# Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

# Der PI3K- Signalweg als therapeutische Zielstruktur von Leiomyosarkomen - Präklinische Validierung mithilfe humaner Xenograftmodelle

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Steven Knospe
Tierarzt aus Frankfurt (Oder)

Berlin 2019 Journal-Nr.: 4114

# Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

# Der PI3K- Signalweg als therapeutische Zielstruktur von Leiomyosarkomen - Präklinische Validierung mithilfe humaner Xenograftmodelle

#### Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Steven Knospe** 

Tierarzt aus Frankfurt (Oder)

Berlin 2019 Journal-Nr.: 4114 Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Bauer

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): leiomyosarcoma, kinases, cell culture, xenografts, transfection, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 01.03.2019

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <a href="https://dnb.de">https://dnb.de</a> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-963-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019
Dissertation, Freie Universität Berlin
D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

Diese Arbeit widme ich meiner Familie und meiner Freundin Katja.

#### Inhaltsverzeichnis

1	Einle	itung	1
	1.1 I	_eiomyosarkome	1
	1.2	Fumorgrading	2
	1.3	Atiologie und Diagnostik	3
	1.4 Ū	Überblick zum aktuellen Behandlungsregime von Leiomyosarkom- Patienten	4
		Die PI3-Kinase als therapeutische Zielstruktur	
		Aktivierung des PI3K Signalweges in Leiomyosarkomen	
		PI3K-Isoformen	
		Ablauf der PI3K-Signalkaskade	
		Dysregulationen des PI3K-Signalweges	
	1.9.1	• •	
	1.9.2		
	1.9.3	Veränderungen weiterer Bestandteile des PI3K-Signalweges	
	1.10	PI3K-Inhibitoren in der modernen Krebstherapie	
	1.10	Quervernetzungen mit anderen Signalwegen	
	1.11	Ziele der vorliegenden Arbeit	
2		oden und Material	
2			
		Material	
	2.1.1	Antikörper	
	2.1.2	Chemikalien	
	2.1.3	Gebrauchslösungen	
	2.1.4	Geräte	
	2.1.5	Inhibitoren	
	2.1.6	Verbrauchsmaterial	
	2.1.7	Zellen	
	2.2 N	Methoden	
	2.2.1	Zellkultur	
	2.2.2	Zytotoxizitätsbestimmungen	
	2.2.3	Proteinanalysen	29
	2.2.4	Lentivirale Transfektion	31
	2.2.5	Xenograftversuche	32
	2.2.6	Isobologramm	34
	2.2.7	PCR	
	2.2.8	Zellzyklusbestimmung	
3		onisse	
_		Zellcharakterisierung	38
		Überblick der ausgewählten Inhibitoren	
		nhibition von PI3Kα bei Leiomyosarkom-Zelllinien	
		nhibition von mTOR bei Leiomyosarkom-Zelllinien	
		PI3K- und mTOR-Inhibitoren zeigen keine Kombinationseffekte	
		Stärkere Effekte durch duale PI3K/mTOR-Inhibition	
		Intersuchung des additiven Effektes von MAPK Inhibitoren in Kombination mit	43
		isib	40
		Kenograftversuche	
	3.8.1	Subkutanes Engraftment	
	3.8.2	Etablierung Nierenkapselmodell	
	3.8.3	In-vivo-Therapie	
4		assion	
5		mmenfassung	
6		nary	
7		aturverzeichnis	
8		rzungsverzeichnis	
9	Publi	kationsverzeichnis	79
1(	) Dank	sagung	80

#### 1 Einleitung

#### 1.1 Leiomyosarkome

Leiomyosarkome (LMS) sind maligne, mesenchymale Neoplasien, die eine glattmuskuläre Differenzierung aufweisen, die mit einem Anteil von 10 - 20% aller bösartigen Weichgewebstumoren zu den häufigsten Sarkomsubtypen gehören [1, 2].

Analog zu vielen anderen Sarkomen zeigen Leiomyosarkomzellen mikroskopisch eine spindelzellige Morphologie. Makroskopisch sind sie von vielfältiger Gestalt und Größe. An der Schnittfläche weisen sie meist eine graue bis weißbraune Färbung auf.

Primär Leiomyosarkome lassen sich bei geschlechtsunspezifischer Betrachtung in drei lokalisierte Gruppen einteilen. Diese sind in der Subkutis bzw. den tiefen Außerdem Weichgewebsschichten finden. existieren abdominal lokalisierte zu Leiomyosarkome und Tumoren mit vaskulärem Ursprung [3].

Prinzipiell ist die Entstehung von Leiomyosarkomen an allen Lokalisationen des Körpers möglich. Allerdings stellen in absteigender Häufigkeit das Retroperitoneum, die Extremitäten und der Uterus die häufigsten Primärtumorregionen dar. [4]

Geschlechterspezifische Betrachtungen betroffener Patienten legen die Wichtigkeit des uterinen Leiomyosarkom bei der Frau nahe. Dieses verursacht 40% aller vorliegenden glattmuskulären Sarkome der Frau [5]. Werden alle neoplastischen Veränderungen des Uterus betrachtet, so nimmt unter den Sarkomen das Leiomyosarkom einen Anteil von 60 - 70% ein [6]. Einer norwegischen Studie zur Folge liegt die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit einem uterinen Leiomyosarkome im Stadium I bei 51% und schon im Stadium II nur noch bei 25% [7].

Ähnliche Überlebensraten finden sich jedoch auch bei Leiomyosarkome in anderen Lokalisationen, so etwa bei den weitaus seltener auftretenden Leiomyosarkomen des vaskulären Systems.

Vaskuläre Leiomyosarkome bilden nur einen Anteil von 2% aller diagnostizierter Leiomyosarkomfälle [8]. Den Ausgangspunkt bildet die Gefäßmedia großer Blutgefäße, wobei das venöse System häufiger betroffen ist als das arterielle System. Die Vena cava inferior zählt mit 60% aller auftretenden Fälle zu den meist betroffenen Lokalisationen vaskulärer

Leiomyosarkome im menschlichen Körper. Selbst nach kurativer Resektion des Primärtumors liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 28% [9].

#### 1.2 Tumorgrading

Für die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Leiomyosarkomen kann die TNM-Klassifikation der Union internationale contre le cancer (UICC) herangezogen werden (Tab. 1). Hierzu wird die histologische Graduierung nach FNCLCC (nach Coindre), die in 3 Bösartigkeitsstufungen graduiert (G1 bis G3), sowie die anatomische Primärlokalisation und die Größe als Berechnungsgrundlage verwendet. (Tab. 2).

Gradeinteilung/TNM Nomenklatur	Erläuterung				
G1	low grade				
G2	high grade				
G3	high grade				
T1	Tumoren mit einem Durchmesser von 5cm oder weniger				
Т2	Tumoren mit einem Durchmesser von mehr als 5cm, aber weniger als 10cm				
Т3	Tumoren mit einem Durchmesser von mehr als 10cm, aber weniger als 15cm				
T4	Tumoren größer als 15cm				
NX	Untersuchung der Lymphknoten nicht möglich				
N0	Keine Lymphknotenmetastasen				
N1	Lymphknotenmetastasen				
M0	Keine Fernmetastasen				
M1	Fernmetastasen				

Tabelle 1: Tumorgrading und TNM-System des American Joint Committee on Cancer for Soft-Tissue Sarcoma (AJCC). Modifiziert nach [10].

Stadieneinteilung	Merkmale
IA	T1, N0, M0, G1
IB	T2, T3, T4, N0, M0, G1
II	T1, N0, M0, G2, G3
IIIA	T2, N0, M0, G2, G3
IIIB	T3, T4, N0, M0, G2, G3
IIIB	Jedes T, N1, M0, Jedes G
IV	Jedes T, Jedes N, M1, Jedes G

Tabelle 2: Stadieneinteilung von Sarkomen anhand des TNM-Systems. Modifiziert nach [10].

#### 1.3 Ätiologie und Diagnostik

Der Großteil aller Patienten, die an Leiomyosarkomen erkranken haben sporadische Tumoren. Umweltfaktoren wie z.B. Ernährung oder Genussmittel, sind nicht mit einem erhöhten Auftreten von Sarkomen assoziiert, allerdings können Leiomyosarkome als post-radiogene Tumorerkrankungen auftreten [11]. Zudem bestehen einige seltene genetische Prädispositionen, wie das Li-Fraumeni-Syndrom, aber auch Keimbahnmutationen des Retinoblastom-Gens. Retinoblastom-Patienten weisen ein erhöhtes Risiko auf, im Laufe ihres Lebens an einem Sarkom zu erkranken. In diesem Patientenkreis wird am häufigsten ein Leiomyosarkom diagnostiziert [12]. Es konnte gezeigt werden, dass auch andere Faktoren, wie etwa eine Immunsuppression, die Entstehung von Sarkomen begünstigen kann. Das häufigste Sarkom bei HIV infizierten Menschen und bei Organspendeempfängern ist das Leiomyosarkom. Außerdem zeigt sich eine hochgradige Assoziation zwischen einer HIV-Infektion und einer zusätzlichen Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus bei der Entstehung von Leiomyosarkomen. [13]

Aufgrund der meist tief gelegenen Primärtumorlokalisationen und des Fehlens einer B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust) können Leiomyosarkome teilweise eine enorme Größe aufweisen, bevor sie diagnostiziert werden. Die durchschnittliche Größe eines Primärtumors zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beträgt etwa acht Zentimeter. Der Schwankungsbereich variiert zwischen 0,7cm und 30cm und zeigt eine Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors [14].

Korrespondierend mit der Tumorgröße verhalten sich die durchschnittlichen Überlebenszeiten betroffener Patienten. Enorme Größen erreichen dabei abdominale Leiomyosarkome, da sie aufgrund ihrer Lage in der Regel zu einem späteren Zeitpunkt diagnostiziert werden als extraabdominale Neoplasien. Speziell uterine Leiomyosarkome zeichnen sich durch ein aggressives Wachstum aus. Alle diese Faktoren tragen dazu bei, dass abdominelle Leiomyosarkome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in den meisten Fällen bereits Metastasen gebildet haben. [4]

Die häufigsten Metastasierungsorte sind an erster Stelle die Lunge, gefolgt vom Peritoneum, den Knochen und der Leber [15]. Entsprechend wird zur Ausbreitungsdiagnostik nur ein CT-Thorax und CT-Abdomen durchgeführt.

Betrachtet man die 5-Jahres-Überlebensraten von Sarkompatienten im Stadium I, II, III und IV, so liegen diese entsprechend bei 86%, 72%, 52% und 10% - 20% [10]. Die durchschnittliche Überlebenszeit betroffener Patienten beträgt 54 Monaten bei uterinen Leiomyosarkomen und bis zu 71 Monaten bei nicht uterinen Leiomyosarkomen. [16]

# 1.4 Überblick zum aktuellen Behandlungsregime von Leiomyosarkom-Patienten

Die aktuelle Behandlung von Patienten mit Leiomyosarkomen fußt auf drei Säulen, bestehend aus chirurgischer Resektion, Strahlen- und Chemotherapie.

Primäre Leiomyosarkome sind hochmaligne Neoplasien, die in 3 von 4 Fällen als *high-grade* Tumoren eingestuft werden und mit einer Häufigkeit von 73% ein tiefgelegenes (unter Einbeziehung der Faszie, unterhalb der Faszie oder intraabdominell/intrathorakal) Wachstum zeigen. Bei einer chirurgischen Resektion von Leiomyosarkomen stellen die Größe des Tumors und der Resektionsstatus die wichtigsten prognostischen Faktoren für das Auftreten eines Lokalrezidivs dar [17]. Bezüglich des Risikos von Fernmetastasen kommt der Größe und dem *Grading* des Tumors jeweils ein unabhängiger prognostischer Wert zu. Rezidive, sei es lokaler oder metastatischer Art, können in einem Zeitraum von bis zu 10 Jahren nach Erstresektion auftreten. [17]

Bei lokalisierten Leiomyosarkomen ist eine komplette Resektion des Primärtumors die zentrale Säule der Behandlung. Bei Patienten mit high-grade Leiomyosarkomen, insbesondere im Bereich der Extremitäten, erfolgt im Anschluss in aller Regel noch eine postoperative Strahlentherapie. Bei Patienten mit uterinem Leiomyosarkom kommt dies allerdings nur bei Überschreiten der Uteruskapsel, lokoregionär fortgeschrittener Tumoren in Betracht [18]. Es deutet sich für die Beckensarkome eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten (71% mit Bestrahlung vs. 52% mit alleiniger chirurgischer Therapie) an, möglicherweise aufgrund der meist krankheitsbestimmenden Rolle der Lokalrezidive in dieser Lokalisation (geringere lokale Rezidivquoten (39% ST vs. 77% ohne ST)) [19]. Bei Patienten mit fehlender operativer Behandlungsoption kann eine Strahlentherapie auch im Sinne einer definitiven Bestrahlung als kurative Behandlungsoption eingesetzt werden [20].

Der Stellenwert der systemischen Chemotherapie ist für Patienten mit lokalisierten Tumoren bislang nicht gut definiert [21]. Randomisierte neoadjuvante oder adjuvante Therapiestudien haben ausschließlich gemischte Patientenkollektive untersucht, so dass die Leiomyosarkom-Subgruppen-Analyse keine abschließende Beurteilung erlaubt [21]. Vor dem Hintergrund des hohen Metastasenrisikos kann jedoch, basierend auf den Daten für die Gruppe der Sarkome als Ganzes eine adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie erwogen werden. Aufgrund der anzunehmenden relativ geringen Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate (11% nach der SMAC-Meta-Analyse) erfolgt dies in der Regel im Rahmen eines "Shared-Decision-Making" gemeinsam mit dem Patienten [22]. Therapeutisch kommen dabei in erster Linie Doxorubicin in Kombination mit Ifosfamid oder in Kombination mit Dacarbazin in Betracht. In der metastasierten Situation stehen mit Gemcitabine und Gemcitabine in Kombination mit Docetaxel oder Dacarbazin auch noch Pazopanib und Trabectedin zur Verfügung [23-25].

Zeigen die Neoplasien eine primär schlechte Ansprechbarkeit auf die Chemotherapeutika oder handelt es sich um eine sekundär erworbene Resistenz, so steht als *second-line* Therapie Trabectedin zur Verfügung. Dieses zeigt eine besonders hohe Wirkung bei Leiomyo- und Liposarkomen [26]. Ob und in welchem Rahmen jedoch betroffene Patienten von einer konventionellen Chemotherapie profitieren, bleibt weiterhin ungeklärt. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass der Einsatz von Chemotherapeutika jedoch ein eher geringes Potential der Behandlungsverbesserung besitzt [27-29].

#### 1.5 Die PI3-Kinase als therapeutische Zielstruktur

Patienten mit Leiomyosarkomen weisen auf klassische chemotherapeutische Therapien häufig nur eine mäßige Empfindlichkeit auf. Für Krebserkrankungen im Allgemeinen konnten eine Vielzahl heterogener aktivierender Mutationen nachgewiesen werden, die aber zur Aktivierung weniger gemeinsamer Signalendstrecken führen ("hallmarks of cancer") [30].

Eine vielversprechende Zielstruktur für die antitumorale Therapie scheint unter anderem der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg zu sein, welcher in den letzten Jahren bei vielen Krebserkrankungen als relevante therapeutische Signalkaskade identifiziert und untersucht wurde. Zu den sogenannten *Hot Spot*-Mutationen zählt unter anderem eine Veränderung in der p110α-Untereinheit der PI3-Kinase. Diese Mutation ist die zweithäufigste in der humanen Onkologie diagnostizierte Aberration und führt zu einer Hyperaktivierung der PI3K-Signalkaskade. Daneben haben Verluste von Tumorsuppressoren einen ähnlich proproliferativen Effekt. Am häufigsten ist davon der Tumorsuppressor PTEN betroffen. Ein Verlust und eine damit einhergehende konstitutive Aktivierung des Signalweges konnten in 30-40% aller humanen Neoplasien nachgewiesen werden (Tab. 3). Auch andere Proteine, die nicht direkt in die PI3K-Signalkaskade eingebunden sind, können zu einer pathologischen Hyperaktivierung beitragen. Eine Mutation des TSC1/TSC2-Komplex führt auf diese Weise zu einer konstitutiven mTOR-Aktivierung [30].

Tumor	PIK3CA Mutationen	PTEN Inaktivierungen	
Brustkarzinom	18 - 40%	20 - 33%	
Kolonkarzinom	14 - 32%	13 - 54%	
Hepatozelluläres Karzinom	6 - 36%	5%	
<b>Endometriales Karzinom</b>	22%	42 - 54%	
Melanom	9%	40 - 50%	
Glioblastom	6 - 27%	20%	

Tabelle 3: Prozentuale Aberration von PI3K und PTEN in ausgewählten Tumorarten [30].

Die Relevanz als therapeutisch adressierbaren Signalweg erkannte man bereits im Jahr 1960, in dem es zum ersten Mal gelang, Rapamycin aus Streptomyces hygroscopicus zu isolieren. Rapamycin wirkt als natürlicher Inhibitor von mTOR, einem Protein, welches eine zentrale Stellung in der PI3K- Signalkaskade einnimmt [30]. Zu Beginn des klinischen Einsatzes wurde Rapamycin zunächst als Immunsuppressivum eingesetzt, um die Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen zu unterdrücken [31]. Später zeigten sich auch antiproliferative Wirkungen auf Tumorzellen, die im Verlauf auch zur Zulassung bei einer Reihe von Krebserkrankungen führte, u.a. beim metastasierten Nierenzellkarzinoms, beim hormon-rezeptor-positiven Mamma-Karzinom, bei hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumoren und Angiomyolipomen u.a. im Kontext mit der Tuberösen Sklerose [32] [33].

Die Inhibition des Signalweges unmittelbar an der PI3-Kinase wurde bereits auch in zahlreichen Studien untersucht, obgleich bislang erst eine Zulassung für den Inhibitor der PI3K-delta-Isoform Idelalisib für die Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie erreicht werden konnte [34].

#### 1.6 Aktivierung des PI3K Signalweges in Leiomyosarkomen

Die Entwicklung eines malignen, invasiv wachsenden und metastasierenden Leiomyosarkom erfolgt über eine progressive Zunahme genetischer Veränderungen. Studien belegen die Anhäufung genetischer Veränderungen mit steigender Tumorgröße [35], wobei hochkomplexe Karyotypen mit nur wenigen repetetiven Veränderungen identifiziert wurden [36]. Unter genetischen Gesichtspunkten zeigen sich bei der Analyse von Patientenmaterial nur wenige Veränderungen, die sich in der Mehrzahl der Patienten finden. So tragen 90% aller Patienten mit einem Leiomyosarkom eine Deletion am Chromosom 10q 11 – 10q 21.2, die zum Verlust des PTEN Gens führt. Zusätzlich werden regelmäßig Verluste am Chromosom 13q 14.3 – 13q 21.1 beobachtet, auf dem sich das Gen für RB1 befindet. Doch nicht nur Deletionen sondern auch Insertionen wie beispielsweise am Chromosom 17p 11 – 17p 12, prägen das typische genetische Bild von Leiomyosarkomen [1].

Auf Grundlage der bereits gewonnenen Daten kann jedoch davon ausgegangen werden, dass eine Dysregulation im Ablauf des PI3-Kinase Signalweges eines der treibenden Kräfte auf dem Weg zur neoplastischen Transformation der Zellen darstellt.

Im Vergleich mit Leiomyomen, dem gutartigen Pendant des Leiomyosarkoms, zeigen diese eine weitaus schwächere Aktivierung des PI3K-Signalweges. Dies kann über Phosphorylierungszustände spezifischer Proteine belegt werden (Tab. 4). Eine Schlüsselrolle nimmt in diesem Geschehen das Protein AKT ein. Dieses liegt beispielsweise in Leiomyosarkomen mehr als viermal so häufig in phosphorylierter und damit in aktivierter Form vor, als es in Leiomyomen der Fall ist [37]. Werden diese Werte vergleichend mit anderen Sarkomen betrachtet, wird deren Bedeutung noch einmal deutlicher. In Tumormaterial von Patienten mit dedifferenziertem Liposarkom konnte diese erhöhte AKT-Aktivierung nur in etwa jedem zweiten Tumor nachgewiesen werden [38].

Protein	Leiomyome	Leiomyosarkome		
pAKT	25,0%	78,3%		
pmTOR	25,0%	72,6%		
pS6	38,0%	74,5%		
p4EBP1	0,0%	70,5%		

Tabelle 4: Gegenüberstellung ausgewählter Proteine der PI3K-Signalkaskade in ihrer phosphorylierten Form, bezüglich ihres Auftretens in Leiomyomen bzw. Leiomyosarkomen. [37]

#### 1.7 PI3K-Isoformen

Mit Hilfe moderner, molekularbiologischer Techniken ist es gelungen, den strukturellen Aufbau der PI3-Kinasen zu entschlüsseln. Anhand der erhaltenen Daten wurde deutlich, dass sich 3 Klassen dieses Enzymes unterscheiden lassen. Diese weisen sowohl strukturelle, als auch funktionelle Unterschiede auf.

Die am besten erforschte Klasse ist die Klasse I. In dieser werden die Unterklasse IA (Abb. 1) und IB (Abb. 2) unterschieden. Beide Unterklassen verfügen sowohl über eine regulatorische, als auch eine katalytische Untereinheit.

Die Klasse IA besteht aus einer p85 regulatorischen und einer p110 katalytischen Untereinheit. Jeder dieser beiden Komponenten weist eigene, isoformspezifische Unterschiede auf. Die p110 Untereinheit besitzt drei Isoformen, welche als p110α, p110β und p110δ bezeichnet werden. Im Genom werden diese Proteine entsprechend durch PIK3CA, PIK3CB und PIK3CD codiert. Darüber hinaus existieren fünf Isoformen der regulatorischen Untereinheit. Drei dieser Isoformen werden durch das Gen PIK3R1 codiert und erhalten ihre Spezifitäten durch posttranskriptionales Splicing. Diese sind p50α, p55α und p85α. Die beiden verbleibenden Isoformen sind p85β, codiert durch das Gen PIK3R2 und p55γ, codiert durch das Gen PIK3R3. Eine Aktivierung von Enzymen dieser Klasse erfolgt über Tyrosinkinase-Rezeptoren.

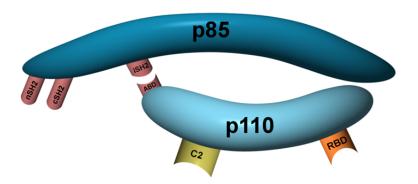


Abbildung 1: Modellhafte Darstellung einer Klasse IA PI3-Kinase. Zu erkennen ist die p85 regulatorische und die p110 katalytische Untereinheit, welche über die ABD und die iSH2-Domain miteinander verbunden sind. Zusätzliche Domainen auf dem Enzymkomplex tragen zu Interaktionen mit Rezeptoren, der Membran und anderen Proteinen bei.

Phosphatidylinositol-3-Kinasen der Klasse IB bestehen aus der p110γ katalytischen und der p101 bzw. p87 regulatorischen Untereinheit. Im Gegensatz zur vorangegangenen Klasse erfolgt die Aktivierung in diesem Fall nicht über Tyrosinkinase-Rezeptoren, sondern über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Abb. 2) [39].

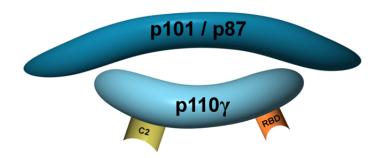


Abbildung 2: Modellhafte Darstellung einer Klasse IB PI3-Kinase. Der grundsätzliche Aufbau entspricht denen der Klasse IA PI3K, jedoch ohne eine feste Verbindung zwischen regulatorischer und katalytischer Untereinheit.

Weniger detailliertes Wissen ist demgegenüber zu den beiden anderen PI3K Klassen bekannt. In der medizinischen Onkologie spielen diese Klassen der PI3-Kinase eine untergeordnete Rolle.

Klasse II besteht aus dem Protein PI3K-C2 (Abb. 3). Dieses lässt sich in die drei Isoformen PI3KC2α, PI3KC2β und PI3KC2γ untergliedern, welche durch ihre dazugehörigen Gene PIK3C2A, PIK3C2B und PIK3C2G codiert werden [40].

Es existiert keine beschriebene regulatorische Untereinheit. Die Inaktivierung des Enzyms wird über die Verdeckung des katalytischen Zentrums mit Bestandteilen des Proteins selbst gewährleistet. Dabei tragen eine amino- und carboxyterminale Erweiterung zu Protein-Protein-Interaktion bei, mithilfe derer eine vorzeitge Aktivierung der katalytischen Einheit verhindert wird [41].

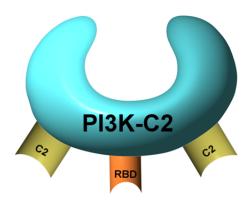


Abbildung 3: Modellhafte Darstellung einer Klasse II PI3-Kinase, bestehend aus dem Protein PI3K-C2. Zwischen beiden Enden des Proteins treten Interaktionen auf, welche dazu führen, dass das katalytische Zentrum verdeckt wird. Zusätzlich gibt es wie bei der Klasse I PI3K-Domainen für die Interaktion mit der Lipidmembran und Ras.

Eine wichtige Rolle spielen Klasse II PI3-Kinase bei endo- und exozytotischen Prozessen in immunkompetenten Zellen [42].

Weitaus weniger verstanden sind die Aufgaben, die von Klasse III PI3-Kinasen übernommen werden (Abb. 4).

Die Klasse III PI3K besteht aus einem Enzymkomplex, welcher als Vps 34 bezeichnet wird und durch das Gen PIK3C3 codiert wird [40]. Zusätzlich zur katalytischen Vps 34-Einheit gehören zu dieser Klasse eine Vps 15 regulatorische Untereinheit. Die genaue Interaktion zwischen diesen beiden Bestandteilen sind jedoch noch nicht geklärt. Bekannt ist hingegen, dass es nach Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren, besonders dem Insulinrezeptor, zu einer Steigerung des intrazellulären Phosphatidylinositol-3-phosphatspiegels, mediiert durch Klasse III PI3K, kommt [43].

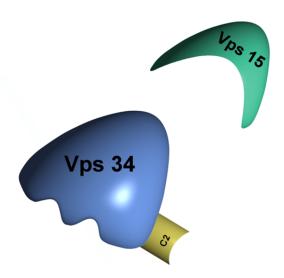


Abbildung 4: Modellhafte Darstellung einer Klasse III PI3-Kinase. Die katalytische Vps34-Untereinheit wird von der regulatorischen Vps15-Untereinheit verdeckt, um einer vorzeitigen enzymatischen Reaktion vorzubeugen.

#### 1.8 Ablauf der PI3K-Signalkaskade

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg gehört zu einem der zentralen Signalwege für die Übermittlung von parakrinen oder autokrinen Wachstumssignalen. Extrazelluläre, über Rezeptoren vermittelte Informationen gelangen durch die Lipidmembran in das Innere der Zelle, wo sie durch das Enzym PI3-Kinase aufgenommen werden und eine streng regulierte Kaskade von nachgeschalteten Proteinen in Gang setzen (Abb. 5).

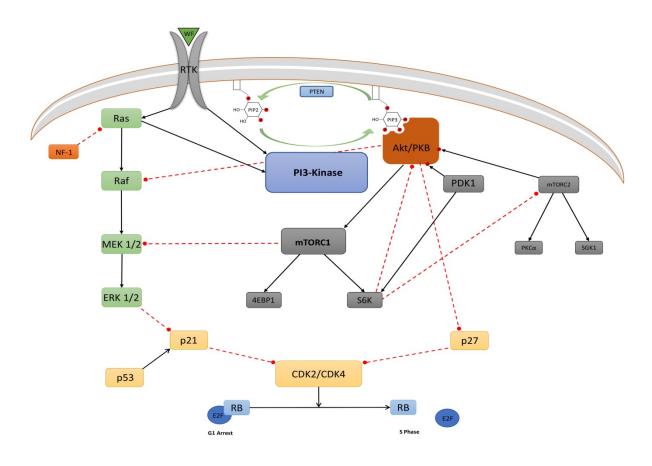


Abbildung 5: Stark vereinfachte Darstellung des Ablaufs des PI3K- (blau) und MAPK- (grün) Signalweges, sowie Interaktionen zwischen den beiden Signalwegen. Modifiziert nach [30].

Eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase erfolgt nach Stimulation des entsprechenden Rezeptors und der Informationsübertragung extrazellulärer Signale durch die Lipidmembran. Es kommt zur Translokation des im Zytosol befindlichen Enzymkomplexes an den signalgebenden und im aktivierten Zustand befindlichen Rezeptor. Die Phosphatidylinositol-3-Kinase ist eine im Zytosol befindliche Lipidkinase. Diese katalysiert die Phosphorylierung von Lipiden in der Zellmembran. Angriffspunkt ist die 3-OH-Gruppe des Inositol-Ringes von membrangebundenen Phospholipiden [30].

Unterschiede in der Substratspezifität werden dabei je nach betrachteter PI3K-Klasse deutlich. Das breiteste Spektrum weisen dabei die Klasse I PI3-Kinasen auf. Diese sind in der Lage, sowohl Phosphatidylinositol (PtdIns), als auch Phosphatidylinositolmonophosphat (PtdIns4P) zu phosphorylieren. Bevorzugterweise kommt es jedoch zu Phosphorylierung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PtdIns(4,5) P2).

Ein engeres Spektrum weisen demgegenüber Klasse II PI3-Kinasen auf. Diese phosphorylieren bevorzugt PtdIns, sind aber auch in der Lage PtdIns4P als Substrat zu verwenden. Das eingeschränkteste Substratspektrum ist von den Klasse III PI3K bekannt. Diese sind lediglich in der Lage, PtdIns zu phosphorylieren [30].

Im inaktivierten Zustand befindet sich die PI3-Kinase im Zytosol. Bei einer Aktivierung des Rezeptors wird der gesamte Enzymkomplex zur Zellmembran rekrutiert und das katalytische Zentrum in räumliche Nähe zum Substrat in der Zellmembran gebracht. Bedingt durch die räumliche Nähe von Enzym und Substrat kann eine enzymatische Reaktion ablaufen und somit Phospholipide der Membran, wie bereits beschrieben, phosphoryliert werden [44].

Bereits auf dieser Ebene werden Barrieren etabliert, um eine überschießende Substratumsetzung durch das Enzym zu verhindern. Das entstehende Produkt PIP3 wirkt in einem negativen Feedbackmechanismus hemmend auf die PI3-Kinase. Bedingt durch den Verlust der Rezeptorbindung nähert sich die regulatorische Untereinheit der katalytischen an und blockiert somit das aktive Zentrum des Enzymes. Resultierend aus der gesenkten Enzymaktivität sinkt auch der intrazelluläre PIP3-Spiegel [45].

Der physiologische Antagonist der PI3-Kinase ist die Phosphatase PTEN (Phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10). PTEN ist eine Lipid- und Proteinphosphatase und tritt sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma oder membrangebunden auf. Es katalysiert die Rückreaktion von Phosphatidylinositol-3-phosphat (PIP3) zu Phosphatidylinositol-2-phosphat (PIP2) und nimmt damit einen wichtigen Platz als Tumorsuppressor ein. Neben der Gegenregulierung der PI3-Kinase-Aktivität ist es an wichtigen weiteren zellulären Aufgaben, wie Chemotaxis, Angiogenese oder der Interaktion mit Histonen beteiligt [46].

Phosphatidylinositol-3-phosphat ist, anders als andere second messanger, nicht frei im Zytosol beweglich, da es in der Zellmembran eingebettet liegt. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass Effektormoleküle zur Lipidmembran rekrutiert werden. Diese Rekrutierung erfolgt über PH-Domainen, welche gebildetes PIP3 in der Membran erkennen und aktiv an dieses binden können. Die Serin/Threonin Proteinkinase AKT verfügt über solch eine PH-Domain [47].

Synonym zu AKT wird in der Literatur die Bezeichnung Proteinkinase B verwendet. Ähnlich der PI3-Kinase tritt auch AKT in verschiedenen Isoformen auf. Diese sind AKT1 bzw. PKBα, AKT2 bzw. PKBβ und AKT3 bzw. PKBγ.

Über die auf der Kinase befindlichen PH-Domaine wird AKT zu membrangebundenem Phosphatidylinositol-3-phosphat rekrutiert. Nach Bindung von AKT an das Phospholipid, gibt dieses seine Phosphorylierungsstellen frei. Daraufhin wird AKT zweifach phosphoryliert. Die erste Phosphorylierung erfolgt durch PDK1 (Phosphoinositide-dependent Kinase 1) an der Aminosäure Thr308. Der zweite Phosphorylierungsschritt erfolgt an Ser473 durch den mTORC2-Komplex [48].

Ziel dieser zweistufigen AKT-Aktivierung ist die nachfolgende Phosphorylierung und somit die Aktivierung des mTORC1-Komplexes. AKT ist in der Lage den mTORC1-Komplex direkt zu phosphorylieren und damit die weitere Kaskade des PI3-Kinase-Signalweges in Gang zu setzen. Zusätzlich ist AKT noch an der mTORC1 Aktivierung über den TSC2-Signalweg beteiligt.

In diesem Kontext ist TSC2 jedoch nicht nur als Nebenweg des PI3K-Signalweges zu betrachten, sondern nimmt eine zentrale Stellung bei der Regulation von zellulären Prozessen ein. Eine Vielzahl von Molekülen und Enzymen wirken direkt oder indirekt auf TSC2 ein und modulieren in dieser Weise dessen Aktivität [49].

mTOR nimmt als Serin/Threonin Proteinkinase eine zentrale Rolle im PI3-Kinase-Signalweg ein. Wie bereits beschrieben, wird zwischen dem mTORC1- und dem mTORC2-Komplex unterschieden. Diese beiden Komplexe unterscheiden sich nicht nur in ihrer Funktionalität, sondern zeichnen sich auch durch einen gesonderten Aufbau aus.

Der mTORC1-Komplex besteht aus den Proteinen mTOR, Raptor, PRAS40, mLST8 und Deptor. Demgegenüber besteht der mTORC2-Komplex auch aus der Kernkomponente mTOR, unterscheidet sich jedoch in den anderen, mit dem Komplex assozierten Proteinen. Diese sind Rictor, Sin1, mLST8, Deptor, Hsp70 und Protor 1/2 [50].

Funktionell betrachtet verfügt mTORC2 über einen kleinen Rahmen. Die hauptsächliche

Aufgabe dieses Komplexes ist die Phosphorylierung von AKT. Darüber hinaus sind weitere Zielstrukturen, wie etwa PKCα und SGK-1, bekannt [51, 52].

Weitgreifender sind die Aufgaben des mTORC1-Komplexes. Die bekanntesten Zielstrukturen sind 4EBP1 und S6K1, nach deren Aktivierung die Proteinsynthese initiiert wird. Phosphoryliertes mTORC1 bindet an eIF3 und wird damit in die räumliche Nähe weiterer Zielstrukturen gebracht. Es folgt die Phosphorylierung von 4EBP1, welches daraufhin seine Bindungsstelle an eIF4E freigibt und somit die Bindung von eIF4G an eIF4E ermöglicht. Zeitgleich erfolgt auch die Phosphorylierung von S6K1 an Thr389, welches daraufhin ebenfalls von eIF3 dissoziiert.

Freies, phosphoryliertes S6K1 wird im Zytosol erneut durch PDK1 an Thr229 phosphoryliert und erlangt sein maximales Aktivitätslevel. In diesem Zustand phosphoryliert S6K1 eIF4B und S6. Diese Bestandteile bilden einen Multiproteinkomplex mit den vorher beschrieben Proteinen und initiieren im weiteren Verlauf die Translation von mRNA [53].

#### 1.9 Dysregulationen des PI3K-Signalweges

#### 1.9.1 Defekte in den Tyrosinkinaserezeptoren

Eine Dysregulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges wurde bereits für eine Reihe von Tumorentitäten beschrieben. Dabei können die genetischen Veränderungen ebenso vielgestaltig sein wie deren Auswirkung auf die Signaltransduktion der Tumorzelle.

Eine gesteigerte Enzymaktivität der PI3-Kinase kann bereits durch Veränderungen im signalgebenden Rezeptor hervorgerufen werden. HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), ein membranständiger Rezeptor, zeigt einen direkten Einfluss auf die Aktivierung der PI3-Kinase. In bis zu 30% aller Brustkrebsfälle kann eine Überexpression und damit auch eine pathologische Aktivierung der PI3K-Signalkaskade über den HER2-Rezeptor nachgewiesen werden [54]. Aber auch Veränderungen anderer Tyrosinkinaserezeptoren können zu solch einer unkontrollierten Aktivierung beitragen. In GIST (Gastrointestinale Stromatumoren) sind genetische Veränderungen des KIT-Rezeptors bereits seit Jahren bekannt [55]. Diese Mutationen führen zu einer Liganden unabhängigen Autophosphorylierung des

Rezeptors, woraufhin wachstumsstimulierende Signale über den PI3K-Signalweg in den Zellkern weitergeleitet werden [56].

#### 1.9.2 Bekannte Mutationen der PI3-Kinase

Mutationen finden jedoch nicht nur in den membrangebundenen Rezeptoren, sondern auch in der PI3-Kinase selbst statt. Besonders gut untersucht ist dieser Sachverhalt für Klasse I PI3K, welche in der Onkologie eine wichtige Rolle spielen. Genetische Veränderungen sind sowohl für die katalytische, als auch für die regulatorische Untereinheit beschrieben.

Eine der am häufigsten veränderten Onkogene des Menschen ist PIK3CA, das Gen, welches für die katalytische p110α Untereinheit der PI3-Kinase codiert. E542K und E545K sind häufig auftretende Punktmutationen in der helikalen Domaine von p110α. Aus diesen Mutationen resultiert eine verminderte Interaktion mit der p85 regulatorischen Untereinheit. Diese führt zu einer fehlerhaften Daueraktivierung der Kinase [57]. Nachweislich treten diese Mutationen in einer großen Anzahl verschiedener epithelialer sowie mesenchymaler Tumoren, wie Blasenkarzinomen, Mammakarzinomen und verschiedenen Sarkomen auf [58-60].

Neben diesen sogenannten *Hotspot*-Mutationen, zu der auch die Punktmutation H1047R in der Kinase Domaine von PIK3CA zählt, gibt es weitere, jedoch weniger häufig auftretende genetische Veränderungen [61]. Hierzu zählen Mutationen der C2-Domaine der p110α Untereinheit. Aufgrund dieser genetischen Aberration kommt es zu einem Anstieg der positiven Ladung des Proteins. Resultierend aus der veränderten elektrostatischen Wechselwirkung zwischen p110α Untereinheit und der Lipidmembran kommt es zu einer Unabhängigkeit der katalytischen von der regulatorischen Untereinheit. Die entstehende dauerhafte Interaktion zwischen katalytischer Untereinheit und dessen Substrat, der Lipidmembran, führt zu einer Daueraktivierung des Signalweges [62].

#### 1.9.3 Veränderungen weiterer Bestandteile des PI3K-Signalweges

Neben genetischen Veränderungen der PI3-Kinase selbst können auch andere Bestandteile der Signalkaskade von Mutationen betroffen sein und somit zu einer pathologischen Aktivierung des Signalweges führen. Eine bedeutende Rolle in der Pathogenese nimmt dabei die

Phosphatase PTEN ein. Genetische Aberrationen dieses Proteins konnten in 30-40% aller humanen Tumoren nachgewiesen werden [30]. Bedingt durch konstitutionelle oder somatische Mutationen [63], epigenetisches und transkriptionales Silencing [64], posttranskriptionale Modifikationen [65] oder Protein-Protein-Interaktionen kommt es zu einem funktionellen Ausfall von PTEN [66]. Dieses als loss-of-function bezeichnete Ereignis führt zu einer Akkumulation von PIP3 an der Lipidmembran und damit zu einer dauerhaften Aktivierung des AKT/mTOR-Signalweges [67]. Ein Verlust von PTEN kann nicht nur zur Entstehung einer neoplastischen Erkrankung beitragen, sondern auch in gleicher Weise deren Verlauf mitbestimmen. Patienten mit einem BRAFV600 mutiertem Melanom hatten signifikant geringere Überlebenszeiten und ein höheres Risiko von Gehirnmetastasen, wenn gleichzeitig ein PTEN Verlust vorlag [68]. Auch in Sarkomen hat der Verlust von PTEN einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeiten betroffener Patienten. Dies konnte vor Kurzem in einer Studie mit undifferenzierten pleomorphen Sarkomen nachgewiesen werden [69]. Mutationen des Proteins AKT können vergleichsweise selten in humanen Tumoren nachgewiesen werden. In einer breit angelegten Studie mit einer Vielzahl von verschiedenen Tumoren konnte nur in einer kleinen Anzahl von Mamma-, Kolorektalen-, Lungen-, und Ovarialkarzinomen eine Mutation von AKT nachgewiesen werden [70]. In der PI3K-Signalkaskade ist mTOR der Proteinkinase AKT nachgeschaltet. Eine pathologische Aktivierung dieses Protein kann für eine Vielzahl von humanen Tumoren bestätigt werden. Inwieweit mTOR jedoch eigenständige onkogene Wirkung ausüben kann bzw. inwieweit es lediglich durch vorgeschaltete Proteine der Signalkaskade aktiviert wird, konnte im Jahr 2013 geklärt werden. Durch induzierte Mutation bestimmter Regionen dieses Proteinkomplexes konnte eine Aktivierung des Signalweges erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen von mTOR in der Lage sind, eine direkte Rolle in der Tumorgenese zu spielen [71].

#### 1.10 PI3K-Inhibitoren in der modernen Krebstherapie

Ein Ziel der aktuellen Forschungen ist es, eine individuelle Tumortherapie zu konzipieren, welche auf den einzelnen Patienten zugeschnitten ist und die grundlegenden molekularbiologischen Aspekte der zugrundeliegenden Krankheit berücksichtigt. Großes

Interesse wird dabei auf den Einsatz niedermolekularer Inhibitoren, wie sie etwa in PI3K-Signalweg Anwendung finden, gelegt. Derzeit gibt es mehr als 70 verschiedene, kommerziell erhältliche Inhibitoren, die den PI3K-Signalweg inhibieren (<a href="http://www.selleckchem.com">http://www.selleckchem.com</a>, Stand: 08/2018). Ein großer Teil dieser Inhibitoren befindet sich aktuell in klinischen Studien am Menschen. Gegenwärtig werden unter clinicaltrials.gov 86 offene Studien mit PI3K Inhibitoren gelistet (Stand 08/2018).

Eine Reihe von vielversprechenden Studien bestätigen die Wirksamkeit von zielgerichteten Therapien des PI3K-Signalweges. Alpelisib, ein p110α Inhibitor, zeigt in pulmonalen Plattenepithelkarzinomen sowie in vitro, als auch in vivo wachstumshemmende Eigenschaften. Außerdem führt der Einsatz von Alpelisib zur Reduktion von mesenchymalen Markern und kann somit der Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) entgegenwirken, welche als Grundlage eines metastatischen Ereignisses gilt [72].

In der BOLERO-2 Studie mit 724 Patienten wurde die Wirkung von Everolimus in Kombination mit dem Aromatasehemmer Exemestan® bei metastasierten Mammakarzinomen untersucht. Die progressionsfreien Intervalle konnten in der kombinierten Anwendung beider Inhibitoren auf 7,8 Monate, im Vergleich mit der alleinigen Anwendung von Exemestan® (3,2 Monate), verlängert werden [73]. Auch duale PI3/mTOR Inhibitoren zeigen sich in ersten klinischen Studien am Menschen als erfolgreiche Alternativen zu konventionellen Chemotherapeutika. In einer breit angelegten Studie mit einer Vielzahl von soliden Tumoren zeigte sich Gedatolisib als wirksame antitumorale Therapie mit moderaten unerwünschten Wirkungen [74].

Die in dieser Arbeit verwendeten PI3K- (Alpelsib [NCT02624557]), mTOR- (Everolimus [NCT01466231]) und dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren (Gedatolisib [NCT03243331], Dactolisib [NCT01658436] und Voxtalisib [NCT00777699]) wurden bereits in klinischen Studien am Menschen eingesetzt und zeichnen sich durch unterschiedliche inhibitorische Wirkungen auf die verschiedenen PI3K-Isoformen und mTOR aus. Zusätzlich bestehen unterschiedliche Affinitäten zu deren Zielstrukturen (Tab. 5).

Inhibitor	IC50 im "Cell free assay" in nM					
	p110α	p110β	p110γ	p110δ	mTOR	weitere Kinasen
Alpelisib (Byl-719)	5,0	~	~	~	X	
Everolimus (RAD001)	X	X	X	X	2,0	
Dactolisib (BEZ235)	4,0	75,0	5,0	7,0	6,0	ATR
Gedatolisib (PKI-587)	0,4	X	5,4	X	1,6	
Voxtalisib (XL-765)	39,0	113,0	9,0	43,0	157,0	DNA-PK

Tabelle 5: IC50 Werte verwendeter Inhibitoren in zellfreien Untersuchungen (~: minimale Wirkung, X: keine Wirkung) Quelle: <a href="http://www.selleckchem.com/">http://www.selleckchem.com/</a>

#### 1.11 Quervernetzungen mit anderen Signalwegen

Zelluläre Stimuli werden nicht nur über einen Signalweg allein an das Ende der Kaskade weitergeleitet. Es gibt in der Zelle zahlreiche Quervernetzungen des PI3K-Signalweges mit anderen Signalkaskaden. Die komplexe Interaktion mit anderen Signalkaskaden macht es dem PI3K-Signalweg negative möglich, dass Signale aus über positive und Rückkopplungsmechanismen auf andere Signalwege "umgelenkt" werden können. Eine der bekanntesten Interaktionen findet mit dem RAS/Raf/MEK/ERK Signalweg statt [75]. Von klinischer Bedeutung sind diese Interaktionen bei gezielter Inhibition eines der beiden Signalwege. Durch Quervernetzungen kann es bei der Inhibition des PI3K-Signalweges zu einer kompensatorischen Aktivierung des MAPK-Signalweges kommen. Dieser Sachverhalt wurde bereits in zahlreichen Studien belegt und tritt sowohl bei alleinigen AKT oder mTOR-Inhibition auf, konnte aber auch schon unter der Anwendung von dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren demonstriert werden. So zeigt sich beispielweise eine kompensatorische Aktivierung des MAPK-Signalweges bei der Anwendung von GDC 0068 (AKT-Inhibitor) in Brustkrebszellen, AZD8055 (mTOR-Inhibitor) in Rhabdomyosarkomzellen oder BEZ235 (dualer PI3K/mTOR-Inhibitor) in Pankreaskarzinomzellen [76-78]. Obwohl bereits viel über die Interaktion und deren Abläufe bekannt ist, konnte bis heute nicht der genaue Mechanismus hinter diesen kompensatorischen Aktivierungen geklärt werden. Negative Rückkopplungsmechanismen über mTORC1 oder mTORC2, die Beteiligung von Wachstumsfaktoren wie EGF oder eine Akkumulation von PIP3 werden als mögliche Ursachen angegeben [79-82]. Diese ungeklärten Mechanismen und die mögliche Interaktion mit weiteren Signalwegen führt dazu, dass sich Resistenzen gegenüber der Therapeutika ausbilden können und gezielte Therapien nicht den gewünschten Effekt zeigen [83]. Weitere Forschungen auf diesem Gebiet könnten helfen, die Signaltransduktion in neoplastischen Zellen besser zu verstehen und eine geplante Therapie zielgerichteter und effektiver zu gestalten.

#### 1.12 Ziele der vorliegenden Arbeit

- 1. Entwicklung eines Xenograft-Modells für Leiomyosarkome
- 2. Validierung der Nierenkapsel-Implantation als mögliches Metastasierungsmodell für Leiomyosarkome
- 3. Validierung von Inhibitoren des PI3K-Signalweges als therapeutischer Ansatz in vitro und vivo

# 2 Methoden und Material

## 2.1 Material

## 2.1.1 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
AKT	1/1000	Cell Signaling
Anti-mouse IgG	1/1000	GE Healthcare
Anti-Rabbit IgG	1/1000	GE Healthcare
p44/42 MAPK (Erk 1/2)	1/1000	Cell Signaling
Phospho-AKT (Ser473)	1/1000	Cell Signaling
Phospho-MAP Kinase 1/2 (Erk 1/2)	1/1000	Cell Signaling
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	1/1000	Cell Signaling
PI3 Kinase p85	1/1000	Cell Signaling
S6 Ribosomal Protein (5G10)	1/1000	Cell Signaling
ß-Actin	1/10000	Sigma Aldrich
4E-BP1	1/1000	Cell Signaling
Phospho-4E-BP1 (Ser65)	1/1000	Cell Signaling
PTEN	1/1000	Cell Signaling
p53	1/1000	Cell Signaling
Tuberin/TSC2	1/1000	Cell Signaling
NF1	1/1000	Thermo Fisher
p21 Waf1/Cip1	1/1000	Cell Signaling
p27 Kip1	1/1000	Cell Signaling
RB	1/1000	Cell Signaling

#### 2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10x TAE	Invitrogen
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific
Agarose	Invitrogen
Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers	GE Healthcare
Aprotinin	Sigma Aldrich
Aqua ad iniectabilia	Braun
Beta-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich

Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
Chloroquine	Sigma Aldrich
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Calbiochem
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
DPBS	Gibco®
EDTA	Sigma Aldrich
EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail cOmplete <sup>TM</sup>	Roche
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol 70%	Carl Roth
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Carl Roth
FACS-Lösungen CS&T Research Beads	BD FACSDiva <sup>TM</sup>
FBS	Biochrom AG
Formalin	Sigma Aldrich
Gelatine	Carl Roth
Glucose 5% B.Braun	Braun
Glycin	Carl Roth
Hepes	Sigma Aldrich
Isothesia (Isofluran)	Henry Schein
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kalziumphosphat	Sigma Aldrich
L- Glutamine	Gibco®
Leupeptin	Sigma Aldrich
L-Glutamine	Gibco®
Methanol	VWR
MOPS SDS Running	Invitrogen
NaCl	Merck
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin/ Amphotericin B	Calbiochem
Phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma Aldrich
Phosphataseinhibitor PhosSTOP <sup>TM</sup>	Roche
Ponceau S	Sigma Aldrich
Puromycin	Santa Cruz
Salzsäure (HCL)	Carl Roth
Spectra <sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein	Thermo Fisher
Sulforhodamine B Salz	Sigma Aldrich
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich
Tris	Santa Cruz
Triton-X-100	Bio Rad
Trypan Blue 0,4%	Gibco®
<u> </u>	

TrypLE <sup>TM</sup> Express	Gibco®
Tween 20	Sigma Aldrich
Vanadate	Sigma Aldrich
WesternBright ECL	Biozym Scientific Gmbh

#### 2.1.3 Gebrauchslösungen

Gebrauchslösung	Zusammensetzung
Net-G Konzentrat (10x)	175,5g NaCl
	121,1g Tris
	37,2g EDTA
	10ml Tween 20
	8g Gelatine
	mit Aqua dest. auf 21 auffüllen
T 0 00	600 1 1
Transferpuffer	600ml Aqua dest.
	200ml Methanol
	14,4g Glycin
	3,03g TRIS
	mit Aqua dest. auf 11 auffüllen
IP-Puffer	50ml Aqua dest.
	50µl SDS 10%
	550μl Triton-X-100
	17,5mg EDTA
	101,5mg Tris-HCL
	48,79mg NaCl
	46,79 mg NaCi
Lysispuffer	4ml IP Puffer
	4μ1 Aprotinin (10mg/ml)
	4μ1 21mM Leupeptin
	4μl 100mM PMSF
	4μl 200mM Vanadate
T 1 CC	2.012. 1.T.: (0.5)(
Ladepuffer	2,812ml Tris (0,5M. pH 6,7)
	6,75ml SDS (10%)
	450mg DTT (87%)
	10ml Glycin
	10mg Bromphenolblau
	mit Aqua dest. auf 20ml auffüllen

ocktail

#### 2.1.4 Geräte

Nuaire
Nuaire
Eppendorf
Invitrogen
NUAIRE
BIO RAD
reichelt
BD
Гесап
GFL
FujiFilm
neoLab
Olympus
Huber
Thermo Scientific
Thermo Scientific
Nuaire
Thermo Scientific
Integra
Heidolph
Heidolph
BIO RAD
Bertin Instruments
Heidolph
Tecan
Гесап
Гесап
stuart
Invitrogen
IKA
Hettich
Hettich Gmbh

# 2.1.5 Inhibitoren

Inhibitor	Kurzbezeichnung	Wirkungsspektrum	Hersteller
Alpelisib	Byl 719	PI3K	Novartis
Dactolisib	BEZ 235	PI3K/mTOR	Novartis
Everolimus	RAD 001	mTOR	Novartis
Gedatolisib	PKI-587	PI3K/mTOR	Pfizer
Trametinib	GSK1120212	MEK 1/2	Novartis
Voxtalisib	XL-765	PI3K/mTOR	Exelixis/Sanofi-
			Aventis

# 2.1.6 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller		
Amersham Protran Premium 0.45 NC Nitrozellulose	GE Healthcare		
Countess Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen		
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen		
Zellkulturflaschen	Falcon <sup>TM</sup>		
Mikrotiterplatten	Thermo Scientific		
Zellschaber	Techno Plastic Products AG		
Filterpapier	Whatman		
Homogenisierungstubes 2ml	Precellys®		
FACS Röhrchen 5ml	Falcon <sup>TM</sup>		
Einwegspritzen	BD		
Einwegkanülen	BD		
Nahtmaterial Monosyn 5/0	Braun		
Gewebekleber Surgibond	SMI AG		

# **2.1.7** Zellen

Zelllinie	Medium	Ursprung der Zelle	Etablierungsort	
SK-LMS 01	A	Primärtumor Uterus	Boston	
LMS 03	A	Metastase Oberschenkeltumor	Boston	
LMS 04	A	Metastase Uterustumor	Boston	
LMS 05	A	Primärtumor Oberschenkel	Boston	

## 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

Die vier verwendeten Leiomyosarkomzelllinien SK-LMS 01, LMS 03, LMS 04 und LMS 05 wurden in Medium A bei 37°C und einer CO²-Konzentration von 5% kultiviert. Eine Auswechslung des Mediums fand alle zwei bis drei Tage statt. Zusätzlich wurden die Zellen wöchentlich unter Reduktion der Gesamtzellzahl in neue Flaschen passagiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde der Zellrasen mit Trypsin von der Oberfläche der Flasche gelöst und die Lösung in ein Greiner-Röhrchen übertragen. Die Zellen wurden zentrifugiert, das überschüssige Medium verworfen und die Zellen in neuem Medium resuspendiert. Ein Teil dieser Suspension wurde in eine neue Zellkulturflasche übertragen und dort weiter kultiviert.

#### 2.2.2 Zytotoxizitätsbestimmungen

Zur Bestimmung der Proliferationshemmung/Zytotoxizität eines verwendeten Inhibitors wurde das "Sulforhodamine B Assay" verwendet [84].

In einer Zellsuspension wurde mittels elektronischem Zellzählers die absolute Anzahl an Zellen bestimmt.

Nachfolgend wurde pro 96-Loch Platte eine für die jeweilige Zelllinie angepasste Anzahl an Zellen pro Vertiefung ausgesät. Diese lag bei SK-LMS 01 bei 3000 Zellen, bei LMS 03 bei 10000 Zellen und bei LMS 04 sowie LMS 05 bei 6000 Zellen. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer ansteigenden Konzentration des zu untersuchenden Inhibitors versehen, wobei der DMSO-Wert als Referenz für unbehandelte Zellen galt. Es erfolgte stets eine Dreifachbestimmung der zu ermittelnden Werte. Im Folgenden betrug die weitere Inkubationszeit 72 Stunden.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Proliferation mit 100µl Trichloressigsäure (TCA) pro Vertiefung gestoppt und die Zellen für eine Stunde bei 4°C am Plattenboden fixiert. Im Anschluss wurde die Platte dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und danach 50µl des 0,4%igen SRB-Farbstoffes in jede Vertiefung gegeben.

Nicht gebundener Farbstoff wurde nach viertelstündiger Inkubation bei Raumtemperatur

mithilfe 1% iger Essigsäure, aus den Löchern gelöst und verworfen. Durch Zugabe von  $100\mu l$  TRIS (10mM) in jedes Loch konnte der von den Zellen gebundene Farbstoff wieder frei gegeben werden.

In Abhängigkeit der Zellzahl ergeben sich somit unterschiedlich stark gefärbte Lösungen, die durch photometrische Absorption bei 560nm gemessen werden konnten. Die ermittelten Werte wurden wie folgt ausgewertet. Der DMSO-Wert wurde auf der Y-Achse mit 1 gleichgesetzt und die restlichen Werte daran normalisiert. Die erhaltenen Messdaten wurden mittels Microsoft Excel grafisch dargestellt.

#### 2.2.3 Proteinanalysen

#### 2.2.3.1 Proteinaufschluss

Zur Bestimmung spezifischer, intrazellulärer Proteine, mithilfe immunhistochemischer Verfahren wurde wie folgt vorgegangen.

Zunächst wurde ein konfluenter Zellrasen der bekannten Zelllinien in einem bestimmten Verhältnis geteilt (SK-LMS 01 1:6, LMS 03 1:2, LMS 04 1:3 und LMS 05 1:3) und auf eine Fläche von 10cm² ausgesät.

Einen Tag später erfolgte die Behandlung mit den gewünschten Inhibitoren und einen weiteren Tag darauf wurde das Zellwachstum gestoppt.

Dazu wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und durch Zugabe des Lysispuffers, unter Zuhilfenahme eines Zellschabers, von dem Untergrund gelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde eine Stunde bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Darauf folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 14000 RPM und ebenfalls 4°C. Dies hatte zum Ziel, unerwünschte Zellbestandteile von der Proteinlösung zu trennen.

Zur genauen Bestimmung des Proteingehaltes der Lösung wurde das "Bradford-Assay" verwendet [85]. Das Prinzip dieses Verfahrens ist es, dass Proteine mit dem im Assay

enthaltenen Farbstoff Coosmassie-Brilliant-Blau G250, Komplexe eingehen und sich somit das Absoptionssprektrum entsprechend des Proteingehaltes von 465nm zu 595nm verschiebt. Nach erfolgter Messung wurde der Proteingehalt durch Verdünnung auf 2µg/µl eingestellt. Weiterhin wurde die Lösung mit Ladepuffer versehen und fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben bei -80°C gelagert.

## 2.2.3.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur weiteren Untersuchung bestimmter Proteine wurde das "SDS-Page-Verfahren" nach Laemmli angewendet [86]. Hierbei werden die Proteine ihrer Größe nach in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Jede Geltasche wurde mit 40µg Protein beladen und eine Spannung von 170V für etwa 60 Minuten angelegt.

#### 2.2.3.3 Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. [87]

Die Transferkammer wurde, wie nach Towbin et al. beschrieben, zusammengesetzt, mit Transferpuffer aufgefüllt und für zwei Stunden eine Spannung von 25V angelegt.

Um den erfolgreichen Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulosemembran zu bestätigen, wurde eine Ponceau S-Färbung durchgeführt.

Dies ist eine unspezifische Proteinfärbung, welche Proteinbanden auf der Membran sichtbar werden lässt.

#### 2.2.3.4 Antikörperfärbungen

Im weiteren Verlauf erfolgte der Nachweis spezifischer Proteine durch antikörpervermittelte Chemolumineszenz. Der verwendete Antikörper wurde in einem vorgegebenen Verhältnis mit Net-G verdünnt und über Nacht zusammen mit der proteinbeladenen Nitrozellulosemembran bei 4°C inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde in fünf Waschschritten (2x 5min, 2x 10min und 1x 20min) mit Net-G von der Membran entfernt, bevor der spezifische sekundäre Antikörper (Anti IgG) mit der Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Es folgten weitere fünf Waschschritte (5x 5min) und die Inkubation mit ECL-Lösung für weitere zwei Minuten. Daraufhin konnte Protein, welches vom Antikörper gebunden wurde und dementsprechend Farbstoff umgesetzt hatte, durch Chemolumineszenz im Luminescent Image Analyzer LAS3000 sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.3.5 Proteinextraktion aus Tumormaterial

Ein Teil des Tumormaterials aus den Xenograftversuchen wurde direkt nach Entnahme aus der Maus in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, um für spätere Proteinanalysen bereit zu stehen.

Für die Proteinextraktion wurde ein etwa 100mg schweres Stück Tumor entnommen und in ein Precellys® ml Röhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe Homogenisierungspuffer. Die Proben wurden in den Precellys Evolution Homogenizer überführt und unter Stickstoffkühlung bei 4°C in zwei Zyklen mit 2000 RPM für 20sek, mit einer Pause von 15sek zwischen den Zyklen, homogenisiert. Das Homogenisat wurde in neue Röhrchen überführt und bei 4°C für 30min auf dem Rotator weiter lysiert. Zur Abtrennung überschüssiger Zellbestandteile wurde die Probe bei 4°C mit 14000 RPM für eine halbe Stunde zentrifugiert. Die klare obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und die Lösung einer Proteinmessung nach Bradford (vgl. Kapitel Proteinaufschluss) unterzogen. Die Lösung wurde durch Verdünnung auf einen Proteingehalt von 2μg/μl eingestellt. Zuletzt wurde die Probe mit Ladepuffer versehen und die Lösung bei 95°C für 5min erhitzt. Die Lagerung der erhaltenen Proteinlösung erfolgte bei -80°C.

## 2.2.4 Lentivirale Transfektion

Zunächst wurden jeweils 1 Million Zellen der bekannten Leiomyosarkom Zelllinien in einem Kulturgefäß mit einem Durchmesser von 10 Zentimetern ausgesät und 24 Stunden unter standardisierten Bedingungen inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden 437,5µl eines Plasmidmixes mit 62,5µl Kalziumphosphat-Lösung (2mol/L) gemischt. Diese Lösung wurde tropfenweise, unter ständigem Schütteln, in 500µl 2xHBS-Lösung gegeben. Es folgte eine 20minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Das Medium wurde vom Zellrasen entfernt und durch 2ml frisches Medium A mit 25μM Chloroquine ersetzt. Zusätzlich wurde die erhaltene Lösung aus Plasmidmix, Kalziumphosphat und HBS-Lösung tropfenweise auf den Zellrasen gegeben. Der Zellrasen mit der Lösung wurde für 2-5 Minuten geschüttelt und im Anschluss bei 37°C für 4-6 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium erneut abgenommen und durch 3ml frisches Medium A ersetzt. Jeweils 24 und 48 Stunden später wurde das Medium von dem Zellrasen entfernt, filtriert und auf die zu infizierenden Zellen in einer 6-Well Platte gegeben.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion und zur Elimination von nicht infizierten Zellen, wurde eine Puromycin-Selektion vorgenommen.

## 2.2.5 Xenograftversuche

Alle Tierversuche wurden beim LANUV NRW (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) beantragt (Aktenzeichen: 84-02.04.2016.A276) und unter strenger Einhaltung des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Verwendet wurden athymische Nacktmäuse, welche sich aufgrund ihrer Immundefizienz bereits als Modell für heterologe Transplantationen von Tumormaterial etabliert haben [88]. Gehalten wurden die Versuchstiere unter standardisierten Bedingungen von 20°C Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% und einem Kunstlichtmanagement, welches einen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus erlaubte. Die Tiere erhielten autoklavierte Futterpellets und Wasser ad libitum.

## 2.2.5.1 Subkutaner Xenograftversuch

Zur Evaluierung des subkutanen Wachstums und der Bereitstellung von solidem Tumormaterial für die subrenalen Xenograftversuche wurden athymischen Nacktmäusen Sarkomzellen in der Flankenregion unter die Haut injiziert.

Dafür wurden Zellen der entsprechenden Leiomyosarkom-Zelllinie in Suspension gebracht (vgl. Zellkultur) und eine definierte Menge von 10 Millionen Zellen pro Flanke unter die Haut injiziert. Nach einer Anwachszeit, welche sich stark nach der verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinie richtete, entstand an der Injektionsstelle eine solide Tumormasse.

Zweimal wöchentlich wurde die Größe des Tumors mittels Schieblehre ermittelt und die Größenzunahme pro Zeit sowie das Gewicht des Versuchstieres dokumentiert.

#### 2.2.5.2 Subrenaler Xenograftversuch

Den Versuchstieren mit subkutanem Tumor wurde nach zervikaler Dislokation der Tumor aus der Flankengegend entfernt, in 25°C warmes PBS überführt und das Gewebe in stecknadelkopfgroße Stücken geteilt. Die weitere Lagerung dieses Tumorgewebes erfolgte ebenfalls in PBS bei Zimmertemperatur.

Nacktmäuse wurden einzeln in eine spezielle Narkosekammer für kleine Nager überführt und mit einer Konzentration von 5% Isofluran begast. Sobald das Tier in Seitenlage gekommen war und eine ruhige Atmung zeigte, wurde es aus der Kammer entfernt und zur weiteren Aufrechterhaltung der Narkose mit einer Maske weiterhin mit 3% Isofluran begast.

Die anästhesierte Maus wurde in linker Seitenlage fixiert und mit Propanol die Rückenlinie, sowie die laterale Bauch- und Brustwand desinfiziert. Mit sterilem Besteck wurde die rechte laterale Bauchwand parallel zu den Lendenwirbelquerfortsätzen, kaudal des Rippenbogens auf einer Länge von 1-2 cm eröffnet.

Durch Verschieben der Inzision auf Höhe der Niere wurde die genaue Lage dieser ausfindig gemacht und oberhalb derer ein etwa ein Zentimeter langer Schnitt durch die Bauchdecke angelegt. Durch den entstandenen Zugang zur Bauchhöhle wurde die Niere nach außen vorgelagert. Durch leichten manuellen Druck wurde die Niere in dieser Position gehalten. Daraufhin wurde am kaudalen Pol der Niere mit einer 22G Kanüle eine etwa drei Millimeter lange Inzision in der Nierenkapsel angelegt. Durch die entstandene Inzision wurde eine Knopfsonde eingeführt, um die Nierenkapsel vom Parenchym zu lösen und somit eine Tasche zu schaffen, in die das Implantat eingesetzt werden konnte. Mit einer Pinzette wurde das vorbereitete Tumorgewebe durch die Inzision in die geschaffene Tasche unterhalb der Nierenkapsel platziert. Nach abschließender Positionierung des Gewebes mit einer Sonde wurde die Niere in die Bauchhöhle reponiert. Die Bauchdecke wurde mit einem 5-0 Monosyn-Faden und einer einfachen, fortlaufenden Kürschnernaht verschlossen. Die Hautränder wurden mit einem Fibrin Gewebekleber adaptiert. Für das postoperative Schmerzmanagement wurde Caprofen in einer Dosierung von 10mg/kg Körpergewicht am Tag der Operation, sowie den ersten und zweiten Tag post OP subkutan injiziert. Die Mäuse wurden in der viertelstündigen Aufwachphase mit Rotlicht bestrahlt, um einer Unterkühlung vorzubeugen und zusätzlich in den nachfolgenden 24 Stunden engmaschig überwacht, um bei eventuell auftretenden Blutungen oder weiteren Komplikationen einschreiten zu können [89].

#### 2.2.5.3 Monitoring des Tumorwachstums

Für die subrenalen Xenograftversuche wurden ausschließlich Zellen verwendet, die vor Versuchsbeginn lentiviral mit Luciferase transduziert wurden, um Tumorgewebe im lebenden Versuchstier darstellen zu können (vgl. lentivirale Transduktion).

Eine viertel Stunde vor Versuchsbeginn wurde den Mäusen 3mg Luciferin, gelöst in 300µl PBS, intraperitoneal injiziert.

Für diese Diagnostik wurden die betreffenden Nacktmäuse in eine spezielle Narkosekammer für kleine Nager überführt und mit einer Konzentration von 5% Isofluran begast. Sobald das Tier in Seitenlage gekommen war und eine ruhige Atmung zeigte, wurde es aus der Kammer entfernt und in den In Vivo-Imager überführt. Dort befand sich eine Narkosemaske, in welche die Maus platziert wurde und zur Aufrechterhaltung der Narkose weiterhin mit 3% Isofluran begast wurde.

Nach Schließen der Dunkelkammer wurden vom Tumorgewebe emittierte Photonen detektiert und mittels einer speziellen Software grafisch dargestellt.

Nach Ablauf der veranschlagten Zeitspanne bzw. bei Erreichen der Abbruchkriterien nach GV-SOLAS wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation euthanasiert.

#### 2.2.6 Isobologramm

Zur Evaluation von kombinatorischen Effekten verschiedener Inhibitoren wurde die Methodik des Isobologramms angewendet. Dazu wurden jeweils 1000 Zellen der bekannten Leiomyosarkom-Zelllinien mithilfe des Multidrop-Dispenser in einer 384-Well Platte ausgesät. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Tecan D300e Digital Dispenser wurde mit den zu verwendenden Inhibitoren befüllt. Dieser war in der Lage, je nach vorgegebene Versuchsbedingungen, unterschiedliche Mengen der Inhibitoren in jede Vertiefung der mit Zellen befüllten Platte zu geben. Es war möglich, Einfach-, Zweifach-, oder Dreifachbestimmungen durchzuführen. Am Ende der Befüllung mit verschiedenen Mengen an Inhibitoren wurde jede Vertiefung automatisch normalisiert, sodass in jeder Vertiefung ein gleiches Volumen an Flüssigkeit vorlag. Die Platten wurden im Anschluss für weitere 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Darauffolgend wurde ein CellTiter-Glo®-Assay, nach

Herstellerangaben durchgeführt. Am Ende wurde mithilfe des Tecan Spark M10 die Lumineszenz gemessen. Eine Auswertung der erhaltenen Messwerte und die Errechnung des kombinatorischen Indexes erfolgte mithilfe der Software CalcuSyn Software (BioSoft).

#### 2.2.7 PCR

#### 2.2.7.1 DNA-Isolierung aus Tumor- und Lungengewebe

Das Tumormaterial, welches sowohl aus den subkutanen als auch aus den subrenalen Xenograftversuchen entnommen wurde, wurde zu einem Teil in Paraffin eingebettet und zu einem anderen Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Entnommenes Lungengewebe wurde komplett in Paraffin eingebettet. Die Extraktion von DNA fand nur aus den in Paraffin eingebetteten Proben statt.

Zunächst wurde mittels einer Spinalkanüle Tumormaterial bzw. Lungengewebe aus den Paraffinblöcken gestanzt und dieses mit Deparaffinization Solution® für 3min auf 56°C erhitzt. Nach Zugabe von 180µl ATL Puffer (DNA Kit) wurde die Probe bei 10000 RPM für eine Minute zentrifugiert und 40 µl Proteinkinase K (DNA Kit) in die untere Phase pipettiert. Die so aufbereitete Probe wurde bei 56°C über Nacht unter ständigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Temperatur des Heizblocks auf 90°C erhöht und die Probe eine weitere Stunde inkubiert. Die klare Phase der Probe wurde in ein neues Reagenz überführt und 200µl AL Puffer (DNA Kit) und 200µl 100% Ethanol hinzugegeben. Nach kurzer Zentrifugation wurde die komplette Lösung auf ein QIAmp Mini Spin Collum® (DNA Kit) pipettiert und bei 8000 RPM für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 500µl AW1 Puffer (DNA Kit) auf die Säule gegeben und wiederum eine Minute bei 8000 RPM zentrifugiert. Erneut wurde der Durchfluss verworfen, 500µl AW2 Puffer (DNA KIT) auf die Säule gegeben und die Probe bei 14000 RPM für 3min zentrifugiert. Wiederum wurde der Durchfluss verworfen und die Säule für weitere 3min bei 14000 RPM zentrifugiert, um letzte Flüssigkeitsrückstände zu entfernen. Falls vorhanden, wurde auch diesmal der Durchfluss verworfen und im Anschluss 20µl Aqua dest. auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Säule ein letztes Mal für 1min bei 14000 RPM zentrifugiert. Der erhaltene Durchfluss enthielt die DNA der Probe.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Probe wurde photometrisch mithilfe des NanoDrop 1000 durchgeführt.

#### 2.2.7.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet [90]. Dabei wird durch die wiederholte Anwendung bestimmter Temperaturzyklen ein bestimmter Abschnitt des Genoms exponentiell vervielfältigt.

Zunächst wurde ein Standard PCR-Ansatz hergestellt. Dazu wurden 5µl (20ng/µl) der zuvor gewonnenen DNA mit 1µl 3'-Primer (TCCGATAAATAACGCGCCCA), 1µl 5'-Primer (GAGATACGCCCTGGTTCCTG), 1µl dNTP-Mix, 0,25µl Polymerase und 10µl 5fach Puffer versetzt. Die erhaltene Lösung wurde im Anschluss mit Aqua dest. auf 50µl aufgefüllt.

Nachdem die Probe in die DNA Engine® eingeführt wurde, wurde das Standard PCR-Protokoll ausgewählt. Zunächst wurde die Probe für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt (Denaturierung), gefolgt von einer Abkühlung auf 50°C für 30 Sekunden (Annealing) und einer erneuten Erhitzung auf 72°C für 60 Sekunden (Elongation). Dieser Zyklus wurde 30fach durchlaufen. Am Ende der PCR stand die finale Elongation der DNA-Stränge für 10 Minuten bei 72°C und einer darauffolgenden Abkühlung auf 4°C zur dauerhaften Lagerung der erhaltenen Probe.

## 2.2.8 Zellzyklusbestimmung

Zur Bestimmung des Zellzyklus wurden die zu untersuchenden Leiomyosarkom-Zellen mithilfe von Trypsin aus der Zellkulturflasche gelöst, in PBS verdünnt und in ein FACS Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Probe bei 300 RPM für 3min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100µl PBS resuspendiert. Es wurde 500µl kaltes 70%iges Ethanol zur Probe gegeben und die Zellen eine Stunde bei -20°C fixiert. Die Probe wurde im Anschluss bei 300 RPM für 3min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Erneut wurde die Probe in 500µl PBS resuspendiert, für 3min bei 300 RPM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss erfolgte eine Resuspension der Probe in 500µl PBS, gefolgt von der Zugabe von 500µl DNA Extraktionspuffer. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 5min wurde die Probe erneut bei 300 RPM für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Probe wurde in 300µl DNA-Färbelösung resuspendiert und 30min unter Lichtausschluss

bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin konnte die Probe in das FACS übertragen werden, wo eine lasergestützte Zellzyklusuntersuchung stattfand. Die erhaltenen Messdaten wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet und grafisch dargestellt.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Zellcharakterisierung

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wurde bereits durch mehrere Autoren als einer der treibenden Kräfte in der Entstehung und dem Wachstum von Leiomyosarkomen bestätigt [36, 37, 91]. In der vorliegenden Studie wurden vier Leiomyosarkom-Zelllinien mit bekannten genetischen Veränderungen dieses Signalweges untersucht.

SK-LMS 01, eine kommerziell erhältliche, sowie LMS 03, LMS 04 und LMS 05, welche durch Dr. Jonathan Fletcher am *Brigham and Women's Hospital* in Boston etabliert wurden,wurden verwendet.

Zu diesen Zelllinien lagen Informationen über den Ursprung der Zelllinie sowie die vorhandenen genetischen Veränderungen vor (Tab. 6).

	SK-LMS 01	LMS 03	LMS 04	LMS 05
Ursprung der Zelllinie	Uterus	Metastase (Diaphragma) P.: Oberschenkel	Metastase (Retroperitoneum) P.: Uterus	Oberschenkel
TSC2				inaktivierende Mutation (Asp1143Val)
RB			Deletion	
PTEN		homozygote Deletion	homozygote Deletion	
TP53	heterozygot G245S und M237K	homozygote Splice-Stellen Mutation	homozygote Deletion	
NF-1	Deletion R1276fs*9			
Sonstiges	c-Met Überexpression, GNAS A210P	ARID1A V1817I	ARID1A M890V	konstitutive mTOR-Aktivierung, STK11 920+32G>A

Tabelle 6: Genetische Aberrationen der untersuchten Leiomyosarkom-Zelllinien SK-LMS 01, LMS 03,

LMS 04 und LMS 05. Die Daten dieser Analysen stammen aus Untersuchungen des *Brigham and Women's Hospitals* in Boston unter der Leitung von Dr. Jonathan Fletcher sowie dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen.

Diese gegebenen Informationen wurden mittels Western Blot-Analysen validiert. Bestätigt werden konnten die Deletion von RB in LMS 04 sowie die PTEN Deletionen in LMS 03 und LMS 04 durch Fehlen der charakteristischen Proteinbande. Weiterhin zeigt sich in gleicher Weise die bekannte NF-1 Deletion in SK-LMS 01. Eine Veränderung im TSC2 Protein von LMS 05 konnte mittels Western Blot nicht bestätigt werden. Deutlich stärkere Proteinbanden zeigten sich in der Zelllinie SK-LMS 01 bei den Proteinen p53 sowie p27 im Vergleich mit den anderen Zelllinien (Abb. 6).

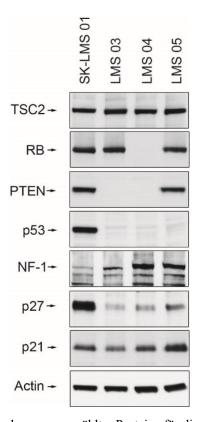


Abbildung 6: Western Blot-Analysen ausgewählter Proteine für die verwendeten LMS-Zelllinien.

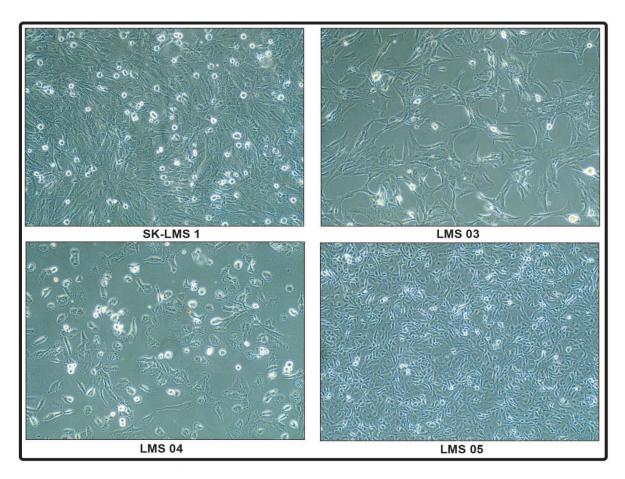


Abbildung 7: Morphologie der LMS-Zelllinien im Hellfeld (10-fache Vergrößerung)

# 3.2 Überblick der ausgewählten Inhibitoren

Zur Validierung der Wirkung von PI3K, mTOR und dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren wurde ein Screening mit derzeit verfügbaren Inhibitoren durchgeführt. Als Inhibitoren der PI3-Kinase sowie des Proteins mTOR, wurden Alpelisib bzw. Everolimus ausgewählt. Beide Substanzen zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu ihren Zielstrukturen aus und wurden bereits in klinischen Studien am Menschen eingesetzt. [92, 93] Für die duale Inhibition von

PI3K und mTOR wurden exemplarisch drei Inhibitoren ausgewählt, welche sich im Spektrum und der Affinität zu einzelnen PI3-Kinase Isoformen unterscheiden. Diese sind Dactolisib, Gedatolisib sowie Voxtalisib. Zusätzlich zu den bekannten Zielstrukturen zeichnen sich diese dualen Inhibitoren durch bekannte *off target*-Effekte aus, welche zur Inhibition weiterer Kinasen führen. Diese sind beispielsweise beim Dactolisib ATR bzw. beim Voxtalisib die DNA-PK.

# 3.3 Inhibition von PI3Ka bei Leiomyosarkom-Zelllinien

Alpelisib ist ein PI3-Kinase-Inhibitor, der sich durch eine hohe Affinität zur Untereinheit p $110\alpha$  auszeichnet. Alle anderen Isoformen der Klasse I PI3-Kinasen werden dabei nur in minimaler weise inhibiert. Der alleinige Einsatz dieses PI3K Hemmers zeigt in allen vier verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien nur minimale wachstumsinhibitorische Effekte. Diese betragen auch in hohen Konzentrationen von  $10\mu M$  maximal 10 - 15% gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abb. 8).

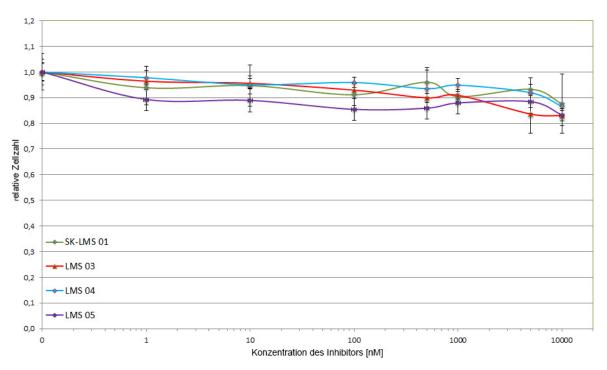


Abbildung 8: Proliferationsassay mit allen LMS-Zelllinien unter Verwendung von Alpelisib (PI3Kα Inhibition)

# 3.4 Inhibition von mTOR bei Leiomyosarkom-Zelllinien

Deutlich stärkere Effekte als unter PI3K-Inhibition lassen sich durch eine mTOR-Inhibition in Leiomyosarkomen erzielen. Dafür wurde in der vorliegenden Studie Everolimus verwendet. Im Zytotoxizitätsassay lassen sich Wachstumshemmungen von 20-40% gegenüber der DMSO-Kontrolle, abhängig von der betrachteten Zelllinie, erzielen. Dabei liegen in allen Zelllinien die größten Effekte in einem Bereich bis 100nM. Darüber hinaus lassen sich auch bei steigenden Konzentrationen des Inhibitors keine zusätzlichen wachstumsinhibitorische Wirkungen nachweisen (Abb. 9).

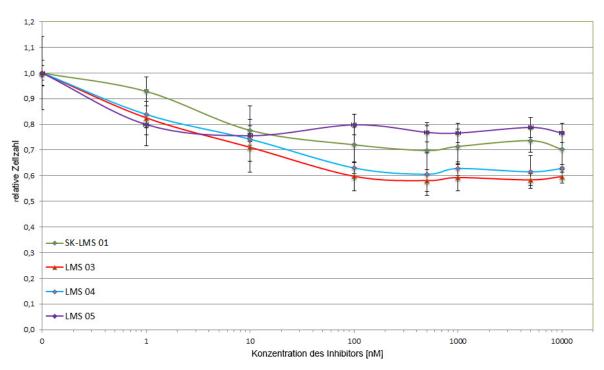


Abbildung 9: Proliferationsassay mit allen Zelllinien unter Verwendung von Everolimus (mTOR-Inhibition).

# 3.5 PI3K- und mTOR-Inhibitoren zeigen keine Kombinationseffekte

Zur Evaluation der gemeinsamen Wirkung eines PI3K und mTOR-Inhibitors wurden Alpelisib und Everolimus in folgender Weise miteinander kombiniert:

Eingesetzt wurde eine feste Konzentration Alpelisib von 5μM, die mit ansteigenden Konzentrationen von Everolimus (1nM, 10nM, 100nM, 500nM, 1000nM, 5000nM, 10000nM) kombiniert wurden. Dabei wurde deutlich, dass die kombinierte Wirkung der beiden Inhibitoren keinen stärkeren wachstumshemmenden Effekt auf die Zellen ausübt als die Anwendung des mTOR-Inhibitors allein. Die Kurven beider Versuche verlaufen nahezu deckungsgleich. Lediglich in LMS 04 zeigt initial in niedrigen Konzentrationen bis 100nM eine stärkere Wachstumsinhibition (Abb. 10)·

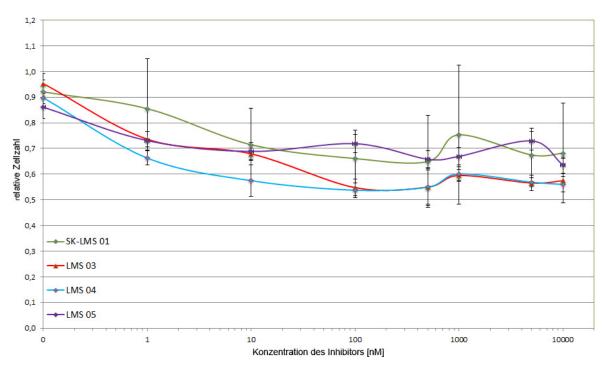


Abbildung 10: Proliferationsassay mit allen Zelllinien unter Verwendung von Alpelisib (PI3Kα-Inhibition) in ansteigenden Konzentrationen mit einer festen Konzentration von 5μM Everolimus (mTOR-Inhibitor)

## 3.6 Stärkere Effekte durch duale PI3K/mTOR-Inhibition

Alle dualen PI3K/mTOR Inhibitoren zeichnen sich durch eine zweifach inhibitorische Wirkung sowohl auf die PI3-Kinase als auch auf mTOR aus. Dabei weisen sie große Schwankungen der Bandbreite ihrer Wirkung auf die einzelnen katalytischen Untereinheiten (Isoformen) der PI3-Kinase als auch auf deren Affinität auf.

Gedatolisib besitzt ein vergleichsweise enges Wirkungsspektrum. Es inhibiert zwei der vier Isoformen der Klasse I PI3-Kinasen, hat jedoch im Vergleich zu den anderen, in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren die höchste Affinität zu diesen sowie auch zu mTOR. Gedatolisib ist der einzige, verwendete Inhibitor, bei dem in allen Zelllinien die IC50-Werte erreicht werden. Diese liegen bei SK-LMS 01 bei 20nM, bei LMS 03 bei 40nM, bei LMS 04 bei 10nM und bei LMS 05 bei 700nM (Abb. 11 - 14).

Ähnliche, wenn auch etwas schwächere Effekte sind unter der Verwendung von Dactolisib zu beobachten. Dactolisib besitzt im Vergleich zum Gedatolisib schwächere Affinitäten zu den einzelnen katalytischen Untereinheiten der PI3K, zeigt jedoch eine inhibitorische Wirkung gegenüber allen vier Isoformen der Klasse I PI3K. Die IC50-Werte liegen bei SK-LMS 01 und LMS 03 in Bereichen, wie sie auch durch Gedatolisib erreicht werden. LMS 04 weist einen mehr als zehnfach so hohen IC50-Wert im Vergleich zum Gedatolisib auf (110nM) und in LMS 05 wird dieser Wert selbst in hohen Konzentrationen von 10μM nicht erreicht. Die schwächste Wirkung der untersuchten Inhibitoren wies Voxtalisib auf. Es besitzt deutlich schwächere Affinitäten zu den katalytischen Untereinheiten der Klasse I PI3-Kinasen und zu mTOR als die beiden vorgenannten Inhibitoren, besitzt zusätzlich jedoch eine hemmende Wirkung auf die DNA-Proteinkinase. Voxtalisib zeigt in allen Zelllinien nur schwache bis sehr schwache wachstumshemmende Eigenschaften. In LMS 04 und LMS 05 beträgt diese Wachstumsinhibition auch in höheren Konzentrationen von 10μM nicht mehr als 10% gegenüber der DMSO-Kontrolle. In den Zelllinien SK-LMS 01 und LMS 03 kann dieser Wert auf 30% bzw. 20% gesteigert werden.

Aufgrund der überlegenen inhibitorischen Wirkung von Gedatolisib gegenüber den beiden anderen dualen Inhibitoren wurde im Verlauf dieser Arbeit Gedatolisib für die weiteren Invitro- als auch In-vivo-Versuche herangezogen.

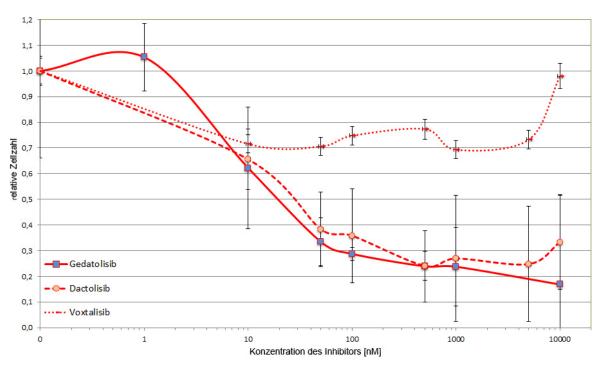


Abbildung 11: Proliferationsassay mit ausgewählten dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren in SK-LMS 01.

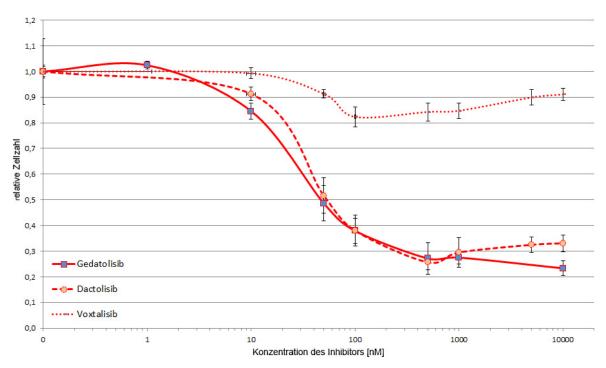


Abbildung 12: Proliferationsassay mit ausgewählten dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren in LMS 03

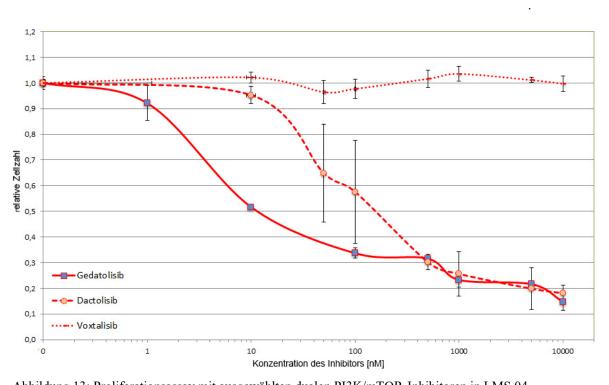


Abbildung 13: Proliferationsassay mit ausgewählten dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren in LMS 04.

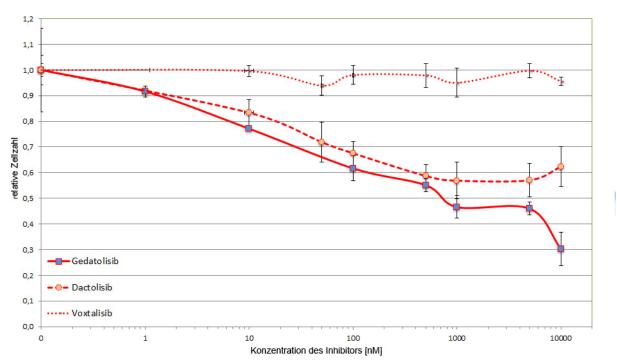


Abbildung 14: Proliferationsassay mit ausgewählten dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren in LMS 05.

Zur Überprüfung dieser wachstumsinhibitorischen Effekte auf Proteinebene wurden Western Blot-Analysen durchgeführt.

Exemplarisch für die Aktivierung des PI3K-Signalweges wurden drei Proteine ausgewählt, die durch ihre phosphorylierte Form den Aktivitätsgrad widerspiegeln. Diese Proteine sind AKT, S6 und 4EBP1.

Alpelisib führt in einer Dosierung von 5 μM zur nahezu kompletten Inhibition der Phosphorylierung von AKT. Nachgeschaltete Proteine der Signalkaskade werden in ihrem Aktivitätslevel geringfügig beeinflusst. Eine minimale Inhibition von pS6 ist nur in LMS 05 bei einer Konzentration von 5μM zu beobachten, wohingegen es in keiner der vier Zelllinien zur Inhibition von p4EBP1 kommt. Bezüglich der pMAPK kommt es bei LMS 04 zu einer Steigerung der Proteinexpression. Bei einer Alpelisibkonzentration von 5μM wird die Intensität dieses Proteins um den Faktor 5,48 gesteigert (Abb. 15). Im Western Blot zeigt Everolimus in einer Konzentration von 1μM eine komplette Hemmung von pS6 in allen Zelllinien und eine geringgradige Inhibition von p4EBP1.

Zu einer steigenden Proteinintensität der pMAPK kommt es wie beim Einsatz von Alpelisib bei LMS 04. Diese Induktion ist mit einer Steigerung der Proteinexpression um den Faktor 3,27 jedoch geringer als bei der Behandlung mit Alpelisib (Abb. 15).

Eine deutliche Inhibition von AKT wird in allen Zelllinien bei der Behandlung mit Gedatolisib in Konzentrationen von 1nM-1000nM erreicht (Tab. 15). Dabei schwanken die Werte der inhibitorischen Konzentration von 10nM in LMS 04 bis 500nM in LMS 03. Ähnliche Effekte werden auch am Ende des PI3K-Signalweges bei der Betrachtung von S6 und 4EBP1 deutlich. Wie bei AKT erfolgt eine komplette Inhibiton dieser Proteine. Am deutlichsten ist diese Hemmung in SK-LMS 01, LMS 04 und LMS 05 zu beobachten, wo eine komplette Inhibition bereits ab einer Konzentration von 50nM erfolgt. Die resistenteste Zelllinie ist in diesem Fall LMS 03. Hier erfolgt eine komplette Inhibition dieser beiden Proteine durch Gedatolisib ab einer Konzentration 500nM. erst von Wie bereits durch mehrere Autoren beschrieben, kann es bei der Verwendung eines dualen PI3K/mTOR-Inhibitors zu einer kompensatorischen Induktion der pMAPK kommen. Diese bekannten Kompensationsmechanismen konnten auch in den verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien beobachtet werden. Bei Konzentrationen von 1000nM Gedatolisib wurde eine Induktion der pMAPK um den Faktor 1,43 in SK-LMS 01, um 6,35 in LMS 04 und um den Faktor 3,74 in LMS 05 beobachtet. Für LMS 03 konnte eine solche Steigerung der pMAPK-Expression nicht bestätigt werden.

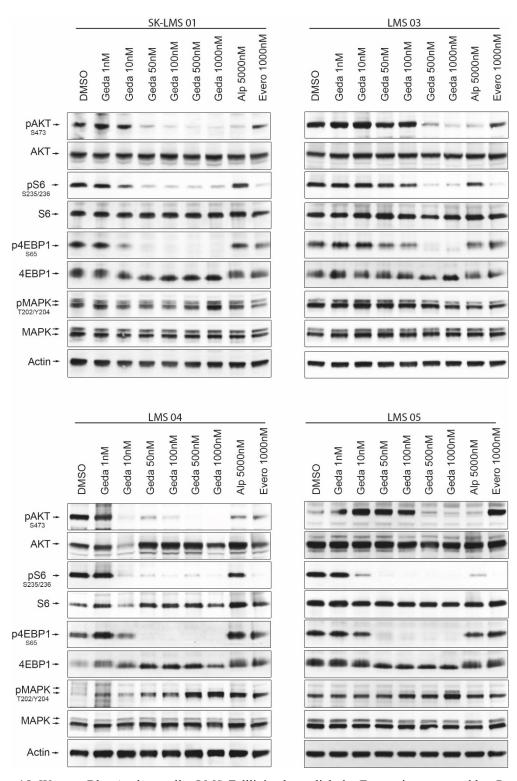


Abbildung 15: Western Blot-Analysen aller LMS-Zelllinien bezüglich der Expression ausgewählter Proteine des PI3K-Signalweges in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form.

# 3.7 Untersuchung des additiven Effektes von MAPK Inhibitoren in Kombination mit Gedatolisib

Aufgrund der bestätigten Induktion der pMAPK in drei der vier verwendeten Zelllinien wurde zur Kompensation dieses negativen Feedbackmechanismus Trametinib, ein MEK Inhibitor, in den Leiomyosarkom-Zelllinien verwendet. Dieses wurde sowohl allein als auch in Kombination mit Gedatolisib angewandt. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich zeigt sich lediglich SK-LMS 01 gegenüber der Behandlung mit Trametinib empfindlich. Dort können in hohen Konzentrationen von 10μM inhibitorische Effekte zwischen 40% und 50% gegenüber der DMSO-Kontrolle erzielt werden. Alle anderen Zelllinien zeigen nur geringe Sensitivitäten gegenüber der alleinigen MEK-Inhibition durch Trametinib.

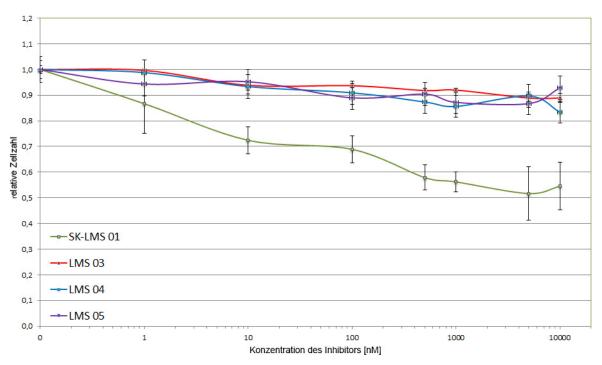


Abbildung 16: Proliferationsassay mit allen LMS-Zelllinien unter Verwendung von Trametinib (MEK-Inhibition).

Zur Überprüfung der Wirkung des Trametinib auf dessen Zielstruktur wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Diese bestätigen eine deutliche Inhibiton der pERK bereits ab einer Konzentration von 50nM in allen vier Zelllinien (Abb.17).

Weiterhin wurden Zytotoxizitätsassays unter der kombinierten Anwendung beider Inhibitoren (Gedatolisib + Trametinib) durchgeführt. Dabei wurde sowohl Gedatolisib in einer

Konzentration von 10nM mit ansteigenden Konzentrationen von Trametinib, als auch Trametinib in einer Konzentration von 100nM mit ansteigenden Konzentrationen von Gedatolisib kombiniert.

In der Kombination von 10 nM Gedatolisib mit steigenden Konzentrationen von Trametinib zeigt sich in allen Zelllinien ein additiver Effekt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve des Trametinib wird dabei um den Wert der Sensibilität der einzelnen Zelllinien gegenüber der Exposition mit Gedatolisib in einer Konzentration von 10nM verschoben. Die Verschiebung der Kurven in Richtung der x-Achse beträgt im Mittel bei SK-LMS 01 17%, bei LMS 03 10%, bei LMS 04 26% und bei LMS 05 24%.

Stärkere kombinatorische Effekte wurden in der Verwendung von 100nM Trametinib mit steigen Konzentrationen Gedatolisib beobachtet. Sowohl in der Zelllinie LMS 03 (17% stärkere Wachstumsinhibition) als auch in LMS 05 (14,4% stärkere Wachstumsinhibition) kommt es zu deutlichen additiven Effekten verglichen mit den Dosis-Wirkungs-Kurven unter der alleinigen Anwendung von Gedatolisib

In der Zelllinie LMS 04 verlaufen hingegen die Kurven der alleinigen Verwendung von Gedatolisib und der Kombination mit 100nM Trametinib nahezu deckungsgleich. In SK-LMS 01 wird unter den beschriebenen Versuchsbedingungen sogar ein synergistischer Effekt erzielt (Abb. 18).

Proteinanalysen unter der kombinierten Anwendung beider Inhibitoren zeigen in den Zellinien SK-LMS 01 sowie LMS 03 eine Inhibition von Proteinen des PI3K-Signalweges in niedrigeren Konzentrationen des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors als in deren alleiniger Anwendung. SK-LMS 01 zeigt bereits ab einer Konzentration von 50nM Gedatolisib kombiniert mit 50nM Trametinib eine deutliche Inhibition von pAKT. Eine vergleichbare Inhibition wird in der alleinigen Anwendung von Gedatolisib erst ab einer Konzentration von 100nM erreicht. Ähnliche, wenn auch schwächere Effekte werden bei der Betrachtung von pS6 sowohl in SK-LMS 01, als auch in LMS 03 deutlich (Abb. 17).

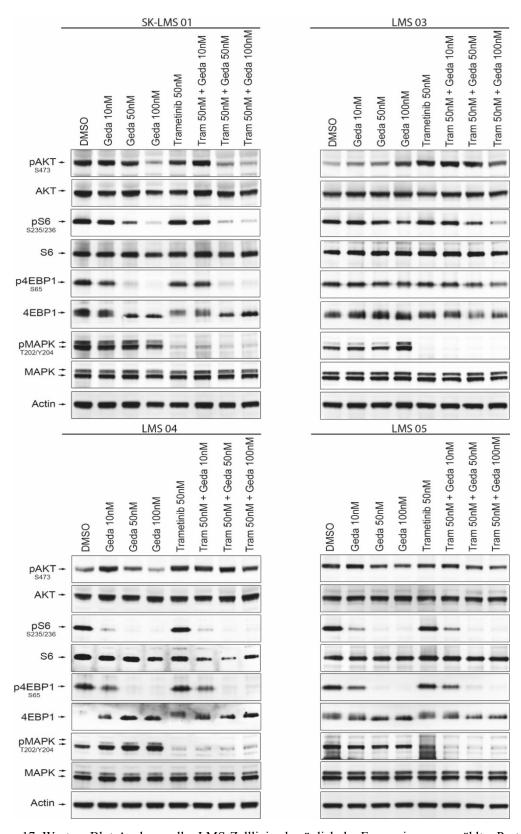


Abbildung 17: Western Blot-Analysen aller LMS-Zelllinien bezüglich der Expression ausgewählter Proteine des PI3K-, sowie des MAPK-Signalweges in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form.

Zur Validierung des synergistischen Effektes von Trametinib und Gedatolisib in SK-LMS 01 wurde die Methodik des Isobologram verwendet, in der kombinatorische Effekte quantitativ dargestellt werden können. Auf Grundlage eines Algorithmus wird ein kombinatorischer Index (CI) berechnet. Ein synergistischer Effekt wird bei kombinatorischen Indizes unter eins erreicht. Je niedriger dieser Zahlenwert, desto höher der synergistische Effekt. Für die beiden eingesetzten Inhibitoren kann in SK-LMS 01 ein kombinatorischer Index von bis zu 0,2 errechnet werden. Dieser Wert wird besonders häufig in 1:1 Kombinationen von Trametinib und Gedatolisib erreicht und zeigt ein hohes Maß an Synergie (Abb. 18).

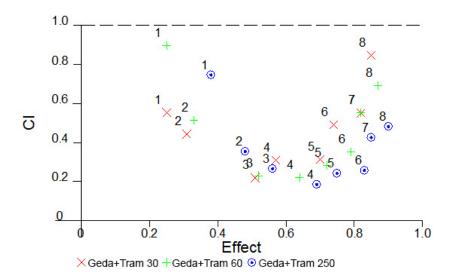
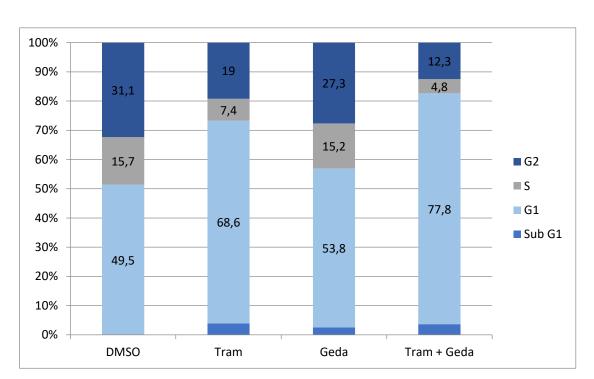


Abbildung 18: Darstellung von kombinatorischen Effekten mittels Isobologram in SK-LMS 01. Aufgetragen sind jeweils ansteigenden Konzentrationen von Gedatolisib (8nM, 15nM, 30nM, 60nM, 125nM, 250nM, 500nM, 1000nM), kombiniert mit festen Konzentrationen von Trametinib (rot:30nM, grün:60nM, blau:250nM).

Inwieweit diese Kombination einen Einfluss auf die Teilungsaktivität der Zelllinie SK-LMS 01 zeigt, wurde mittels Zellzyklusanalysen untersucht. Nach der Behandlung mit 10nM Gedatolisib konnte der prozentuale Anteil an Zellen, welche sich in der S-/G2-Phase befinden, auf 42,5%, gegenüber der DMSO-Kontrolle mit einem Anteil von 46,8%, gesenkt werden. Eine stärkere Verkleinerung dieser prämitotischen Phasen wurde hingegen mit der alleinigen Behandlung von 100nM Trametinib erreicht. Der Anteil der Zellen der S-/G2-Phase betrug in diesem Fall 26,4%. Der stärkste Effekt wurde in der Kombination beider Inhibitoren deutlich, in welcher der prozentuale Anteil auf 17,1% reduziert werden konnte (Abb. 19). Die Absenkung



der S- und G2-Phase des Zellzyklus zeigt somit einen Zellzyklusarrest unter der kombinierten Anwendung von Gedatolisib und Trametinib in SK-LMS 01 an.

Abbildung 19: Zellzyklusbestimmungen von SK-LMS 01. Die eigesetzten Konzentrationen der Inhibitoren für Gedatolisib (duale PI3K/mTOR-Inhibition) lagen bei 10nm und für Trametinib (MEK-Inhibition) bei 100nM.

# 3.8 Xenograftversuche

#### 3.8.1 Subkutanes Engraftment

Zur Generierung von solidem Tumormaterial, als auch zur Überprüfung des subkutanen Engraftment der vier Leiomyosarkomzelllinien in der Nacktmaus wurden Zellen subkutan injiziert. Aufgrund der vorherigen lentiviralen Transduktion der Zellen mit Luciferase konnte die Entwicklung des Tumormaterials im lebenden Tier dargestellt und dokumentiert werden. Alle vier verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien zeigten eine hundertprozentige Engraftmentrate in den Versuchstieren (Abb. 20). Die benötigten mittleren Zeiten bis zum Erreichen einer großen, soliden Tumormasse sind dabei stark von der verwendeten Zelllinie abhängig.

Die kürzesten Abstände zwischen der Injektion der Zellen und dem Erreichen einer großen Tumormasse (Abbruchkriterien nach FELASA) benötigten LMS 03 und LMS 04 mit einer

durchschnittlichen Zeit von 3 Wochen. SK-LMS 01 benötigte 4 Woche und LMS 05 zeigte mit einer durchschnittlichen Wachstumszeit von einem halben Jahr das langsamste Wachstum aller Zelllinien.

Zelllinie	Verlaufskontrolle	Engraftmentrate	Zelllinie	Verlaufskontrolle	Engraftmentrate
SK-LMS 01		100%	LMS 04	100	100%
LMS 03		100%	LMS 05		100%

Abbildung 20: Engraftmentrate im subkutanen Xenograftversuch bei allen vier LMS-Zelllinien. Dargestellt sind die Versuchstiere in Narkose in einer Dunkelkammer zur Detektion von Photonen, welche durch Luciferase transduzierte Zellen emittiert werden.

### 3.8.2 Etablierung Nierenkapselmodell

Zur Validierung eines Metastasierungsmodells für Leiomyosarkome wurde das Nierenkapselmodell für die Nacktmaus ausgewählt. Lentiviral transduzierte Tumoren wurden aus Spendertieren entnommen (subktane Xenograftversuche) und subrenal in zehn Empfängertiere implantiert. Ziel dieses Eingriffes war die Entwicklung eines soliden Tumors unter der Nierenkapsel sowie eine eventuelle Metastasierung in andere Organe.

Nach erfolgreicher Durchführung dieser OP wurde ein- bis zweimal wöchentlich ein Screening zur Überprüfung des Engraftments unter der Nierenkapsel durchgeführt.

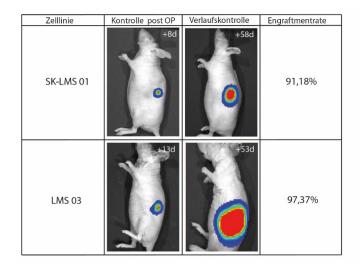
Hohe Engraftmentraten wurden dabei in den Zelllinien SK-LMS 01 sowie LMS 03 deutlich. Jeweils neun von zehn Versuchstieren zeigten sowohl postoperativ als auch in der Abschlusskontrolle nach etwa zwei Monaten starke Lumineszenzsignale in der linken Flanke.

Deutlich geringer waren die Engraftmentraten der beiden anderen Zelllinien. In der Zelllinie LMS 04 zeigte eine von zehn Mäusen in der ersten postoperativen Kontrolle ein schwaches Lumineszenzsignal, welches jedoch dort bei der Abschlusskontrolle nach 2 Monaten nicht mehr detektierbar war. *Post mortem* durchgeführte Untersuchungen der linken Niere zeigten narbige Veränderungen, jedoch keinen Hinweis für ein Tumorwachstum in diesem Organ.

Etwas bessere Ergebnisse wurden in der postoperativen Kontrolle in LMS 05 beobachtet. Fünf der neun verwendeten Versuchstiere zeigten postoperativ ein schwaches Luminezenzsignal in der linken Flanke. Eine erwartete Zunahme des Signales nach zwei Monaten blieb jedoch aus. Stattdessen waren weiterhin lediglich schwache Signale ermittelbar. Zur Überprüfung des Zeitraumes bis zum Erreichen eines starken Luminszenzsignales wurde der Versuch über die geplanten zwei Monate hinweg weitergeführt. Erst bei der Kontrolle am Tag 197 nach der OP zeigte auch LMS 05 vergleichbar starke Signale, wie sie in SK-LMS 01 und LMS 03 nach zwei Monaten beobachtet wurden (Abb. 21).

Nach Ablauf der Verlaufskontrollen wurden die Versuchstiere aller Zelllinien einer Sektion unterzogen, um Rückschlüsse der Stärke des Lumniszenzsignals auf die eigentliche Tumorgröße zu erhalten. Dabei zeigte sich eine starke Korrelation zwischen gemessener Intensität des Lumineszenzsignals und der an der linken Niere gebildeten Tumormasse. Mit steigender Größe des Tumors stieg auch die Intensität des Signals proportional an.

Aufgrund der geringen Engraftmentrate von LMS 04 und LMS 05 wurden diese beiden Zelllinien von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.



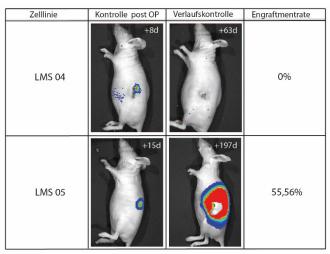


Abbildung 21: Engraftmentrate im subrenalen Xenograftversuch bei allen vier LMS-Zelllinien. Dargestellt sind die Versuchstiere in Narkose in einer Dunkelkammer zur Detektion von Photonen, welche durch Luciferase transduzierte Zellen emittiert werden. Pro Zelllinien wurde jeweils eine postoperative und eine Aufnahme an Ende der Versuchsreihe abgebildet.

Nach erfolgreicher Etablierung des Nierenkapsel-Xenograftmodells in SK-LMS 01 und LMS 03 sollte deren Potential zur Ausbildung von Metastasen untersucht werden. Hierzu wurden weiteren Versuchstieren Tumormaterial der jeweiligen Zelllinie unter die Nierenkapsel implantiert. Das erfolgreiche Engraftment wurde erneut mittels In-vivo-Imager überprüft. Nach Ablauf von zwei Monaten wurden alle Versuchstiere einer Sektion unterzogen. Makrometastasen konnten bei dieser Untersuchung bei keinem der Tiere festgestellt werden. Weitere Untersuchungen erfolgten am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen durch einen Pathologen. Mithilfe histologischer Verfahren (HE-Färbungen) konnten keine Mikrometastasen in den eingereichten Lungengeweben der Versuchstiere bestätigt werden. Zur Validierung der Ergebnisse der Pathologie wurden Gewebeproben aus den in Paraffin eingebetteten Lungenproben gewonnen und eine PCR zum Nachweis von Luciferase-positiven-Zellen durchgeführt. Weder in Versuchstieren mit der Zelllinie SK-LMS 01 noch mit LMS 03 konnten Tumorzellen in den genommenen Gewebeproben der Lunge nachgewiesen werden (Abb. 22). Lediglich im Versuchstier 3.8 zeigte sich eine schwache Bande auf Höhe des Luciferase-Signals in der PCR. Nach erneuter Überprüfung des Organs im Institut für Pathologie konnten jedoch keine Tumorzellen nachgewiesen werden.

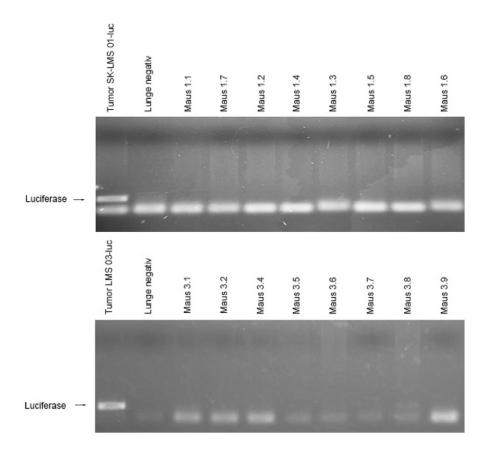


Abbildung 22: PCR-Auswertung von Lungenmaterial zur Untersuchung auf das Vorhandensein von Luciferase tragenden Zellen. Die Abbildungen zeigen jeweils die Zelllinie SK-LMS 01 (oben) und LMS 03 (unten).

Das Nierenkapselmodell hat sich im Versuchstier Nacktmaus, unter Verwendung von Leiomyosarkom-Zelllinien, als Metastasierungsmodell für nicht geeignet herausgestellt. In keiner der gesammelten Gewebeproben der Lunge gab es einen Hinweis auf eine Metastasierung in dieses Organ.

## 3.8.3 In-vivo-Therapie

Zur Beurteilung der inhibitorischen Eigenschaften von Gedatolisib und Trametinib in vivo wurde deshalb auf das subkutane Xenograftmodell zurückgegriffen. Nacktmäusen wurden dabei 2,5 Millionen Zellen der Leiomyosarkomzelllinie SK-LMS 01 subkutan in beide Flanken injiziert. Nach einer einmonatigen Anwachsperiode wurden die Versuchstiere in vier randomisierte Gruppen geteilt und nach einem festgelegten Behandlungsplan therapiert. Die orale Applikation von Trametinib erfolgte dabei täglich und die parenterale Applikation von Gedatolisib alle drei Tage. Die Größe der subkutanen Tumoren wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und nach dem Versuchsende, zwei Wochen nach Therapiebeginn,

evaluiert. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der Tumorlast von therapierten Mäusen gegenüber den Kontrolltieren. Der mediane Zuwachs der Tumormasse betrug in der Kontrollgruppe 122,8 mm³. Deutlich geringer fielen dabei die medianen Zuwächse in den anderen Gruppen aus. Unter der Behandlung mit Trametinib lag dieser Zuwachs bei 26,7 mm³, bei Gedatolisib bei 30,8 mm³ und unter der kombinierten Anwendung der beiden Inhibitoren bei 26,1 mm³. Demzufolge lässt sich unter der kombinierten Anwendung des dualen PI3K/mTOR- und des MEK-Inhibitors eine signifikante Reduktion der Tumorlast in der Nacktmaus erzielen (Abb. 23).

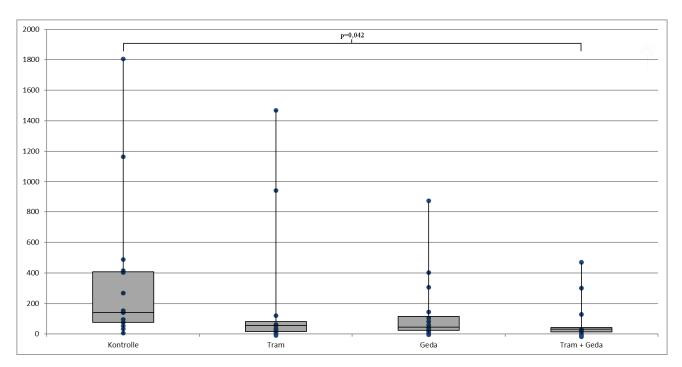


Abbildung 23: Auswertung des subkutanen Xenograftversuches von SK-LMS 01 mithilfe eines Boxplot-Diagramms. Aufgetragen sind die vier Versuchsgruppen (Kontrollgruppe, Trametinib-Gruppe, Gedatolisib-Gruppe und Trametinib- + Gedatolisib-Gruppe) unter Ermittlung der Tumor Ratio für jeden gebildeten Tumor.

## 4 Diskussion

Die Prognose von Patienten mit Leiomyosarkomen (LMS) ist trotz der Verbesserung von Operationstechniken und dem Einsatz intensiver multimodaler Therapien nach wie vor schlecht. Leiomyosarkome besitzen ein hohes Potential zur Metastasenbildung und Patienten im Stadium IV weisen eine mittlere Überlebenszeit von nur 1 Jahr auf [94]. Auch neuere für Leiomyosarkome zugelassene Therapien, wie Trabectedin (medianes progressionsfreies Überleben: 2,97 Monate [95]) oder Pazopanib (medianes progressionsfreies Überleben: 5 Monate [25]), weisen nur kurzfristige mediane Tumorkontrollraten auf [96]. Auch Immuntherapien scheinen bislang, bis auf wenige kasuistische Einzelfälle, ohne einen sicheren Wirkungshinweis zu sein [97].

Bislang stehen für betroffene Patienten keine Therapiekonzepte zur Verfügung, die auf rekurrenten genetischen Veränderungen basieren.

Seit einigen Jahren häufen sich die Hinweise darauf, dass der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg einer der entscheidenden Grundlagen in der Pathogenese von Leiomyosarkomen sein könnte. In neuen Veröffentlichungen wird stets auf die Abhängigkeit dieser beiden Komponenten hingewiesen. In einer großen Studie von The Cancer Genome Atlas wurde eine Reihe von Sarkomen auf ihre genetischen Veränderungen untersucht. Unter anderem wurde eine große Anzahl von Leiomyosarkomen in diese Untersuchungen eingeschlossen. Neben Mutationen bzw. Deletionen von TP53 und RB1 konnten auch regelhaft Veränderungen des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges nachgewiesen werden. Deletionen von PTEN Amplifikationen vom IGF1-Rezeptor, AKT, RICTOR und mTOR üben in einer Vielzahl der Fälle onkogene Wirkungen aus. Eine daraus resultierende Veränderung und Aktivierung des gesamten PI3K-Signalweges konnte in 84% der Proben nachgewiesen werden [36]. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch eine Studie aus dem Jahr 2018. In dieser wurden Tumoren von Patienten mit Leiomyosarkomen einer genetischen Analyse unterzogen. Erneut zeigte sich die sehr hohe Frequenz der Inaktivierung von TP53 und RB1, aber auch Veränderungen von PTEN konnten zu 54% in dieser Kohorte nachgewiesen werden [98]. Noch stärker scheint die genomische Aktivierung bei uterinen Leiomyosarkomen vorzukommen. In dieser Studie konnten Veränderungen im Proteingehalt von TP53, RB1, sowie PTEN in 92%, 88% bzw. 75% der Proben gezeigt werden [99].

Basierend auf den bisher publizierten Daten könnte bei einem Teil der Patienten mit Leiomyosarkomen eine konstitutive Aktivierung des PI3K-Signalwegs vorliegen. Über die biologische Abhängigkeit der Zelle von der Aktivierung ist bislang wenig bekannt.

Wir haben zunächst Zelllinien validiert und konnten typische, bei Leiomyosarkomen berichtete Veränderungen nachweisen. Diese Veränderungen stehen in Übereinkunft mit den bisher publizierten Daten. So konnten beispielsweise PTEN- (LMS 03 und LMS 04) und RB1 Deletionen (LMS 04), aber auch TP53-Mutationen (SK-LMS 01 und LMS 03) in unseren Zelllinien nachgewiesen werden. Des Weiteren besitzt die Zelllinie LMS 05 eine TSC2 Mutation, welche zu einer PI3K unabhängigen konstitutiven Aktivierung von mTOR führt. Auf Grundlage der vielfältigen Veränderungen der verwendeten Zelllinien war es möglich, ein breites Spektrum der im klinischen Alltag vorhandenen Mutationen von Leiomyosarkom-

Basierend auf diesem Wissen haben wir ein Screening mit einer großen Anzahl von derzeit verfügbaren Inhibitoren des PI3K-Signalweges durchgeführt. Am potentesten zeigten sich dabei die dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren. Zunächst wurden spezifische PI3K und mTOR Inhibitoren allein und in Kombination miteinander untersucht.

Patienten in unserem Modell abzubilden.

Es zeigte sich, dass die alleinige PI3K-Inhibition in allen untersuchten Zelllinien nahezu wirkungslos war. Das in dieser Studie verwendete Alpelisib ist ein spezifischer PI3Kα-Inhibitor. Die übrigen PI3K Isoformen der Klasse I werden dabei nur in minimaler Weise inhibiert. Anhand von Western Blot-Analysen konnte bestätigt werden, dass es bei einer alleinigen PI3Kα-Inhibition zu einer ineffektiven Hemmung des Signalweges kommt. Trotz des Einsatzes PI3K-Signalweg nicht gehemmt, des **Inhibitors** ist der anhand Phosphorylierungszustände nachgeschalteter Proteine bestätigt werden konnte. Möglicherweise stellt sich die Inhibition einer einzelnen PI3K-Isoform als zu ineffektiv dar, um zu einer Hemmung der Signaltransduktion beizutragen. Studien bestätigen eine überlegene Wirkung von isoformspezifischen PI3K-Inhibitoren, wenn die betroffenen Tumorzellen eine

treibende Mutation in der zu inhibierenden Struktur aufweisen. Kopf-Hals-Tumoren mit PI3KCA-Mutation zeigen beispielsweise eine deutlich gesteigerte Ansprechbarkeit auf Alpelisib gegenüber Tumorzellen mit intakten PI3Kα [100].

Die von uns verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien weisen keine PI3K-Mutationen auf. Es kommt jedoch zu einer indirekten Aktivierung der PI3-Kinase aufgrund der Deletion der Phosphatase PTEN. Dies ist bei der Hälfte der verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien der Fall. Diese Zelllinie zeigen jedoch keine erhöhte Ansprechbarkeit auf Alpelisib. Wir konnten mit unseren Ergebnissen demonstrieren, dass eine PTEN-Deletion keine direkte Rationale zum Einsatz eines PI3Kα-Inhibitors darstellt. Neuste Erkenntnisse von Ovarialtumoren mit einer PTEN-Deletion zeigen jedoch, dass diese Zellen eine starke Abhängigkeit von PI3Kβ besitzen könnten [101].

Diese Isoform wird von Alpelisib jedoch nur in minimaler Weise inhibiert, wodurch es vermutlich, trotz des Einsatzes des Inhibitors, zu einer Aktivierung des Signalweges kommt. Bestätigt werden konnten diese Daten in einer Studie mit dem spezifischen PI3Kβ Inhibitor KIN-193. In dieser Untersuchung zeigte sich eine starke Korrelation zwischen einer bestehenden PTEN-Deletion und der Ansprechbarkeit auf den Inhibitor KIN-193 in Brustkrebs und Prostatakarzinomen [102].

In den von uns verwendeten Leiomyosarkom-Zellinien konnten wir eine solche PI3Kβ-Abhängigkeit in PTEN-deletierten Zellen nicht nachweisen. LMS 03 und LMS 04 mit bestätigter PTEN-Deletion zeigten keine deutlichen Unterschiede bei dem Einsatz von Dactolisib (u.a. PI3Kβ-Inhibition) und Gedatolisb (keine PI3Kβ Inhibition). Dies wäre jedoch bei einer bestehenden PI3Kβ-Abhängigkeit zu erwarten gewesen.

Beim Einsatz von Alpelisib kann es durch intrinsische oder erworbene Resistenzen, trotz der Inhibition von  $PI3K\alpha$ , vermittelt über andere PI3K-Isoformen, zur Phosphorylierung von mTORC1 kommen. Dieser Mechanismus konnte beispielsweise bei der Untersuchung von Brustkrebszellen bestätigt werden [103]. Die Möglichkeit der Tumorzelle, die Signaltransduktion auf andere PI3K-Isoformen umschalten zu können, scheint eine entscheidende Rolle bei der Resistenzbildung und bei möglichem Therapieversagen zu sein. Eine Inhibition von mTOR, welches in der Signalkaskade unterhalb von PI3K liegt, scheint eine weitere mögliche Therapieoption darzustellen.

Gegenüber der schwachen Wirkung des PI3K-Inhibitors zeigt der mTOR-Inhibitor eine moderate Wirkung in allen verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien. Bereits bei der Betrachtung des PI3K-Inhibitors konnte gezeigt werden, dass der Fokus nicht auf der Inhibition einer einzelnen Zielstruktur liegen kann, sondern vielmehr darauf, wie essentiell diese Zielstruktur für die onkogene Signaltransduktion in der Zelle ist. S6 und 4EBP1 scheinen in diesem Zusammenhang als Endglieder der PI3K-Signalkette ein Indikator dafür zu sein, wie effektiv die Hemmung bestimmter Strukturen für die Unterbrechung der gesamten Kaskade ist. In einer Studie mit verschiedenen Sarkomzelllinien unter der Verwendung des mTOR-Inhibitors Ridaforolimus zeigte sich die Leiomyosarkomzelllinie SK-LMS 01 als eine der sensibelsten gegenüber Ridaforolimus. Quantifiziert werden konnten diese guten Ergebnisse in Leiomyosarkomen unter anderem durch eine signifikante Reduktion von phosphoryliertem S6 und 4EBP1, sowohl in vitro als auch in vivo [104]. Auch andere mTOR-Inhibitoren zeigen in Leiomyosarkomen ähnliche Effekte wie Ridaforolimus. In einer klinischen Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem Leiomyosarkom, die refraktär auf konventionelle Chemotherapie reagierten, konnten mit dem mTOR Inhibitor Temsirolimus mäßige Effekte erzielt werden. In der untersuchten Patientenkohorte konnte durch den Einsatz vom Temsirolimus in 50% der Fälle (3/6) ein stable disease erreicht werden [105]. Eine gezielte mTOR-Inhibition scheint in Leiomyosarkomen mit biologischer Abhängigkeit von diesem Signalweg, eine fundamentale Säule der antiproliferativen Therapie darzustellen.

Wobei die alleinige mTOR-Inhibition nur einen moderaten wachstumshemmenden Effekt ausübt und die Kombination mit einer PI3K-Inhibition einen deutlichen Therapievorteil zu verschaffen vermag [80].

Interessanterweise ist die Kombination von den PI3K- und mTOR-Inhibitoren Alpelisib und Everolimus bei der in vitro Betrachtung von Leiomyosarkomen deutlich ineffektiver als die Anwendung von kombinierten PI3K/mTOR Inhibitoren. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Inhibition mehrerer PI3K-Isoformen durch die dualen Inhibitoren liegen. Dactolisib zeigt beispielweise eine inhibitorische Wirkung gegenüber allen vier Isoformen der Klasse I PI3-Kinasen. Ein weiterer Aspekt scheint jedoch nicht nur in der Quantität, sondern auch in der Qualität der Inhibition bestimmter Isoformen zu liegen. Im Proliferationsassay besitzt Gedatolisib nahezu identische inhibitorische Eigenschaften wie Dactolisib, obwohl dieser Inhibitor weder eine Wirkung gegenüber der PI3Kβ-, noch der

PI3K $\delta$ -Isoform zeigt. Die Affinitäten zu den übrigen Zielstrukturen sind jedoch deutlich größer als dies bei Dactolisib der Fall ist. Die Affinität zur PI3K $\alpha$ -Isoform ist beispielsweise um das 10fache erhöht. Möglicherweise spielt in Leiomyosarkomen die kombinierte Inhibition der PI3K $\alpha$ -, als auch der PI3K $\gamma$ -Isoform eine entscheidende Rolle zum Erreichen eines starken antiproliferativen Effektes. Zudem scheint die Affinität zu den essenziellen Zielstrukturen ein wichtiger Faktor zu sein.

Voxtalisib ist ein selektiver PI3K $\gamma$ -Inhibitor mit hoher Affinität zu dieser Struktur. Die übrigen PI3K Isoformen der Klasse I als auch mTOR werden nur mit niedriger Affinität inhibiert. Es zeigt sich eine nur geringe antiproliferative Wirkung, was vermuten lässt, dass eine starke Inhibition von mTOR und der PI3K $\alpha$ -Isoform mit zusätzlicher Inhibition von PI3K $\gamma$  die effektivste Therapie von PI3K-Signalweg-abhängigen Leiomyosarkomen darstellt.

Ähnliche Daten zu Abhängigkeiten von bestimmten Isoformen der Klasse I PI3-Kinasen sind bereits von B-Zell-Lymphomen bekannt. Bei der selektiven Hemmung bestimmter Isoformen konnte in diesem Tumormodell gezeigt werden, dass sowohl eine effektive PI3K $\alpha$ -, als auch eine PI3K $\delta$ -Hemmung notwendig sind, um eine gute antiproliferative Wirkung zu erzielen [106].

Es scheint somit möglich zu sein, dass bestimmte Tumore von mehreren PI3K-Isoformen abhängig sind und die onkogene Signaltransduktion wechselweise durch die eine oder die andere Isoform übernommen werden kann.

Wie effizient die Hemmung einer bestimmten Struktur für die Tumorzelle ist kann, wie bereits erwähnt, daran festgemacht werden, inwieweit Proteine auf dem gesamten PI3K-Signalweg gehemmt werden.

Exemplarisch für duale Inhibitoren zeigt Gedatolisib in allen vier Leiomyosarkom-Zelllinien durch deutliche Reduktion der phosphorylierten Formen von AKT, S6 und 4EBP1 eine Hemmung des gesamten Signalweges. Diese Reduktion der Phosphorylierungszustände korreliert mit der effektiven Wachstumshemmung im Proliferationsassay. Erstaunlicherweise kommt es beim Einsatz von PI3K- bzw. mTOR-Inhibitoren nicht zu diesen deutlichen Veränderungen.

Alpelisib hemmt pAKT, aber seltsamerweise nicht pS6 und p4EBP1. Die Inhibition des gesamten Signalweges scheint aber essenziell für einen starken antiproliferativen Effekt zu sein.

Damit stehen unsere Ergebnisse über Leiomyosarkome nicht im Einklang mit anderen Veröffentlichungen. Wie aus der bereits zitierten Studie über Kopf-Hals-Tumoren hervorgeht, konnte in den dort verwendeten Zelllinien mit Alpelisib sowohl eine Hemmung von pAKT, als auch eine Hemmung von pS6 erreicht werden [100].

Ähnliche Daten liegen über Melanomzelllinien vor. Alpelisib zeigt auch dort einen deutlichen Effekt gegenüber pAKT und pS6 bereits in fünfach niedrigeren Konzentration, als sie bei unseren Leiomyosarkom-Zelllinien verwendet wurden [107]. Wir spekulieren hierzu, dass die eng miteinander verwobenen komplexen Signalnetzwerke der PI3K- und RAS/RAF/MAPK-Signalwege gewebespezifische Unterschiede aufweisen.

Die mTOR-Inhibition durch Everolimus scheint sich in ähnlicher Weise ineffektiv auf die gesamte PI3K-Signalkaskade auszuwirken. Wir konnten zeigen, dass Everolimus in unseren Leiomyosarkomzelllinien zwar die Phosphorylierung von pS6, jedoch nicht von pAKT und p4EBP1 hemmt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinkunft mit Daten zum myelodysplastischen Syndrom. Auch dort konnte durch den Einsatz von Everolimus zwar eine Inhibition von pS6, jedoch nicht von pAKT erzielt werden. In einigen Fällen führt die mTOR-Inhibition sogar zu einer leichten Induktion von pAKT [108]. Es scheint plausibel, dass eine genetische Veränderung oberhalb der mTOR-Ebene, beispielsweise durch eine PTEN-Deletion, zu einer möglichen Akkumulation von pAKT führen könnte. Diese Möglichkeit wurde aber nach unserem Wissensstand bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht weiter evaluiert. Weitere Daten zum nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom führen eine andere Möglichkeit der Induktion von pAKT an. Ein möglicher negativer feedback loop, welcher nach der Inhibition von mTOR aktiviert wird, könnte zu einer Induktion von pAKT führen. Diese pAKT-Induktion war mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 reversibel, wodurch ein Rückkopplungseffekt wahrscheinlich ist. Everolimus führte auch in dieser Studie jedoch zu einer Hemmung von pS6 und p4EBP1 [109].

Leiomyosarkome zeigen diese starke Inhibition durch Everolimus nicht. In keiner der vier verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien konnte eine Hemmung von p4EBP1 durch den Einsatz von Everolimus erzielt werden. Rückschlüsse aus der zuletzt genannten Studie könnten Aufschlüsse zu diesem Sachverhalt liefern. Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome reagieren

zwar mit einer Hemmung von p4EBP1 auf den Einsatz von Everolimus, weiterhin konnte aber zusätzlich gezeigt werden, dass es zu einer Steigerung von phosphoryliertem eIF4E kommt. Es scheint möglich, dass die PI3-Kinase für die Phosphorylierung und somit den daraus resultierenden Konflikt in der Zelle verantwortlich ist. Möglicherweise stellt sich ein instabiles Gleichgewicht des eIF4E in der Zelle zwischen der dephosphorylierten Form, getriggert durch 4EBP1, und der phosphorylierten Form, welche durch Einflüsse der PI3-Kinase zustande kommen. Es erscheint möglich, dass dieses Gleichgewicht in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zugunsten von peIF4E und in Leiomyosarkomen zugunsten von p4EBP1 verschoben sein könnte.

Diese Option sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Ähnliche kompensatorische Mechanismen wurden speziell bei der Anwendung von dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor Gedatolisib in unseren Studien beobachtet. Im Western Blot kommt es bei steigender Konzentration des Inhibitors zu einer kompensatorischen Aktivierung der pMAPK. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit bisher publizierten Daten zur Anwendung von dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren. In Pankreas- und Nierenkarzinomen, aber auch bereits in Leiomyosarkomen, konnte eine kompensatorische Aktivierung der pMAPK unter der Anwendung von Dactolisib beobachtet werden. Als Ursache für diese Mechanismen wird ein negativer feedback loop über den mTORC2-Komplex vermutet [78, 80, 110]. Dieses Phänomen scheint jedoch nicht nur eine Ursache der dualen Inhibition zu sein, sondern konnte auch bei der alleinigen Anwendung von mTOR- oder AKT- Inhibitoren, sowohl in vivo, als auch in vitro in diversen Tumoren beobachtet werden [76, 77, 81, 82]. Der genaue Mechanismus konnte bis zur jetzigen Zeit allerdings noch nicht genau geklärt werden. Vermutet wird in diesen Fällen das Einsetzen von negativen Rückkopplungsmechanismen und Quervernetzungen zwischen den Signalwegen, welche die Signaltransduktion vom PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, auf den RAS/Raf/MEK/ERK-Signalweg umschalten. Über diesen Signalweg werden nun weiterhin wachstumsstimulierende und proliferationsfördernde Signale an die Zelle weitergegeben.

Um dieses Umschalten auf den RAS/Raf/MEK/ERK-Signalweg in den von uns verwendeten Leiomyosarkom-Zelllinien zu unterbinden wurde der MEK-Inhibitor Trametinib eingesetzt. Zunächst wurde die alleinige Wirkung von Trametinib auf die vier Leiomyosarkom-Zelllinien untersucht. Trametinib zeigte lediglich in SK-LMS 01 einen wachstumshemmenden Effekt. In

dieser Zelllinie besteht eine NF-1-Deletion, welche zu einer konstitutiven Aktivierung und damit zu einer biologischen Abhängigkeit von diesem Signalweg führt. Rekapitulieren lässt sich dieses genetische Ereignis in Mausmodellen mit NF-1 Knockout. Die Versuchstiere reagierten auf diesen Knockout mit darauffolgender Adenovirusinjektion mit der Bildung von myogenen Tumoren und peripheren Nervenscheidentumoren. Nach der Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD325901 konnte das Wachstum der neu gebildeten Tumoren verzögert und die Ausbildung des membranständigen Rezeptors VEGFα reduziert werden [111].

In der Kombination des PI3K/mTOR- und des MEK- Inhibitors besteht demzufolge das Potential, mögliche negative Rückkopplungsmechanismen zu unterbinden und eine effektivere antiproliferative Therapie zu konzipieren, als es mit der Inhibition einzelner Signalwege der Fall wäre. Diese Effekte konnten jedoch nur in der Zelllinie SK-LMS 01 beobachtet werden. LMS 03, LMS 04 und LMS 05 zeigten diese erwünschten Effekte nicht. In SK-LMS 01 kommt es unter der kombinierten Anwendung von Gedatolisib (PI3K/mTOR-Inhibitor) und Trametinib (MEK Inhibitor) zu einem deutlich gesteigerten wachstumshemmenden Effekt. Eine Synergie und ein deutlicher Zellzyklus-Arrest unter Verwendung beider Inhibitoren konnte nachgewiesen werden. Solche synergistischen Effekte und das Einsetzen von Apoptosen konnten bereits in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen werden. In einer Studie mit Ovarialkarzinomen erreichte in allen sechs verwendeten Zelllinien die Kombination von Voxtalisib (PI3K/mTOR-Inhibitor) und Pimasertib (MEK-Inhibitor) einen synergistischen Effekt [112].

Diese Kombination wurde unseres Wissens bisher in Leiomyosarkomen noch nicht weiter untersucht. Diese Ergebnisse könnten daher eine Rationale für eine Studie sein, bei der eine Kombinationstherapie bei Patienten untersucht wird, die Mutationen beider Signalwege aufweisen.

Um diesen translationalen Ansatz weiter zu verfolgen, sollten diese vielversprechenden Ergebnisse im Xenograftversuch weiter validiert werden. Das Ziel war zunächst die Etablierung eines Metastasierungsmodelles für Leiomyosarkome. In Nacktmäusen betrugen die subkutanen Anwachsraten 100% für jede Zelllinie (10/10). Nach einer Anwachszeit von etwa zwei Monaten bildete sich bei drei von vier Zelllinien ein solider Tumor unter der Haut in der

Flankenregion. In diesen Xenograftversuchen konnten wir keine Hinweise auf pulmonale Metastasierungen feststellen.

Im sukutanen Xenograftversuch mit Nacktmäusen scheint es somit nicht möglich zu sein, ein Metastasierungsmodell für Leiomyosarkome zu etablieren.

Studien anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass eine Transplantation von Tumormaterial unter die Nierenkapsel zu einer besseren Engraftmentrate und invasivem und metastatischem Verhalten führen kann.

Als orthotopes Tumormodell ist die Niere hervorragend geeignet, um Invasivität und Metastasierungsverhalten patietennah im Mausversuch rekapitulieren zu können [113]. Aber auch andere Tumoren zeigen ähnliches biologisches Verhalten unter der Nierenkapsel. 2014 gelang es, Patientenmaterial von Lungentumoren unter die Nierenkapsel von Nacktmäusen zu transplantieren. Die Engraftmemtraten unter der Nierenkapsel waren sogar 9,1% höher als dies in der subkutanen Lokalisation der Fall war [114]. Weitere Versuche unter der Verwendung von endometrialen Tumoren zeigen unter der Nierenkapsel von NOD SCID gamma (NSG) Mäusen ein invasives und metastatisches Wachstum [115]. In unseren Studien mit den bekannten Leiomyosarkom-Zelllinien kam es zu hervorragenden Anwachsraten. Bei den Zelllinien SK-LMS 01 und LMS 03. LMS 04 und LMS 05 zeigten hingegen deutlich schlechtere Anwachsraten als dies im subkutanen Xenograftversuch der Fall war. Eine pulmonale Metastasierung konnte auch hier in keinem der durchgeführten Xenograftversuche bestätigt werden.

Es scheint somit nicht möglich zu sein, für Leiomyosarkome in Nacktmäusen ein Metastasierungsmodell durch subrenale Xenograftversuche zu etablieren. Möglicherweise scheint die Verwendung von NOD SCID Mäusen für zukünftige Versuche erfolgsversprechender zu sein. Auch die Möglichkeit eines orthotopen Tumormodelles, zur Etablierung eines Metastasierungsmodells für Leiomyosarkome sollte bei zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

### 5 Zusammenfassung

Leiomyosarkome (LMS) sind eine der am häufigsten auftretenden, mesenchymalen Tumoren des Menschen. Sie weisen eine glattmuskuläre Differenzierung auf und können prinzipiell im gesamten menschlichen Körper entstehen. Gehäuft werden sie jedoch im Retroperitoneum, den Extremitäten oder dem Uterus diagnostiziert. Leiomyosarkome zeichnen sich durch aggressives Wachstum aus und haben in einer Vielzahl der Fälle bei der Erstdiagnose dieser Erkrankung bereits Metastasen in anderen Organen wie Lunge, Leber oder den Knochen gebildet. Trotz intensiver multimodaler Therapien verstirbt ein Großteil der Patienten aufgrund von metastatischen Veränderungen. Bisher ist es nicht möglich, diese Erkrankung auf Grundlage von Therapien, basierend auf konkreten genetischen Veränderungen, zu behandeln.

Diverse Studien weisen darauf hin, dass es in Leiomyosarkomen gehäuft zu Dysregulationen im PI3K-Signalweg kommt und die gebildeten Tumoren eine biologische Abhängigkeit von diesem Signalweg zeigen. Mit diesem Wissen wäre es möglich, neue Therapiekonzepte für betroffene Patienten zu etablieren.

In dieser Arbeit sollte die Inhibition des PI3-Kinase-Signalweges auf die Proliferationsaktivität von Leiomyosarkom-Zelllinien untersucht werden. Wir konnten zeigen, dass sich mit dem Einsatz eines dualen PI3K/mTOR-Inhibitors in vitro deutlich stärkere Effekte erzielen lassen, als es bei der alleinigen Inhibition von PI3K oder mTOR möglich ist. Zusätzlich konnten wir mithilfe von Proteinanalysen Kompensationsmechanismen der Zelle aufdecken, welche es ermöglichen, einer Hemmung des PI3K-Signalweges entgegen zu wirken. Durch Feedbackmechanismen kommt es zur verstärkten Aktivierung des MAPK-Signalweges bei dem Einsatz von Inhibitoren des PI3K-Signalweges in Leiomyosarkomen. Dieser Kompensation konnte mit dem MEK-Inhibitor Trametinib entgegengewirkt werden. Die kombinierte Anwendung des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors Gedatolisib mit dem MEK-Inhibitor Trametinib zeigte in der Zelllinie SK-LMS 01 einen synergistischen Effekt. Durch in-vivo-Untersuchungen konnten die positiven Wirkungen der kombinierten Anwendungen beider Inhibitoren bestätigt werden. Es zeigte sich im subkutanen Xenograftversuch mit SK-LMS 01 eine signifikant reduzierte Tumormasse gegenüber der Kontrollgruppe.

Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten bei der Planung neuer Therapiekonzepte für Leiomyosarkom-Patienten berücksichtigt werden und könnten helfen, nicht nur eine bessere Therapie zu gewährleisten, sondern auch möglichen Resistenzen vorzubeugen.

### 6 Summary

#### Targeting the PI3K- and MAPK pathway in leiomyosarcoma

Leiomyosarcomas (LMS) are one of the most common soft tissue tumors in humans and typically show smooth-muscle differentiation. While these tumors can arise anywhere in the body, most LMS are found in the retroperitoneum, the extremities and the uterus. LMS are characterized by their aggressive growth and in many patients, at first diagnosis, metastases have already spread to other sites like lung, liver or bones. Despite intense, multimodal therapies the majority of patients die because of metastatic events. As of yet, no targeted therapies, exploiting concrete genetic aberrations have been approved for LMS treatment.

Various studies have shown a dysregulation and oncogenic addiction of the PI3K signaling pathway in LMS tumors, which could be exploited to establish new therapy concepts for patients.

In the current study we evaluated the inhibition of the PI3K signaling pathway in LMS cell lines in vitro and in vivo. We show that dual PI3K/mTOR inhibitors are superior to inhibitors of PI3K or mTOR alone. In addition we identified a compensatory feedback mechanism by which induction of MAPK signaling counteracts PI3K/mTOR inhibition. This effect could be successfully abrogated using the MEK inhibitor trametinib. Dose-combination experiments with the PI3K/mTOR inhibitor gedatolisib and trametinib revealed synergistic effects in one LMS cell line. In vivo experiments with a nude mouse LMS xenograft model confirmed the superior efficacy of combined treatment with these inhibitors, as observed by a significantly reduced tumor volume in combined treatment vs. control group.

These promising preclinical results could serve as a basis for new therapeutical concepts for LMS patients.

### 7 Literaturverzeichnis

- 1. Serrano, C. and S. George, *Leiomyosarcoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2013. **27**(5): p. 957-74.
- 2. Martin-Liberal, J., *Leiomyosarcoma: Principles of management*. Intractable Rare Dis Res, 2013. **2**(4): p. 127-9.
- 3. Cardesa, A., et al., *Pathologie: Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut*. Vol. Auflage: 3. 2008: Springer. 1043.
- 4. Lamm, W., et al., *Distinctive outcome in patients with non-uterine and uterine leiomyosarcoma*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 981.
- 5. Toro, J.R., et al., *Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases.* Int J Cancer, 2006. **119**(12): p. 2922-30.
- 6. D'Angelo, E. and J. Prat, *Uterine sarcomas: a review*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(1): p. 131-9.
- 7. Abeler, V.M., et al., *Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients.* Histopathology, 2009. **54**(3): p. 355-64.
- 8. Kapoor, R., A. Bansal, and S.C. Sharma, *Leiomyosarcoma of inferior vena cava: Case series of four patients.* J Cancer Res Ther, 2015. **11**(3): p. 650.
- 9. Baumann, A., et al., *Leiomyosarkome*. Gefässchirurgie, 2008(6/2008).
- 10. James D. Brierley, M.K.G., Christian Wittekind, *TNM Classicifiaction of malignant tumours*. 2017(8th Edition).
- des Guetz, G., et al., *Postirradiation sarcoma: clinicopathologic features and role of chemotherapy in the treatment strategy.* Sarcoma, 2009. **2009**: p. 764379.
- 12. Francis, J.H., et al., *Increased risk of secondary uterine leiomyosarcoma in hereditary retinoblastoma*. Gynecol Oncol, 2012. **124**(2): p. 254-9.
- 13. Bhatia, K., et al., Sarcomas other than Kaposi sarcoma occurring in immunodeficiency: interpretations from a systematic literature review. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(5): p. 537-46.
- 14. Demicco, E.G., et al., *Progressive loss of myogenic differentiation in leiomyosarcoma has prognostic value.* Histopathology, 2015. **66**(5): p. 627-38.
- 15. Tirumani, S.H., et al., *Metastatic pattern of uterine leiomyosarcoma: retrospective analysis of the predictors and outcome in 113 patients.* J Gynecol Oncol, 2014. **25**(4): p. 306-12.
- 16. Carvalho, J.C., D.G. Thomas, and D.R. Lucas, *Cluster analysis of immunohistochemical markers in leiomyosarcoma delineates specific anatomic and gender subgroups.* Cancer, 2009. **115**(18): p. 4186-95.
- 17. Gladdy, R.A., et al., *Predictors of survival and recurrence in primary leiomyosarcoma*. Ann Surg Oncol, 2013. **20**(6): p. 1851-7.
- 18. Wong, P., et al., *Postoperative radiotherapy improves local control and survival in patients with uterine leiomyosarcoma*. Radiat Oncol, 2013. **8**: p. 128.
- 19. Trovik, L.H., et al., *Adjuvant radiotherapy in retroperitoneal sarcomas. A Scandinavian Sarcoma Group study of 97 patients.* Acta Oncol, 2014. **53**(9): p. 1165-72.
- 20. Ma, S., et al., *Radiotherapy treatment of large esophageal leiomyosarcoma: A case report.*Oncol Lett, 2015. **9**(5): p. 2422-2424.
- 21. Abendroth, A. and S. Bauer, [Adjuvant chemotherapy for soft tissue sarcoma? a clear no-well yes-ish]. Dtsch Med Wochenschr, 2013. **138**(41): p. 2107-10.
- 22. Pervaiz, N., et al., A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. Cancer, 2008. **113**(3): p. 573-81.

- 23. Gupta, A.A., et al., Chemotherapy (gemcitabine, docetaxel plus gemcitabine, doxorubicin, or trabectedin) in inoperable, locally advanced, recurrent, or metastatic uterine leiomyosarcoma: a clinical practice guideline. Curr Oncol, 2013. **20**(5): p. e448-54.
- 24. Garcia-Del-Muro, X., et al., Randomized phase II study comparing gemcitabine plus dacarbazine versus dacarbazine alone in patients with previously treated soft tissue sarcoma: a Spanish Group for Research on Sarcomas study. J Clin Oncol, 2011. **29**(18): p. 2528-33.
- 25. Yoo, K.H., et al., Efficacy of pazopanib monotherapy in patients who had been heavily pretreated for metastatic soft tissue sarcoma: a retrospective case series. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 154.
- 26. Angarita, F.A., et al., *Trabectedin for inoperable or recurrent soft tissue sarcoma in adult patients: a retrospective cohort study.* BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 30.
- 27. Miura, J.T., et al., *Impact of chemotherapy on survival in surgically resected retroperitoneal sarcoma*. Eur J Surg Oncol, 2015. **41**(10): p. 1386-92.
- 28. Ricci, S., et al., *Does adjuvant chemotherapy improve survival for women with early-stage uterine leiomyosarcoma?* Gynecol Oncol, 2013. **131**(3): p. 629-33.
- 29. Mancari, R., et al., *Adjuvant chemotherapy in stage I-II uterine leiomyosarcoma: a multicentric retrospective study of 140 patients.* Gynecol Oncol, 2014. **133**(3): p. 531-6.
- 30. Weinberg, R.A., *The biology of cancer*. Second Edition ed. 2014: Garland Science. xx, 875 pages.
- 31. Kahan, B.D., et al., A phase I study of a 4-week course of SDZ-RAD (RAD) quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. Transplantation, 1999. **68**(8): p. 1100-6.
- 32. Huang, S. and P.J. Houghton, *Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic.* Curr Opin Investig Drugs, 2002. **3**(2): p. 295-304.
- 33. Alayev, A. and M.K. Holz, *mTOR signaling for biological control and cancer.* J Cell Physiol, 2013. **228**(8): p. 1658-64.
- 34. Yang, Q., et al., *Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(7): p. 1537-42.
- 35. El-Rifai, W., et al., *DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 985-90.
- 36. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, e.d.s.c. and N. Cancer Genome Atlas Research, *Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas*. Cell, 2017. **171**(4): p. 950-965 e28.
- 37. Setsu, N., et al., *The Akt/mammalian target of rapamycin pathway is activated and associated with adverse prognosis in soft tissue leiomyosarcomas.* Cancer, 2012. **118**(6): p. 1637-48.
- 38. Ishii, T., et al., *Activation of the Akt-mTOR and MAPK pathways in dedifferentiated liposarcomas*. Tumour Biol, 2015.
- 39. Yip, P.Y., *Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(2): p. 165-76.
- 40. Thorpe, L.M., H. Yuzugullu, and J.J. Zhao, *PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting.* Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 7-24.
- 41. Vanhaesebroeck, B., et al., *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 329-41.
- 42. Franco, I., et al., *PI3K class II alpha controls spatially restricted endosomal PtdIns3P and Rab11 activation to promote primary cilium function.* Dev Cell, 2014. **28**(6): p. 647-58.

- 43. Nemazanyy, I., et al., Class III PI3K regulates organismal glucose homeostasis by providing negative feedback on hepatic insulin signalling. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8283.
- 44. Gillham, H., et al., Intracellular movement of green fluorescent protein-tagged phosphatidylinositol 3-kinase in response to growth factor receptor signaling. J Cell Biol, 1999. **146**(4): p. 869-80.
- 45. Yu, J., et al., Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1379-87.
- 46. Milella, M., et al., *PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors.* Front Oncol, 2015. **5**: p. 24.
- 47. Kang, Y., et al., Regulation of AKT activity by inhibition of the pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P3 interaction using flavonoids. J Microbiol Biotechnol, 2018.
- 48. Toker, A. and S. Marmiroli, *Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease.* Adv Biol Regul, 2014. **55**: p. 28-38.
- 49. Ma, L., et al., *Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer.* Cancer Res, 2007. **67**(15): p. 7106-12.
- 50. Mok, K.W., D.D. Mruk, and C.Y. Cheng, Regulation of blood-testis barrier (BTB) dynamics during spermatogenesis via the "Yin" and "Yang" effects of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and mTORC2. Int Rev Cell Mol Biol, 2013. **301**: p. 291-358.
- 51. Mizunuma, M., et al., *mTORC2-SGK-1* acts in two environmentally responsive pathways with opposing effects on longevity. Aging Cell, 2014. **13**(5): p. 869-78.
- 52. Angliker, N. and M.A. Ruegg, *In vivo evidence for mTORC2-mediated actin cytoskeleton rearrangement in neurons.* Bioarchitecture, 2013. **3**(4): p. 113-8.
- 53. Holz, M.K., et al., mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. Cell, 2005. **123**(4): p. 569-80.
- 54. Dittrich, A., et al., *The HER2 Signaling Network in Breast Cancer--Like a Spider in its Web.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2014. **19**(3-4): p. 253-70.
- 55. Garner, A.P., et al., *Ponatinib inhibits polyclonal drug-resistant KIT oncoproteins and shows therapeutic potential in heavily pretreated gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients.*Clin Cancer Res, 2014. **20**(22): p. 5745-5755.
- 56. Patel, S., Exploring novel therapeutic targets in GIST: focus on the PI3K/Akt/mTOR pathway. Curr Oncol Rep, 2013. **15**(4): p. 386-95.
- 57. Kalsi, N., et al., *Biophysical aspect of phosphatidylinositol 3-kinase and role of oncogenic mutants (E542K & E545K)*. J Biomol Struct Dyn, 2016. **34**(12): p. 2711-2721.
- 58. Duenas, M., et al., *PIK3CA gene alterations in bladder cancer are frequent and associate with reduced recurrence in non-muscle invasive tumors.* Mol Carcinog, 2015. **54**(7): p. 566-76.
- 59. Arsenic, R., et al., *Analysis of PIK3CA mutations in breast cancer subtypes*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2014. **22**(1): p. 50-6.
- 60. Teicher, B.A., *Searching for molecular targets in sarcoma*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(1): p. 1-10.
- 61. Kumar, D.T. and C.G. Doss, *Investigating the Inhibitory Effect of Wortmannin in the Hotspot Mutation at Codon 1047 of PIK3CA Kinase Domain: A Molecular Docking and Molecular Dynamics Approach.* Adv Protein Chem Struct Biol, 2016. **102**: p. 267-97.
- 62. Gymnopoulos, M., M.A. Elsliger, and P.K. Vogt, *Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5569-74.

- 63. Chen, X.Y., et al., *PTEN inactivation by germline/somatic c.950\_953delTACT mutation in patients with Lhermitte-Duclos disease manifesting progressive phenotypes.* Clin Genet, 2014. **86**(4): p. 349-54.
- 64. Zhou, X.P., et al., *Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation.* Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1123-8.
- 65. Chen, H.J., et al., *Characterization of cryptic splicing in germline PTEN intronic variants in Cowden syndrome*. Hum Mutat, 2017. **38**(10): p. 1372-1377.
- 66. De Melo, J., L. He, and D. Tang, *The protein-protein interaction-mediated inactivation of PTEN*. Curr Mol Med, 2014. **14**(1): p. 22-33.
- 67. Dillon, L.M. and T.W. Miller, *Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function*. Curr Drug Targets, 2014. **15**(1): p. 65-79.
- 68. Bucheit, A.D., et al., Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations. Clin Cancer Res, 2014. **20**(21): p. 5527-36.
- 69. Roland, C.L., et al., *Analysis of Clinical and Molecular Factors Impacting Oncologic Outcomes in Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma*. Ann Surg Oncol, 2016. **23**(7): p. 2220-8.
- 70. Bleeker, F.E., et al., *AKT1(E17K) in human solid tumours*. Oncogene, 2008. **27**(42): p. 5648-50.
- 71. Murugan, A.K., A. Alzahrani, and M. Xing, *Mutations in critical domains confer the human mTOR gene strong tumorigenicity*. J Biol Chem, 2013. **288**(9): p. 6511-21.
- 72. Bonelli, M.A., et al., Inhibition of PI3K Pathway Reduces Invasiveness and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Squamous Lung Cancer Cell Lines Harboring PIK3CA Gene Alterations. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(8): p. 1916-27.
- 73. Hortobagyi, G.N., Everolimus plus exemestane for the treatment of advanced breast cancer: a review of subanalyses from BOLERO-2. Neoplasia, 2015. **17**(3): p. 279-88.
- 74. Shapiro, G.I., et al., *First-in-Human Study of PF-05212384 (PKI-587), a Small-Molecule, Intravenous, Dual Inhibitor of PI3K and mTOR in Patients with Advanced Cancer.* Clin Cancer Res, 2015. **21**(8): p. 1888-95.
- 75. Castellano, E. and J. Downward, *RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway.* Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 261-74.
- 76. Yan, Y., et al., Evaluation and clinical analyses of downstream targets of the Akt inhibitor GDC-0068. Clin Cancer Res, 2013. **19**(24): p. 6976-86.
- 77. Renshaw, J., et al., *Dual blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) pathways synergistically inhibits rhabdomyosarcoma cell growth in vitro and in vivo*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(21): p. 5940-51.
- 78. Soares, H.P., et al., *Dual PI3K/mTOR Inhibitors Induce Rapid Overactivation of the MEK/ERK Pathway in Human Pancreatic Cancer Cells through Suppression of mTORC2*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(4): p. 1014-23.
- 79. Carracedo, A., et al., *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer.* J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3065-74.
- 80. Fourneaux, B., et al., Dual inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway suppresses the growth of leiomyosarcomas but leads to ERK activation through mTORC2: biological and clinical implications. Oncotarget, 2017. **8**(5): p. 7878-7890.
- 81. Butler, D.E., et al., Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. Oncotarget, 2017. **8**(34): p. 56698-56713.
- 82. Rozengurt, E., H.P. Soares, and J. Sinnet-Smith, Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(11): p. 2477-88.

- 83. Mohan, S., et al., *MEK Inhibitor PD-0325901 Overcomes Resistance to PI3K/mTOR Inhibitor PF-5212384 and Potentiates Antitumor Effects in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(17): p. 3946-56.
- 84. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
- 85. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- 86. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- 87. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
- 88. Morton, C.L. and P.J. Houghton, *Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 247-50.
- 89. Nicholson, T.M., et al., Renal capsule xenografting and subcutaneous pellet implantation for the evaluation of prostate carcinogenesis and benign prostatic hyperplasia. J Vis Exp, 2013(78).
- 90. Mullis, K., et al., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
- 91. Gibault, L., et al., From PTEN loss of expression to RICTOR role in smooth muscle differentiation: complex involvement of the mTOR pathway in leiomyosarcomas and pleomorphic sarcomas. Mod Pathol, 2012. **25**(2): p. 197-211.
- 92. Juric, D., et al., *Phosphatidylinositol 3-Kinase alpha-Selective Inhibition With Alpelisib* (BYL719) in PIK3CA-Altered Solid Tumors: Results From the First-in-Human Study. J Clin Oncol, 2018: p. JCO2017727107.
- 93. Motzer, R.J., et al., *Phase II randomized trial comparing sequential first-line everolimus and second-line sunitinib versus first-line sunitinib and second-line everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2014. **32**(25): p. 2765-72.
- 94. Reichardt, P.-D.D.m.P., *Moderne Therapie von Weichteilsarkomen*. CMExtra, 2015. **01**: p. 27-31.
- 95. De Sanctis, R., et al., *Efficacy of trabectedin in advanced soft tissue sarcoma: beyond lipo- and leiomyosarcoma*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 5785-91.
- 96. Munhoz, R.R., et al., A Phase Ib/II Study of Gemcitabine and Docetaxel in Combination With Pazopanib for the Neoadjuvant Treatment of Soft Tissue Sarcomas. Oncologist, 2015. **20**(11): p. 1245-6.
- 97. Ben-Ami, E., et al., *Immunotherapy with single agent nivolumab for advanced leiomyosarcoma of the uterus: Results of a phase 2 study.* Cancer, 2017. **123**(17): p. 3285-3290.
- 98. Chudasama, P., et al., *Integrative genomic and transcriptomic analysis of leiomyosarcoma*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 144.
- 99. Cuppens, T., et al., *Integrated genome analysis of uterine leiomyosarcoma to identify novel driver genes and targetable pathways.* Int J Cancer, 2018. **142**(6): p. 1230-1243.
- 100. Keam, B., et al., *In vitro anticancer activity of PI3K alpha selective inhibitor BYL719 in head and neck cancer.* Anticancer Res, 2015. **35**(1): p. 175-82.
- 101. Schmit, F., et al., *PI3K isoform dependence of PTEN-deficient tumors can be altered by the genetic context.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(17): p. 6395-400.
- 102. Ni, J., et al., Functional characterization of an isoform-selective inhibitor of PI3K-p110beta as a potential anticancer agent. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 425-33.

- 103. Moshe Elkabets, S.V., Dejan Juric et al., mTORC1 Inhibition Is Required for Sensitivity to PI3K  $p110\alpha$  Inhibitors in PIK3CA-Mutant Breast Cancer. Science Translational Medicine, 2013 July 31. **5**(196): p. 196ra99.
- 104. Squillace, R.M., et al., *Antitumor activity of ridaforolimus and potential cell-cycle determinants of sensitivity in sarcoma and endometrial cancer models.* Mol Cancer Ther, 2011. **10**(10): p. 1959-68.
- 105. Italiano, A., et al., *Temsirolimus in advanced leiomyosarcomas: patterns of response and correlation with the activation of the mammalian target of rapamycin pathway.* Anticancer Drugs, 2011. **22**(5): p. 463-7.
- 106. Pongas, G.N., C.M. Annunziata, and L.M. Staudt, *PI3Kdelta inhibition causes feedback activation of PI3Kalpha in the ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma*. Oncotarget, 2017. **8**(47): p. 81794-81802.
- 107. Musi, E., et al., *The phosphoinositide 3-kinase alpha selective inhibitor BYL719 enhances the effect of the protein kinase C inhibitor AEB071 in GNAQ/GNA11-mutant uveal melanoma cells.* Mol Cancer Ther, 2014. **13**(5): p. 1044-53.
- 108. Advani, A.S., et al., *Ribosomal S6 kinase and AKT phosphorylation as pharmacodynamic biomarkers in patients with myelodysplastic syndrome treated with RAD001*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2014. **14**(2): p. 172-177 e1.
- 109. Sun, S.Y., et al., *Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition.* Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7052-8.
- 110. Bailey, S.T., et al., *mTOR* inhibition induces compensatory, therapeutically targetable MEK activation in renal cell carcinoma. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e104413.
- 111. Dodd, R.D., et al., *NF1 deletion generates multiple subtypes of soft-tissue sarcoma that respond to MEK inhibition.* Mol Cancer Ther, 2013. **12**(9): p. 1906-17.
- 112. Inaba, K., et al., Synergistic antitumor effects of combination PI3K/mTOR and MEK inhibition (SAR245409 and pimasertib) in mucinous ovarian carcinoma cells by fluorescence resonance energy transfer imaging. Oncotarget, 2016. **7**(20): p. 29577-91.
- 113. Thong, A.E., et al., *Tissue slice grafts of human renal cell carcinoma: an authentic preclinical model with high engraftment rate and metastatic potential.* Urol Oncol, 2014. **32**(1): p. 43 e23-30.
- 114. Pan, H., Z. Ma, and L. Mao, [Establishment of nude mouse models of patient-derived lung cancer xenograft]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2014. **36**(8): p. 571-4.
- 115. Unno, K., et al., Establishment of human patient-derived endometrial cancer xenografts in NOD scid gamma mice for the study of invasion and metastasis. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e116064.

# 8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung		
°C	Grad Celsius		
3-OH	Hydroxylgruppe am dritten Kohlenstoffatom		
4EBP1	4E-binding protein 1		
Abb.	Abbildung		
ABD	Adaptor-binding domain		
ACTG2	Smooth muscle actin gamma		
AKT	Proteinkinase B		
Aqua dest.	destilliertes Wasser		
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related		
BEZ235	Dactolisib		
Byl719	Alpelisib		
C2-Domain	Strukturprotein		
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2		
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4		
CI	Combinatorial index		
cm	Zentimeter		
CO <sup>2</sup>	Kohlenstoffdioxid		
cSH2	C-terminal SH2 domain		
Deptor	Domain-containing mTOR-interacting protein		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Deoxyribonucleic acid		
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase		
E2F	Transkriptionsfaktor		
E542K	Punktmutation an Position 542 (Glutamin gegen Lysin)		
E545K	Punktmutation an Position 545 (Glutamin gegen Lysin)		
EGF	Epidermal growth factor		
eIF3	Eukaryotic initiation factor 3		
eIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B		
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E		
eIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4G		
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase		
FACS	Fluorescence-activated cell sorting		
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations		
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren		
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde/Society of Laboratory Animal Science		
H1047R	Punktmutation an Position 1047 (Histidin gegen Arginin)		

HER2	Human epidermal growth factor receptor 2				
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus				
Hsp70	Heat shock protein 70 kDa				
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration				
IgG	Immunglobulin G				
iSH2	Inter SH2 domain				
KIT	Stem cell factor receptor				
LANUV-NRW	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein Westfalen				
LMS	Leiomyosarkom				
MAPK	Mitogen-activated protein kinase kinase				
MEK 1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase				
mLST8	Mammalian lethal with SEC13 protein 8				
mTOR	Mammalian target of rapamycin				
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex				
NF1	Neurofibromatose Typ 1				
nSH2	N-terminal SH2 domain				
p110	Protein mit Molekularmasse von 110 kDa				
p21	Protein mit Molekularmasse von 21 kDa				
p27	Protein mit Molekularmasse von 27kDa				
p50	Protein mit Molekularmasse von 50 kDa				
p53	Protein mit Molekularmasse von 53 kDa				
p55	Protein mit Molekularmasse von 55 kDa				
p85	Protein mit Molekularmasse von 85 kDa				
p87	Protein mit Molekularmasse von 87 kDA				
PBS	Phosphate-buffered saline				
PCR	Polymerase chain reaction				
PDK1	Phosphoinositide-dependet kinase 1				
PH-Domain	Pleckstrin homology domain				
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase				
PI3K3CB	Gen für p110β				
PIK3C2A	Gen für PI3K-C2-alpha				
PIK3C2B	Gen für PI3K-C2-beta				
PIK3C2G	Gen für PI3K-C2-gamma				
PIK3C3	Gen für Vsp34				
PIK3CA	Gen für p110α				
PIK3CD	Gen für p110δ				
PIK3R1	Gen für p85A				
PIK3R2	Gen für p85B				
PIK3R3	Gen für p55G				

PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat			
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat			
PKB	Proteinkinase B			
ΡΚCα	Protein kinase C alpha			
PKI-587	Gedatolisib			
PRAS40	Proline-rich AKT substrate of 40 kDa			
Protor 1/2	Proline-rich protein			
PtdIns	Phosphatidylinositol			
PtdIns(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat			
PtdIns4P	Phosphatidylinositolmonophosphat  Phosphatidylinositolmonophosphat			
PTEN	Phosphatase and tensin homologie deleted in chromosom 10			
RAD001	Everolimus			
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma			
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR			
Ras	Rat sarcoma			
RB	Retinoblastom Protein			
RBD	Ras-binding domain			
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin			
RPM	Revolutions per minute			
RTK	Rezeptortyrosinkinase			
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis			
SGK1	Serum and glucocorticoide-regulated kinase 1			
Sin1	Stress-activated map kinase-interacting protein 1			
SMA	Smooth muscle actin			
SRB	Sulforhodamine B assay			
ST	Strahlentherapie			
Tab.	Tabelle			
TCA	Trichloressigsäure			
TNM	Tumor-Nodus-Metastase			
TP53	Gen für p53			
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan			
TSC2	Tuberin			
V	Volt			
VEGFα	Vascular endothelial growth factor A			
Vps15	Vacuolar protein sorting 15			
Vps34	Vacuolar protein sorting 34			
WF	Wachstumsfaktor			
WHO	World Health Organisation			
XL-765	Voxtalisib			

### 9 Publikationsverzeichnis

Aus Inhalten dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

### Posterpräsentation:

**Knospe S.**, Grunewald S., Mühlenberg T., Christoff M., Ketzer J., Fletcher J., Bauer S. (Essen, D; Boston, USA) "Der PI3K- und MAPK Signalweg als Zielstruktur für "high-grade" Leiomyosarkome", Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Wien, 01.10.2018

## 10 Danksagung

In erster Linie geht mein Dank an Prof. Dr. Sebastian Bauer (Universitätsklinik Essen) und an Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier (Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin), ohne deren Unterstützung meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein weiteres Dankeschön geht an die AG Bauer der Translationalen Sarkomforschung am Universitätsklinikum Essen (Thomas Mühlenberg, Susanne Grunewald, Miriam Christoff und Julia Ketzer), die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Außerdem bedanke ich mich bei Uwe Schott für seine große Flexibilität bei der Gestaltung meiner Arbeitszeit und seiner stets hilfreichen Sichtweise.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Katja Fasse bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich auch in schweren Zeiten unterstützt haben.

# 11 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 01.03.2019

Steven Knospe



mbvberlin mensch und buch verlag