Aus der Medizinischen Klinik

# mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

### DISSERTATION

# Hemmung des JAK/STAT3-Pathways mit JAK-Inhibitoren in Mammakarzinomen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Barbara Bax

aus Ratingen

Datum der Promotion:

25. November 2022

# Inhaltsverzeichnis

Abl	bildur	igsvei	rzeichnis	5
Tat	oellen	verze	ichnis	7
Abl	kürzu	ngsve	erzeichnis	8
Abs	stract	•••••		10
Zus	amm	enfas	sung	11
1		Ei	nleitung	13
	1.1	Ma	ammakarzinom	
		1.1.1	Epidemiologie	
		1.1.2	Pathologie	
		1.1.3	Allgemeine Therapieprinzipien	
	1.2	Sig	gnaltransduktionswege und verwendete Substanzen	
		1.2.1	JAK/STAT-Signaltransduktionsweg	15
		1.2.2	JAK/STAT-Signaltransduktionsweg und der Bezug zum Mammak	arzinom 17
		1.2.3	PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg	
		1.2.4	PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg und der Bezug zum	
			Mammakarzinom	
		1.2.5	PIM-Proteine und der Bezug zum Mammakarzinom	
	1.3	Zie	elsetzung und Fragestellung der Arbeit	
2		Μ	ethodik	25
	2.1	Ma	aterialien	
		2.1.1	Geräte	
		2.1.2	Verbrauchsmaterialien	
		2.1.3	Reagenzien	
		2.1.4	Puffer und Lösungen	
		2.1.5	Substanzen	
		2.1.6	Antikörper	
		2.1.7	Handelsübliche Reaktions-Kits	
		2.1.8	Software	
	2.2	Ze	lllinien-Charakteristika und Herkunft	
	2.3	Ze	llbiologische Methoden	
		2.3.1	Zellkultivierung und Zellzahlbestimmung	

3

4

2.3.2	Kryokonservierung, Auftauen und Konservierung von Aliquots	32
2.4 Bi	ochemische Methoden	32
2.4.1	MTT-Test – Diagnostischer Zellkulturtest	32
2.4.2	Zellzählversuch	33
2.4.3	Colony formation assay	33
2.4.4	Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> – Anreicherung von Nukleosomen im	
	Zytoplasma	34
2.4.5	Western Blot	34
2.5 St	atistische Auswertung	36
E	rgebnisse	37
3.1 Ph	osphorylierungsgrad von Signalproteinen des JAK/STAT- und	~-
PI 2.2 D	3K/AK1/m1OR-Signaltransduktionswegs	
3.2 Pr	oliferationsinhibition der Mammakarzinomzellinien unter Inkubatio	on mit
JA JA		
3.3 Pr	oliterationsinhibition der Mammakarzinomzeilinien unter Inkubatio	)n mit
PI 2.4 V.	SK-INNIDITOF BYL/19	
<b>3.4 K</b> (	Dimbination von JAK2-Inhibitor BSK805 mit PI3K-Inhibitor BYL719	44
3.4.1	Synergistischer Effekt auf die Proliferationsinnibition der	4.4
2 4 2		44
3.4.2	Zytostatischer und zytotoxischer Effekt der Inhibitorkombination	4/
3.4.3	Einfluss des Zelizyklus	48
5.4.4 2.4.5	Apoptose-Induktion	48
5.4.5	Signaltrangen in der Expression von Proteinen des PISK/AK1/IIITOK	- 51
25 E-	Signaturansduktionswegs	51
).5 EX	pression von Frivi-Kinasen in Manmakarzmonizenninen	······54
5.0 PT DI	omerationsimulation der Mammakarzmomzemmen unter inkubatio M. Insisitor I. C. P. 221	۳ חחר 52
F1 27 V.	M-IIIII0110F LGD521	
<b>3.7 K</b>	Supergistischer Effekt auf die Proliferationsinhibition der	
5.7.1	Mammakarzinomzelllinion	55
372	Zytostatischer und Zytotovischer Effekt der Inhibitorkombination	55
3.7.2	Einfluss des Zellzuklus	
3.7.5	A poptose-Induktion	57 60
3.7.4	Fehlende Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs	63
5.1.5	· · · ·	····· 05
D	ISKUSSION	65
4.1 JA	K/STAT-Aktivierung in Mammakarzinomzelllinien	65
4.2 Ke	ombination der Inhibitoren BSK805 und BYL719	66

### 3

		4.2.1	Veränderungen im Zellzyklus als Erklärungsansatz für die	
			Proliferationsinhibition	67
		4.2.2	Apoptose eine mögliche Erläuterung für die Proliferationsinhibition	68
		4.2.3	Dysregulation im Signaltransduktionsweg	68
	4.3	Ko	mbination der Inhibitoren BSK805 und LGB321	68
		4.3.1	Modifizierter Zellzyklus infolge der Kombination der Inhibitoren	69
		4.3.2	Apoptose-Induktion	69
		4.3.3	Unabhängigkeit vom PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg	70
	4.4	Au	swirkungen auf Mammakarzinom-Stammzellen	70
	4.5	Au	sblick	71
5		Li	teraturverzeichnis	73
6		Ei	desstattliche Versicherung	85
7		Le	benslauf	86
8		Da	anksagung	88

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: JAK/STAT-Signaltransduktionsweg17
Abbildung 2: PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg
Abbildung 3: Substrate von PIM123
Abbildung 4: Expression und Phosphorylierungsgrad von JAK2, STAT3 und STAT5 ausgewählter Mammakarzinomzelllinien in der Western Blot-Analyse
Abbildung 5: Expression und Phosphorylierungsgrad von P70S6K, 4EBP1 und AKT ausgewählter Mammakarzinomzelllinien in der Western Blot-Analyse
Abbildung 6: INK424 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinomzelllinien
Abbildung 7: BSK805 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinomzelllinien40
Abbildung 8: Expression und Phosphorylierungsgrad von Schlüsselproteinen des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs41
Abbildung 9: BYL719 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinomzelllinien
Abbildung 10: Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie ZR-75 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination47
Abbildung 11: Expression von Schlüsselproteinen des Zellzyklus in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination
Abbildung 12: DNA-Fragmentierung der Zelllinien ZR-75 und BT-20 in Abhängigkeit der Behandlung mit 2,5 μM BSK805, 2,5 μM BYL719 und deren Kombination49
Abbildung 13: PARP-Spaltung in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination
Abbildung 14: Caspase-3-Spaltung in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination
Abbildung 15: Expression von BIM und PUMA, Mediatoren der Apoptose-Regulation in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination51
Abbildung 16: Expression von Schlüsselproteinen des mTOR-Signaltransduktionswegs in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination

Abbildung 17: Expression der PIM-Kinasen für die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-453
in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK80553
Abbildung 18: LGB321 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter
Mammakarzinomzelllinien
Abbildung 19: Reduktion der absoluten Zellzahl in Abhängigkeit der Behandlung mit
BSK805, LGB321 und deren Kombination. 57
Abbildung 20: Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie MCF-7
Abbildung 21: Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie SKBR-3
Abbildung 22: Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie BT-474
Abbildung 23: Expression von Schlüsselproteinen des Zellzyklus in Abhängigkeit der
Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination
Abbildung 24: Normierte relative Nukleosomenanreicherung der Zelllinien SKBR3 und
BT-474 in Abhängigkeit der Behandlung mit 2,5 μM BSK805, 2,5 μM LGB321 und deren
Kombination. 61
Abbildung 25: Expression von Mediatoren der Apoptose-Regulation für die Zelllinie BT-
474 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination 62
Abbildung 26: Expression von Schlüsselproteinen des mTOR-Signaltransduktionswegs in
Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika ausgewählter Zelllinien. 31
Tabelle 2: Kombinatorischer Effekt auf die Proliferationsinhibition ausgewählter
Mammakarzinomzelllinien
Tabelle 3: Kombinatorischer Effekt auf die Proliferationsinhibition ausgewählter
Mammakarzinomzelllinien
Tabelle 4: Kombinatorischer Effekt auf die Proliferationsinhibition ausgewählter
Mammakarzinomzelllinien
Tabelle 5: IC50 Werte der Zelllinien BT-20, MDA-MB-436, ZR-75, BT-474 und MDA-MB-
231 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination46
Tabelle 6: Kombinatorischer Effekt auf die Proliferationsinhibition ausgewählter
Mammakarzinomzelllinien55
Tabelle 7: <i>IC</i> 50 Werte der Zelllinien MCF-7, MDA-MB-436, SKBR3, BT-474 und T47D in
Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination56

# Abkürzungsverzeichnis

4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AKT	Serin/Threonin-Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2 associated agonist of cell death
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIM	Bcl-2-like protein 11
BRCA	Breast cancer gene
Мус	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
c-SRC	Tyrosinkinase c-Src (Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i> )
Caspase	cysteine-aspartic protease
CI	Kombinations-Index
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A
CDC25C	cell division cycle 25 homolog C
CDK	cyclin-dependent kinase
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECL	Elektrochemilumineszenz
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Estrogen receptor/ Östrogenrezeptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FKS	Fetales Kälberserum
GAS-Sequenz	Gamma Activating Sequence
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IL-6	Interleukin 6
INK-424	Ruxolitinib
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrate
JAK	Januskinase
Ki-67	Antigen Kiel-67
МАРК	mitogen-activated protein kinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mTOR	mechanistic target of Rapamycin

mTORC	mechanistic target of Rapamycin complex
NF-кB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NVP-BSK805-NX-9	BSK805
NVP-BYL719	BYL719
NVP-LGB321-NX-9	LGB-321
p21 <sup>Cip1/Waf1</sup>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27 <sup>KIP1</sup>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p53	tumor protein 53
P/S	Penicillin-Streptomycin
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS + Tween
РІЗК	Phosphoinositol 3 Kinase
PIM	Proviral integration site for moloney murine leukemia virus
	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit
FINJUA	alpha
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5 trisphosphat
Ponceau S	3-hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfophenylazo]phenylazo)-2,7-
I onecau 5	naphthalenedisulfonic acid sodium salt
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RPM	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SOCS	suppressor of cytokine signaling proteins
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOR	target of Rapamycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	tuberous sclerosis complex
TYK2	tyrosine kinase 2
PVDF Membran	Polyvinylidenfluorid Membran

# Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women. In addition to chemotherapy and antihormonal therapy, targeted therapies are increasingly used in the treatment of breast cancer. The overactivation of various signal transduction pathways including the PI3K/AKT/mTOR and JAK/STAT pathway is substantial in breast cancer growth. In the present work, the in vitro activity of several potential targeted therapies was investigated on breast cancer cell lines.

First, the activity of two JAK inhibitors, INK424 and NVP-BSK805-NX-9 (BSK805), was investigated using cell viability assay (MTT assay) on breast cancer cell lines. BSK805 alone led to a moderate cell viability reduction at high concentrations. In contrast, the breast cancer cell lines did not show any sensitivity to INK424, even at maximum concentration. These results suggested that inhibition of a single pathway alone may not be sufficient to induce proliferation inhibition and apoptosis.

Due to the known crosstalk between PI3K/AKT/mTOR and JAK/STAT pathway, the JAK2 inhibitor BSK805 and the PI3K inhibitor NVP-BYL719 (BYL-719/ alpelisib) were combined. Significant proliferation inhibition was shown. In addition, nucleosome enrichment in Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> and cleavage product of the apoptosis key protein PARP in western blot were increased, showing significantly enhanced apoptosis for the breast cancer cell lines BT-20 and ZR-75 under inhibitor combination.

Further activity enhancement of JAK2 inhibition was suspected in combination with PIM kinase inhibitors. PIM kinases are also controlled by JAK/STAT signaling and regulate the proliferation of breast cancer cells. The pan-PIM-inhibitor LGB321 showed minimal inhibition of proliferation in most of the tested cell lines. In combination with BSK805, enhanced cytostatic and cytotoxic effects were observed. Cell line BT-474, showed increased apoptosis in Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> and western blot in inhibitor combination of BSK805 and LGB321.

In conclusion, breast cancer cells in-vitro showed little sensitivity to JAK2 inhibition alone. Inhibiting additional survival pathways, however, resulted in synergistic or additive effects. The additional inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway or PIM kinase, respectively, significantly increased the proliferation inhibitory effect associated with cell cycle arrest and apoptosis induction in breast cancer cells. The combination of JAK2 inhibitor with PI3K- or pan-PIM kinase inhibitors requires further investigation to assess clinical applicability.

## Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Neben Chemotherapie und antihormoneller Therapie finden in der Behandlung des Mammakarzinoms immer häufiger zielgerichtete Substanzen Anwendung. Beim Mammakarzinom kommt es zur Überaktivierung diverser Signaltransduktionswege, u. a. des JAK/STAT- und des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs. In der vorliegenden Arbeit wurde die *in-vitro*-Aktivität mehrerer potenzieller zielgerichteter Substanzen an Mammakarzinomzelllinien untersucht.

Zunächst wurde die Aktivität von zwei JAK-Inhibitoren, INK424 und NVP-BSK805-NX-9 (BSK805), mit Hilfe von Zellviabilitätstests (MTT-Tests) an Mammakarzinomzelllinien untersucht. **BSK805** allein führte in hoher Konzentration zu einer moderaten Zellviabilitätsreduktion. Gegenüber INK424 zeigten sich die Mammakarzinomzelllinien auch bei maximaler Konzentration nicht sensibel. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die alleinige Signaltransduktionswegs möglicherweise nicht ausreicht, Hemmung eines um eine Proliferationshemmung und Apoptose zu induzieren.

Aufgrund des bekannten *Crosstalk* zwischen PI3K/AKT/mTOR- und JAK/STAT-Signaltransduktion wurde der JAK2-Inhibitor BSK805 mit dem PI3K-Inhibitor NVP-BYL719 (BYL719/ Alpelisib) kombiniert. Es zeigte sich eine signifikante Proliferationsinhibition. Darüber hinaus stiegen sowohl die Nukleosomenanreicherung im *Cell Death Detection ELISA*<sup>PLUS</sup> als auch die Spaltproduktmenge des Apoptoseschlüsselproteins PARP im *Western Blot* deutlich an, was sich auf eine signifikant erhöhte Apoptose bei den Brustkrebszelllinien BT-20 und ZR-75 unter Inhibitorkombination zurückführen lässt.

Eine weitere Aktivitätsverstärkung der JAK2-Inhibition wurde in der Kombination mit PIM-Kinase-Inhibitor vermutet. PIM-Kinasen stehen unter der Kontrolle des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs und sind an der Proliferation von Mammakarzinomzellen beteiligt. Der pan-PIM-Kinase-Inhibitor LGB321 zeigte bei der Mehrheit der getesteten Zelllinien eine geringfügige proliferationsinhibierende Wirkung. In Kombination mit BSK805 waren jedoch deutliche zytostatische und zytotoxische Wirkungen zu beobachten. Die Zelllinie BT-474 zeigte bei Inhibitorkombination aus BSK805 und LGB321 im *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* und *Western Blot* ebenfalls verstärkt Apoptose.

Zusammenfassend waren alle getesteten Mammakarzinomzellen *in-vitro* gegenüber einer alleinigen JAK2-Hemmung wenig sensibel. Die Kombination mit Inhibitoren weiterer Signaltransduktionswege zeigte jedoch eine synergistische oder additive Wirksamkeit. Durch die zusätzliche Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs bzw. von PIM-Kinasen verstärkte sich die antiproliferative Wirkung, die mit Zellzyklusarrest und Apoptose-Induktion assoziiert ist, signifikant. Die Kombination aus JAK2-Inhibitor mit PI3K- bzw. pan-PIM-Kinase-Inhibitor sollte zukünftig weiter untersucht werden, um eine klinische Anwendbarkeit zu prüfen.

# 1 Einleitung

### 1.1 Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Im Jahr 2012 erkrankten weltweit ca. 1,7 Millionen Frauen am Mammakarzinom und mehr als 520.000 verstarben daran [1]. Es wird angenommen, dass im Jahr 2050 weltweit 3,2 Millionen Frauen jährlich am Mammakarzinom erkranken werden [1]. Jedoch zeigt sich trotz steigender Inzidenz eine sinkende Sterberate [2].

Das Lebenszeitrisiko beträgt 12,9 %, wobei jede achte Frau die Diagnose eines Mammakarzinoms innerhalb ihres Lebens erhält [3]. Auf Deutschland bezogen liegt die Neuerkrankungsrate bei 71.640 Frauen jährlich [4]. Etwa 682 Männer erkranken in Deutschland pro Jahr am Mammakarzinom [4]. Die 5-Jahresüberlebensrate für das lokalisierte Mammakarzinom liegt bei 98,6 %, im metastasierten Stadium dagegen bei 23,3 % [5]. Metastasen können lymphogen oder hämatogen disseminieren. Regional betroffene Lymphknoten sind in der Regel ipsilaterale axilläre Lymphknoten [6]. Die hämatogene Metastasierung erfolgt am häufigsten in Knochen, Lunge, Leber und Gehirn [6]. Faktoren, welche prognostisch bedeutsam für das Rezidivrisiko sind, umfassen den pTNM-Status, die histologische Klassifikation, das *Grading*, den Resektionsstatus und die peritumorale Lymphgefäß- und Gefäßinvasion, den Rezeptorstatus und die Keimbahnmutationen [7] [8] [9]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren [4]. Nach 10 Jahren liegt die Häufigkeit eines Lokalrezidivs bei 8–10 % [10].

### 1.1.2 Pathologie

Mammakarzinome stellen in der Regel Adenokarzinome dar, welche von Milchdrüsen und deren Gängen ausgehen. Lobuläre und duktale Neoplasien werden unterschieden [11]. Die *World Health Organisation* unterscheidet zwischen invasiven Karzinomen ohne speziellen Typ und invasiven Karzinomen mit speziellem Typ [11]. Das invasive Karzinom ohne speziellen Typ ist der häufigste Subtyp des Mammakarzinoms und entspringt dem Milchgangepithel [11]. Daneben existiert das invasiv lobuläre Karzinom und weitere seltenere Tumorsubtypen, wie z.B. das invasiv tubuläre oder muzinöse Karzinom [11]. Die Differenzierung erfolgt nach der Einteilung von Elston und Ellis (Modifikation des Bloom- Richardson-*Grading*) in G1: gut differenziert, geringer Malignitätsgrad, G2: mäßig differenziert, mittlerer Malignitätsgrad und G3: schlecht differenziert, hoher Malignitätsgrad [12]. Dabei spielen für die Einteilung der drei Differenzierungsgrade, Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate eine Rolle [12]. U.a. können die Tumorherde multifokal oder multizentrisch auftreten [13]. Zu lokalisieren sind Mammakarzinome am häufigsten im äußeren oberen Quadranten, gefolgt vom inneren oberen

Quadranten und der Mamille [14]. Immunhistochemische Marker, welche in der Primärdiagnostik zu bestimmen sind, sind der Östrogenrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR), *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu) und das Antigen Kiel-67 (Ki-67). HER2/neu ist Bestandteil der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Familie und beeinflusst verschiedene Signaltransduktionswege, wie z.B. den MAPK- und PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg, wobei Zellproliferation stimuliert und Apoptose gehemmt wird [15]. Ki-67 ist ein Proliferationsindex-Marker, wobei ein hoher Proliferationsindex mit schnellem Tumorwachstum assoziiert ist [16].

Unterschieden werden Luminal-A und Luminal-B-Tumore, wobei Luminal-A-Tumore durch ER- oder PR-positiv bzw. HER2/neu-negative Tumore mit niedriger Proliferationsrate und Luminal-B-Tumore mit hoher Proliferationsrate charakterisiert sind [17]. Ein Hormonrezeptor-positiver Tumor definiert sich über mehr als 1 % ER- oder PR-positive Tumorzellen [18]. Schätzungsweise 75–80 % aller Mammakarzinome gelten als Hormonrezeptor-positiv und gelten als grundsätzlich sensibel für eine endokrine Therapie [19] [20]. HER2/neu-überexprimierende Tumore können zusätzlich zur endokrinen Therapie oder Chemotherapie mit HER2-gerichteten Substanzen (Antikörpern oder Tyrosinkinase-Inhibitoren) behandelt werden [21]. *Triple*-negative Tumore, welche 12–17 % aller Mammakarzinome bilden, sind sowohl ER/PR-negativ als auch HER2/neu-negativ [22]. *Triple*-negative Tumore sind assoziiert mit Aggressivität des Tumors und schlechterer Prognose [23].

### 1.1.3 Allgemeine Therapieprinzipien

In der Regel wird im Rahmen einer Tumorkonferenz, zusammengesetzt aus verschiedenen Fachdisziplinen, wie der Onkologie, der Gynäkologie, der Pathologie und der Radiologie ein Behandlungsplan für den Patienten individuell erstellt. Grundlage aller Therapieregime für das frühe Mammakarzinom ist die Komplettresektion mit tumorfreien Resektionsrändern, RO-Resektion [24]. Neben der operativen Therapie besteht die Möglichkeit der neoadjuvanten und adjuvanten Therapie.

Für die Wahl der adjuvanten Therapie sind u.a. Tumorgröße, Lymphknotenstatus, *Grading*, Hormonrezeptor-Status, HER2/neu-Status und das Alter des Patienten entscheidende Einflussgrößen [25]. Es besteht die Empfehlung für Patientinnen mit ER- und/oder PR-positiven Tumoren eine endokrine Therapie mit dem selektiven Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen, einem Aromatasehemmer oder mit einer sequentiellen Kombination beider, durchzuführen [26]. Indikationen für eine adjuvante Chemotherapie mit einem Taxan oder Anthrazyklin sind HER2/ neu-überexprimierende Tumore, *triple*-negative Tumore und Luminal-B-Tumore mit hohem Rezidivrisiko [25]. Für Patientinnen mit HER2/neu-überexprimierenden Tumoren mit Tumorgröße > 1cm schließt sich eine in der Regel einjährige Antikörpertherapie mit HER2gerichteten Substanzen an [21]. Das metastasierte Mammakarzinom ist fast ausschließlich nicht kurativ behandelbar. Primäre Therapieziele sind daher der Erhalt der Lebensqualität und die Verlängerung der Lebenszeit [27] [28]. Wie in der adjuvanten Situation finden beim metastasierten Mammakarzinom Chemotherapeutika und zielgerichtete Substanzen Anwendung. Allerdings entwickeln alle metastasierten Mammakarzinome Resistenzen gegen die eingesetzten Substanzen oder weisen eine primäre Resistenz auf, sodass dringender Bedarf nach neuen effektiven Therapiemethoden besteht.

### 1.2 Signaltransduktionswege und verwendete Substanzen

#### 1.2.1 JAK/STAT-Signaltransduktionsweg

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg in Prozesse ist involviert der Zellproliferation, -migration und -apoptose [29]. Bestandteile des Signaltransduktionswegs sind extrazelluläre Liganden, ein Transmembran-Rezeptor und eine an den Rezeptor gekoppelte Tyrosinkinase (JAK) (Abbildung 1). JAK sind evolutionär konservierte zytoplasmatische Rezeptor-Tyrosinkinasen, wobei JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 differenziert werden [30]. JAK besitzt ein Molekulargewicht von 120-130 kDa und ist zusammengesetzt aus 7 Segmenten (JH1-7) [30]. Der Name der Rezeptor gekoppelten Tyrosinkinase ist angelehnt an den römischen Gott Janus, wobei die Doppelköpfigkeit an die gleichartigen Proteindomänen der Tyrosinkinase erinnert [30]. Die Besonderheit der Proteindomänen besteht darin, dass nur eine einzelne Domäne eine physiologische Aktivität zeigt [30]. Dabei besitzt die Kinasedomäne JH1 die Fähigkeit zur enzymatischen Aktivität, wohingegen JH2, als Pseudokinasedomäne bezeichnet, regulierende und gleichzeitig inhibierende Funktionen aufweist [30]. JH3 und JH4 werden als Src-homology 2 (SH2) ähnliche Domänen definiert [31]. Die übrigen Segmente der Tyrosinkinase werden unter dem Begriff FERM zusammengefasst, welches ein Akronym aus F für 4,1 Protein, E für Ezrin, R für Radixin und M für Moesin bildet [32]. Dies sind Proteine, in denen die Domäne erstmalig erfasst wurde [32]. FERM interagiert mit Kinasen und Zytokinrezeptoren [33].

Sobald es zur Bindung durch einen Liganden kommt, führt das zur Phosphorylierung der des Rezeptors. Die entstandenen Phosphotyrosinreste Tyrosinrestes verfügen am Carboxyterminus des Rezeptors über eine Bindungsstelle für die SH2-Domänen von downstream Proteinen [34]. So können STATs über ihre zugehörige SH2-Domäne an die aktivierte Tyrosinkinase binden. Dabei entsteht ein aktiviertes Dimer. Unterschieden werden sieben verschiedene Varianten von 75-95 kDa schweren STAT-Proteine (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6) [35]. Der Aufbau der STAT-Monomere ist stets identisch, wobei sich nach N-terminaler-Domäne, eine "coiled-coil"-Domäne, eine DNAeine eine Bindungsdomäne, SH-2-Domäne und schließlich C-terminale-Transkriptionsaktivierungs-Domäne anschließt [36]. Nachfolgend kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung bestimmter STATs. Beispielsweise kommt es in Abhängigkeit von

Interferon-y durch JAK1 und JAK2 zur Homodimerisierung von STAT1, bzw. durch JAK1 und TYK2 in Abhängigkeit von Interferon- $\alpha/\beta$  zur Heterodimerisierung von STAT1 und STAT2 [37]. Nach der Phosphorylierung gelangt STAT in Abhängigkeit von Importin-α-5 über die Bindung an die nukleäre Lokalisierungssequenz in den Zellkern und steht dort zur Aktivierung oder Repression entsprechender Zielgene zur Verfügung [36]. Im Zellkern erfolgt die Bindung von STAT an palindromische DNA-Elemente, welche ebenfalls als gamma activating sequence (GAS-Sequenz) bezeichnet werden, wodurch die aktivierten STATs ihre Wirkung als Transkriptionsfaktoren entfalten können [36]. Eine Potenzierung der STAT vermittelten Transkriptionsaktivität kann mithilfe von tyrosin- und serinabhängiger Phosphorylierung erreicht werden. Inhibierende Wirkung der STAT-Aktivtät ist auf den supressor of cytokine signaling proteins (SOCS), den Protein-Tyrosin-Phosphatasen und den SUMO E3-Ligasen zurückzuführen, wobei dies nur eine grobe Vereinfachung der zu Grunde liegenden Komplexität der Regulation der STAT-Aktivität darstellt [36] [38].

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg interagiert auf verschiedenen Ebenen mit anderen Signaltransduktionswegen, u. a. dem Ras/Raf/MAPK/ERK-Signaltransduktionsweg und dem PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg. Die Verbindung zum Ras/Raf/MAPK/ERK-Signaltransduktionsweg verläuft dabei über eine JAK2 abhängige Aktivierung des Proteins *rat sarcoma* (Ras) über einen Komplex aus *SHC-transforming protein*, *Son of sevenless homolog* und *growth factor receptor-bound protein 2* [39].

In Abhängigkeit der Tyrosinkinase kann es zur Phosphorylierung vom Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) und p85 kommen, wobei es hierdurch wiederum zur Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg kommt.



**Abbildung 1: JAK/STAT-Signaltransduktionsweg** modifiziert nach [40] [35]. Pfeil = aktivierende Wirkweise, WF = Wachstumsfaktor, BSK805 = JAK2-Inhibitor

#### 1.2.2 JAK/STAT-Signaltransduktionsweg und der Bezug zum Mammakarzinom

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg spielt in Mammakarzinomzellen über diverse Mechanismen eine maßgebliche Rolle. 2007 gelang es der Arbeitsgruppe um Ying Zhan, Zhou *et al.* (2007) die STAT3 Aktivität als wesentlichen Mechanismus der Lebensfähigkeit der Mammakarzinom-Zelllinie (Zelllinie) MCF-7 herauszuarbeiten [41]. Neben STAT3 ist auch das aktivierte STAT5a für das Zellüberleben bedeutsam [42]. Ein potenzielles Interleukin zur Aktivierung des Signaltransduktionswegs stellt das Interleukin 6 (IL-6) dar, wobei Marotta *et al.* (2011) die Aktivität des IL-6/JAK2/STAT3-Signaltransduktionswegs in CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>--</sup> Mammakarzinomzellen nachweisen konnten [43]. Ein hoher IL-6-Spiegel ist verbunden mit Tumorprogression und der Aktivierung von NOTCH3, welches im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung von Stammzellen steht [44]. Beeinflusst wird der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg beim Mammakarzinom ebenso über die Aktivierung weiterer Signaltransduktionswege, wie dem *eukaryotic ribosome biogenesis protein 1*, c-Src oder PI3K/AKT/mTOR [45].

In triple-negativen Mammakarzinomen wurde eine Amplifikation des JAK2-Gens auf dem 9p24.1-Lokus gefunden [46]. Die Missense-Mutation, eine Punkt-Mutation V617F auf dem JAK2-Gen, ist mit einer verkürzten Lebenszeit der Patienten verbunden. Die Sequenz ändert sich von GTC zu TTC [47]. Therapeutisch steht die Gabe spezifischer JAK-Inhibitoren für verschiedene Tumorerkrankungen, wie z. B. myelofibotische Erkrankungen und entzündliche Autoimmunerkrankungen, wie z. B. Rheumatoide Arthritis, zur Verfügung [48]. Nachdem ein JAK1/2-Inhibitor, Ruxolitinib (INK424) bei Myelofibrose beachtliche Ergebnisse bezüglich Inhibition der Tumorprogression zeigte, testete man diesen Zusammenhang an triple-negativen Tumoren, wobei sich dies nicht bestätigten ließ [49]. Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Kim et al. (2019), wobei Tamoxifen-resistente Mammakarzinomzellen bei Applikation von INK424 eine Reduktion des Tumorwachstums und der Angiogenese zeigten [50]. INK424 ist ein kompetitiver Inhibitor von JAK1 und JAK2 [49]. In einem weiteren Mausexperiment wurde ein anderer JAK2-Inhibitor NVP-BSK805-NX-9 (BSK805) untersucht, welcher in Kombination mit einer Paclitaxel-basierten Chemotherapie ein reduziertes Tumorwachstum demonstrierte [51]. BSK805 ist ein Adenosintriphosphat kompetitiver JAK2-Inhibitor, wobei jener auch gegenüber JAK1, JAK3 und TYK2 Wirkung aufweist [52]. Mit BSK805 behandelte Zellen zeigten eine Reduzierung der Phosphorylierung von STAT5 [52].

### 1.2.3 PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg

Der PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg ist bedeutsam für die Regulation der Zellzyklusprogression, wobei eine Überaktivierung dieses Signaltransduktionswegs mit sein kann [53] Tumorzellproliferation und -wachstum assoziiert (Abbildung 2). Wachstumsfaktoren, wie der epidermal growth factor (EGF), der platelet-derived growth factor, der fibroblast growth factor und der IRS1 können zu einer Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs führen, indem sie an transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinasen binden, die eine Aktivierung durch Autophosphorylierung erfahren [54] [55]. Rezeptor-Tyrosinkinasen ermöglichen sowohl eine Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), als auch des Proteins Ras [56].

PI3K, ist eine heterodimere Kinase, die aus einer katalytischen Untereinheit p110 und aus einer regulatorischen Untereinheit p85 besteht [57]. Nach Bindung der regulatorischen Domäne an den aktivierten Wachstumsfaktor überträgt PI3K mittels katalytischer Untereinheit eine Phosphatgruppe auf Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) [58]. Dabei entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) [58]. PIP3, ein klassischer sekundärer Botenstoff, rekrutiert die Serin/Threonin-Proteinkinase B (AKT) an die Plasmamembran und phosphoryliert

diese mit Hilfe der *phosphoinositide-dependent kinase 1*. Durch die beschriebene Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung von AKT, wobei sich drei verschiedene Isoformen, AKT1 (PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) und AKT3 (PKB $\gamma$ ) unterscheiden [59]. Gemein ist diesen Isoformen eine hohe Übereinstimmung der jeweiligen Aminosäuresequenzen, deren Kodierung jedoch über unterschiedliche Gene erfolgt. AKT wirkt sich differenziert auf unterschiedliche Substrate aus, die in zelluläre Funktionen im Rahmen von Zellzyklusprogression, Zellüberleben, Zellwachstum und Glukosemetabolismus eingebunden sind. AKT besitzt darüber hinaus die Fähigkeit zur Inaktivierung der proapoptotischen Faktoren *Bcl-2 associated agonist of cell death* (BAD) und Procaspase-9 [60] [61]. Dieser Inaktivierung liegt die Phosphorylierung durch AKT an der Serin-Bindungsstelle 136 von BAD zu Grunde, woraufhin die Apoptose-Signalkaskade zum Erliegen kommt [60].

Als 1991 Studien an Hefen zum Mechanismus des Naturstoffes Rapamycin durchgeführt wurden, entdeckte man die Serin/Threonin-Kinase *target of Rapamycin* (TOR), welches ein weiteres Schlüsselsubstrat im PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg repräsentiert [62]. Der *mechanistic target of Rapamycin complex 1* (mTORC1) ist an der Regulation von Zellwachstum, Autophagie, Lipidsynthese und Ribosomenbiogenese beteiligt, wobei der *mechanistic target of Rapamycin complex 2* (mTORC2) eine Rolle bei der Organisation des Aktinozytoskeletts und der Phosphorylierung von AKT spielt [63]. Die mTOR-Aktivierung erfolgt über eine AKT-vermittelte Inaktivierung der Tumorsupressorproteine *TSC1* (Harmatin), *TSC2* (Tuberin) und die dadurch bedingte Anhäufung der GTPase *Ras-homolog-enriched-in-brain* [64]. Umgekehrt bedeutet das, dass ein aktivierter TSC1/TSC2-Komplex zu einer Hemmung von mTOR führen wird.

mTORC1 besitzt eine Kinaseaktivität. Die Phosphorylierung führt zum einen zur Aktivierung der S6 Kinase 1 (S6K1) und zum anderen zur Inaktivierung des *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4EBP1). [65] S6K1 kann über einen Feedbackmechanismus die mTORC1-Aktivität über Phosphorylierung regulieren.



Zellüberleben

Abbildung 2: PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg modifiziert nach [66] [67]. Wachstumsfaktoren führen über Rezeptortyrosinkinasen zur Rekrutierung von PI3K an die Zellmembran, wobei es über Zwischenschritte zur Aktivierung der Proteinkinase AKT und der Serin/Threonin-Kinase mTOR kommt. Sowohl AKT als auch mTOR besitzen die Fähigkeit zur Aktivierung und Inkativierung zellulärer Funktionen. WF = Wachstumsfaktor, RTK = Rezeptortyrosinkinase, P = phosphoryliert, Pfeil = aktivierende Wirkweise, Strich = inhibierende Wirkweise, BYL719 = PI3K-Inhibitor

#### 1.2.4 PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg und der Bezug zum Mammakarzinom

Der PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg ist von großer Relevanz beim Mammakarzinom, wobei insbesondere die *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha* (PIK3CA-Mutation) beim ER-positiven Mammakarzinom von Bedeutung ist. PIK3CA kodiert für die p110α-Untereinheit von PI3K. Die Mutation betrifft vor allem die Regionen E545K, E542K und H1047R und führt zur unkontrollierten Aktivierung von AKT [68]. 70 % der

Mammakarzinome sind assoziiert mit einer Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs und in 30 % der Fälle findet sich eine PIK3CA-Mutation [69].

Insbesondere durch die Überaktivierung dieses Signaltransduktionswegs und die benannten Mutationen kommt es zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber endokrinen, HER2/neuspezifischen und zytotoxischen Substanzen [70]. Verschiedene Inhibitoren dieses Signaltransduktionswegs sind daher Gegenstand von Studien/ der aktuellen Forschung [70].

Die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beeinflussen die Tumorentwicklung des Mammakarzinoms. Ein Beispiel dafür bietet der Tumorsuppressor *phosphatase and tensin homologue* (PTEN), eine Phosphatase, die die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 via Dephosphorylierung umkehrt [71] [58]. PTEN lässt sich als negativer Regulator der PI3K beschreiben, wobei es durch Dephosphorylierung zur Inhibierung der PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionskaskade kommt [72]. Demnach führt ein Verlust von PTEN zu einer gesteigerten Aktivität von AKT [73]. Eine Mutation von PTEN ist neben dem Mammakarzinom bei diversen weiteren Tumorsubtypen zu beobachten [58]. Eine Metaanalyse von Li *et al.* (2017) beschreibt einen Zusammenhang zwischen dem Verlust der Expression von PTEN und der Mammakarzinomentstehung [73].

Ein Verlust dieses Tumorsuppressors, aber auch AKT-Aktivierungen bzw. Amplifikationen und oben genannte PIK3CA-Mutationen führen ebenso zu einer Verstärkung des Signaltransduktionswegs [58] [74].

Beschriebene Zusammenhänge trugen zur Entwicklung von Klasse 1 PI3K-Inhibitoren bei [75]. Diese inhibieren sowohl die Untereinheit p110 $\alpha$ , als auch die Untereinheiten  $\beta$  und  $\delta$ . Spezifische PI3K-p110 $\alpha$ -Inhibitoren erwiesen sich als besonders wirksam für PIK3CA-mutierte Zelllinien [76]. Ein von Novartis produzierter spezifischer PI3K-p110 $\alpha$ -Inhibitor ist das 2-Aminothiazole Derivat NVP-BYL719 (BYL719/ Alpelisib), welcher in der SOLAR-1 (*Clinical studies of alpelisib in breast cancer 1*) Studie untersucht wurde [77]. Nebenwirkungen umfassen hyperglykämische Entgleisungen, gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhö und Nausea sowie makulopapuläre Ausschläge [76]. Der primäre Endpunkt, progressionsfreies Überleben wurde in der mit BYL719 und Fulvestrant behandelten Gruppe erreicht. Im Gegensatz zu der Gruppe, welche mit Fulvestrant und Placebo behandelt wurden, erhöhte sich das progressionsfreie Überleben in der Kohorte mit PIK3CA-Mutation [76]. BYL719 wurde in Verbindung mit Fulvestrant für die Behandlung von Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen, PIK3CA-mutierten Brustkrebs zugelassen [78].

### 1.2.5 PIM-Proteine und der Bezug zum Mammakarzinom

*Proviral integration site for moloney murine leukemia virus* (PIM)-Proteine sind der Familie der Serin/Threonin-Kinasen zuzuordnen, wobei PIM1, PIM2 und PIM3 unterschieden werden [79].

1984 entdeckte man das Onkogen PIM1 in einem Mausexperiment in Moloney murine Leukaemia virus-induced lymphomas [80].

PIM1 ist auf dem Chromosom 6 (6p21.2) und Chromosom 17 lokalisiert [79]. Im Gegensatz zu anderen Kinasen fehlt die regulatorische Domäne und es besteht eine dauerhafte Aktivierung [81]. Über die ISFR/ GAS-Sequenz erfolgt die Bindung von STAT3 und STAT5 an den PIM1-Promotor, wobei es zur Hochregulierung der PIM1-Genexpression kommt [82]. Neben STAT kann auch der Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-кB) zur Expression vom PIM1 führen [83]. PIM-Kinasen sind überexprimiert in vielen Tumorsubtypen, wobei sie Signaltransduktionswege involviert in sind, die mit Zellzyklusprogression-, Zelltod- und Tumorgenese in Verbindung stehen [83] (Abbildung 3). Während PIM1 insbesondere bei hämatologischen und soliden Tumoren in einem überexprimierten Zustand zu finden ist, wird PIM2 bei Lymphomen und leukämischen Erkrankungen und PIM3 bei Adenokarzinomen gefunden [84]. Spezifisch für das Mammakarzinom ist eine Überexpression von PIM1, wobei in HER2- und Hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen eine Amplifikation der genomischen Region 6p21p-25 gefunden wurde, welches für das Protoonkogen PIM1 kodiert [85].

phosphorylieren und PIM-Kinasen verschiedene Substrate greifen in differenzierte Signaltransduktionswege ein. PIM1 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog (MYC) an den Bindungsstellen Serin 62 und Threonin 58, wobei dies zu einer erhöhten Stabilität von MYC führt [86]. MYC ist ein Protoonkogen und von Relevanz für die Zellproliferation und den Zellmetabolismus. MYC Überexpression führt beim Mammakarzinom zu Resistenzen gegenüber chemotherapeutischer Behandlung und geht mit einer schlechteren Prognose einher [87].

Des Weiteren haben die PIM-Kinasen über die Inaktivierung von cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21<sup>Cip1/Waf1</sup>) und cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27<sup>KIP1</sup>) bzw. die Aktivierung von cell division cycle 25 homolog A (CDC25A) und cell division cycle 25 homolog C einen entscheidenden Einfluss auf den Zellzyklus [88] (CDC25C)[89]. Die Transkriptionsmodulatoren p21<sup>Cip1/Waf1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> können in einem Zusammenschluss mit Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen den Zellzyklus in der Gap 1 phase (G1) bzw. während des Übergangs von der G1 zur Synthesis Phase (S) arretieren [90]. Überdies besteht die Möglichkeit einer Phosphorylierung des Transmembranrezeptors NOTCH, welcher eine Rolle für die Progression von Tumorzellen spielt [91]. In Mammakarzinomen findet sich eine NOTCH-Überexpression, welche mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.

PIM-Kinasen gelingt es über eine Phosphorylierung an den Serin-Bindungsstellen 112, 136 und 155, den proapoptotischen Transkriptionsmodulator BAD zu inaktivieren, wobei es zu einer Apoptose-Inhibition kommt [92]. Dagegen gelingt es BAD in der unphosphorylierten Form über eine Bindung an Bcl-2 und *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL), deren inhibierende Wirkung

auf die Apoptose-Modulatoren *Bcl-2-associated X protein* und *Bcl-2 homologous antagonist/ killer* zu unterbinden und damit Apoptose zu betreiben [92].



**Abbildung 3: Substrate von PIM1** modifiziert nach [84] [93]. PIM1 übt Einfluss auf zelluläre Funktionen wie Zellzyklus, -wachstum, -überleben und den NF- $\kappa$ B- Signaltransduktionsweg. Pfeil = aktivierende Wirkweise, Strich = inhibierende Wirkweise, LGB321 = PIM-Inhibitor

Bedingt durch die Überexpression von PIM-Kinasen in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen ist die Entwicklung spezifischer Inhibitoren von Interesse/ hoher medizinischer Relevanz. Inzwischen sind mehr als 100 verschiedene PIM-Inhibitoren bekannt, wobei die Vielzahl dieser insbesondere gegen PIM1 und PIM3 gerichtet sind [94]. Eine mögliche Erklärung ist, dass PIM2 im Vergleich mit den übrigen PIM-Proteinen eine niedrigere Michaelis-Menten-Konstante für ATP  $K_m = 4 \mu mol/L$  aufweist, we shalb ein ausschließlich spezifisch gegenüber PIM2 gerichteter Inhibitor schwierig zu generieren ist, da er stark genug binden muss, um ATP kompetitiv zu verdrängen [95]. Der pan-PIM-Kinase-Inhibitor NVP-LGB321-NX-9 (LGB321) stellt allerdings ein ATP-kompetitives Molekül dar, welches gleichermaßen auf PIM1, PIM2 und PIM3 inhibierend wirkt [95]. LGB321 besitzt eine Wirkung auf die Zellproliferation verschiedener hämatologischer Erkrankungen, wie z.B. das Multiple Myelom, die akute myeloische Leukämie und die chronische myeloische Leukämie [95]. Der PIM-Inhibitor ist ein oral verfügbarer Wirkstoff und in therapeutischer Dosis in Mausexperimenten tolerabel [95]. Für Multiple Myelom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass es zu einer Dephosphorylierung des Proteins BAD bei Applikation von LGB21 kommt [95]. Diese war für die Zelllinie KMS-11 konzentrationsabhängig, wobei eine Konzentrationssteigerung in einer vermehrten Reduktion der Phosphorylierung resultierte [95]

### 1.3 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Die im Folgenden aufgeführten Experimente dienten der Untersuchung der tumorzellinhibierenden Wirkung JAK-Inhibitoren beim von Mammakarzinom am Zellkulturmodell.

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg ist beteiligt an zellproliferatorischen- und apoptotischen Vorgängen, wie unter Kapitel 1.2.1 erläutert. Mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse wurden zunächst Proteinexpressionsgrade von Schlüsselproteinen des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs untersucht und im Zellkulturtest Zellviabilitäten unter Inkubation mit JAK-Inhibitoren BSK805 und INK424 bestimmt.

Ein weiterer, für das Mammakarzinom essenzieller Signaltransduktionsweg ist der PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg. Dafür wurde als Kombinations-Substanz der PI3K-Inhibitor BYL719 ausgewählt. Es ergab sich die Frage nach einem möglichen synergistischen Effekt der Kombination aus JAK-Inhibition mit BSK805 und PI3K-Inhibition mit BYL719. Die Analyse der Fragestellung erfolgte im MTT-Test.

Zur Untermauerung der gemeinsamen Wirksamkeit sollte das Kolonieverhalten der Zelllinien und apoptotische Vorgänge mit Hilfe der Methodik des *Cell Death Detection ELISA*<sup>PLUS</sup> und *Western Blot-Versuchen* untersucht werden.

Des Weiteren ist die Überexpression von PIM-Kinasen für die Zellzyklusprogression und den Zelltod beim Mammakarzinom verantwortlich [80]. Vor diesem Hintergrund wurde die Kombinationsinkubation aus dem JAK-Inhibitor BSK805 und dem PIM-Inhibitor LGB321 auf synergistische Wirksamkeit bezüglich Zellverhalten und Proliferationsinhibition getestet.

Sofern bei diesen Experimenten eine Proliferationsinhibition vorlag, ergaben sich weitere Fragen:

- Ist die Proliferationsinhibition zytostatisch oder zytotoxisch bedingt?
- Welche Mechanismen liegen der Proliferationsinhibition zu Grunde?
- Welche Zelllinien sind besonders sensibel gegenüber der Kombinationsinkubation der Inhibitoren?

# 2 Methodik

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller	
Brutschrank HERA cell 240	Heraeus, Hanau, DE	
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München, DE	
<i>ELISA-Reader</i> (anthos ht2)	Anthos Mikrosysteme, Krefeld, DE	
Fotokasetten Hypercassette	Amersham Life Science, Amersham, UK	
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, DE	
Hamilton Spritze	Hamilton, Bonaduz, CH	
Kamera	Intas Science Imaging, Göttingen, DE	
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar, DE	
Mehrkanalpipetten	Abimed, Langenfeld, DE	
	Dunn Labortechnik, Asbach, DE	
	Eppendorf, Hamburg, DE	
Microprocessor ph Meter	WTW, Weilheim, DE	
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, DE	
Neubauer-Zählkammer	LO- Laboroptik Ltd, Lancing, UK	
Pipetten $(10 \mu L, 20 \mu L, 100 \mu L, 20 \mu L,$	Abimed, Langenfeld, DE	
1000 μL)	Eppendorf, Hamburg, DE	
	Thermo LabSystems, Beverly, USA	
Pipettierhilfen	Integra Biosciences, Fernwald, DE	
	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, DE	
Schüttler	Heidolph, Schwabach, DE	
Semi-Dry-Blot-Gerät	Hoefer SemiPhor, San Francisco, USA	
Sterilwerkbänke	Heraeus, Hanau, DE	
	Integra Biosciences, Fernwald, DE	
Stickstofftank Cryo 2000	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE	
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, DE	
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE	
Vortexer	Heidolph, Schwabach, DE	
	JANKE&KUNKEL IKA-Labortechnik,	
	Staufen, DE	
	UniEquip, Martiensried, DE	
Waage	Sartorius, Göttingen, DE	
Wasserbad (SW-21C)	Julabo, Seelbach, DE	
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, DE	
	Heraeus, Hanau, DE	
	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE	

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmalspritze	Braun, Wertheim, DE
Filme	GE Healthcare, Chicago, USA

Filterpapier (Extra Thick Blot paper)	Bio-Rad, München, DE
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Mikroreaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL,	Eppendorf, Hamburg, DE
2 mL)	
Multipipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE
	Ritter, Schwabmünchen, DE
Petrischalen	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Pipettenspitzen (10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L)	Eppendorf, München, DE
	SARSTEDT, Nümbrecht, DE
Immun-Blot PVDF Membran	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Serologische Einmal-Pipetten (2 mL, 5 mL,	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
10 mL, 25 mL)	
Transferpipetten	SARSTEDT, Nümbrecht, DE
Whatman Filter	Whatman GmbH, Dassel, DE
Zellkulturflaschen ( $25 \text{ cm}^2$ , $75 \text{ cm}^2$ , $175 \text{ cm}^2$ )	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 Well)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zellschaber	Corning Incorporated, USA
	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
	SPL Life Sciences, Eumhyeon-ri, Korea

## 2.1.3 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, DE
3-(4,5)-Dimethyl-2-thiazolyl-2H-	Sigma-Aldrich, Traufkirchen, DE
tetrazoliumbromid (Pulver)	
Amphotericin B	Corning, Berlin, DE
APS	Serva, Heidelberg, DE
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Entwickler	Kodak, NY, USA
Ethanol 96 %	VWR, Darmstadt, DE
FKS	Gibco, Eggenstein, DE
Fixierer	Kodak, NY, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
	ROTH, Karlsruhe, DE
Glycin	ROTH, Karlsruhe, DE
	Merck, Darmstadt, DE
Isopropanol	Qiagen, Hilden, DE
Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Membrane Blocking Agent	GE Healthcare, Little Chalfront, UK
Methanol	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Milchpulver	GE Healthcare, Little Chalfront, UK
PBS, Dulbecco`s (sterile, unsterile)	Biochrom, Berlin, DE
P/S	Biochrom, Berlin, DE
PhosphoSafe Extraction Buffer	Merck, Darmstadt, DE
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Precision Plus Protein	Biorad, München, DE

Protease Inhibitor	Roche, Basel, CH
Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping	Millipore, Billerica, USA
Solution	
Rotiphorese Gel 40	ROTH, Karlsruhe, DE
<i>RPMI</i> 1640	Gibco, Eggenstein, DE
SDS	ROTH, Karlsruhe, DE
TEMED	ROTH, Karlsruhe, DE
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Tris-HCL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypsin/ EDTA	Biochrom, Berlin, DE
Tween 20	National diagnostics, Atlanta, USA

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung		
Blockierlösung	2 % Milchpulver in PBS-Tween (PBS-T)		
	0,1 %		
Elektrophoresepuffer 10×	30 g Tris-Base		
	144 g Glycin		
	10 g SDS		
	Aqua dest. auffüllen bis 1 L		
Ladepuffer 4×	250 mM Tris-HCl (pH 6,8)		
	40 % Glycerin		
	8 % SDS		
	16 % DTT		
	0,4 % Bromphenolblau		
	vor Gebrauch + 20 % $\beta$ -Mercaptoethanol		
MTT I	5 mg/mL 3-(4,5)-Dimethyl-2-thiazolyl-2H-		
	tetrazoliumbromid (Pulver) in PBS lösen		
MTT II	10 % SDS in 0,01 M HCl		
PBS 10×	80 g Natriumchlorid		
	2 g Kaliumchrid		
	14,4 g Natriumhydrogenphosphat		
	2,4 g Kaliumhydrogenphosphat		
	Aqua dest. auffüllen bis 1 L		
PBS-T 0,1 %	200 mL PBS 10x		
	1 mL Tween-20		
	Aqua dest. auf 1 L		
Sammelgel 4 % 5 mL	3,2 mL Aqua Bidest		
	0,5 mL Acrylamid		
	1,25 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		
	50 µL 10 % SDS		
	50 µL 10 % APS		
	10 µL TEMED		
SDS 2×	0,2 mL 0,5 M Tris-HCl		
	8,0 mL 10 % SDS		
	2,0 mL Glycerin		
	Aqua dest. auffüllen bis 20 mL		

Stripping Solution	1 mL Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping	
	Solution 10×	
	Aqua dest. auffüllen bis 10 ml	
Transferpuffer 10×	58,2 g Tris-Base	
	29,3 g Glycin (MW 75)	
	3,75 g SDS (mit oder ohne SDS)	
	Aqua dest. auffüllen bis 1 L	
Trenngel 8/10 % 10 mL	5,3/4,8 mL Aqua Bidest	
	2,0/ 2,5 mL Acrylamid	
	2,5 /1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	
	100 µL 10 % SDS	
	50/100 µL 10 % APS	
	5/10 µL TEMED	

#### 2.1.5 Substanzen

Substanzen	Hersteller
INK424	Novartis, Basel, CH
NVP-BSK805-NX-9	Novartis, Basel, CH
NVP-BYL719	Novartis Basel, CH
NVP-LGB321-NX-9	Novartis Basel, CH

### 2.1.6 Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Actin (I-19): sc-1616	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz
			Biotechnology, Inc.,
			Heidelberg, DE
AKT (pan) (11E7)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
Bcl-xl (H5): sc-8392	Maus	1:2000	Santa Cruz
			Biotechnology, Inc.,
			Heidelberg, DE
BIM (C34C5)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
Cleaved Caspase-3	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling
(Asp175) (5A1E)			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
Cyclin A	Maus	1:1000	Santa Cruz
			Biotechnology, Inc.,
			Heidelberg, DE
Cyclin B1 (GNS1): sc-	Maus	1:1000	Santa Cruz
245			Biotechnology, Inc.,
			Heidelberg, DE
Cyclin D1 (DSC6)	Maus	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
Cyclin E (HE 12)	Maus	1:500	Santa Cruz

			Biotechnology, Inc.,
			Heidelberg, DE
JAK2 (D2E12) XP	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
PARP	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-4EBP1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
1			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-AKT (Ser473)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-AKT (Thr308)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-BAD	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
-			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-JAK2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
(Tyr1007/1008)			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-P70S6K (Thr389)	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-STAT3 (Tyr705)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
p-STAT5 (Tyr694)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
PIM1 (D1D2) XP	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
PIM2 (D1D2) XP	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
PIM3 (D17C9)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
PUMAα/β (H-136):	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
sc-28226			Biotechnology, Inc.,
			Heidelberg, DE
STAT3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA
STAT5	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
			Technology, Inc.,
			Danvers, USA

Sekundärer	Verdünnung	Hersteller
Antikörper		
Goat anti-rabbit IgG-	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg,
HRP: sc-2004		DE
Anti-mouse Ig	1:2000	Amersham Biosciences, Freiburg, DE
Horseradish		
Peroxidase linked		
whole antibody		
NA931V		

### 2.1.7 Handelsübliche Reaktions-Kits

Handelsübliche Reaktions-Kits	Hersteller
BCA Protein Assay Kit (Pierce)	Thermo Scientific, Bonn, DE
Cell Death Detection ELISA PLUS	Roche, Basel, CH
ECL Advance	GE Healthcare, Little Chalfront, UK
ImmunoCruz	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg,
	DE
Hemacolor-Schnellfärbung	Merck, Darmstadt, DE

### 2.1.8 Software

Software	Hersteller
CalcuSyn	Biosoft, Cambridge, UK
Microsoft Office Excel 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA

### 2.2 Zelllinien-Charakteristika und Herkunft

Die Zelllinien wurden über die *American Type Culture Collection (AFCC)* und die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ) bezogen. Es wurden ausschließlich adhärente Zellen für die Experimente verwendet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Charakteristika der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	HER2/neu	ER	PR	Mutation	Morphologie
ZR-75	+	+	+/-	PTEN	Epithelial, luminal
MDA-MB-453	+	-	-	PIK3CA, PTEN	Epithelial, luminal
MCF-7	-	+	+	РІКЗСА	Epithelial, luminal
T47D	-	+	+	PIK3CA, p53	Epithelial, luminal
BT-20	-	-	-	PIK3CA, p53	Epithelial, basal
BT-474	+	+	+	PIK3CA, p53	Epithelial, luminal
MDA-MB-436	-	-	-	p53, RB1, BRCA1	Mesenchymal, basal
MDA-MB-231	-	-	-	BRAF, KRAS, p53	Mesenchymal, basal
MDA-MB-361	+	+/-	-	PIK3CA, p53	Epithelial, luminal
SKBR3	+	-	-	p53	Epithelial, luminal

**Tabelle 1: Charakteristika ausgewählter Zelllinien.** Differenzierung der Zelllinien nach HER2-Status, Hormonrezeptor-Status, möglichen Mutationen und der jeweiligen Morphologie. Die Inhalte der Tabelle wurden den Referenzen [96] [97] [98] [99] und den jeweiligen ATCC-Datenblättern entnommen. + = Expression vorhanden, - = fehlende Expression, +/- Expressionsgrad sowohl als auch

Bezüglich Hormonrezeptor-Typ und HER2-Status lassen sich die Zelllinien BT-20, MDA-MB-436 und MDA-MB-231 zusammenfassen, da die Gesamtheit der drei Zelllinien Hormonrezeptornegativ ist. Demgegenüber stehen die Zelllinien ZR-75 und BT-474, wobei sowohl HER2- und Hormonrezeptor-Status positiv ausfallen. Morphologisch ergibt sich eine Differenzierung der Zelllinien in epitheliale und mesenchymale Zellen, wobei der überwiegende Teil der ausgewählten Zelllinien epithelialer Herkunft ist, mit Ausnahme von MDA-MB-436 und MDA-MB-231. Es besteht eine Konformität für die Zelllinien für das Vorliegen einer Mutation, wobei sich diese je nach Zelllinie unterscheidet. Häufige Mutationen betreffen die Tumorsupressorgene PTEN, PIK3CA und *tumor protein p53* (p53).

### 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Zellkultivierung und Zellzahlbestimmung

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter Benutzung einer Sterilwerkbank. Hierbei verwendete Materialien wurden vor Verwendung gründlich mit 70 % Alkohol desinfiziert. Die Zelllinien wurden in *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) 1640 Medium unter Zugabe von 10 % fetales Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S) und 1–2 % Amphotericin B zum Schutz vor bakteriellen und pilzlichen Kontaminationen kultiviert. Aufbewahrt wurden die adhärenten Zelllinien in sterilen Zellkulturflaschen in Brutschränken, gesättigt mit Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid bei einer Temperatur von 37°C. In Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten der Zelllinie wurde ein Mediumwechsel bzw. eine Passage der Zellen alle drei bis vier Tage durchgeführt. Für eine Passage der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Für die Zellzahlbestimmung

zwecks Aussaat der Zellen im Rahmen eines Experimentes wurden Zellsuspension und Trypanblau in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und in Neubauer-Zählkammern standardisiert gezählt.

### 2.3.2 Kryokonservierung, Auftauen und Konservierung von Aliquots

Ein Kryoröhrchen wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein mit 5 mL Kulturmedium vorbereitetes Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Zellen zehn Minuten bei 890 *revolutions per minute* (RPM) zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen und die Zellen in 7 mL frischem Kulturmedium resuspendiert und in Kultur gebracht. Für das Einfrieren von Zellen wurde dem Standardmedium 5 mL Dimethylsulfoxid und 5 % FKS zugesetzt. Zunächst erfolgten die Zellpassagierung und die Zellzählung (2.3.1). Im Anschluss wurden die Zellen mit vorbereitetem Kältemedium in Lösung gebracht und in dafür vorgesehene Kryoröhrchen pipettiert. Die Aufbewahrung der Kryoröhrchen erfolgte in Boxen mit Isopropanol bei -80°C. Der Transfer in einen Stickstofftank zur langfristigen Aufbewahrung der Probenröhrchen erfolgte nach einem Zeitraum von ein bis zwei Wochen.

### 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 MTT-Test – Diagnostischer Zellkulturtest

Der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT-Test) umfasst eine Methodik zur Untersuchung der metabolischen Stoffwechselaktivität von Zellen, welche in einer Wechselbeziehung mit der Zellviabilität steht [100]. Die Zellviabilität ist definiert durch den Anteil an lebenden Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Je kleiner der Wert der Zellviabilität in Prozent, desto größer die Proliferationsinhibition. Grundlage für dieses Verfahren bietet die enzymatische Reduzierung eines gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT I-Lösung) in ein blaues Thiazolylblau Formazan, vermittelt durch Zellen von Vitalität.

In Abhängigkeit der Zelllinie wurde eine Suspension von  $1,0 \times 10^4$  bis  $1,0 \times 10^5$  Zellen pro mL Kulturmedium vorbereitet. Je nach Versuchsaufbau wurden 80–90 µL dieser Suspension in die Vertiefungen von 96-Well-Platten pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Herstellung der Substanzkonzentrationen. Dabei wurden Experimente mit Monosubstanzen (BSK805, INK424, BYL719, LGB321) und auch Experimente mit Medikamentenkombinationen (BSK805 und BYL719, BSK805 und LGB321) durchgeführt. Für die Monoversuche lagen die verwendeten Substanzkonzentrationen zwischen 0,039 µM und 5 µM in ansteigender Konzentration. Medikamentenkonzentrationen von 0,625 µM bis 5 µM wurden für die Kombinationsversuche ausgewählt. Dabei wurde innerhalb der Monoversuche für jede Probe ein sechsfacher und innerhalb der Kombinationsversuche ein dreifacher Ansatz benutzt. Vier Tage nach Behandlung schloss sich die Gabe von 10 µL MTT I-Lösung je Well an. Nach 30–240minütiger Inkubationszeit wurden 100 µL MTT II-Lösung je Well hinzugegeben. Damit die Formazankristalle in Lösung gehen konnten, war eine weitere Inkubation über Nacht im Brutschrank notwendig. Die optische Dichte wurde im Anschluss mit der *SoftMax Pro Software* am *Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 512 nm bestimmt. Mithilfe von Excel wurde die Zellviabilität in Prozent, bezogen auf die Kontrolle, berechnet. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde bei den Monoversuchen der Mittelwert aus sechs und in den Kombinationsversuchen aus drei parallellaufenden Proben gebildet. Die Standardabweichung der Zellviabilitätswerte der einzelnen Proben sollte dabei 10 % nicht übersteigen. Insgesamt wurden ein bis drei Versuche durchgeführt, wobei genau ein repräsentatives Ergebnis dargestellt wird.

#### 2.4.2 Zellzählversuch

Um die Ergebnisse des MTT-Versuches zu überprüfen, wurde ein Zellzählversuch unternommen. Dafür wurden Zellen in 24-Multiwell Zellkulturplatten ausgesät und nach Inkubation über Nacht mit BSK805 5  $\mu$ M und LGB321 5  $\mu$ M behandelt. Im Gegensatz zum MTT-Versuch wurde eine wesentlich kleinere Anzahl an Zellen hierfür verwendet. Analog zum MTT-Experiment erfolgte die Zellzählung nach vier Tagen. Die adhärenten Zellen wurden trypsiniert und in Medium resuspendiert. Die Zählung wurde mit Neubauer Zählkammern durchgeführt.

#### 2.4.3 Colony formation assay

Colony formation Assay bzw. Clonogenic Assay beschreibt eine Methode zur Untersuchung der Proliferations- und Überlebensfähigkeit von unbehandelten Zellen im Vergleich zu behandelten Zellen. Dabei wird sich die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen zu Nutze gemacht, wobei eine Kolonie durch eine Ansammlung von mindestens 50 Zellen definiert ist [101]. Unter Verwendung einer 12-Multiwell Zellkulturplatte wurde eine Zellsuspension von 1000-2000 Zellen in 1–2 mL Kulturmedium je Well aufgetragen. Zum Zwecke der Zelladhärenz schloss sich eine eintägige Inkubation an. Es erfolgte die Behandlung der Zelllinie ZR-75 mit entsprechenden Medikamentenkonzentrationen, je ein Well 2,5 µM BSK805, 2,5 µM BYL719 und eine Kombination von 2,5 µM BSK805 und 2,5 µM BYL719. Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB436 wurden wie folgt behandelt: je ein Well 2,5 µM BSK805, 2,5 µM LGB321 und eine Kombination von 2,5 µM BSK805 und 2,5 µM LGB321, wobei für die Zelllinie BT-474 eine Konzentration von 1 µM für BSK805 und LGB321 gewählt wurde. Zusätzlich diente je ein Well der Kontrolle ohne Behandlung. Die Proben wurden zweifach angesetzt. Eine erneute Behandlung in gleicher Substanzkonzentration erfolgte nach einer Woche. Nach insgesamt zweiwöchiger Inkubation wurden die Zellsuspensionen mittels Hemacolor-Schnellfärbung fixiert und mit Hilfe einer Digitalkamera fotografisch festgehalten. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer Glaspipette das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt. Als nächstes fand ein Waschschritt mit PBS statt. Im Anschluss wurden die Proben in drei Schritten unter Gebrauch

von Lösung eins, zwei und drei gefärbt. Abschließend erfolgte ein erneuter Waschschritt mit PBS und das Trocknen der Proben bei Raumtemperatur für 1–2 h.

### 2.4.4 Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> – Anreicherung von Nukleosomen im Zytoplasma

Zum Zwecke der Messung des programmierten Zelltods bietet sich die Vorgehensweise im Rahmen eines *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* an. Diesem Verfahren liegt der Nachweis der Anreicherung von Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma jeweiliger Zell-Lysate zu Grunde. Jene Methodik basiert auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay unter Verwendung von Antikörpern, welche gegenüber Histonen und DNA gerichtet sind.

Die Zellen der Zelllinien wurden in 24-Multiwell Zellkulturplatten in einer Dichte von  $1.0 \times 10^5$ Zellen pro mL ausgesät. Es schloss sich nach einem 24-stündigen Inkubationsintervall die Behandlung mit den gekennzeichneten Liganden an. Parallel erfolgte die Vorbereitung eines MTT Ansatzes zum Zwecke der Zellnormierung (2.4.1). Nach einem Inkubationsintervall von vier Tagen wurden die Zellen gelöst und in kleine Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden für 10 min zentrifugiert, um eine Trennung von Zellpellet und überstehendem Kulturmedium zu erreichen. Das Zellpellet wurde unter Verwendung von 400 µL Lysis Puffer resuspendiert. Ein erneuter Zentrifugierungsschritt schloss sich nach 30 min Zelllyse an. In die Vertiefungen einer mit Streptavidin benetzten Mikrotiterplatte wurden nun 20 µL des entstandenen Lysates pipettiert und jeweils 80 µL einer exakt nach Herstellerangaben vorbereiteten Immunoreagent-Lösung, bestehend aus Peroxidase-konjugiertem Anti-DNA-Antikörper, Anti-Histon-Biotin-Antikörper und Inkubationspuffer, hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde im Anschluss unter Abdeckung mit einer Folie für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bewegt. Nachdem die Flüssigkeit aus den Vertiefungen abgesaugt wurde, wurden die Mikrotiterplatte mit 3×250 µL Inkubationspuffer gewaschen. Es erfolgte die Gabe von je 100 µL 2,2'-Azino-di(3ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS-Lösung), wobei nach 20 min Inkubation unter Schütteln der Mikrotiterplatte 100 µL ABTS Peroxidase Stop Solution appliziert wurden. Abschließend wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm unter Benutzung des Microplate Reader gemessen.

#### 2.4.5 Western Blot

Die Untersuchung mit Hilfe eines Western Blot diente der Detektion und nachfolgender Analyse des Expressionsgrades unterschiedlicher Proteine einer Zellkulturprobe. Dieses molekularbiologische Verfahren, welches zuerst im Jahre 1979 beschrieben wurde, umfasst verschiedene Arbeitsschritte. Eingangs werden die Proteine einer Zellkulturprobe elektrophoretisch aufgetrennt, um diese nach erfolgreichem Membrantransfer mittels Antikörper anschließend sichtbar zu machen [102].

Zunächst erfolgte die Zellbehandlung, wobei als erster Arbeitsschritt für die Proteingewinnung je 10 ml Zellsuspension in einer Dichte von  $1,0 \times 10^4$  bis  $1,0 \times 10^5$  Zellen pro mL Kulturmedium in

Petrischalen ausgesät wurde. Nach einer Inkubation von 24 h fand ein Mediumwechsel statt, wobei die Zelllinien MDA-MB-436, BT-20, ZR-75, MCF-7, SKBR3 und BT-474 wie folgt behandelt wurden: eine Schale mit 2,5  $\mu$ M BSK805, eine Schale je nach Ansatz mit 2,5  $\mu$ M BYL719 oder 2,5  $\mu$ M LGB321, zwei Schalen mit einer Kombination aus BSK805 und BYL719 bzw. BSK805 und LGB321 und eine Kontrollschale ohne Inhibitorzusatz. Abhängig vom durchgeführten Versuch, schloss sich ein jeweiliges Inkubationsintervall von 24–72 h an.

Die Proteinextraktion wurde mit Hilfe des Lösens der adhärenten Zellen unter Verwendung eines Zellschabers vom Boden der Petrischale eingeleitet. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein auf Eis vorbereitetes Zentrifugenröhrchen transferiert. Danach wurden die Proben bei 890 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 5 mL eiskaltem PBS einmal resuspendiert. Es schlossen sich zwei weitere Zentrifugations- und Waschschritte mit PBS unter beschriebenen Bedingungen an. In Abhängigkeit der Größe des entstandenen Zellpellets erfolgte die Gabe von 40–120 µL Lysis-Puffer, bestehend aus 90 % *PhosphoSafe*-Lysepuffer und 10 % *Complete protease inhibitor*. Im Anschluss wurden die Proben stark "gevortext" und bei –20°C eingefroren. Diesem Schritt folgte ein dreimaliges Wiederholen der Teilschritte: Auftauen, Vortexen und Einfrieren.

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde die weitere Proteinbestimmung unter Verwendung des Protokolls des *BCA-Protein-Assay-Kit* durchgeführt. Dazu wurden in 3-fachen Ansätzen Verdünnungen aus 2 µL des Lysats und 98 µL PBS hergestellt und in die Vertiefungen einer 96-Multiwell Zellkulturplatte pipettiert. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen am *Microplate Reader* unter Anwendung des Programms *SoftMax Pro* ermittelt und eine entsprechende Standardkurve erstellt.

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurden zunächst zwei Gele, bestehend aus 4% Sammelgel und 8–10 % Trenngel in Abhängigkeit der ermittelten Proteingröße hergestellt. Zur Probenvorbereitung wurden 45–50  $\mu$ g Protein mit 2x *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) und 5  $\mu$ L Ladepuffer versehen, sodass die Gesamtmenge der hergestellten Lösung 13  $\mu$ L betrug.

Bei 95°C wurden die Proben 10 min im Thermomixer denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und für 1 min zentrifugiert. Unter Verwendung einer Hamilton Spritze wurden je 12,5  $\mu$ L der entsprechenden Proben sorgfältig in die Geltaschen aufgetragen. Die erste Tasche diente der Kontrolle unter Gebrauch eines Markers. Für 2–2,5 h erfolgte der Elektrophoresevorgang bei einer Spannung von 80–100 Volt und einer Stromstärke von 25–30 mA.

Für die Übertragung der Proteinbanden vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) wurde ein *Semi-Dry-Blot*-Verfahren angewandt. Dafür wurde eine Membran für wenige Minuten in Methanol getränkt und danach mit Filterpapier und Gel für 30 min mit Transferpuffer inkubiert. Sandwichartig erfolgte die Zusammensetzung von Filterpapier, PVDF-

Membran, Gel und wiederum Filterpapier. Der *Blot*-Vorgang erfolgte bei 15 Volt über eine Zeitspanne von 1-2 h.

Eine erste Visualisierung der Proteinbanden erfolgte in 3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4sulfophenylazo]phenylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid sodium salt (Ponceau-S-Lösung), wobei ein Transfererfolg des Blot-Vorgangs sichergestellt werden konnte. Darauffolgende Waschschritte mit Phosphate buffered saline- Tween (PBS-T) dienten der Entfernung der entstandenen Rückstände durch die Ponceau-S-Lösung. Die Inkubation der PVFD-Membran mit der Blockierlösung erfolgte für 1–1,5 h bei Raumtemperatur. Daran schloss sich die Gabe des Primär-Antikörpers über Nacht an. Nach  $2 \times 5$  min und  $2 \times 10$  min waschen mit PBS-T, um ungebundenen Primär-Antikörper zu entfernen, wurde die PVFD-Membran mit dem Sekundärantikörper für weitere 2 h inkubiert. Es folgten weitere Waschritte für  $3 \times 5$  min und  $3 \times 10$  min mit PBS-T. Die Detektion der Proteinbanden wurde unter Verwendung des ECL Advance Kits durchgeführt. Dabei wurden Lösung A und Lösung B in gleichem Verhältnis miteinander vermischt und für 5 min unter Lichtabschluss auf die PVDF-Membran gegeben. In Abhängigkeit der Sichtbarkeit der Banden schloss sich nach 1–60 min die Filmentwicklung unter Verwendung einer Fixierer- und Entwicklerlösung unter Ausschluss von Licht, in einer Dunkelkammer an.

Eine erneute Detektion anderweitiger Antikörper und jeweiliger Proteinbanden war möglich, indem die PVDF-Membran für 30 min mit einer *Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution* benetzt wurde. Danach war ein Vorgehen mit Blockierung und Antikörpergabe in oben beschriebener Reihenfolge möglich. Die Wiederverwendung einer Membran war durch dieses Vorgehen bis zu 5-mal möglich.

### 2.5 Statistische Auswertung

Die Experimente wurden unter gleichen Bedingungen bis zu zweimal wiederholt. Entstandene Standardabweichungen, welche 10 % nicht überschreiten sollten, wurden erhoben und mit Hilfe von Excel tabellarisch aufgearbeitet. Jeweils ein repräsentatives Ergebnis wurde dargestellt. Zur statistischen Auswertung des MTT-Tests fand die Software *CalcuSyn* Verwendung. Zwei Werte waren hierfür von besonderem Interesse, zum einen die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) und zum anderen sogenannte Kombinations-Indices (CI) zur Darstellung möglicher Kombinationseffekte der untersuchten Kombination der Substanzen. Die IC<sub>50</sub> entspricht hierfür jeweils der Inhibitorkonzentration in  $\mu$ M, bei welcher die Zellviabilität 50 % beträgt. CI-Werte, welche kleiner gleich Eins waren, entsprachen einem synergistischen, CI-Werte gleich Eins einem additiven und CI-Werte größer als Eins einem antagonistischen Kombinationseffekt [103]. Voraussetzung für die Erfassung der Kombinations-Indices bildete ein stets konstantes Konzentration [103].
# 3 Ergebnisse

# 3.1 Phosphorylierungsgrad von Signalproteinen des JAK/STAT- und PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs

Zuerst wurden die Expressionslevel verschiedener Proteine des JAK/STAT-Signaltransduktionsweg mit Hilfe von *Western Blot*-Experimenten untersucht. Dabei standen die Proteine JAK2, STAT3 und STAT5 im phosphorylierten (aktivierten) Zustand im Mittelpunkt der Betrachtungen (Abbildung 4).



Abbildung 4: Expression und Phosphorylierungsgrad von JAK2, STAT3 und STAT5 ausgewählter Mammakarzinomzelllinien in der Western Blot-Analyse.

Die Zelllinien in Abbildung 4 zeigten eine deutliche Phosphorylierung der Proteine JAK2 und STAT3. Die Zelllinie BT-474 exprimierte im Vergleich zu den anderen Zelllinien, das Protein JAK2 weniger stark. Besonders deutlich zeigte sich die Phosphorylierung für das Protein STAT3 bei der Zelllinie SKBR3. STAT5 war im phosphorylierten Stadium schwierig zu detektieren und zeigte sich nur bei den Zelllinien T47D und SKBR3 in einem aktivierten Zustand.

Detektion Anschließend erfolgte die von phosphorylierten Signalproteinen des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweges, wie p-P70S6K, p-4EBP1, p-AKT. Bei allen untersuchten Zelllinien stellte sich eine konstitutive Aktivierung dieses Signaltransduktionswegs dar. Unterschiede zwischen den Zelllinien gab bezüglich es Expression und Phosphorylierungsgrad der Proteine (Abbildung 5).



Abbildung 5: Expression und Phosphorylierungsgrad von P70S6K, 4EBP1 und AKT ausgewählter Mammakarzinomzelllinien in der Western Blot-Analyse.

Die Phosphorylierung des Proteins AKT zeigte sich bei den Zelllinien ZR-75, BT-474, MCF-7 und T47D weniger stark ausgeprägt, wobei sie bei MDA-MB-231 nicht detektiert werden konnte. Eine ausgeprägte Phosphorylierung von P70S6K ließ sich bei den Zelllinien ZR-75, MDA-MB-453, BT-474, MCF-7 und SKBR3 feststellen.

# 3.2 Proliferationsinhibition der Mammakarzinomzelllinien unter Inkubation mit JAK2-Inhibitoren

Bei nachgewiesener konstitutiver Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs in den untersuchten Zelllinien wurde mittels zweier unterschiedlicher JAK-Inhibitoren INK424 (Pan-JAK-Inhibitor) und BSK805 (JAK2-Inhibitor) getestet, ob dieser Signaltransduktionsweg effektiv hemmbar ist. Um die Wirksamkeit der JAK-Inhibitoren zu testen, wurde zunächst die Zellviabilität mit Hilfe eines diagnostischen Zellkulturtests (MTT-Test) ermittelt. Die einzelnen Zelllinien wurden mit den Testsubstanzen BSK805 und INK424 in 4 unterschiedlichen Konzentrationen von 0,625  $\mu$ M–5  $\mu$ M über ein 4-tägiges Inkubationsintervall behandelt. Als Vergleichsprobe diente eine unbehandelte Kontroll-Zelllinie. Unter Verwendung der MTT-Lösungen nach vorgegebenem Hersteller-Protokoll erfolgte die Darstellung der Ergebnisse. Zur Visualisierung der Wirkunterschiede der einzelnen Zelllinien auf die Testsubstanzen wurden zur besseren Überschaubarkeit jeweils 2 Diagramme angefertigt (Abbildung 6 und 7). Die Daten wurden mit Hilfe der Software *SoftMax Pro* ausgewertet.



**Abbildung 6: INK424 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinomzelllinien.** Ermittlung der Zellviabilitäten in % unter Verwendung des MTT-Tests nach 4-tägiger Inkubation mit JAK2-Inhibitor INK424 in steigender Konzentration zwischen 0,625 µM und 5 µM.

Die Inkubation der Zelllinien mit dem JAK-Inhibitor INK424 zeigte nur minimale prozentuale Veränderungen bezüglich der Reduktion der Zellviabilität. Auch eine Konzentrationssteigerung des Inhibitors von  $0,625 \,\mu\text{M}$  auf eine Maximalkonzentration von  $5 \,\mu\text{M}$  führte nicht zu einer erheblichen Steigerung der Proliferationsinhibition.



**Abbildung 7: BSK805 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinomzelllinien.** Ermittlung der Zellviabilitäten in % unter Verwendung des MTT-Tests nach 4-tägiger Inkubation mit JAK2-Inhibitor BSK805 in steigender Konzentration zwsischen 0,625 µM und 5 µM.

Bei den ausgewählten Zelllinien war bei Verwendung des Inhibitors BSK805 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Reduktion der Zellviabilität zu erkennen. Die Proliferationsinhibition war dosisabhängig. Eine um die Hälfte reduzierte Zellviabilität bei Inkubation mit der Höchstkonzentration von 5  $\mu$ M zeigten die Zelllinien MCF-7, SKBR3 und T47D. Wohingegen die Zelllinien MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-361, MDA-MB-231, BT-20, ZR-75 und BT-474 bei Verwendung von 5  $\mu$ M BSK805 eine Reduktion der Zellviabilität von bis zu 50 % aufwiesen. Die Zelllinie SKBR3 war besonders sensitiv gegenüber

BSK805. Bei einer Konzentration von 2,5  $\mu$ M BSK805 ergab sich eine Zellviabilität von 51,6 %, welche sich bei Gabe der doppelten Konzentration auf 7,0 % verringerte.

Insgesamt zeigten sich jedoch innerhalb der Zelllinien bezüglich der Zellviabilitätsreduktion nur moderate Veränderungen bei vergleichsweise hoher Konzentrationsgabe, weshalb Experimente zur Analyse zu Grunde liegender Signaltransduktionswege folgten. Unter Verwendung des *Western Blot*-Verfahrens wurden durch BSK805 bedingte Veränderungen in der Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs ermittelt (Abbildung 8).



Abbildung 8: Expression und Phosphorylierungsgrad von Schlüsselproteinen des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot-Verfahren nach 24 h Inkubation mit BSK805 in einem Konzentrationsbereich von  $1-5 \,\mu$ M. Wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "housekeeping" Protein Actin diente.

Die beiden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-453 zeigten im *Western Blot*-Versuch bei steigender BSK805-Konzentration eine Abschwächung der Intensität der Phosphorylierung von STAT3. Dies spiegelte die zielgerichtete Wirkung von BSK805 wider. Schlüsselproteine des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs, wie p-P70S6K, p-4EBP1 und p-AKT erfuhren dagegen eine dosisabhängige Intensivierung des Signals. Dies könnte bedeuten, dass eine Hemmung von JAK2 zu einer Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs führt und sich dadurch limitierend auf die Wirksamkeit von JAK2-Inhibitoren verhält. Um eine

Wirkverstärkung des JAK2-Inhibitors zu erzielen, folgte die Überlegung einer Kombination mit einer zusätzlichen, den PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg beeinflussenden Substanz.

# 3.3 Proliferationsinhibition der Mammakarzinomzelllinien unter Inkubation mit PI3K-Inhibitor BYL719

Ein möglicher Kombinationspartner bildete der PI3K-Inhibitor BYL719, welcher zunächst in einem weiteren MTT-Monosubstanzversuch untersucht wurde. Im MTT-Versuch standen sich Konzentrationen von 0,625  $\mu$ M–5  $\mu$ M gegenüber. Unter gleichen Inkubationsbedingungen, wie in den vorausgegangenen Experimenten, erfolgte die Differenzierung der Wirkung von BYL719 auf die Proliferationsinhibition der ausgewählten Zelllinien.



Abbildung 9: BYL719 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinomzelllinien. Ermittlung der Zellviabilitäten in % unter Verwendung des MTT-Tests nach 4-tägiger Inkubation mit PI3K-Inhibitor BYL719 in steigender Konzentration zwischen 0,625  $\mu$ M und 5  $\mu$ M.

Eine Reduktion der Zellviabilität war bei allen Zelllinien unter Einsatz des Inhibitors BYL719 zu verzeichnen (Abbildung 9). Eine Verringerung der Zellviabilität unter 50 % ließ sich bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M bei den Zelllinien SKBR3, T47D, MDA-MB-453, BT-20, BT-474, MCF-7 und MDA-MB-361 darstellen. Wobei schon eine geringe Konzentration von 0,625  $\mu$ M ausreichte, um bei der Hälfte der untersuchten Zelllinien eine Zellviabilität in der Gegenüberstellen. Die größte Wirksamkeit hinsichtlich der Reduktion der Zellviabilität in der Gegenüberstellung der Zelllinien zeigte sich bei MDA-MB-453 und MDA-MB-361, die beide eine PIK3CA-Mutation aufwiesen (Tabelle 1). Im Kontrast dazu führte die Inkubation mit BYL719 bei den

Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 nur zu einer minimalen Zellviabilitätsreduktion von bis zu 15 %.

## 3.4 Kombination von JAK2-Inhibitor BSK805 mit PI3K-Inhibitor BYL719

## 3.4.1 Synergistischer Effekt auf die Proliferationsinhibition der Mammakarzinomzelllinien

Nach Abschluss der MTT-Monosubstanzversuche folgten MTT-Kombinationsversuche unter Verwendung einer Kombination aus JAK2-Inhibitor BSK805 und PI3K-Inhibitor BYL719. Ziel war es, eine mögliche Verstärkung der Proliferationsinhibition der Monosubstanzen auf die Zelllinien zu prüfen. Neben einer unbehandelten Kontrollgruppe wurden die Zelllinien unter Berücksichtigung der Monosubstanzversuche mit verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,1–5  $\mu$ M der Monosubstanzen inkubiert. Dabei wurde für die Monosubstanzen jeweils eine Verdünnungsreihe benutzt. Besondere Beachtung fand dabei, dass die gewählten Abstände zwischen den ausgewählten Konzentrationen der Monosubstanzen identisch sind. Im Folgenden wurde die Zellviabilität in Prozent für den Kombinationsversuch tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 2). Innerhalb der Darstellung findet sich eine Gegenüberstellung der Monosubstanzen und deren kombinatorischer Gabe.

		Zellviabilität in %				
	Konzentration	Konzentration BYL719 in µM				
Zelllinien	BSK805 in $\mu$ M	0	1,25	2,5	5	
BT-20	0	100,0	52,7	30,2	15,5	
	1,25	86,1	38,9	20,2	7,7	
	2,5	78,4	28,9	10,9	4,1	
	5	68,2	15,9	5,0	1,6	
MDA-MB-	0	100,0	91,7	81,4	76,6	
436	1,25	75,7	73,9	72,2	68,6	
	2,5	87,2	79,4	72,9	67,2	
	5	67,7	62,6	58,0	40,8	

Tabelle 2

		Zellviabilität in %				
Zelllinien	Konzentration					
	BSK805 in µM	0	0,1	0,5	1	
ZR-75	0	100,0	92,4	81,6	75,2	
	1,25	81,9	85,8	74,0	67,4	
	2,5	75,8	73,7	61,6	55,9	
	5	58,0	58,9	46,8	40,8	
SKBR3	0	100,0	81,3	80,0	64,5	
	1,25	84,7	77,4	68,2	57,1	
	2,5	74,5	67,4	56,6	48,2	
	5	50,0	47,4	38,4	31,6	
BT-474	0	100,0	91,7	73,6	61,0	
	1,25	99,1	92,9	74,5	59,8	
	2,5	96,0	86,8	73,9	59,8	
	5	87,1	79,4	67,5	54,9	

Tabelle 3

		Zellviabilität in %					
	Konzentration	Konzentration BYL719 in µM					
Zelllinien	BSK805 in $\mu M$	0	0,1	0,5	1		
	0	100,0	90,5	94,7	89,1		
MDA-MB-	0,1	95,1	90,5	92,7	89,1		
231	0,5	91,7	91,5	90,3	89,6		
	2,5	92,0	88,6	87,1	89,8		

Tabelle 4

Tabellen2–4:KombinatorischerEffektaufdieProliferationsinhibitionausgewählterMammakarzinomzelllinien.Unter Verwendung des MTT-Tests ermittelte Zellviabilitäten in % der Zelllinien BT-20, MDA-MB-436, ZR-75, SKBR3, BT-474 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805,BYL719sowiederenKombinationinobenstehendausgewiesenenKonzentrationenin µM.DerBehandlungszeitraum der Mammakarzinom-Zellen betrug 4 Tage.Die Standardabweichung liegt für alle Ergebnisseunter 10 %.

In Bestätigung der Monosubstanzversuche zeigte die Substanz BYL719 insgesamt eine stärkere Reduktion der Zellviabilität als die Substanz BSK805 bei gleicher Konzentration.

Anschließend wurden die in Tabelle 2-4 zusammengefassten kombinatorischen Effekte auf die Proliferationsinhibition der Zelllinien unter Verwendung der Statisik-Software *CalcuSyn* quantifiziert. Tabelle 5 gibt einen Überblick der ermittelten Ergebnisse, wobei die Spalten 2 und 3 die  $IC_{50}$  der Mono-Regimes zeigen. Die Spalten 4 und 5 beinhalten die näherungsweise

errechneten  $IC_{50}$  der beiden Monosubstanzen, wenn diese in Kombination eingesetzt werden. Die Summe der beiden Werte ergibt die  $IC_{50}$  des Kombinationspräparats.

In den Spalten 6 und 7 sind die entsprechenden Kombinations-Indices (CI-Werte) enthalten. CI
Werte kleiner Eins <1 entsprechen einem synergistischen, gleich Eins =1 einem additiven und
CI-Werte größer als Eins >1 einem antagonistischen Kombinationseffekt [103].

	<b>BSK805</b>	BYL719 in µM	BSK805 + BYL719				
<i>IC</i> 50	in µM		BSK805 in µM	BYL719 in µM	<i>CI1C</i> 50	<i>CIIC</i> 90	
BT-20	13,53	1,34	1,08	1,08	0,88	0,35	
MDA-MB-436	208,86	17,12	4,30	4,30	0,27	0,18	
ZR-75	7,98	5,99	3,68	0,74	0,59	0,23	
SKBR3	5,30	13,11	2,99	0,60	0,61	0,41	
BT-474	12,78	1,69	5,88	1,18	1,16	1,25	
MDA-MB-231	$3,32*10^{6}$	7,10*10 <sup>20</sup>	3,04*10 <sup>37</sup>	3,04*10 <sup>37</sup>	9,17*10 <sup>30</sup>	3,89*10 <sup>62</sup>	

Tabelle 5:  $IC_{50}$  Werte der Zellinien BT-20, MDA-MB-436, ZR-75, BT-474 und MDA-MB-231 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination. Die zugrundeliegenden Werte für die Berechnung der  $IC_{50}$  und der Kombinations-Inidees ( $CI_{IC50}$  und  $CI_{IC90}$ ) sind den Tabellen 2 - 4 zu entnehmen.

Für die Zelllinie BT-20 ließ sich mit einer  $IC_{50} = 1,34 \,\mu$ M eine hohe Sensibilität gegenüber der Behandlung mit BYL719 feststellen. Wohingegen die  $IC_{50} = 13,53 \,\mu$ M bei Gabe von BSK805, die im MTT-Versuch verabreichte Maximalkonzentration von 5  $\mu$ M bedeutend überschritt. Das Zusammenwirken der Substanzen ergab für den  $CI_{IC50} = 0,88$  einen relativ schwachen Synergismus. Jedoch zeigte sich bei steigender Konzentration ein dosis-abhängig zunehmender Synergismus, betätigt durch einen  $CI_{IC90} = 0,35$ . Der IC<sub>90</sub> der Kombination beträgt 2,47  $\mu$ M beider Substanzen. Um eine solche Zellviabilitätsreduktion von 90 % erreichen zu können, wären in Mono-Regimen vergleichsweise hohe Dosen von 239  $\mu$ M für BSK805 und 7,27  $\mu$ M für BYL719 erforderlich. Ein moderates Ansprechen auf die Inkubation mit dem jeweiligen Mono-Regime stellte sich für die epitheliale Zelllinie ZR-75 dar. Die Anwendung der kombinierten Gabe der beiden Substanzen erfuhr eine beträchtliche synergistische Wirkverstärkung. Überdies verstärkte sich der synergistische Effekt bei Dosiserhöhung, sichtbar durch eine Änderung des  $CI_{IC50} = 0,59$  auf  $CI_{IC90} = 0,23$ .

Ebenso konnte für die Zelllinie SKBR3 eine synergistische Wirkung der Kombination der Inhibitoren festgestellt werden, wobei ein  $CI_{IC50} = 0,61$  erreicht wurde.

Eine Sensibilität gegenüber der Substanz BYL719 wies die epitheliale Zelllinie BT-474 auf, wobei sich diese wiederum gegenüber BSK805 bei Applikation der Maximaldosis von 5  $\mu$ M mit

einer Zellviabilität von 87 % resistent zeigte. Eine Wirkverstärkung der Kombination der Inhibitoren blieb aus, ebenso bei Dosiserhöhung. Die alleinige Gabe von 1  $\mu$ M BYL719 verringerte die Zellviabilität auf 61 %, welche sich bei Hinzugabe von 5  $\mu$ M BSK805 wiederrum nur um weitere 6 % minimierte.

Die Zelllinie MDA-MB-231, welche sich bereits resistent gegenüber dem Mono-Regime erwies, zeigte hinsichtlich einer kombinatorischen Wirkverstärkung keine Veränderung. Kombinations-Indices weit über 1 implizierten die bereits angenommene antagonistische Wirkung.

Zusammenfassend zeigte sich innerhalb der ausgewählten Zelllinien für BT-20, ZR-75 und SKBR3 ein kombinatorischer Effekt bezüglich der Reduktion der Zellviabilität. Im Gegensatz dazu stehen die Zelllinien BT-474 und MDA-MB-231, bei welchen eine Wirkverstärkung der Monosubstanzen ausblieb.

#### 3.4.2 Zytostatischer und zytotoxischer Effekt der Inhibitorkombination

Im Anschluss an die MTT-Experimente erfolgte die Kontrolle der Zellzahlreduktion unter Verwendung der Monosubstanzen und der Kombination der Inhibitoren an einer geringeren Zellzahl. Zu diesem Zwecke wurden Zellen in geringerer Dichte gegenüber den MTT-Versuchen im Rahmen eines *Colony formation assay* ausgesäht und über 2 Wochen mit den jeweiligen Substanzen mit einer Konzentration von 2,5  $\mu$ M inkubiert (Abbildung 10).



Abbildung 10: Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie ZR-75 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination. Abgebildet ist die Zelllinie ZR-75, wobei oberhalb der Abbildung der eingesetzte Inhibitor und die jeweilige Konzentrationsgabe angegeben ist. Der Inkubationszeitraum betrug 2 Wochen. Der Versuch wurde im Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten. Nach 2-wöchiger Inkubationszeit zeigte sich für die Zelllinie ZR-75 bei alleiniger Applikation von BSK805 eine geringere Kolonisationsgröße im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dahingegen zeigte sich bei Gabe von BYL719 (und auch bei der Kombination aus BSK805 und BYL719) neben der Reduktion der Koloniegröße auch eine reduzierte Koloniezahl. Dieser Effekt verstärkte sich bei der Kombination von BSK805 und BYL719. Bei kombinierter Gabe der beiden Substanzen war eine annähernd vollständige Wachstumshemmung zuverzeichnen. Mit den Ergebnissen aus den voherigen Untersuchungen ließen sich sowohl zytostatische als auch zytotoxische zu Grunde liegende Mechanismen vermuten, wobei für BSK805 der zytostatische und für BYL719 der zytotoxische vordergründig von Bedeutung ist.

#### 3.4.3 Einfluss des Zellzyklus

Ebenso wurde der Einfluss der Inhibitoren auf das Expressionslevel der Schlüsselproteine des Zellzyklus untersucht (Abbildung 11).



Abbildung 11: Expression von Schlüsselproteinen des Zellzyklus in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination. Die Zelllinien wurden mit jeweils 2,5 µM BSK805, 2,5 µM BYL719 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 48 h inkubiert, wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das *"housekeeping"* Protein Actin diente.

Schlüsselproteine des Zellzyklus betreffend induzierte das Mono-Regime BYL719 und darüber hinaus die kombinierte Gabe eine unterschiedlich ausgeprägte Reduktion des Signals des zellzyklusregulierenden Proteins Cyclin A. Wohingegen weitere Zellzyklus-Proteine Cyclin B1 und Cyclin E in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination keine Veränderungen in ihrer Expression zeigten.

#### 3.4.4 Apoptose-Induktion

Im weiteren Verlauf wurde die Apoptose-Induktion der Monosubstanzen und der Kombination der Inhibitoren untersucht. Für die Analyse fand die Methodik des *Cell Death Detection ELISA*<sup>*PLUS*</sup> Anwendung. Es wurden die Zelllinien BT-20 und ZR-75 mit je 2,5  $\mu$ M BSK805 und 2,5  $\mu$ M BYL719 und die entsprechende Kombination über 4 Tage inkubiert. Nachfolgend wurde

das Zelllysat analysiert, wobei das Ziel des Versuches in der Erfassung von angereicherten Nukleosomen als Marker für Apoptose bestand. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurde bei den ausgewählten Zelllinien teilweise bereits bei Monosubstanz-Gabe eine vermehrte Nukleosomenanreicherung detektiert (Abbildung 12).



**Abbildung 12: DNA-Fragmentierung der Zellinien ZR-75 und BT-20 in Abhängigkeit der Behandlung mit 2,5 μM BSK805, 2,5 μM BYL719 und deren Kombination.** Nach einem Inkubationszeitraum von 4 Tagen wurde die Nukleosomenanreicherung unter Verwendung des Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> ermittelt.

Bei beiden Zelllinien führte die Behandlung mit BYL719 zu einer vergleichsweise höheren Nukleosomenanreicherung als die Behandlung mit BSK805, sodass es bei der Zelllinie BT-20 zu

einer Verdreifachung apoptotischer Zellen kam. Bei kombinierter Inkubation der Substanzen konnte eine große Steigerung der Nukleosomenanreicherung erzielt werden. Dies bedeutete für die Zelllinie ZR-75 bei Kombination der Inhibitoren eine 18× stärkere Anreicherung der Nukleosomen gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Für die zwei epithelialen Zelllinien BT-20 und ZR-75 korrelierte die Zellviabilitätsreduktion im Proliferationstest und die Nukleosomenanreicherung im *Cell Death Detection ELISA*<sup>PLUS</sup>.

Eine Induktion der Apoptose, welche sich insbesondere durch die Applikation der kombinatorischen Gabe der Substanzen im *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* zeigte, wurde nun mit Hilfe eines *Western Blot* überprüft werden.



Abbildung 13: PARP-Spaltung in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination. Die Zellinien wurden mit jeweils 2,5  $\mu$ M BSK805, 2,5  $\mu$ M BYL719 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 48 h inkubiert, wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "housekeeping" Protein Actin diente.

Eine Inkubation der Zelllinien MDA-MB-436, BT-20 und ZR-75 mit dem Inhibitor BYL719 konnte eine vermehrte Spaltung der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), ein Apoptose-Indikator, erfasst werden, welche sich bei Kombination der Inhibitoren noch steigerte.



Abbildung 14: Caspase-3-Spaltung in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination. Die Zellinien wurden mit jeweils 2,5 µM BSK805, 2,5 µM BYL719 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 72 h inkubiert, wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "housekeeping" Protein Actin diente.

Überdies zeigte ebenfalls der Apoptose-Mediator *Cleaved Caspase-3* bei Zelllinie BT-20 eine deutliche Zunahme bei Inkubation mit beiden Inhibitoren. Bereits für das BYL719 Mono-Regime war eine moderate Veränderung der Signalintensität sichtbar, die bei Anwendung der Inhibitoren in Kombination noch deutlicher zum Vorschein kam.



Abbildung 15: Expression von BIM und PUMA, Mediatoren der Apoptose-Regulation in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination. Die Zellinien wurden mit jeweils 2,5 μM BSK805, 2,5 μM BYL719 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 72 h inkubiert, wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "*housekeeping*" Protein Actin diente.

Die Abbildungen 13 und 14 sind eine Bestätigung des Ergebnisses im *Cell Death Detection ELISA*<sup>*PLUS*</sup> für das Vorliegen von Apoptose, insbesondere für die Kombination der Inhibitoren. Als potenzieller Mechanismus der Apoptose wurden die proapoptotischen Proteine BIM und PUMA untersucht. Sowohl bei alleiniger Behandlung mit BYL719 als auch bei Kombination der Inhibitoren zeigte sich eine Signalerhöhung in den Zelllinien BT-20 und ZR-75.

## 3.4.5 Veränderungen in der Expression von Proteinen des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs

Die Expressionslevel verschiedener Proteine des mTOR-Signaltransduktionswegs wurden an den Zelllinien MDA-MB-436, BT-20 und ZR-75 untersucht. Die Zelllinien zeigten bereits im MTT-Test einen Kombinationseffekt unter kombinierter Substanzinkubation. Eine Untersuchung erfolgte mit Hilfe von *Western Blot*. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand das Phosphorylierungslevel von Schlüsselproteinen des mTOR-Signaltransduktionsweg, u.a. STAT3, AKT und 4EBP1.



Abbildung 16: Expression von Schlüsselproteinen des mTOR-Signaltransduktionswegs in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, BYL719 und deren Kombination. Die Zellinien wurden mit jeweils 2,5 µM BSK805, 2,5 µM BYL719 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Die Detektion erfolgte unter Zuhilfenahme des *Western Blot*-Verfahrens. Wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das *"housekeeping"* Protein Actin diente.

In Kapitel 3.2. wurde bereits eine Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs durch BSK805 festgestellt. Dies bestätigte sich in Abbildung 16. Die Proteine P70S6K, AKT und 4EBP1 zeigten unter Monosubstanz-Gabe von BSK805 eine stärkere Phosphorylierung. Dagegen ließ sich unter der Gabe von BYL719 bzw. der Kombination der Inhibitoren eine P70S6K, Dephosphorylierung von STAT3, AKT und 4EBP1 beobachten. Das Phosphorylierungsniveau zeigte sich unterhalb des Levels der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 16). Der PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg ist entscheidend für die Zellproliferation und die Hemmung von Apoptose. Dadurch ist die inhibierende Wirkung von BYL719 auf den PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg für die kombinatorischen Effekte von BSK805 und BYL719 von Bedeutung.

## 3.5 Expression von PIM-Kinasen in Mammakarzinomzelllinien

Im Anschluss an die Kombinationsversuche aus BSK805 und BYL719 rückte ein weiterer Kombinationspartner für den JAK2-Inhibitor in den Fokus, um den Einfluss weiterer Signaltransduktionswege zu testen. Dabei handelte es sich um den PIM-Inhibitor LGB321. Zunächst erfolgte eine Untersuchung der Expressionslevel mit Hilfe von *Western Blot*-Experimenten, um einen Überblick über das Vorhandensein von PIM-Proteinen in mit BSK805 behandelten Zelllinien zu erlangen.



Abbildung 17: Expression der PIM-Kinasen für die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-453 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot-Verfahren nach 24 h Inkubation mit BSK805 in einem Konzentrationsbereich von  $1-5 \mu M$ , wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "housekeeping" Protein Actin diente.

Die PIM-Kinasen, PIM1, PIM2 und PIM3 waren konstitutiv exprimiert in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-453 (Abbildung 17). Eine Inkubation mit BSK805, sowie die Konzentrationssteigerung des Inhibitors auf die Maximalkonzentration von  $5 \,\mu$ M führte zu keiner detektierbaren Änderung der Proteinexpression von PIM.

# 3.6 Proliferationsinhibition der Mammakarzinomzelllinien unter Inkubation mit PIM-Inhibitor LGB321

Für einen weiteren MTT-Versuch wurde der PIM-Inhibitor LGB321 als möglicher Kombinationspartner von BSK805 ausgewählt und seine Wirkung auf verschiedene Mammakarzinomzelllinien untersucht (Abbildung 18).



**Abbildung 18: LGB321 bedingte Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinomzelllinien.** Ermittlung der Zellviabilitäten in % unter Verwendung des MTT-Tests nach 4-tägiger Inkubation mit PIM-Inhibitor LGB321 in steigender Konzentration von 0,625 µM -5 µM.

Es zeigten sich im MTT-Monosubstanzversuch nur geringgradige Effekte des PIM-Inhibitors auf die Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Lediglich bei einer Inhibitorkonzentration von 5  $\mu$ M konnte für die Zelllinie MDA-MB-453 eine Reduktion der Zellviabilität auf 42 % und für T47D und SKBR3 eine Reduktion der Zellviabilität auf 33 % beobachtet werden.

## 3.7 Kombination von JAK2-Inhibitor BSK805 und PIM-Inhibitor LGB321

## 3.7.1 Synergistischer Effekt auf die Proliferationsinhibition der Mammakarzinomzelllinien

Zur Begutachtung denkbarer synergistischer Effekte folgte auch an dieser Stelle eine Kombinationsinkubation aus dem JAK2-Inhibitor BSK805 und dem PIM-Inhibitor LGB321. Für die Detektion eines möglichen Einflusses der kombinierten Inhibitioren wurde ein MTT-Kombinationsversuch verwendet.

		Zellviabilität in %			
	Konzentration	Konzentration LGB 321 in µM			
Zelllinien	BSK805 in $\mu M$	0	1,25	2,5	5
	0	100,0	80,9	79,1	65,5
MCE 7	1,25	82,7	74,5	65,5	49,1
WICF-/	2,5	68,2	59,1	51,8	39,1
	5	43,6	34,5	29,1	20,0
	0	100,0	91,1	94,4	82,2
MDA MD 436	1,25	86,7	82,2	80,0	74,4
MDA-MD-450	2,5	77,8	74,4	71,1	66,7
	5	57,8	58,9	55,6	47,8
	0	100,0	98,2	94,9	78,6
CVDD2	1,25	93,6	89,3	87,8	76,6
SKBKJ	2,5	89,6	84,9	80,9	60,9
	5	60,4	29,9	19,8	6,2
	0	100,0	87,1	79,8	75,8
DT 474	1,25	90,7	84,1	81,8	78,1
B1-4/4	2,5	83,1	67,2	55,0	50,0
	5	67,2	30,1	19,5	9,3
T47D	0	100,0	71,6	64,7	57,4
	1,25	89,7	65,0	61,6	44,1
	2,5	74,9	59,2	51,4	31,7
	5	56,2	40,5	27,2	18,1

**Tabelle 6: Kombinatorischer Effekt auf die Proliferationsinhibition ausgewählter Mammakarzinom zelllinien.** Unter Verwendung des MTT-Tests ermittelte Zellviabilitäten in % der Zelllinien MCF-7, MDA-MB-436, SKBR3, BT-474 und T47D in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 sowie deren Kombination in obenstehend ausgewiesenen Konzentrationen in  $\mu$ M. Der Behandlungszeitraum der Mammakarzinomzellen betrug 4 Tage. Die Standardabweichung liegt für alle Ergebnisse unter 10%. Alle ausgewählten Zelllinien reagierten, wie bereits im Monosubstanzversuch moderat auf die Inkubation mit dem Inhibitor BSK805 und zeigten eine Reduktion der Zellzahl von bis zu 50 %. Demgegenüber zeigte LGB321 eine geringfügige Reduktion der Zellzahl von bis zu 30 %. Die Kombination der Inhibitoren erzielte einen synergistischen Effekt. So führte die Inkubation mit der Höchstkonzentration von jeweils 5  $\mu$ M bei den Zelllinien BT-474 und SKBR3 zu einer Reduktion der Zellzahl von über 90 %. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe der Software *CalcuSyn* ausgewertet um IC<sub>50</sub>, CI<sub>IC50</sub> und CI<sub>IC90</sub> zu bestimmen (Tabelle 7).

	BSK805 (μM)	LGB321 (µM)	BSK805 + LGB321				
<i>IC</i> 50			BSK805 (µM)	LGB321 (µM)	CI <sub>IC</sub> 50	<i>CI</i> 1 <i>C</i> 90	
MCF-7	4,23	17,7	2,40	2,40	0,70	0,38	
MDA-MB-436	6,93	121,77	4,88	4,88	0,74	0,66	
SKBR3	7,31	10,20	2,71	2,71	0,64	0,34	
BT-474	9,72	36,18	2,38	2,38	0,31	0,08	
T47D	5,82	9,62	2,08	2,08	0,57	0,31	

Tabelle 7:  $IC_{50}$  Werte der Zellinien MCF-7, MDA-MB-436, SKBR3, BT-474 und T47D in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination. Die zugrundeliegenden Werte für die Berechnung der  $IC_{50}$  und der Kombinations-Inidces ( $CI_{IC50}$  und  $CI_{IC90}$ ) sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Die  $IC_{50}$  für LGB321 lag für alle Zelllinien jenseits der maximal verabreichten Konzentration von 5 µM. Dies galt mit Ausnahme von MCF-7 mit einer  $IC_{50}$  von 4,23 µM ebenso für die Monosubstanz BSK805. Die Kombination der beiden Substanzen zeigte bei allen Zelllinien einen moderaten bis starken Synergismus. Dieser verstärkte sich bei zunehmender Konzentrationssteigerung. Zur Erlangung der  $IC_{50}$  für die Kombination der Inhibitoren läge die Konzentration je Monosubstanz weniger als 5 µM. Insbesondere sprachen die Zelllinien BT-474 und T47D, bei denen durch die Monosubstanz-Gabe allenfalls geringe Viabilitätsminderungen erreicht wurden, auf die Verabreichung der kombinierten Gabe in beachtenswertem Maße an. Dies spiegelte sich für BT-474 in einer  $IC_{50} = 2,38$  µM für die Kombination der Inhibitoren und für T47D mit 2,08 µM wider. Dieser synergistische Effekt drückte sich ebenfalls im  $CI_{IC50}$  der Behandlung mit BSK805 und LGB321 (0,31 und 0,57) aus.

Um die Ergebnisse des MTT-Versuches in einem weiteren Experiment zu prüfen, wurden einige Mammakarzinomzellen in Multiwell-Zellkulturplatten ausgesäht und mit den Monosubstanzen BSK805 und LGB231 und einer Kombination der beiden Inhibitoren behandelt. Der Inkubationszeitraum betrug 4 Tage, wobei für das Experiment eine relativ hohe Inhibitorkonzentration von je 5  $\mu$ M zum Einsatz kam. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die absoluten Zellzahlen mit Hilfe der Trypanblaufärbung und einer Neubauer Zählkammer ermittelt (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Reduktion der absoluten Zellzahl in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination.** Die Inkubation der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 4 Tagen nach Inkubation von je 5 µM der jeweiligen Testsubstanz.

Für die ausgewählten Zelllinien MDA-MB-436, MCF-7 und SKBR3 konnte eine Reduktion der Zellzahlen unter Behandlung mit den jeweiligen Substanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erfasst werden. Dabei fand sich die größtmöglich erreichbare Reduktion der Zellzahl bei Inkubation der Kombination der beiden Inhibitoren. So bedeutete dies für die Zelllinie SKBR3 eine Abnahme der Zellzahl um das sechsfache von der unbehandelten Kontrollprobe im Vergleich zur kombinationsbehandelten Probe. Dabei konnten die Ergebnisse des vorausgehenden MTT-Tests bestätigt werden.

#### 3.7.2 Zytostatischer und Zytotoxischer Effekt der Inhibitorkombination

Im Anschluss an MTT-Test und Zellzählversuch erfolgte die Kontrolle der Zellzahlreduktion unter Verwendung der Monosubstanzen und der Kombination der Inhibitoren im *Colony formation Assay*. Zu diesem Zwecke wurden Zellen ausgesäht und über 2 Wochen mit den jeweiligen Substanzen in relativ geringer Konzentration 1–2,5 µM inkubiert. Zu untersuchen war eine Veränderung der Koloniezahl bzw. Koloniegröße.



Abbildung 20



Abbildung 21



#### Abbildung 22

Abbildung 20-22: Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinien MCF-7, SKBR3 und BT-474 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination. Abgebildet sind die Zelllinien MCF-7, SKBR3 und BT-474, wobei oberhalb der Abbildung Medikament und jeweilige Konzentrationsgabe deklariert ist. Der Inkubationszeitraum betrug 2 Wochen. Der Versuch wurde im Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten

Nach 2 Wochen zeigte sich insbesondere bei der Kombination der Inhbitoren eine deutliche Minimierung der Koloniezahl bzw. der Koloniegröße und -dichte. Bei den Zelllinien SKBR3 und BT-474 konnte bei Anwendung der Kombination der Inhibitoren ein annähernd vollständiger Wachstumsarrest verzeichnet werden.

#### 3.7.3 Einfluss des Zellzyklus

Im Anschluss folgte eine Untersuchung der Expressionslevel von Schlüsselproteinen des Zellzyklus im *Western Blot*.



Abbildung 23: Expression von Schlüsselproteinen des Zellzyklus in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination. Die Zellinien wurden mit jeweils 2,5 µM BSK805, 2,5 µM LGB321 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 48 h inkubiert, wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "*housekeeping*" Protein Actin diente.

Bei Testung der Inhibitorkombination BSK805 und LGB321 zeigten sich keine bis geringfügige Veränderungen in der Expression der Proteine des Zellzyklus (Abbildung 23). Allerdings kam es bei Detektion des Zellzyklusproteins Cyclin A zu einer Intensitätsreduktion der Signalbande bei Kombination der Inhibitoren für die Zelllinien MCF-7, BT-474 und MDA-MB-436.

#### 3.7.4 Apoptose-Induktion

Darüber hinaus wurden mögliche Apoptose-Vorgänge mit Hilfe der Methodik des *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* analysiert. Die Abbildung 24 stellt die normierte relative Nukleosomenanreicherung der Zelllinien SKBR3 und BT-474 in Abhängigkeit der Behandlung mit 2,5  $\mu$ M BSK805, 2,5  $\mu$ M LGB321 und deren Kombination dar.



Abbildung 24: Normierte relative Nukleosomenanreicherung der Zelllinien SKBR3 und BT-474 in Abhängigkeit der Behandlung mit 2,5 µM BSK805, 2,5 µM LGB321 und deren Kombination. Nach einem Inkubationszeitraum von 4 Tagen wurde die Nukleosomenanreicherung unter Verwendung des Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> ermittelt.

Bei Monosubstanz-Gabe zeigte sich bei den hierfür ausgewählten Zelllinien keine Zunahme der Nukleosomenanreicherung. Ausgenommen davon war eine minimale Steigerung der Nukleosomenanreicherung bei SKBR3 bei der Gabe von LGB321. Indessen zeigte sich bei Kombination der Inhibitoren BSK805 und LGB321 eine starke Steigerung der Anzahl der angereicherten Nukleosomen. Insbesondere ließ sich dies für die Zelllinie BT-474 mit einer 60× stärkeren Anreicherung der Nukleosomen bei Kombination der Inhibitoren gegenüber der

Kontrolle beobachten. Überdies ließ sich für die Kombination der Inhibitoren eine Korrelation zwischen ermittelter Reduktion der Zellviabiliät im MTT-Test und vermehrter Nukleosomenanreicherung im *Cell Death Detection ELISA*<sup>PLUS</sup> feststellen.

Die im *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* gewonnen Erkenntnisse zur Apoptose-Induktion sollten mittels *Western Blot* mit einer weiteren Methodik verifiziert werden (Abbildung 25).



Abbildung 25: Expression von Mediatoren der Apoptose-Regulation für die Zelllinie BT-474 in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination. Die Zellinien wurden mit jeweils 5  $\mu$ M BSK805, 5  $\mu$ M LGB321 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h inkubiert, wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "*housekeeping*" Protein Actin diente.

Dafür wurde die Hormonrezeptor-positive Zelllinie BT-474 herangezogen, welche mit den Monosubstanzen BSK805 und LGB321 und deren Kombination für einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h inkubiert wurde. Zunächst war das Apoptose-Protein Cleaved Caspase-3 Gegenstand der Untersuchungen, wobei sich bei Inkubation mit der Kombination der Inhibitoren BSK805 und LGB321 eine vermehrte Aktivierung und Caspasen-Spaltung nach einem Inkubationszeitraum von 48 und 72 h zeigte. Dagegen blieb eine Caspasen-Spaltung bei kürzerer Inkubationszeit von 24 h aus und die Signalintensität der Proteinbanden erwies sich als unverändert. Ein weiterer Apoptose-Mediator PARP konnte mit Hilfe der Western Blot-Analyse erfasst werden. In diesem Fall konnte ein Anstieg jenes PARP Spaltproduktes bei kombinierter Gabe der Monosubstanzen festgestellt werden. Bereits nach kurzer Inkubationszeit von 24 h fiel bei Kombination der Inhibitoren eine vermehrte Spaltung von PARP auf, wobei sich diese bei zunehmender Inkubationszeit steigerte. Eine Dephosphorylierung von p-BAD ließ sich bei Inkubation mit LGB321 und verstärkt bei Kombination der Inhibitoren darstellen. Bcl-xl und PUMA, weitere Apoptose-Proteine, zeigten keine nennenswerten Änderungen der Expression ihrer Proteinbanden in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination. Eine Variation des Inkubationszeitraumes hatte zudem keinen Einfluss auf die Expression.

#### 3.7.5 Fehlende Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs

Um die in den vorausgegangenen Experimenten erfassten synergistischen Effekte der Kombinationsinkubation aus BSK805 und LGB321 zu analysieren, erfolgte die Durchführung von weiteren *Western Blot*-Versuchen. Dabei stand die Ermittlung möglicher Veränderungen in der Expression von Proteinen des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs im Vordergrund (Abbildung 26).



Abbildung 26: Expression von Schlüsselproteinen des mTOR-Signaltransduktionswegs in Abhängigkeit der Behandlung mit BSK805, LGB321 und deren Kombination. Die Zellinien wurden mit jeweils 2,5 µM BSK805, 2,5 µM LGB321 bzw. deren Kombination über einen Zeitraum von 48 h (72 h) inkubiert. Die Detektion erfolgte unter Zuhilfenahme des Western Blot-Verfahrens, wobei für die Quantifizierung probeabhängiger Schwankungen als entsprechende Ladekontrolle das "housekeeping" Protein Actin diente.

AKT zeigte eine Abnahme der Proteinbande bei Kombination der Inhibitoren im Vergleich zur Monoinkubation bzw. zur Kontrollgruppe bei den Zelllinien MCF-7, BT-474, SKBR3. P70S6K zeigte für BSK805 einen Anstieg der Phosphorylierung. 4EBP1 erfuhr eine Signalintensivierung unter Inkubation mit BSK805. Die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg durch BSK805 wurde durch die Zugabe von LGB321 nur unwesentlich verändert. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass die kombinatorische Wirkverstärkung von BSK805 und LGB321 unabhängig vom mTOR-Signaltransduktionsweg sei und andere Mechanismen der Proliferationsinhibition zu Grunde lägen.

# 4 Diskussion

Die nachweislich hohe Zahl an Mammakarzinom-Neuerkrankungen pro Jahr ist wesentlich für das umfangreiche Interesse und den Forschungsbedarf hinsichtlich neuer Therapieansätze. Für die hohe Studiendichte spielen zudem Resistenzmechanismen der aktuell eingesetzten Standardtherapeutika eine Rolle. Neben klassischen Chemotherapeutika und Hormontherapeutika rücken zielgerichtete Therapien in den Fokus. Ansatzpunkt für den Einsatz letzterer ist die Überaktivierung von Signaltransduktionswegen in Mammakarzinomzellen.

## 4.1 JAK/STAT-Aktivierung in Mammakarzinomzelllinien

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg ist beim Mammakarzinom überaktiviert. Dies spiegelt sich u.a. in einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 bei 50–60 % der Mammakarzinome wider [104]. STAT3 steht in Assoziation zur Proliferation tumoröser Zellen und Metastasierung (1.2.1) [105].

In dieser Arbeit wurde am *in-vitro* Modell des Mammakarzinoms versucht, die Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs durch den Einsatz von zwei zielgerichteten Substanzen, INK424 (pan-JAK-Inhibitor) und BSK805 (JAK2-Inhibitor) zu inhibieren.

In der *Western Blot*-Analyse zeigte sich für alle ausgewählten Mammakarzinomzelllinien eine konstitutive Aktivierung von JAK2/STAT3. Dies spiegelte sich in der Phosphorylierung der Schlüsselproteine JAK2 und STAT3 wider. Unter Inkubation mit BSK805 ließ sich für die Zelllinien MCF7 und MDA-MB-453 eine Dephosphorylierung von STAT3 erkennen (Abbildung 8). Dies führte zur Bestätigung, dass BSK805 einen inhibierenden Einfluss auf JAK2 ausübt. Diese Veränderungen im Phosphorylierungsgrad von STAT3 konnten bereits Kim et al. (2019) feststellen [50].

Im MTT-Test zeigten sich die Mammakarzinomzelllinien nicht sensibel gegenüber INK424. Eine Reduktion der Zellviabilität unter 50 % gelang auch bei Inkubation mit der Höchstkonzentration von 5  $\mu$ M nicht. Die Beobachtung der fehlenden Proliferationsinhibition bei Inkubation mit INK424 decken sich mit den Erkenntnissen der Studie von Balko et al. (2016) [51]. Diese stellten die fehlende Sensibilität von INK424 für Mammakarzinom-Tumorzellverbände mit JAK2-Amplifikation fest und argumentierten, dass die fehlende Wirksamkeit gegenüber JAK2 und STAT6 eine Erklärung liefert [51].

Für BSK805 konnte innerhalb der Zelllinien eine moderate Proliferationsinhibition festgestellt werden (Abbildung 7). Insbesondere bei Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf 5  $\mu$ M zeigte die epitheliale Zelllinie SKBR3 eine deutliche Proliferationsinhibition mit einer Zellviabilität von 6,98 %. Ebenso untersuchten Balko et al. (2016) die Wirksamkeit von BSK805 auf Tumorzellverbände [51]. Sie konnten zeigen, dass BSK805, das Tumorwachstum signifikant

reduziert, sowohl bei Einzelgabe als auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel [51].

Insgesamt zeichnete sich eine erhöhte Sensitivität HER2/neu-überexprimierender Zelllinien im Vergleich zu HER2/neu-negativen Zelllinien ab. Es besteht ein Zusammenhang zwischen HER2 und dem JAK/STAT-Signaltransduktionsweg, wobei HER2 durch Bildung eines Heterodimers mit HER4 die Tyrosinkinase Src anregt, wodurch es zur Aktivierung des JAK/STAT5-Signaltransduktionswege kommt [106]. Außerdem besteht die Möglichkeit der Phosphorylierung und Translokation von STAT3 in den Zellkern durch HER2 [107].

Zusammenfassend reichte eine alleinige Inhibition des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs mittels einer zielgerichteten Substanz für eine wirksame Proliferationsinhibition der Tumorzellverbände nicht aus.

## 4.2 Kombination der Inhibitoren BSK805 und BYL719

Bogani et al. (2013) stellten fest, dass sich bei myeloproliferativen Neoplasien die PI3K/AKT/mTOR- und JAK/STAT-Signaltransduktionswege gegenseitig beeinflussen [108]. Bei Kombination eines mTOR- und eines JAK2-Inhibitors konnte eine signifikante synergistische Wirkung auf die Proliferationsinhibition der Zellen nachgewiesen werden [108]. Ebenso zeigten Britschgi et al. (2012) an *triple*-negativen Mammakarzinomzellen bei kombinierter Inhibition der Signaltransduktionswege ein reduziertes Tumorwachstum [109].

Möglicherweise kann der aktivierte PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg die JAK/STAT-Inhibition kompensieren. Daher erfolgte der Versuch einer kombinierten Inhibition mit BSK805 und BYL-719 (PI3K-Inhibitor), wobei u.a. Experimente zur Zellviabilität und zur Apoptose durchgeführt wurden.

In der *Western Blot*-Analyse zeigte sich bei Inkubation mit BSK805 eine Feedback-Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg. Diese Aktivierung könnte eine mögliche Erklärung für die moderaten Effekte der Proliferationsinhibition durch BSK805 im MTT-Test liefern.

Im MTT-Test konnte bei Kombinationsinkubation von BSK805 mit BYL719 eine synergistische Proliferationsinhibition bei nahezu allen untersuchten Zelllinien erzielt werden (Tabelle 2-4). Quantifiziert wurde die synergistische Wirkung der Kombinationstherapie mit Hilfe von CI-Werten nach Chou und Talalay (Tabelle 5) [110]. Die Zelllinie MDA-MB-231 zeigte im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien nur ein geringes Ansprechen auf die kombinierten Inhibitoren. Ursächlich hierfür könnte eine KRAS-Mutation der Zelllinie sein, welche bei den übrigen Zelllinien nicht vorhanden ist [111]. Beispielsweise stellten Patra et al. (2017) fest, dass die Zelllinie MDA-MB-231 sich resistent gegenüber Trastuzumab präsentierte, wobei die KRAS mutierte Zelllinie die höchste Proliferationsrate zeigte [112]. Des Weiteren wies diese Zelllinie

keine PIK3CA-Mutation auf, so dass der PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg für die Prolifertaion dieser Zellen von minderer Bedeutung war und analog seine Inhibition weniger Effekte erzielte.

Mit Hilfe des MTT-Tests konnte die synergistische Wirksamkeit der Inhibitoren festgestellt werden, allerdings ohne Kenntnis über die zugrundeliegende Ätiologie der Proliferationsinhibition. Infolgedessen folgten Versuche zur Detektion möglicher Ursachen. Denkbare Gründe für den Synergismus der Kombination der Inhibitoren sind Veränderungen im Zellzyklus, Apoptose-Prozesse, sowie die Dysregulation von Signaltransduktionswegen.

#### 4.2.1 Veränderungen im Zellzyklus als Erklärungsansatz für die Proliferationsinhibition

Um einen möglichen Einfluss des Zellzyklus auf die Proliferationsinhibition zu konstatieren, erfolgte die Betrachtung von Schlüsselproteinen des Zellzyklus im *Western Blot*. Dabei fiel bei Detektion von Cyclin A eine Verminderung der Proteinexpression bei Kombination der Inhibitoren auf. Cyclin A reguliert an verschiedenen Stellen den Zellzyklus über Interaktion mit *cyclin-dependent kinase* (CDK) [113]. CDK sind inaktive Serin/Threonin-Kinasen, welche erst in Verbindung mit spezifischen Cyclinen aktiviert werden. Cyclin A interagiert sowohl mit CDK2 als auch mit CDC2 (CDK1) innerhalb des Zellzyklus [114]. Dabei besteht eine Aktivierung von Cyclin A/ CDK2 für den Übergang von der G1- zur S-Phase [115]. Der Komplex aus Cyclin A/ CDC2 ist in der S-Phase und dem Übergang von der G2/M-Phase aktiv [116]. Veränderungen von Cyclinen spielen eine entscheidende Rolle für die Tumorprogression, wobei insbesondere eine Überexpression von Cyclin A mit einer schlechten Prognose verbunden ist [117].

Die Proteinkinase AKT kann den Komplex aus CDK2 und Cyclin A phosphorylieren, wobei dies zur Progression des Zellzyklus führt [118]. Dieser von Maddika et al. (2008) beschriebene Prozess könnte möglicherweise ein Erklärungsansatz für die Dephosphorylierung von Cyclin A und der damit verbundene Zellzyklusarrest unter Kombination der Inhibitoren sein [118].

Weitere Mediatoren des Zellzyklus Cyclin B1 und Cyclin E blieben im Rahmen dieser Arbeit in ihrem Phosphorylierungsstatus unverändert. Cyclin B1 ist ein wesentliches Protein der M-Phase, wobei es schon in der späten S-Phase aktiviert wird und einen Komplex mit CDK1 bildet [119] [120]. Das Zellzyklusprotein Cyclin E ist zunächst in der G1-Phase aktiv und nach Bindung an CDK2 mitbeteiligt an dem Übergang der G1- in die S-Phase [121].

Die ausbleibende Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Cycline B und E bei Inhibitorkombination könnte einen Hinweis darauf geben, dass diese keine Wirkung auf die frühe G1-Phase bzw. M-Phase hat. Die Veränderung von Cyclin A und der ausbleibende Einfluss auf die Cycline B und E deuten darauf hin, dass die Inhibitorkombination einen Zellzyklusarrest nur an der Stelle im Zellzyklus verursacht, an der es zu einer Interaktion mit Cyclin A kommt (Abbildung 11).

## 4.2.2 Apoptose eine mögliche Erläuterung für die Proliferationsinhibition

Im *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>*, ein Verfahren zur Apoptose-Messung, führte die Kombinationsinkubation von BSK805 und BYL719 bei den Zelllinien ZR-75 und BT-20 zu einer verstärkten Nukleosomenanreicherung, ein Indikator für Apoptose.

*Western Blot*-Experimente folgten zur Überprüfung dieses Ergebnisses und konnten Apoptose-Vorgänge nachweisen. Es zeigte sich eine Aktivierung und vermehrte Spaltung von Caspase-3 und PARP bei kombinierter Inhibitor-Gabe im Vergleich zur Gabe der Einzelsubstanzen (Abbildungen 13 und 14). Britschgi et al. (2012) konnten ebenso bei kombinierter Inhibition der PI3K/AKT/mTOR- und JAK/STAT-Signaltransduktionswege eine vermehrte PARP-Spaltung feststellen [109]. Zusätzlich ließ sich ein Anstieg von BIM bei Kombinationsinhibition erkennen, welcher auch in dieser Arbeit bei Kombination von BSK805 und BYL719 deutlich zu erkennen war [109]. BIM ist ein Mitglied der BCL-2 Familie und übernimmt eine proapoptotische Funktion, indem es zur Oligomerisierung von BAX und BAK und schließlich zur Freisetzung von Cytochrom C führt [122] [123].

#### 4.2.3 Dysregulation im Signaltransduktionsweg

Die im Abschnitt 4.2 beschriebene Feedback-Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg durch BSK805 konnte durch Zugabe von BYL719 inhibiert werden. Dies verdeutlichte sich im *Western Blot*-Experiment, wobei sich AKT unter BSK805 phosphoryliert darstellte und bei Kombination dephosphoryliert. Ebenso zeigte sich die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs durch BSK805 in einer verstärkten Phosphorylierung von P70S6K und 4EBP1. Bei kombinierter Inhibition stellten sich P70S6K und 4EBP1 dephosphoryliert dar.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass die Feedback-Aktivierung durch BSK805 die Wirksamkeit von BSK805 auf Mammakarzinomzellen einschränkt. Die zusätzliche Applikation von BYL719 hebt die Feedback-Aktivierung auf, wodurch es zu einer erhöhten Sensibilität der Mammakarzinomzellen gegenüber der JAK2-Hemmung durch BSK805 kommt.

## 4.3 Kombination der Inhibitoren BSK805 und LGB321

Es ist bekannt, dass PIM-Kinasen beim Mammakarzinom überexprimiert sind und eine entscheidende Rolle für das Tumorwachstum spielen [85]. PIM1 hat eine Wirkung auf Prozesse der Zellproliferation, -migration und Apoptose (1.2.5)[84]. Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg ist über die Aktivierung von PIM1 über STAT3 und STAT5 für die Expression der PIM-Kinasen verantwortlich [124]. Gao et al. (2019) stellten die Aktivierung von PIM1 über IL6/STAT3 fest und die Bedeutung für die epitheliale-mesenchymale Transition [125]. Obgleich PIM1 ein Target von JAK/STAT ist, konnte in der Untersuchung der Expressionslevel im Western Blot dieser Arbeit, BSK805 keine Veränderung in der Expression

der PIM-Proteine auslösen. Daher ergab sich die Frage nach weiteren beteiligten Mediatoren zur Kontrolle der Expression von PIM-Proteinen beim Mammakarzinom. Neben der Aktivierung von PIM1 über den klassischen JAK/STAT-Signaltransduktionsweg sind möglicherweise weitere Signaltransduktionswege wichtig. In der Literatur ist die Aktivierung von PIM1 via NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg für B-Lymphozyten bekannt [126]. Dabei steht zu Beginn der Kaskade CD40, ein Rezeptor der TNFR-Familie welcher über NF- $\kappa$ B eine Erhöhung der PIM1-Expression bewirkt [126]. Ebenfalls wäre die Aktivierung von PIM1 über den NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg beim Mammakarzinom denkbar [127]. In Anwesenheit von TNF- $\alpha$  katalysiert PIM1 die Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B Untereinheit RelA/p65 am S276, dadurch wird eine Ubiquitinierung und Proteolyse via SOCS1 unterbunden [128].

Die fehlende Inhibierung von PIM durch BSK805 könnte eine mögliche Erklärung für die bedingte Wirksamkeit von BSK805 als Monosubstanz sein (Abbildung 17).

Vor diesem Hintergrund erfolgte die Gabe einer Kombination der Inhibitoren BSK805 und PIM-Inhibitor LGB321. Unter kombinierter Gabe der Inhibitoren zeigte sich ein synergistischer Effekt auf die Proliferationsinhibition im MTT-Test (Tabelle 6). Es stellte sich unter Kombinationsinkubation eine deutliche Reduktion der Zellviabilität für die Zelllinien BT-474 und SKBR3 heraus. Bei Kombination der Höchstkonzentration aus je 5  $\mu$ M BSK805 und LGB321 wurde eine Reduktion der Zellviabilität von 90,7 % für die Zelllinie BT-474 und 93,8 % für die Zelllinie SKBR3 erreicht.

#### 4.3.1 Modifizierter Zellzyklus infolge der Kombination der Inhibitoren

Um die Ätiologie der Kombinationswirkung zu detektieren, folgten *Western Blot*-Versuche zur Analyse des Zellzyklus. Mit Ausnahme von Cyclin A ließen sich bei den üblichen anderen Schlüsselproteinen des Zellzyklus, wie Cyclin D und E keine Veränderungen in der Expression feststellen. Bei Cyclin A zeigte sich eine Signalabschwächung bei kombinierter Substanz-Gabe. PIM-Kinasen haben u.a. einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus über die Phosphorylierung von CDC25A [129]. Wiederum gelingt CDC25A die Phosphorylierung von Cyclin A während der G2-Phase des Zellzyklus [130]. Dies könnte die Signalreduktion von Cyclin A unter Kombinations-Gabe erklären.

#### 4.3.2 Apoptose-Induktion

Veränderungen im Zellzyklus konnten keine vollständige Begründung für die beobachtete Proliferationsinhibition liefern, weshalb auch die Induktion von apoptotischen Vorgängen getestet wurde. Die Methodik des *Cell Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* eignete sich zur Detektion apoptotischer Vorgänge. Für die Zelllinien SKBR3 und BT-474 ließ sich gegensätzlich zur Kontrolle und Monoinhibitor-Inkubation eine Mehranreicherung von Nukleosomen im Zytoplasma feststellen (Abbildung 24).

Im Western Blot-Experiment konnte für die Zelllinie BT-474 die Existenz apoptotischer Vorgänge bestätigt werden, wobei insbesondere bei längerem Inkubationszeitraum von 48–72 h eine vermehrte Aktivierung und Spaltung der Proteine Caspase-3 und PARP bei Kombination der Inhibitoren zu verzeichnen war (Abbildung 25). P-BAD, ein Indikator für PIM-Aktivitäten könnte die Erklärung für das Vorhandensein von Apoptose bei Kombination der Inhibitoren liefern. P-BAD zeigte sich bei Kombination der Inhibitoren verstärkt dephosphoryliert (Abbildung 25). Darüber hinaus erfuhr dies eine Verstärkung in Abhängigkeit vom Inkubationszeitraum, weshalb der Inkubationszeitraum als ein einflussreicher Faktor ausgemacht werden konnte. Die Verringerung der Signalstärke des phosphorylierten BAD Proteins bestätigte die Annahme von Aho et al. (2004), dass die PIM1-Kinase BAD phosphoryliert, wobei dies bei Inhibition der Kinase ausbleibt [131]. Im dephosphorylierten Zustand führt BAD zur Aktivierung apoptotischer Prozesse. Die Phosphorylierung von BAD ist ebenso Bestandteil der Signaltransduktionskaskade unterhalb von JAK2, wobei jene Involvierung beider Targets in die Regulation des Phosphorylierungsstatus von BAD eine schlüssige Erklärung für die apoptotische Verstärkung der Kombination der Inhibitoren liefert. Mazzacurati et al. (2015) sahen die Phosphorylierung von BAD durch AKT und ERK als Erklärung für die verhältnismäßig geringere Auswirkung des PIM-Inhibitors als Mono-Regime auf die Phosphorylierung von BAD [132].

#### 4.3.3 Unabhängigkeit vom PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg

Neben Zellzyklus und Apoptose wurde ebenso die Untersuchung des Einflusses von PIM-Inhibitor auf Veränderung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs angeschlossen. Die Zelllinien MCF-7, BT-474 und SKBR3 zeigten bei Zugabe von LGB321 nur eine geringfügige Abschwächung der Signalstärke von Proteinen der mTOR-Signaltransduktionskaskade, welche durch BSK805 aktiviert wurden. Daraus folgte die Annahme, dass die ermittelten synergistischen Effekte der Kombination der Inhibitoren unabhängig vom mTOR-Signaltransduktionsweg seien.

#### 4.4 Auswirkungen auf Mammakarzinom-Stammzellen

Es besteht die Vermutung, dass sich Tumorzellen in Tumorstammzellen umwandeln und trotz Apoptose-Induktion dem programmierten Zelltod zu entgehen [133] [134]. Tumorstammzellen erneuern sich selbst und zeigen sich u.a. durch spezifische DNA-Reparatur-Mechanismen und der Expression von Efflux-Pumpen resistent gegenüber Tumormedikamenten [135]. Der Versuch der Überwindung dieser Resistenzmechanismen ist für die Entwicklung der zielgerichteten Therapie wesentlich.

Marotta et al. (2011) konnten zeigen, dass JAK2/STAT3 in das Wachstum von Mammakarzinom-Stammzellen involviert ist [43]. Die Inhibition von JAK2 führte zur Abnahme der Zellzahl der Mammakarzinom-Stammzellen [43]. Mit Hilfe der DNA-Methylomanalyse

beschrieben auch Hernandez-Vargas et al. (2011) die konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs in Mammakarzinom-Stammzellen mit dem Phänotyp CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> [136]. Ebenso spielt der PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle für das Stammzell-Überleben. Bei Applikation eines PI3K-Inhibitors und eines mTOR-Inhibitors reduzierte dies die Tumorigenität [41]. Ebenso stellten Gargini et al. (2015) fest, dass die Inhibition von PI3K zu einer Verringerung der Populationsgröße von CD44<sup>+</sup>/ CD24<sup>-</sup> -Mammakarzinomzellen führt [137].

Jiménez-García et al. (2017) erhoben die Annahme, dass ebenso PIM in Mammakarzinomen möglicherweise in Prozesse der Selbsterneuerung auf dem Grund einer Entzündungsreaktion verwickelt sind [127]. Die Regulation der Tumorstammzellen erfolgt über inflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6 und IL-8 [127]. Korkaya et al. (2011) beschrieben eine Feedbackschleife zwischen der Freisetzung inflammatorischer Zytokine durch tumorassoziierte Fibroblasten und Makrophagen und der Aktivierung der NF-кB/STAT3-Signaltransduktionskaskade zwecks Neuprogrammierung der Tumorstammzellen [138]. Weitere Annahmen beinhalten die bereits beim Prostatakarzinom beschriebene Phosphorylierung des Stammzellmarkers BCRP/ABCG2 durch PIM1 [139]. Des Weiteren kommt es zu einer Phosphorylierung von OCT4 und MYC durch die PIM-Kinase [140] [141]. Die Gesamtheit dieser Mechanismen, welche in Assoziation zur PIM-Kinase stehen, könnten eine Rolle für die Neuprogrammierung von Mammakarzinom-Stammzellen spielen.

Um die Auswirkungen auf Stammzellebene zu untersuchen, erfolgte ein *Colony formation assay*. Grundlage dieses Tests zur Analyse der Überlebensfähigkeit von Zellen, ist die Eigenschaft der Koloniebildungsfähigkeit. Stammzellen besitzen die Fähigkeit eine Kolonie zu bilden. Die Koloniebildungsfähigkeit wurde bei Kombination der Inhibitoren BSK805 und BYL719 bei der Zelllinie ZR-75 deutlich gehemmt. Ebenso konnte dies für die Kombination BSK805 und LGB321 für die Zelllinien MCF-7, SKBR3 und BT-474 festgestellt werden. Dies wies bei beiden Kombinationsversuchen auf eine Hemmung der Tumorstammzellen durch die jeweilige Inhibitorkombination hin. Die Hemmung der Tumorstammzellen spielt eine Rolle für den beschriebenen Synergismus der kombinierten Inhibition von BSK805 und BYL719 sowie BSK805 und LGB321.

## 4.5 Ausblick

Bedeutsam ist, dass trotz konstitutiver JAK2/STAT3-Aktivierung, der JAK2-Inhibitor BSK805 nur moderate Wirkung auf die Proliferationsinhibition hat. Die durch BSK805 bedingte Feedback-Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionswegs und die ausbleibende Veränderung der PIM-Expression im *Western Blot* könnten Gründe für die limitierte Wirksamkeit von BSK805 gegenüber den Mammakarzinomzelllinien sein. Im MTT-Test konnten für die Kombinationsinkubation mit BYL719 bzw. LGB321 synergistische Effekte auf die Proliferationsinhibition nachgewiesen werden. Eine Rolle für die Wirksamkeit der Kombinationsinkubation könnten die Induktion des Zellzyklus und Apoptose-Prozesse spielen.

Die kombinierte Inhibition von BSK805 mit PI3K-Inhibitor BYL719 bzw. BSK805 und PIM-Inhibitor LGB321 ist vielversprechend. Die klinische Anwendbarkeit sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Im Einzelnen müsste zunächst an weiteren Zellkulturmodellen nachfolgend Tiermodell die tolerable Verabreichungskonzentration bzw. im und Nebenwirkungen untersucht werden. Ebenso sollte der molekulare Mechanismus der Inhibitoren im Detail weiterführend untersucht werden. Des Weiteren sollte das Augenmerk auf mögliche Interaktionen und damit verbunden unerwünschte Nebenwirkungen gerichtet werden. Ein erster Ansatz für die Erweiterung bzw. Veränderung des bisherigen Mammakarzinom-Therapieregimes ist die SOLAR-1-Studie, welche zur Zulassung von BYL719 (Alpelisib) in der Kombination mit Fulvestrant in der Therapie des Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen, PIK3CA-mutierten Mammakarzinoms führte. Doch, wie diese Arbeit zeigt, stünden andere Kombinationspartner für BYL719 zur Verfügung, die man weiter untersuchen sollte [142].

Ein weiteres interessantes Forschungsprojekt wäre die Untersuchung der Resistenzbildung der Mammakarzinomzellen gegenüber dem JAK2-Inhibitor, um anschließend im direkten Vergleich mit nicht resistenten Mammakarzinomzellen den Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose-Induktion zu untersuchen.

Die Erkenntnisse und Schlussfolgerungen dieser Arbeit bestätigen, dass es noch weiteren Forschungsbedarf im Bereich der zielgerichteten Therapien im Mammakarzinom gibt.
## 5 Literaturverzeichnis

1. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M, O'Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS, Investigators A. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. Clin Breast Cancer. 2005;6(5):391-401.

2. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, Jemal A, Siegel RL. Breast cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(6):438-51.

3. Rhiem K, Schmutzler RK. Risikofaktoren und Prävention des Mammakarzinoms. Der Onkologe. 2015;21(3):202-10.

4. Dr. Peter Kaatsch DCS, Prof. Dr. Alexander Katalinic DSH, Dr. Sabine Luttmann, Dr. Mechthild Waldeyer-Sauerland,, Waldmann DA, Monika Christ DJF, Dr. Jutta Hansmann, Dr. Stefanie Klein, Dr. Kristine Kranzhöfer,, Dr. Beatrice Kunz DKM, Dr. Andrea Penzkofer, Dr. Kornelia Treml, Dr. Grit Vollmer,, Dr. Susanne Weg-Remers DBB, Nina Buttmann-Schweiger, Dr. Stefan Dahm, Julia Fiebig, Manuela Franke,, Ina Gurung-Schönfeld DJH, Dr. Klaus Kraywinkel, Dr. Antje Wienecke. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2019.

5. Brufsky AM. Managing postmenopausal women with hormone receptor-positive advanced breast cancer who progress on endocrine therapies with inhibitors of the PI3K pathway. Breast J. 2014;20(4):347-57.

6. Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. Breast Cancer (Auckl). 2015;9(Suppl 1):23-34.

7. Management of Early Breast Cancer. Wellington, NZ New Zealand Guidelines Group (NZGG) 2009.

8. Song Y, Barry WT, Seah DS, Tung NM, Garber JE, Lin NU. Patterns of recurrence and metastasis in BRCA1/BRCA2-associated breast cancers. Cancer. 2020;126(2):271-80.

9. Gujam FJ, Going JJ, Edwards J, Mohammed ZM, McMillan DC. The role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival and methods of detection in patients with primary operable breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2014;89(2):231-41.

10. Voogd AC, Nielsen M, Peterse JL, Blichert-Toft M, Bartelink H, Overgaard M, van Tienhoven G, Andersen KW, Sylvester RJ, van Dongen JA, Danish Breast Cancer Cooperative Group. Breast Cancer Cooperative Group of the European Organization for R, Treatment of C. Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. J Clin Oncol. 2001;19(6):1688-97.

11. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. Breast Care (Basel). 2013;8(2):149-54.

12. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991;19(5):403-10.

13. Tot T, Gere M, Pekar G, Tarjan M, Hofmeyer S, Hellberg D, Lindquist D, Chen TH, Yen AM, Chiu SY, Tabar L. Breast cancer multifocality, disease extent, and survival. Hum Pathol. 2011;42(11):1761-9.

14. Rummel S, Hueman MT, Costantino N, Shriver CD, Ellsworth RE. Tumour location within the breast: Does tumour site have prognostic ability? Ecancermedicalscienc. 2015;9:552.

15. Carpenter RL, Lo HW. Regulation of Apoptosis by HER2 in Breast Cancer. J Carcinog Mutagen. 2013;2013(Suppl 7).

16. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol. 1984;133(4):1710-5.

17. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, Senn HJ. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Annals of Oncology. 2015;26(8):1533-46.

18. Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S, Hagerty KL, Mangu PB, Temin S, Hanna WM. Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2012;20(3):214-63.

19. Setiawan VW, Monroe KR, Wilkens LR, Kolonel LN, Pike MC, Henderson BE. Breast cancer risk factors defined by estrogen and progesterone receptor status: the multiethnic cohort study. Am J Epidemiol. 2009;169(10):1251-9.

20. Ciruelos Gil EM. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer Treat Rev. 2014;40(7):862-71.

21. Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, D'Amico R. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2012(4):CD006243.

22. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. Cancer. 2007;109(9):1721-8.

23. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.

24. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, Klimberg S, Chavez-MacGregor M, Freedman G, Houssami N, Johnson PL, Morrow M, Society of Surgical O, American Society for Radiation O. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. J Clin Oncol. 2014;32(14):1507-15.

25. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet. 2005;365(9472):1687-717.

26. Awan A, Esfahani K. Endocrine therapy for breast cancer in the primary care setting. Curr Oncol. 2018;25(4):285-91.

27. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment. JAMA. 2019;321(3):316.

28. Sambi M, Qorri B, Harless W, Szewczuk MR. Therapeutic Options for Metastatic Breast Cancer. Adv Exp Med Biol. 2019;1152:131-72.

29. Furth PA. STAT signaling in different breast cancer sub-types. Mol Cell Endocrinol. 2014;382(1):612-5.

30. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol. 1998;16:293-322.

31. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. Immunol Rev. 2009;228(1):273-87.

32. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Conboy JG, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ, Jr., Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, Solomon F, Marchesi VT, Tsukita S, Tsukita S, Hoover KB, et al. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. Trends Biochem Sci. 1998;23(8):281-2.

33. Haan C, Is'harc H, Hermanns HM, Schmitz-Van De Leur H, Kerr IM, Heinrich PC, Grotzinger J, Behrmann I. Mapping of a region within the N terminus of Jak1 involved in cytokine receptor interaction. J Biol Chem. 2001;276(40):37451-8.

34. Ferrao R, Lupardus PJ. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK-Receptor Interactions. Front Endocrinol (Lausanne). 2017;8:71.

35. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. Nat Rev Immunol. 2003;3(11):900-11.

36. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. Mol Biosyst. 2006;2(11):536-50.

37. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol. 2005;5(5):375-86.

38. Bohmer FD, Friedrich K. Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. JAKSTAT. 2014;3(1):e28087.

39. Fernandez-Perez L, Guerra B, Diaz-Chico JC, Flores-Morales A. Estrogens regulate the hepatic effects of growth hormone, a hormonal interplay with multiple fates. Front Endocrinol (Lausanne). 2013;4:66.

40. Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. Biomed Res Int. 2013;2013:421821.

41. Zhou J, Wulfkuhle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, Margolick JB, Liotta LA, Petricoin E, 3rd, Zhang Y. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(41):16158-63.

42. Ren S, Cai HR, Li M, Furth PA. Loss of Stat5a delays mammary cancer progression in a mouse model. Oncogene. 2002;21(27):4335-9.

43. Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, Bloushtain-Qimron N, Kim JJ, Choudhury SA, Maruyama R, Wu Z, Gonen M, Mulvey LA, Bessarabova MO, Huh SJ, Silver SJ, Kim SY, Park SY, Lee HE, Anderson KS, Richardson AL, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Liu XS, Root DE, Hahn WC, Frank DA, Polyak K. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. J Clin Invest. 2011;121(7):2723-35.

44. Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Paterini P, Marcu KB, Chieco P, Bonafe M. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. J Clin Invest. 2007;117(12):3988-4002.

45. Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. Oncogene. 2001;20(20):2499-513.

46. Barrett MT, Anderson KS, Lenkiewicz E, Andreozzi M, Cunliffe HE, Klassen CL, Dueck AC, McCullough AE, Reddy SK, Ramanathan RK, Northfelt DW, Pockaj BA. Genomic amplification of 9p24.1 targeting JAK2, PD-L1, and PD-L2 is enriched in high-risk triple negative breast cancer. Oncotarget. 2015;6(28):26483-93.

47. Karim S, Malik IR, Nazeer Q, Zaheer A, Farooq M, Mahmood N, Malik A, Asif M, Mehmood A, Khan AR, Jabbar A, Arshad M, Yousafi Q, Hussain A, Mirza Z, Iqbal MA, Rasool M. Molecular analysis of V617F mutation in Janus kinase 2 gene of breast cancer patients. Saudi J Biol Sci. 2019;26(6):1123-8.

48. Kontzias A, Kotlyar A, Laurence A, Changelian P, O'Shea JJ. Jakinibs: a new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease. Curr Opin Pharmacol. 2012;12(4):464-70.

49. Stover DG, Gil Del Alcazar CR, Brock J, Guo H, Overmoyer B, Balko J, Xu Q, Bardia A, Tolaney SM, Gelman R, Lloyd M, Wang Y, Xu Y, Michor F, Wang V, Winer EP, Polyak K, Lin NU. Phase II study of ruxolitinib, a selective JAK1/2 inhibitor, in patients with metastatic triple-negative breast cancer. NPJ Breast Cancer. 2018;4:10.

50. Kim JW, Gautam J, Kim JE, Kim JA, Kang KW. Inhibition of tumor growth and angiogenesis of tamoxifen-resistant breast cancer cells by ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor. Oncol Lett. 2019;17(4):3981-9.

51. Balko JM, Schwarz LJ, Luo N, Estrada MV, Giltnane JM, Davila-Gonzalez D, Wang K, Sanchez V, Dean PT, Combs SE, Hicks D, Pinto JA, Landis MD, Doimi FD, Yelensky R, Miller VA, Stephens PJ, Rimm DL, Gomez H, Chang JC, Sanders ME, Cook RS, Arteaga CL. Triple-negative breast cancers with amplification of JAK2 at the 9p24 locus demonstrate JAK2-specific dependence. Science Translational Medicine. 2016;8(334).

52. Baffert F, Regnier CH, De Pover A, Pissot-Soldermann C, Tavares GA, Blasco F, Brueggen J, Chene P, Drueckes P, Erdmann D, Furet P, Gerspacher M, Lang M, Ledieu D, Nolan L, Ruetz S, Trappe J, Vangrevelinghe E, Wartmann M, Wyder L, Hofmann F, Radimerski T. Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805. Mol Cancer Ther. 2010;9(7):1945-55.

53. Perez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjold B, Rutqvist LE, Skoog L, Stal O. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(12):3577-84.

54. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(8):627-44.

55. Tenhagen M, van Diest PJ, Ivanova IA, van der Wall E, van der Groep P. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects, and possible drug targets. Endocr Relat Cancer. 2012;19(4):R115-29.

56. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature. 2006;441(7092):424-30.

57. Jimenez C, Hernandez C, Pimentel B, Carrera AC. The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. J Biol Chem. 2002;277(44):41556-62.

58. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene. 2008;27(41):5497-510.

59. Santi SA, Douglas AC, Lee H. The Akt isoforms, their unique functions and potential as anticancer therapeutic targets. Biomol Concepts. 2010;1(5-6):389-401.

60. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 1997;91(2):231-41.

61. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science. 1998;282(5392):1318-21.

62. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science. 1991;253(5022):905-9.

63. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr Biol. 2004;14(14):1296-302.

64. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(12):988-1004.

65. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell. 2017;169(2):361-71.

66. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. Curr Opin Pharmacol. 2008;8(4):393-412.

67. Xu F, Na L, Li Y, Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. Cell Biosci. 2020;10:54.

68. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstrom PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. Cancer Res. 2005;65(7):2554-9.

69. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. Breast Cancer (Dove Med Press). 2015;7:111-23.

70. Lee JJ, Loh K, Yap YS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. Cancer Biol Med. 2015;12(4):342-54.

71. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. Oncogene. 2007;26(9):1338-45.

72. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. Annu Rev Pathol. 2009;4:127-50.

73. Li ST, Shen YW, Wang MY, Yang J, Lv M, Li P, Chen ZL, Yang J. Loss of PTEN expression in breast cancer: association with clinicopathological characteristics and prognosis. Oncotarget. 2017;8(19):32043-54.

74. DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grunwald V, Ray RB, Hidalgo M. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. Ann Oncol. 2004;15(10):1510-6.

75. Elkabets M, Vora S, Juric D, Morse N, Mino-Kenudson M, Muranen T, Tao J, Campos AB, Rodon J, Ibrahim YH, Serra V, Rodrik-Outmezguine V, Hazra S, Singh S, Kim P, Quadt C, Liu M, Huang A, Rosen N, Engelman JA, Scaltriti M, Baselga J. mTORC1 inhibition is required for sensitivity to PI3K p110alpha inhibitors in PIK3CA-mutant breast cancer. Sci Transl Med. 2013;5(196):196ra99.

76. Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, Conte P, Mayer IA, Kaufman B, Yamashita T, Lu YS, Inoue K, Takahashi M, Papai Z, Longin AS, Mills D, Wilke C, Hirawat S, Juric D, Group S-S. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. N Engl J Med. 2019;380(20):1929-40.

77. Furet P, Guagnano V, Fairhurst RA, Imbach-Weese P, Bruce I, Knapp M, Fritsch C, Blasco F, Blanz J, Aichholz R, Hamon J, Fabbro D, Caravatti G. Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. Bioorg Med Chem Lett. 2013;23(13):3741-8.

78. FDA approves alpelisib for metastatic breast cancer Food and Drug Administration2019 [updated 2019-05-28. Available from: https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-alpelisib-metastatic-breast-cancer.

79. Brault L, Gasser C, Bracher F, Huber K, Knapp S, Schwaller J. PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. Haematologica. 2010;95(6):1004-15.

80. Cuypers HT, Selten G, Quint W, Zijlstra M, Maandag ER, Boelens W, van Wezenbeek P, Melief C, Berns A. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. Cell. 1984;37(1):141-50.

81. Bachmann M, Moroy T. The serine/threonine kinase Pim-1. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(4):726-30.

82. Matikainen S, Sareneva T, Ronni T, Lehtonen A, Koskinen PJ, Julkunen I. Interferonalpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, cmyc, and pim-1 genes in human T cells. Blood. 1999;93(6):1980-91.

83. Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A. The PIM family of serine/threonine kinases in cancer. Med Res Rev. 2014;34(1):136-59.

84. Zhang X, Song M, Kundu JK, Lee MH, Liu ZZ. PIM Kinase as an Executional Target in Cancer. J Cancer Prev. 2018;23(3):109-16.

85. Braso-Maristany F, Filosto S, Catchpole S, Marlow R, Quist J, Francesch-Domenech E, Plumb DA, Zakka L, Gazinska P, Liccardi G, Meier P, Gris-Oliver A, Cheang MC, Perdrix-Rosell A, Shafat M, Noel E, Patel N, McEachern K, Scaltriti M, Castel P, Noor F, Buus R, Mathew S, Watkins J, Serra V, Marra P, Grigoriadis A, Tutt AN. PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer. Nat Med. 2016;22(11):1303-13.

86. Zhang Y, Wang Z, Li X, Magnuson NS. Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation. Oncogene. 2008;27(35):4809-19.

87. Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, Chandriani S, Lenburg ME, Gonzalez-Angulo AM, Creasman KJ, Bazarov AV, Smyth JW, Davis SE, Yaswen P, Mills GB, Esserman LJ, Goga A. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. J Exp Med. 2012;209(4):679-96.

88. Wang Z, Bhattacharya N, Mixter PF, Wei W, Sedivy J, Magnuson NS. Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. Biochim Biophys Acta. 2002;1593(1):45-55.

89. Morishita D, Katayama R, Sekimizu K, Tsuruo T, Fujita N. Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. Cancer Res. 2008;68(13):5076-85.

90. Ciarallo S, Subramaniam V, Hung W, Lee JH, Kotchetkov R, Sandhu C, Milic A, Slingerland JM. Altered p27(Kip1) phosphorylation, localization, and function in human epithelial cells resistant to transforming growth factor beta-mediated G(1) arrest. Mol Cell Biol. 2002;22(9):2993-3002.

91. Santio NM, Landor SKJ, Vahtera L, Yla-Pelto J, Paloniemi E, Imanishi SY, Corthals G, Varjosalo M, Manoharan GB, Uri A, Lendahl U, Sahlgren C, Koskinen PJ. Phosphorylation of

Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells. Oncotarget. 2016;7(28):43220-38.

92. Macdonald A, Campbell DG, Toth R, McLauchlan H, Hastie CJ, Arthur JS. Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. BMC Cell Biol. 2006;7:1.

93. Tursynbay Y, Zhang J, Li Z, Tokay T, Zhumadilov Z, Wu D, Xie Y. Pim-1 kinase as cancer drug target: An update. Biomed Rep. 2016;4(2):140-6.

94. Qian KC, Studts J, Wang L, Barringer K, Kronkaitis A, Peng C, Baptiste A, LaFrance R, Mische S, Farmer B. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of human Pim-1 kinase. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2005;61(Pt 1):96-9.

95. Garcia PD, Langowski JL, Wang Y, Chen M, Castillo J, Fanton C, Ison M, Zavorotinskaya T, Dai Y, Lu J, Niu XH, Basham S, Chan J, Yu J, Doyle M, Feucht P, Warne R, Narberes J, Tsang T, Fritsch C, Kauffmann A, Pfister E, Drueckes P, Trappe J, Wilson C, Han W, Lan J, Nishiguchi G, Lindvall M, Bellamacina C, Aycinena JA, Zang R, Holash J, Burger MT. Pan-PIM kinase inhibition provides a novel therapy for treating hematologic cancers. Clin Cancer Res. 2014;20(7):1834-45.

96. Riaz M, van Jaarsveld MT, Hollestelle A, Prager-van der Smissen WJ, Heine AA, Boersma AW, Liu J, Helmijr J, Ozturk B, Smid M, Wiemer EA, Foekens JA, Martens JW. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. Breast Cancer Res. 2013;15(2):R33.

97. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell. 2006;10(6):515-27.

98. Hollestelle A, Nagel JH, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, Ng SS, French PJ, Peeters JK, Rozendaal MJ, Riaz M, Koopman DG, Ten Hagen TL, de Leeuw BH, Zwarthoff EC, Teunisse A, van der Spek PJ, Klijn JG, Dinjens WN, Ethier SP, Clevers H, Jochemsen AG, den Bakker MA, Foekens JA, Martens JW, Schutte M. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat. 2010;121(1):53-64.

99. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, Minna JD, Pollack JR. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. PLoS One. 2009;4(7):e6146.

100. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011;731:237-45.

101. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc. 2006;1(5):2315-9.

102. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(9):4350-4.

103. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul. 1984;22:27-55.

104. Chung SS, Giehl N, Wu Y, Vadgama JV. STAT3 activation in HER2-overexpressing breast cancer promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell traits. Int J Oncol. 2014;44(2):403-11.

105. Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. Int J Cancer. 2016;138(11):2570-8.

106. Belsches-Jablonski AP, Biscardi JS, Peavy DR, Tice DA, Romney DA, Parsons SJ. Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. Oncogene. 2001;20(12):1465-75.

107. Shah D, Osipo C. Cancer stem cells and HER2 positive breast cancer: The story so far. Genes Dis. 2016;3(2):114-23.

108. Bogani C, Bartalucci N, Martinelli S, Tozzi L, Guglielmelli P, Bosi A, Vannucchi AM, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro AGIMM. mTOR inhibitors alone and in combination with JAK2 inhibitors effectively inhibit cells of myeloproliferative neoplasms. PLoS One. 2013;8(1):e54826.

109. Britschgi A, Andraos R, Brinkhaus H, Klebba I, Romanet V, Muller U, Murakami M, Radimerski T, Bentires-Alj M. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. Cancer Cell. 2012;22(6):796-811.

110. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res. 2010;70(2):440-6.

111. Brachmann SM, Hofmann I, Schnell C, Fritsch C, Wee S, Lane H, Wang S, Garcia-Echeverria C, Maira SM. Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(52):22299-304.

112. Patra S, Young V, Llewellyn L, Senapati JN, Mathew J. BRAF, KRAS and PIK3CA Mutation and Sensitivity to Trastuzumab in Breast Cancer Cell Line Model. Asian Pac J Cancer Prev. 2017;18(8):2209-13.

113. Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. Cell Mol Life Sci. 2002;59(8):1317-26.

114. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J. 1992;11(3):961-71.

115. Yam CH, Ng RW, Siu WY, Lau AW, Poon RY. Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2. Mol Cell Biol. 1999;19(1):635-45.

116. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. Cell. 1991;67(6):1169-79.

117. Husdal A, Bukholm G, Bukholm IR. The prognostic value and overexpression of cyclin A is correlated with gene amplification of both cyclin A and cyclin E in breast cancer patient. Cell Oncol. 2006;28(3):107-16.

118. Maddika S, Ande SR, Wiechec E, Hansen LL, Wesselborg S, Los M. Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis. J Cell Sci. 2008;121(Pt 7):979-88.

119. King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. Cell. 1994;79(4):563-71.

120. Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. Int J Biochem Cell Biol. 1997;29(4):559-73.

121. Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. Science. 1992;257(5078):1958-61.

122. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. Cancer Cell. 2006;9(5):351-65.

123. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. Cancer Cell. 2002;2(3):183-92.

124. Warfel NA, Kraft AS. PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. Pharmacol Ther. 2015;151:41-9.

125. Gao X, Liu X, Lu Y, Wang Y, Cao W, Liu X, Hu H, Wang H. PIM1 is responsible for IL-6-induced breast cancer cell EMT and stemness via c-myc activation. Breast Cancer. 2019;26(5):663-71.

126. Zhu N, Ramirez LM, Lee RL, Magnuson NS, Bishop GA, Gold MR. CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. J Immunol. 2002;168(2):744-54.

127. Jimenez-Garcia MP, Lucena-Cacace A, Robles-Frias MJ, Ferrer I, Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A. Inflammation and stem markers association to PIM1/PIM2 kinase-induced tumors in breast and uterus. Oncotarget. 2017;8(35):58872-86.

128. Nihira K, Ando Y, Yamaguchi T, Kagami Y, Miki Y, Yoshida K. Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65. Cell Death Differ. 2010;17(4):689-98.

129. Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Muramatsu T, Asai A, Kuchino Y. Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. J Biol Chem. 1999;274(26):18659-66.

130. Goldstone S, Pavey S, Forrest A, Sinnamon J, Gabrielli B. Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. Oncogene. 2001;20(8):921-32.

131. Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. FEBS Lett. 2004;571(1-3):43-9.

132. Mazzacurati L, Lambert QT, Pradhan A, Griner LN, Huszar D, Reuther GW. The PIM inhibitor AZD1208 synergizes with ruxolitinib to induce apoptosis of ruxolitinib sensitive and resistant JAK2-V617F-driven cells and inhibit colony formation of primary MPN cells. Oncotarget. 2015;6(37):40141-57.

133. Safa AR. Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells. Crit Rev Oncog. 2016;21(3-4):203-19.

134. He YC, Zhou FL, Shen Y, Liao DF, Cao D. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. Int J Mol Sci. 2014;15(5):8335-51.

135. Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I, Ochiya T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. Int J Mol Sci. 2017;18(12).

136. Hernandez-Vargas H, Ouzounova M, Le Calvez-Kelm F, Lambert MP, McKay-Chopin S, Tavtigian SV, Puisieux A, Matar C, Herceg Z. Methylome analysis reveals Jak-STAT pathway deregulation in putative breast cancer stem cells. Epigenetics. 2011;6(4):428-39.

137. Gargini R, Cerliani JP, Escoll M, Anton IM, Wandosell F. Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway. Stem Cells. 2015;33(3):646-60.

138. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. J Clin Invest. 2011;121(10):3804-9.

139. Xie Y, Xu K, Linn DE, Yang X, Guo Z, Shimelis H, Nakanishi T, Ross DD, Chen H, Fazli L, Gleave ME, Qiu Y. The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. J Biol Chem. 2008;283(6):3349-56.

140. Xie Y, Bayakhmetov S. PIM1 kinase as a promise of targeted therapy in prostate cancer stem cells. Mol Clin Oncol. 2016;4(1):13-7.

141. Brumbaugh J, Hou Z, Russell JD, Howden SE, Yu P, Ledvina AR, Coon JJ, Thomson JA. Phosphorylation regulates human OCT4. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(19):7162-8.

142. Andre F, Mills D, Taran T. Alpelisib for PIK3CA-Mutated Advanced Breast Cancer. Reply. N Engl J Med. 2019;381(7):687.

## 6 Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Laura Barbara Bax, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Hemmung des JAK/STAT3-Pathways mit JAK-Inhibitoren in Mammakarzinomen" "Inhibition of the JAK/STAT3 pathway with JAK inhibitors in breast carcinomas." selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.og) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Unterschrift

## 7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Jan Eucker für die Überlassung des Forschungsthemas dieser Dissertation bedanken. Die Anfertigung meiner wissenschaftlichen Arbeit mit dem Titel "mTOR-Inhibitoren beim Mammakarzinom" unter der Betreuung von Dr. Jan Eucker im Rahmen des Moduls Wissenschaftliches Arbeiten II meines Medizinstudiums war der Grundstein für mein Interesse für das Themengebiet der experimentellen Forschung in der Onkologie. Dr. Jan Eucker hat mich stets tatkräftig im Prozess des Entstehens dieser Dissertation mit seinen konstruktiven Anregungen und Anmerkungen unterstützt. Seine Verlässlichkeit und sein Engagement haben mir sehr in der Anfertigung der Dissertation geholfen.

Überdies geht ein aufrichtiges Dankeschön an Dr. rer. nat. Chuanbing Zang und Dr. rer. nat. Hongyu Liu, die mich an das experimentelle Arbeiten im Labor herangeführt haben und mich auf meinen Weg durch die vielen Stunden im Labor begleitet haben. Durch sie habe ich die Methodiken des experimentellen Arbeitens und Forschens erlernt. Zu jeder Zeit hatten sie ein offenes Ohr und viele nützliche Ideen und Verbesserungsvorschläge.

Besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Familie, meinen Eltern Egbert und Michaela Bax und meiner Schwester Julia Bax danken für die Ermöglichung meines Medizinstudiums, ihre Zuneigung und Unterstützung. Sie standen stets an meiner Seite und schenkten mir Kraft. Sie halfen mir mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren ohne Leistungsdruck, sondern geprägt von Verständnis und Zuwendung.

Meinem Freund Valentin Kießling möchte ich insbesondere für seine Geduld danken und dass er viele Stunden mit unserer gemeinsamen Tochter Clara verbracht hat, was es mir möglich machte, mit viel Ruhe und Konzentration an meiner Dissertation arbeiten zu können. Das hat mich immer wieder aufgebaut und ermutigt.

Weiterhin möchte ich auch allen weiteren Familienmitgliedern und Freunden danken, welche sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit zu lesen.