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P.T. Hawkins, M.P. Wymann, and R.L. Williams. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular cell*, 6(4):909–919, 2000.
- [132] A. Arcaro and M.P. Wymann. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochemical Journal*, 296(Pt 2):297, 1993.
- [133] E. Blommaart, U. Krause, J. Schellens, H. Vreeling-Sindelárová, and A.J. Meijer. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 243(1-2):240–246, 2004.
- [134] G.J. Brunn, J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J. Lawrence Jr, and R.T. Abraham. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *The EMBO journal*, 15(19):5256, 1996.
- [135] L. Hu, C. Zaloudek, G.B. Mills, J. Gray, and R.B. Jaffe. In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clinical Cancer Research*, 6(3):880–886, 2000.

- [136] T. Schönhals et al. Die Wirkung von AKT-Inhibitoren auf die humane Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien. 2011.
- [137] J.B. Engel, S. Schönhals, T. and Häusler, M. Krockenberger, M. Schmidt, E. Horn, F. Köster, J. Dietl, J. Wischhusen, and A. Honig. Induction of programmed cell death by inhibition of AKT with the alkylphosphocholine perifosine in in vitro models of platinum sensitive and resistant ovarian cancers. *Archives of gynecology and obstetrics*, 283(3):603–610, 2011.
- [138] B. Rubio-Viqueira and M. Hidalgo. Targeting mTOR for cancer treatment. *New trends in cancer for the 21st century*, pages 309–327, 2006.
- [139] M. Monzó, R. Rosell, J. Javier Sánchez, J.S. Lee, A. O’Brate, J. Luis González-Larriba, V. Alberola, J.C. Lorenzo, L. Núñez, J.Y. Ro, et al. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 17(6):1786–1786, 1999.
- [140] H.G. Meerpohl, A. Pfeiderer, W. Kleine, and G. Teufel. Chemotherapy for stage iii-iv ovarian cancer: The CAP-regimen in previously untreated patients. *Onkologie*, 5(5):238–241, 1982.
- [141] J. Hahne, S. Meyer, S. Gambaryan, U. Walter, J. Dietl, J.B. Engel, and A. Höning. Immune escape of AKT overexpressing ovarian cancer cells. *International Journal of Oncology*, pages 1–5, 2013.
- [142] A. Carracedo, L. Ma, J. Teruya-Feldstein, F. Rojo, L. Salmena, A. Alimonti, A. Egia, A.T. Sasaki, G. Thomas, S.C. Kozma, et al. Inhibition of mtorc1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of clinical investigation*, 118(9):3065, 2008.
- [143] J. Sunayama, K.-I. Matsuda, A. Sato, K. Tachibana, K. Suzuki, Y. Narita, S. Shibui, K. Sakurada, T. Kayama, A. Tomiyama, 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*, 28(11):1930–1939, 2010.
- [144] J.A. McCubrey, L.S. Steelman, S.L. Abrams, J.T. Lee, F. Chang, F.E. Bertrand, P.M. Navolanic, D.M. Terrian, R.A. Franklin, A.B. D’Assoro, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in enzyme regulation*, 46:249, 2006.

- [145] T.J. Kim, J.W. Lee, S.Y. Song, J.J. Choi, C.H. Choi, B.G. Kim, J.H. Lee, and D.S. Bae. Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *British journal of cancer*, 94(11):1678–1682, 2006.
- [146] J.R. Testa, D.A. Altomare, Z.M. Liu, J. Pei, P. Poulikakos, M.K. Rao, R. Timakhov, H.Q. Wang, H. You, et al. Akt function and oncogenic activity. *Scientific Report*, 2005.
- [147] J.B. Engel, H. Schmidt, S. Häussler, J. Diessner, J. Hahne, S. Meyer, J. Wischhusen, J. Dietl, and A. Höning. Antitumorwirkung des PI3K Antagonisten AEZS126* in Modellen des tripelnegativen Mammakarzinoms. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 71(05):P521, 2011.
- [148] S. Bialik, V.L. Cryns, A. Drincic, S. Miyata, A.L. Wollowick, A. Srinivasan, and R.N. Kitsis. The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. *Circulation research*, 85(5):403–414, 1999.
- [149] W. Han, J. Xie, L. Li, Z. Liu, and X. Hu. Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. *Apoptosis*, 14(5):674–686, 2009.
- [150] S.C. Enns, L.A.V. Cordeiro, A.M. Sarr, J. Luz, J. Kim, V. Ferreira-Silva, P. Wolff, and J.E. Belizário. Tumor necrosis factor- α signaling cascades in apoptosis, necrosis, necroptosis and cell proliferation. *Braz. J. morphol. Sci*, 23(1):109–120, 2006.
- [151] P. Vandenabeele, L. Galluzzi, T.V. Berghe, and G. Kroemer. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10):700–714, 2010.
- [152] J. Šimenc and M. Lipnik-Štangelj. Staurosporine induces apoptosis and necroptosis in cultured rat astrocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(4):399–405, 2012.
- [153] J. Brittenden, S. Heys, J. Ross, and O. Eremin. Natural killer cells and cancer. *Cancer*, 77(7):1226–1243, 1996.
- [154] B. MacNeil, L. Hoffman-Goetz, et al. Effect of exercise on natural cytotoxicity and pulmonary tumor metastases in mice. *Medicine and science in sports and exercise*, 25:922–922, 1993.

- [155] R. Bellucci, H.-N. Nguyen, A. Martin, S. Heinrichs, A.C. Schinzel, W.C. Hahn, and J. Ritz. Tyrosine kinase pathways modulate tumor susceptibility to natural killer cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7):2369, 2012.
- [156] L. Kelland. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8):573–584, 2007.

6 Anhang

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der wesentlichen Komponenten des PI3K-AKT-Signalweges (modifiziert nach Diaz-Padilla, et al. [12])	5
1.2	Schematische Darstellung der wesentlichen Komponenten des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges (modifiziert nach Frémin, et al. [41]) . .	10
1.3	Schematische Darstellung von Autophagie induzierenden und inhibierenden Faktoren (modifiziert nach Kondo, et al. [23])	11
2.1	Pipettierschema nach Bradford	36
3.1	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie . .	45
3.2	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie .	46
3.3	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie . . .	47
3.4	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie .	48
3.5	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der SKOV-3-Zelllinie .	49
3.6	Zusammenstellung aller im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC50-Werte	51
3.7	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der A2780-Zelllinie nach 24 Stunden	51
3.8	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der A2780-Zelllinie nach 48 Stunden	52
3.9	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der A2780-Zelllinie nach 72 Stunden	53
3.10	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie nach 24 Stunden	54
3.11	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie nach 48 Stunden	55
3.12	Effekte der Kombinationsbehandlung mit AEZS-126 und Rapamycin auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie nach 72 Stunden	56
3.13	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden A2780-Zellen	58

3.14	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden Acis2780-Zellen	59
3.15	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden A2780-Zellen	60
3.16	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität von nicht proliferierenden Acis2780-Zellen	61
3.17	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden . . .	63
3.18	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden . . .	64
3.19	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden . . .	65
3.20	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden	66
3.21	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden	67
3.22	Rapamycin-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden	68
3.23	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden . . .	69
3.24	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden . . .	70
3.25	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden . . .	71
3.26	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 24 Stunden	72
3.27	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 48 Stunden	73
3.28	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 nach 72 Stunden	74
3.29	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Necrostatin-1 .	75
3.30	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Necrostatin-1	76
3.31	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der A2780-Zelllinie bei Kombination mit Necrox-2	77

3.32	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Vitalität der Acis2780-Zelllinie bei Kombination mit Necrox-2	78
3.33	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Expression verschiedener Signaltransduktionsproteine bei der Zelllinie A2780	80
3.34	AEZS-126-abhängige Effekte auf die Expression verschiedener Signaltransduktionsproteine bei der Zelllinie Acis2780	81
3.35	Vergleich der Expression verschiedener Signaltransduktionsproteine bei den Zelllinien A2780 und Acis2780	82
3.36	Rapamycin-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der A2780-Zellen	84
3.37	Rapamycin-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der Acis2780-Zellen	85
3.38	AEZS-126-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der A2780-Zellen	86
3.39	AEZS-126-abhängige Effekte auf den Zellzyklus der Acis2780-Zellen	87
3.40	Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf den Zellzyklus der A2780-Zellen	88
3.41	Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf den Zellzyklus der Acis2780-Zellen	89
3.42	AEZS-126-abhängige Effekte auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie A2780	91
3.43	AEZS-126-abhängige Effekte auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie Acis2780	92
3.44	AEZS-126-abhängige Effekte auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie SKOV-3	93
3.45	Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie A2780	94
3.46	Effekte der Kombinationsbehandlung von AEZS-126 mit Rapamycin auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie Acis2780	95
3.47	Lytische Aktivität polyklonaler NK-Zellen auf die Zellen der Zelllinien A2780 und Acis2780	97
3.48	AEZS-126-abhängige Effekte auf die lytische Aktivität polyklonaler NK-Zellen auf die Zellen der Zelllinie A2780	98
3.49	AEZS-126-abhängige Effekte auf die lytische Aktivität polyklonaler NK-Zellen auf die Zellen der Zelllinie Acis2780	99

Akronyme

3-MA 3-Methyladenin

AIF Apoptose-induzierende Faktor

Apaf-1 apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1

APS Ammoniumpersulfat

ATP Adenosintriphosphat

Bcl-2 B-cell lymphoma 2

Bcl-xl B-cell lymphoma-extra large

BECN1 Beclin-1

BMF Bcl-2-modifizierender Faktor

BNIP3 Bcl-2-Adenovirus-E1B-19-kD-interagierendem Protein 3

BRCA BReast CAncer

BSA Rinder-Serumalbumin

CD cluster of differentiation

CTMP Carboxy-terminale Modulator-Protein

CFSE 5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

DAPk Zelltod-assozierte Proteinkinase

dATP deoxy-Adenosintriphosphat

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

Drp1 dynamin-related protein 1

DR Todes-Rezeptor

ERK extrazellulär Signal-regulierten Kinase

FADD Fas-assoziierte Protein mit Todes-Domäne

FCS Fetales Kälberserum

FIGO Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

Grb2 Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundene Protein-2

HSpin1 human homolog of the Drosophila melanogaster gene spinster 1

IL-2 Interleukin-2

LY294002 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one

MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MEK MAPK/ERK-Kinase

MHC major-histocompatibility-complex

MM Magermilchpuffer

mTOR Mammalian Target of Rapamycin

NK Natürliche Killer

PARP-1 Poly(-ADP-Ribose)-Polymerase 1

PBL Lymphozyten des peripheren Blutes

PBMC mononukleären Zellen des peripheren Blutes

PBSO prophylaktische beidseitige Salpingo-Ovarektomie

PBS phosphatgepufferte Salzlösung

PBST Phosphat-Tween-Puffer

PDK1 Phosphoinositide-dependent Kinase-1

PH-Domäne Pleckstrin-Homolog-Domäne

PI3K Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIP2 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP3 Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat

PKB Proteinkinase B

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

P/S Penicillin / Streptomycin

PtdIns Phosphatidylinositol

PTEN Phosphatase-und-Tensin-Homologs

PTPC Permeabilitäts-Transitions-Poren-Komplex

Raf rapidly accelerated fibrosarcoma

Ras Rat sarcoma

RIP1 Rezeptor-interagierende Serin-Threonin-Proteinkinase-1

rpm Umdrehungen pro Minute

SDS Natriumdodecylsulfat

SHIP SH2-enthaltende Inositol-5-Phosphatase

TEMED Tetramethylethyldiamin

TGF Transforming Growth Factor

TNF Tumornekrosefaktors

TRADD Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-Typ 1-assoziierte Todes-Domäne-Protein

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

zVAD-fmk Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon

Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht an Herrn Prof. Dr. med. Johannes Dietl, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes,

Herrn Prof. Dr. med. Arnd Hönig für die Überlassung des Themas und die zügige Bearbeitung.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an meinen Betreuer Dr. rer. nat. Jens Hahne richten, für die intensive Betreuung während der experimentellen Phase, die konstruktive Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Susanne Meyer für die Hilfestellung bei der Durchführung einiger Untersuchungen.

Auch möchte ich mich sehr bei meiner Familie und meinem Verlobten Andreas bedanken, die mich immer unterstützt und gestärkt haben und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank gilt auch meinem Bruder Oliver für die tatkräftige Unterstützung und seine Geduld in allen technischen Bereichen.