

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow)

**Wirksamkeit verschiedener *targeted drugs* in Keimzelltumorzelllinien
mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad und differenzieller
Cisplatinsensitivität**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Judith Schaffrath
geboren am 13.10.1986 in Neuhaus am Rennweg

Gutachter:

Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow, Halle (Saale)

Prof. Dr. Claudia Wickenhauser, Halle (Saale)

Prof. Dr. Lara Tickenbrock, Hamm-Lippstadt

05.05.2015

09.03.2016

Referat

Keimzelltumoren stellen bei jungen Männern im Alter zwischen 15 und 35 Jahren die häufigste bösartige Tumorerkrankung dar. Zwar konnte seit der Einführung Cisplatin-basierter Therapiekonzepte die Überlebensrate auf über 90 % gesteigert werden, doch kommt es in etwa 20 % der Fälle zur Entwicklung einer Chemotherapieresistenz, welche mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist. Trotz umfangreicher Forschungen sind bisher weder die Ursache der Cisplatinresistenz noch vielversprechende Therapiealternativen für diese Patienten bekannt. In zahlreichen anderen Tumorentitäten konnten in den letzten Jahren durch den Einsatz zielgerichteter Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren, welche sich aufgrund ihres differenten Wirkmechanismus und Nebenwirkungsprofils als Kombinationspartner für konventionelle Chemotherapeutika eignen, die Ansprechraten erhöht und neue Therapiekonzepte etabliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirksamkeit der Tyrosinkinaseinhibitoren AEW541 (IGF-1R) und AEE788 (EGFR, HER2/neu, VEGFR) sowie des Serin/Threoninkinase-Inhibitors RAD001 (mTOR) und den Einfluss dieser *targeted drugs* auf die Cisplatinsensitivität in Keimzelltumorlinien mit unterschiedlicher Differenzierung und Cisplatinsensitivität zu untersuchen. Mittels Sulforhodamin-B-Assay wurde zunächst die Zytotoxizität der Wirkstoffe nach Einzel- sowie Kombinationsbehandlung der Zelllinien ermittelt. Durch Western Blots wurde darüber hinaus die Expression und Phosphorylierung der Wachstumsfaktorrezeptoren sowie der Einfluss der Kinaseinhibitoren auf den Aktivitätsstatus dieser Proteine bestimmt.

Mithilfe der Zytotoxizitätsassays konnten die untersuchten Zelllinien zunächst hinsichtlich ihrer Cisplatinsensitivität charakterisiert werden. Die Wirksamkeit der verwendeten Kinaseinhibitoren konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden, dabei zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen cisplatinsensitiven und -resistenten Zelllinien. Eine Korrelation zwischen dem Nachweis der Expression der Rezeptoren im Western Blot und dem Ansprechen auf die Inhibitoren konnte nicht belegt werden, der Nachweis einer Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung durch die Substanzen gelang nur partiell. Die Kombination aus Cisplatin und den *targeted drugs* zeigte in den einzelnen Zelllinien unterschiedliche, jedoch überwiegend antagonistische und additive Effekte.

Der Einsatz der untersuchten Kinaseinhibitoren stellt damit keinen erfolgversprechenden Therapieansatz zur Überwindung der Cisplatinresistenz in Keimzelltumoren dar.

Schaffrath, Judith: Wirksamkeit verschiedener *targeted drugs* in Keimzelltumorzelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad und differenzieller Cisplatinsensitivität, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 71 Seiten, 2015.

INHALTSVERZEICHNIS**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III**

1	EINLEITUNG	1
1.1	DER TESTIKULÄRE KEIMZELLTUMOR.....	1
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE	1
1.1.2	PATHOGENESE	1
1.1.3	THERAPIE.....	3
1.2	CISPLATIN – WIRKMECHANISMUS UND RESISTENZPROBLEMATIK.....	4
1.2.1	WIRKUNGSWEISE VON CISPLATIN	4
1.2.2	ERKLÄRUNGSANSÄTZE FÜR DIE CISPLATINRESISTENZ	6
1.2.3	CISPLATINRESISTENZ BEI TESTIKULÄREN KEIMZELLTUMOREN.....	8
1.3	ZIELGERICHTETE THERAPIE IN DER ONKOLOGIE.....	10
1.3.1	HEMMUNG VON mTOR DURCH RAD001.....	10
1.3.2	HEMMUNG VON IGF-1R DURCH AEW541	12
1.3.3	HEMMUNG VON EGFR, HER2/NEU UND VEGFR DURCH AEE788.....	14
2	ZIELSTELLUNG	17
3	MATERIAL UND METHODIK.....	18
3.1	ZELLINIEN	18
3.2	ZELLKULTUR	18
3.3	SRB-ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAY.....	19
3.3.1	SENSITIVITÄTSBESTIMMUNG GEGENÜBER EINZELNEN SUBSTANZEN	19
3.3.2	SENSITIVITÄTSBESTIMMUNG GEGENÜBER EINER KOMBINATION DER SUBSTANZEN.....	20
3.4	WESTERN BLOT-ANALYSEN	21
3.4.1	PROTEINISOLIERUNG.....	21
3.4.2	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	21
3.4.3	WESTERN BLOTTING.....	21
3.5	STATISTIK	22
3.6	MATERIALAUFLISTUNG	23
3.6.1	ZELLKULTUR.....	23
3.6.2	MEDIKAMENTE	23
3.6.3	SRB-ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAY	23
3.6.4	PROTEINBESTIMMUNG	23
3.6.5	ANTIKÖRPER	25
3.6.6	FIRMENVERZEICHNIS	26

4	ERGEBNISSE	27
4.1	SENSITIVITÄT DER TKZT-ZELLINIEN GEGENÜBER DEN GETESTETEN SUBSTANZEN	27
4.2	VERÄNDERUNGEN IN DER WIRKSAMKEIT DURCH KOMBINATION DER SUBSTANZEN	31
4.2.1	EINFLUSS DER KINASEINHIBITOREN AUF DIE CISPLATINSENSITIVITÄT	31
4.2.2	EFFEKTE EINER KOMBINATION DER KINASEINHIBITOREN	33
4.3	PROTEINEXPRESSIONSANALYSE IM WESTERN BLOT	34
4.3.1	ANALYSE DER REZEPTOREXPRESSION UND REZEPTORPHOSPHORYLIERUNG IN HUMANEN TKZT-ZELLINIEN	34
4.3.2	ANALYSE DER AUSWIRKUNGEN EINER BEHANDLUNG MIT KINASEINHIBITOREN AUF DIE REZEPTORPHOSPHORYLIERUNG	36
5	DISKUSSION	41
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER TKZT-ZELLINIEN HINSICHTLICH IHRER SENSITIVITÄT GEGENÜBER CISPLATIN UND DEN TARGETED DRUGS RAD001, AEW541 UND AEE788	42
5.1.1	CISPLATIN	42
5.1.2	RAD001	43
5.1.3	AEW541	45
5.1.4	AEE788.....	48
5.2	EFFEKTE EINER KOMBINATIONSBEHANDLUNG AUS CISPLATIN UND EINZELNEN TARGETED DRUGS AUF DIE CISPLATINSENSITIVITÄT DER TESTIKULÄREN KEIMZELLTUMOREN	50
5.2.1	RAD001	50
5.2.2	AEW541	51
5.2.3	AEE788.....	52
5.3	EFFEKTE EINER KOMBINATIONSBEHANDLUNG AUS RAD001 UND AEW541 BZW. AEE788	53
6	ZUSAMMENFASSUNG	55
7	LITERATURVERZEICHNIS	57
8	THESEN	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Standard-Maßeinheiten werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM- and Rad3-related protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDDP	<i>cis-Diamino-Dichloro-Platin(II), Cisplatin</i>
CIS	<i>carcinoma in situ</i>
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Embryonales Karzinom
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i>
ERCC1	<i>excision repair cross-complementation group 1</i>
FKS	fetales Kälberserum
GCT	<i>germ cell tumor</i>
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMG	<i>high mobility group</i>
IC	<i>inhibitory concentration</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IGF-1R	<i>insulin-like growth factor-1 receptor</i>
IR	Insulinrezeptor
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mind.	mindestens
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung carcinoma</i>
OD	Optische Dichte

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween-20
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRB	Sulforhodamin B
SSEA-3/-4	<i>stage-specific embryonic antigen-3/-4</i>
STABW	Standardabweichung
TCA	Trichloressigsäure
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TKZT	Testikulärer Keimzelltumor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Der testikuläre Keimzelltumor

Testikuläre Keimzelltumoren (TKZT) sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien, die 90-95 % aller Hodentumoren ausmachen. Die übrigen 5-10 % verteilen sich auf nicht-germinale Tumoren wie Leydig-Zell-Tumoren, Sertoli-Zell-Tumoren oder Lymphome. Die Mehrzahl der TKZT ist primär im Hoden lokalisiert, lediglich 5 % der Patienten weisen einen extragonadalen Primärtumor entlang der Mittellinie des Körpers auf, vor allem im Retroperitoneum und Mediastinum. Auf Grundlage ihrer Histologie werden die TKZT in seminomatöse und nicht-seminomatöse Keimzelltumoren unterteilt (Oosterhuis und Looijenga, 2005; Albers *et al.*, 2011; Winter und Albers, 2011).

1.1.1 Epidemiologie

Obwohl nur etwa 1-1,5 % aller Krebserkrankungen bei Männern auf die testikulären Keimzelltumoren entfallen, sind sie die häufigsten bösartigen soliden Tumoren in der Altersgruppe zwischen 15 und 35 Jahren (Mannuel *et al.*, 2011). Dabei liegt das Hauptmanifestationsalter der Seminome zwischen 30 und 40 Jahren, das der Nichtseminome zwischen 20 und 30 Jahren (Manecksha und Fitzpatrick, 2009). Ein zweiter, deutlich kleinerer Häufigkeitsgipfel der TKZT lässt sich in der Altersgruppe über 80 Jahren beobachten. Auffällig sind darüber hinaus die Verdopplung der Inzidenz innerhalb der letzten 40 Jahre sowie deren große Schwankungen zwischen verschiedenen Populationen und geographischen Regionen. So variiert die Neuerkrankungsrate zwischen 0,8/100000 pro Jahr in Japan und bis zu 15,2/100000 pro Jahr in den skandinavischen Ländern (Garner *et al.*, 2005; Winter und Albers, 2011).

1.1.2 Pathogenese

Aufgrund des vorrangigen Auftretens der TKZT im vergleichsweise jungen Lebensalter wird von einer Initiierung der Tumorentwicklung bereits während der fetalen Entwicklung ausgegangen (Horwich *et al.*, 2006). Inwieweit bestimmte Umweltfaktoren und Prädispositionen bei diesem Prozess eine Rolle spielen, ist umstritten. Als gesicherter Risikofaktor gilt der Kryptorchismus, welcher zu einer etwa 2-10fachen Risikoerhöhung führt (Schottenfeld *et al.*, 1980; Swerdlow *et al.*, 1997; Garner *et al.*, 2005). Auch ein bereits kontralateral oder innerhalb der Familie aufgetretener Hodentumor führt zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko. Als weitere Einflussfaktoren werden testikuläre Atrophie, Infertilität, erhöhte Östrogenlevel in der Schwangerschaft, inguinale Hernien und skrotale Traumata diskutiert (Dieckmann und Pichlmeier, 2004). Die Beobachtung, dass verschiedene Erkrankungen häufig mit der Entwicklung eines TKZT korrelieren, führte in den vergangenen Jahren zur Hypothese des testikulären Dysgenesie-Syndroms (TDS). Erkrankungen wie Kryptorchismus, Hypospadien, Subfertilität und maligne Keimzelleoplasien haben demnach

einen gemeinsamen Ursprung und werden als verschiedene Manifestationen des gleichen Syndroms mit gleichen Risikofaktoren angesehen (Boisen *et al.*, 2001; Skakkebaek, 2004). Die Existenz dieser gemeinsamen Entität ist jedoch nicht gesichert. So steht die unterschiedliche Entwicklung der Häufigkeiten der im TDS zusammengefassten Erkrankungen im Widerspruch zu einer gemeinsamen Entstehung (Thorup *et al.*, 2010).

Die genauen Mechanismen, welche zur Entwicklung eines TKZT führen, sind noch immer nicht vollständig geklärt. Als gemeinsame, nicht-invasive Vorläuferläsion sowohl der seminomatösen als auch der nichtseminomatösen Keimzelltumoren gilt das *Carcinoma in situ* (CIS), auch bezeichnet als „intratubuläre Keimzellneoplasie unklassifiziert“ (intratubular germ cell neoplasia unclassified, ITGCNU) oder „testikuläre intratubuläre Neoplasie“ (TIN) (Skakkebaek, 1972; Oosterhuis und Looijenga, 2005). Während der physiologischen Spermatogenese entwickeln sich aus embryonalen Stammzellen die primordialen Keimzellen, welche in die Genitaleiste wandern, fortan als Gonozyten bezeichnet werden, stark proliferieren und sich später zu Prä spermatogonien differenzieren (van de Geijn *et al.*, 2009). Bei der Entstehung eines CIS ist dieser Entwicklungsschritt gestört, es kommt zur malignen Transformation der primordialen Keimzellen bzw. Gonozyten. Unklar ist, welche Faktoren für diese Störung der Differenzierung verantwortlich sind. Diskutiert wird eine Veränderung im Umgebungsmilieu der Zellen, hervorgerufen durch genetische Defekte oder eine Exposition gegenüber Umwelteinflüssen (Rajpert-De Meyts, 2006). Die Zellen des CIS sind gekennzeichnet durch die Expression des Transkriptionsfaktors Oct3/4, der plazentaren alkalischen Phosphatase (PLAP) und c-Kit (Rajpert-De Meyts und Skakkebaek, 1994; Looijenga *et al.*, 2003; Rajpert-De Meyts *et al.*, 2003). Oct3/4 wird darüber hinaus in Seminomen und embryonalen Karzinomen, nicht jedoch in den gesunden Tubuli exprimiert und eignet sich daher als Marker zum Screening testikulärer Biopsien (Looijenga *et al.*, 2003).

Da die Inzidenzen von CIS und TKZT weitgehend übereinstimmen und sich nach sieben Jahren bei 70 % aller CIS eine Progression zu einem invasiven Tumor zeigt, ist davon auszugehen, dass jedes CIS letztlich zu einem TKZT fortschreitet (von der Maase *et al.*, 1986; Giwercman *et al.*, 1991). Molekularbiologisch geht die Progression zu einem malignen, invasiven Wachstum mit einem Zugewinn des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p) einher. Diese Überrepräsentation von 12p ist beim präinvasiven CIS nicht nachweisbar und gilt als ein gemeinsames Charakteristikum aller TKZT (Atkin und Baker, 1982; Rosenberg *et al.*, 2000). Auch in extragonadalen Keimzelltumoren kann die Abberation nachgewiesen werden (Horwich *et al.*, 2006). Dabei finden sich bei bis zu 80 % aller Keimzelltumoren ein oder mehrere Isochromosome (i(12p)), die übrigen, i(12p)-negativen Tumoren weisen zusätzliche Kopien von 12p bzw. einzelner Abschnitte auf (Rodriguez *et al.*, 1993).

Aus dem *Carcinoma in situ* entstehen sowohl Seminome als auch Nichtseminome über eine Zwischenstufe, das intratubuläre Seminom bzw. intratubuläre Nichtseminom. Das

intratubuläre Nichtseminom entwickelt sich zunächst zum embryonalen Karzinom (EC) weiter, dessen Zellen die Stammzellen des Nichtseminoms repräsentieren. Aus ihnen können Teratome als Ausdruck der somatischen Differenzierung sowie Dottersacktumore und Chorionkarzinome durch extraembryonale Differenzierung hervorgehen (van de Geijn *et al.*, 2009). Meist treten Nichtseminome jedoch als Mischtumore mit unterschiedlich differenzierten Bestandteilen auf (Houldsworth *et al.*, 2006). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Differenzierung der EC-Zellen zu Keimzellen möglich ist. Das embryonale Karzinom kann daher als totipotenter Tumor bezeichnet werden (Honecker *et al.*, 2006). Zusätzlich können nichtseminomatöse Zellen durch Reprogrammierung aus Seminomzellen entstehen (Oosterhuis *et al.*, 2003).

Insgesamt machen Seminome etwa 50 %, reine Nichtseminome etwa 30 % und sogenannte kombinierte Keimzelltumoren mit seminomatösen und nichtseminomatösen Bestandteilen etwa 20 % aller TKZT aus (Oosterhuis und Looijenga, 2005).

1.1.3 Therapie

Hodentumoren gelten derzeit als eine der am besten behandelbaren Tumorentitäten. Während der vergangenen 40 Jahre kam es zu einem Anstieg der 5-Jahresüberlebensrate von 63 % auf 96 % (Boring *et al.*, 1993; Siegel *et al.*, 2011). Auch bereits metastasierte Tumoren haben eine im Vergleich zu anderen Tumorentitäten hohe Heilungschance. So werden für die Nichtseminome je nach Einteilung in prognostische Kategorien 5-Jahresüberlebensraten von 92 % (gute Prognose), 80 % (intermediäre Prognose) und 48 % (schlechte Prognose), für die Seminome, die stets der Kategorie mit guter oder intermediärer Prognose angehören, 86 % bzw. 72 % erreicht (Albers *et al.*, 2011). Bei primär extragonadal lokalisierten Keimzelltumoren sind die Überlebensraten schlechter (Trama *et al.*, 2011).

Der Grund für diesen starken Anstieg der Zahl erfolgreich behandelter Patienten liegt in der Einführung von Cisplatin (Cis-Diamino-Dichloro-Platin(II)) in die Therapie des TKZT in den 1970er Jahren. Zuvor wurden Patienten meist mit Dactinomycin, teilweise in Kombination mit Methotrexat oder Chlorambucil behandelt. Zwar konnte durch diese Therapie ein Ansprechen bei etwa 50 % der Tumoren beobachtet werden, jedoch lag die Gesamtüberlebensrate bei nur 5-10 % (Li *et al.*, 1960; Einhorn, 1997). Ein Langzeitüberleben von 25 % konnte durch eine Kombinationstherapie mit Bleomycin und Vinblastin erzielt werden (Samuels *et al.*, 1976). Nachdem Cisplatin erstmals 1973 in breit angelegten Studien unter anderem an Patienten mit TKZT erfolgreich getestet wurde, folgte 1974 die erste Studie mit einer Kombinationstherapie aus Cisplatin, Vinblastin und Bleomycin (Einhorn und Donohue, 1977). Aufgrund einer geringeren neuromuskulären Toxizität und des besseren Langzeitüberlebens der Patienten wurde Vinblastin später durch Etoposid ersetzt (Williams *et al.*, 1987). Diese Kombination aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB) gilt bis heute als Standard (Einhorn, 2002).

Trotz des guten Ansprechens der Keimzelltumoren auf die genannten Chemotherapeutika erreichen 20-30 % der Patienten keine vollständige Heilung durch die Standardtherapie (Einhorn, 1990). Zwar können durch Zweitlinien- und Hochdosischemotherapie in bis zu 80 % dieser Fälle Komplettremissionen erreicht werden, jedoch haben Patienten mit einem Rezidiv nach einer solchen Behandlung eine sehr schlechte Prognose (Porcu *et al.*, 2000). Dabei kommt es bei einigen Patienten zur Entwicklung einer Cisplatinresistenz (Kollmannsberger *et al.*, 2008). Tumoren gelten als cisplatinrefraktär, wenn es innerhalb von vier Wochen nach einer initial erfolgreichen Cisplatin-basierten Therapie mit Reduktion oder Stabilisierung der Tumorgröße zur Progression der Erkrankung kommt, während eine Progression während der Behandlung als absolute Cisplatinresistenz bezeichnet wird (Beyer *et al.*, 1996). In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Substanzen und kombinierten Therapieregimen in Studien auf ihre Wirksamkeit gegenüber cisplatinresistenten Keimzelltumoren untersucht, jedoch ohne nennenswerte Erfolge (Kollmannsberger *et al.*, 2008). Zudem sind derzeit weder die Mechanismen, die die außergewöhnliche Sensitivität des Großteils der Keimzelltumoren gegenüber Cisplatin bedingen, noch die Gründe für die Resistenzentwicklung bei einigen Tumoren ausreichend verstanden.

1.2 Cisplatin – Wirkmechanismus und Resistenzproblematik

Seit der ersten Beschreibung der hemmenden Wirkung von Platinverbindungen auf die Zellteilung von *Escherichia coli* sowie ihrer zytotoxischen Wirkung bei Tumorerkrankungen in den 1960er Jahren hat Cisplatin eine große Bedeutung in der Therapie zahlreicher Tumorerkrankungen (Rosenberg *et al.*, 1965; Rosenberg *et al.*, 1969). Es ist heute eines der meistgenutzten Chemotherapeutika und wird, meist in Kombination mit anderen Zytostatika, in der Behandlung verschiedener solider Tumoren wie Blasen-, Ovarial-, Zervix- und Lungenkarzinomen eingesetzt (Lebwohl und Canetta, 1998).

1.2.1 Wirkungsweise von Cisplatin

Cisplatin ist ein anorganischer, neutraler, quadratisch-planarer Komplex (Abbildung 1), dessen Aufnahme in die Zelle sowohl durch Diffusion als auch über den Kupfertransporter CTR1 erfolgt (Ishida *et al.*, 2002; Safaei, 2006).

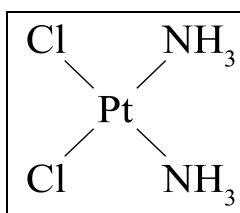


Abbildung 1: Molekülstruktur von Cisplatin

Durch die geringe Chloridkonzentration im Intrazellulärraum (~ 4 mmol/L) kommt es innerhalb der Zelle zur spontanen Substitution eines oder beider Chlorliganden durch Wassermoleküle und somit zur Aktivierung des zuvor aufgrund der hohen extrazellulären Chloridkonzentration (~ 100 mmol/L) inaktiven Moleküls (Kelland, 2000). Nur diesem hochreaktiven Cisplatin-Komplex ist eine Bindung an die DNA möglich. Jedoch kommt es aufgrund der starken Reaktivität der aktivierten Cisplatinmoleküle auch zur Reaktion mit anderen nucleophilen Verbindungen in der Zelle wie RNA, Proteine, Glutathion und Metallothioneine, sodass nur etwa 1 % des intrazellulären Cisplatins an die genomische DNA bindet (Perez, 1998; Timerbaev *et al.*, 2006). Dabei laufen bevorzugt Reaktionen mit der N7-Position des Imidazolrings der Purinbasen Guanin und Adenin ab (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985). Dies führt zur Ausbildung von DNA-Protein-Addukten und DNA-DNA-Verknüpfungen sowohl innerhalb eines DNA-Stranges als auch zwischen beiden Strängen (Eastman, 1987). Als häufigste Läsionen gelten dabei *Crosslinks* innerhalb eines DNA-Stranges, vor allem zwischen zwei benachbarten Guaninbasen und zwischen Guanin und Adenin (Köberle *et al.*, 2010).

Die durch Cisplatin hervorgerufenen Veränderungen in der Struktur der DNA werden durch verschiedene Mechanismen in der Zelle erkannt. Derzeit wird zahlreichen Proteinen eine Rolle in der Erkennung der DNA-Schäden zugesprochen, dazu gehören das MutS α -Protein des *mismatch repair complex* (MMR), Proteine der *high mobility group 1 and 2* (HMG1/2) Familie, Histon H1, das „TATA binding protein“ (TBP) und der RNA-Polymerase I-bindende Faktor (hUBF) (Köberle *et al.*, 2010). Die Bindung dieser Proteine führt zu einem Zellzyklusarrest am G1- oder G2-Checkpoint, wodurch die Reparatur der beschädigten DNA ermöglicht und die Weitergabe der fehlerhaften Information durch Mitose verhindert wird (Galluzzi *et al.*, 2011; Vitale *et al.*, 2011). Dabei erfolgt die Entfernung der veränderten DNA-Abschnitte vor allem über den Reparaturmechanismus des *nucleotide excision repair* (NER) (Furuta *et al.*, 2002).

Ist eine Reparatur der fehlerhaften Abschnitte nicht möglich, kommt es zu einer Abfolge von Prozessen, an deren Ende der programmierte Zelltod (Apoptose) steht. Welche Prozesse ausgehend von den Cisplatin-induzierten DNA-Schäden dazu führen, ist nicht vollständig verstanden. Die Annahme, die Zytotoxizität von Cisplatin beruhe auf einer Hemmung der DNA-Synthese, gilt als widerlegt (Gonzalez *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Hauptwirkung von Cisplatin in der Initiierung von Signalkaskaden, die zur Apoptose führen, liegt (Barry *et al.*, 1990). Dabei sind die Prozesse, die einerseits zur Reparatur der Schäden und damit zum Zellüberleben und andererseits zum Zelltod führen, durch zahlreiche Proteine miteinander verknüpft. Diese besitzen abhängig vom Ausmaß der DNA-Schäden teilweise gegensätzliche Funktionen und können sowohl Reparaturmechanismen als auch Signalkaskaden mit dem Ziel der Apoptose initiieren (Bernstein, 2002). Zwei wichtige Schalter dieser Kaskaden sind die Kinasen ATM (*ataxia teleangiectasia mutated protein*) und ATR (*ATM- and*

Rad3-related protein), die nach ihrer Aktivierung zur Phosphorylierung und damit Stabilisierung von p53 beitragen (Damia *et al.*, 2001; Siddik, 2003). Das Protein p53 liegt unter normalen Bedingungen in der Zelle inaktiviert vor und führt bei seiner Aktivierung zunächst zum Zellzyklusarrest. Durch Bindung an spezielle Sequenzen der DNA und Beeinflussung der Transkription ist es anschließend in der Lage, sowohl Reparaturmechanismen als auch proapoptotische Prozesse zu initiieren (Vogelstein *et al.*, 2000). Dabei werden beide Signalkaskaden, die zur Apoptose führen – der intrinsische und der extrinsische Weg – aktiviert. So kommt es unter dem Einfluss von p53 zur gesteigerten Expression von Bax, einem proapoptotischen Protein der Bcl-2-Familie, deren Mitglieder die Permeabilität der Mitochondrienmembran beeinflussen und dadurch pro- und antiapoptotische Wirkung haben können (Miyashita und Reed, 1995; Elmore, 2007). Eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von proapoptotischen Proteinen wie Bax, Bak und Bid – oder eine Verminderung der Konzentration des entgegengesetzt wirkenden Proteins Bcl-2 – führt über diese Permeabilitätserhöhung zu einer Freisetzung von Cytochrom c in die Zelle und setzt so über die Caspase 9 den intrinsischen Signalweg der Apoptose in Gang (Moffitt *et al.*, 2010). Den extrinsischen Signalweg beeinflusst p53 durch eine verstärkte Expression der Rezeptoren Fas (CD95) und DR5 (TRAIL-Rezeptor), die als sogenannte „Todesrezeptoren“ für proapoptotische extrazelluläre Signale dienen, sowie ihrer Liganden FasL und TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Wu *et al.*, 1997; Maecker *et al.*, 2000; Kuribayashi *et al.*, 2008). Die Bindung dieser Liganden bewirkt eine Aktivierung der Caspase 8. Extrinsischer und intrinsischer Signalweg münden schließlich in einer gemeinsamen Endstrecke, indem die Caspasen 8 und 9 wiederum die Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren, welche letztlich zahlreiche zelluläre Proteine zerstören und den Zelltod herbeiführen (Moffitt *et al.*, 2010).

1.2.2 Erklärungsansätze für die Cisplatinresistenz

Zwar zeigt die Behandlung mit Cisplatin aufgrund der beschriebenen Zytotoxizität initial häufig ein Ansprechen des malignen Gewebes mit einer Verkleinerung bzw. Stabilisierung der Tumorgroße, jedoch werden die Erfolgsraten durch Resistenzen gegenüber der Therapie limitiert. Einige Tumoren (vor allem kolorektale, Lungen- und Prostatakarzinome) haben eine intrinsische Resistenz, während andere (vor allem Ovarialkarzinome) diese erst während einer zunächst erfolgreichen Behandlung entwickeln (Köberle *et al.*, 2010). Die Ursachen für diesen Wirkungsverlust sind vielfältig und trotz umfangreicher Forschungen wenig verstanden, die zahlreichen diskutierten Mechanismen können jedoch grob in vier Gruppen eingeteilt werden: Prozesse, die

- (1) die Wirkstoffkonzentration in der Zelle vermindern,
- (2) den Wirkmechanismus an der DNA beeinflussen,
- (3) die zelluläre Reaktion auf den DNA-Schaden verändern und

(4) außerhalb der Cisplatinwirkung liegen.

Eine Verminderung der intrazellulären Wirkstoffkonzentration (1) kann durch eine verringerte Aufnahme und eine Verstärkung von Abtransport und Inaktivierung einer Substanz bedingt sein. An Ovarialkarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass klinisch relevante Konzentrationen von Cisplatin zu einer Herabregulierung des am Transport in das Zellinnere beteiligten Kupfertransporters CTR1 führen (Holzer und Howell, 2006). Auch eine Überexpression von Membranproteinen, die Cisplatin aus der Zelle entfernen, wurde bei verschiedenen cisplatinresistenten Tumorzelllinien gefunden, so z.B. beim Malignen Melanom (ATPase MRP2) und Ovarialkarzinom (Kupfer-transportierende ATPasen ATP7A und ATP7B) (Katano *et al.*, 2002; Liedert *et al.*, 2003). Darüber hinaus bindet das intrazellulär aktivierte, äußerst reaktive Cisplatin im Zytoplasma unter anderem an thiolhaltige Moleküle wie Glutathion, Methionin und Metallothioneine und wird so inaktiviert. In einigen resistenten Zellen konnte eine erhöhte Konzentration dieser Proteine nachgewiesen werden, jedoch gibt es auch gegenteilige Ergebnisse (Murphy *et al.*, 1991; Mellish *et al.*, 1993; Kawai *et al.*, 2002).

Da eine erhöhte Reparaturkapazität ebenfalls eine verminderte Zytotoxizität von Cisplatin bewirken kann (2), haben sich zahlreiche Untersuchungen mit möglichen Veränderungen des NER bei resistenten Tumoren beschäftigt. Häufig konnte dabei eine negative Korrelation zwischen der Expression eines am NER beteiligten Proteins (ERCC1) und der Cisplatinsensitivität gefunden werden, unter anderem bei Neoplasien der Blase, des Magens sowie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (Metzger *et al.*, 1998; Olaussen *et al.*, 2006; Bellmunt *et al.*, 2007). Da eine verstärkte ERCC1-Expression bereits bei zahlreichen cisplatinresistenten Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte, stellt diese Veränderung derzeit einen vielversprechenden Erklärungsansatz dar. Weitere Reparaturmechanismen wie das *mismatch repair system* (MMR), *translesion synthesis* (TLS) und die homologe Rekombination (HR) scheinen bei der Beseitigung von Cisplatin-induzierten Schäden eine untergeordnete Rolle zu spielen, jedoch zeigten sich bei resistenten Zelllinien auch hier Veränderungen. Vermutlich erkennen MMR-Proteine die fehlerhafte DNA, können die Schäden jedoch nicht beheben und initiieren daher die Apoptose (Vaisman *et al.*, 1998). Dieser Vorstellung entspricht die Entstehung einer Cisplatinresistenz bei Verlust der am MMR beteiligten Erkennungsproteine MLH1 und MSH2, die unter anderem in kolorektalen und endometrialen Tumorzellen nachgewiesen wurde (Aebi *et al.*, 1996). Durch TLS-Polymerasen können unreparierte DNA-Abschnitte überbrückt werden, sodass deren erhöhte Expression ebenfalls eine Resistenz bedingen könnte (Livneh, 2001). Diese Assoziation konnte in Gliom- und Kolonkarzinomzellen gefunden werden (Lin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Bei Ovarialkarzinomen wurde zudem beobachtet, dass Mutationen von *BRCA1/2* – zwei Gene, die wichtige Komponenten des HR-Systems codieren – die Überlebenszeit unter Cisplatintherapie erhöhen, vermutlich aufgrund der deshalb verminderten Reparaturkapazität (Ben David *et al.*, 2002).

Auch die verminderte Fähigkeit der Zelle, bei Schädigung den Zelltod durch Apoptose zu induzieren (3), kann zu Resistenzentwicklungen beitragen. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt p53, dessen Gen bei etwa der Hälfte aller malignen Tumoren Mutationen aufweist (Harris und Hollstein, 1993). In einer Untersuchung zahlreicher Zelllinien konnte gezeigt werden, dass p53-Mutationen mit einer geringeren Sensitivität gegenüber Cisplatin korrelieren (O'Connor *et al.*, 1997). Bei Lungen-, Ovarial- und Kopf-Hals-Tumoren mit Cisplatinresistenz und wiederholten Rezidiven konnten zudem erhöhte Level antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 gefunden werden (Han *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005; Erovic *et al.*, 2005).

Aus der Vielzahl der diskutierten Resistenzmechanismen, die außerhalb der direkten zytotoxischen Wirkung von Cisplatin liegen (4), soll hier lediglich die Rolle des *human epidermal growth factor receptor 2* (c-erbB-2, HER2/neu) erwähnt werden. Eine nicht signifikante Assoziation zwischen Überexpression und Cisplatinresistenz konnte beim NSCLC gefunden werden (Fijolek *et al.*, 2006).

Es wird deutlich, dass es derzeit keine abschließende Erklärung für die Ursachen der Resistenz gegenüber Cisplatin gibt. Die Verringerung der Sensitivität scheint vielmehr das Resultat aus dem Zusammenspiel verschiedener Veränderungen zu sein, deren individuelle Bedeutung bei den unterschiedlichen Tumoren variiert.

1.2.3 Cisplatinresistenz bei testikulären Keimzelltumoren

Testikuläre Keimzelltumoren dienen häufig als Modelle für cisplatinsensitive Tumoren. Sowohl für die außergewöhnliche Sensitivität als auch für die Entwicklung von Resistenzen dieser Tumorentität gibt es zahlreiche Erklärungsansätze. Die Ursache für die bemerkenswerte Wirksamkeit von Cisplatin scheint dabei in der zellulären Reaktion auf die erzeugten DNA-Schäden zu liegen, da keine Veränderungen bei Transport- und Inaktivierungsprozessen sowie der Bindung an die DNA in TKZT-Zellen im Vergleich zu den Vorgängen in anderen Tumorzellen beobachtet werden konnten (Masters und Köberle, 2003).

Ein wichtiger Ansatzpunkt ist die hohe Apoptoserate der Spermatozyten-Vorläuferzellen während der Spermatogenese, die Ausdruck einer Art „Qualitätskontrolle“ ist und die Weitergabe fehlerhafter DNA an die Nachkommen verhindert (Braun, 1998). Damit gehen die Überexpression des proapoptotischen Faktors Bax sowie die verringerte Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2, die sich bei einer Analyse von drei TKZT-Zelllinien zeigten, einher (Chresta *et al.*, 1996). Andere Untersuchungen konnten jedoch keine Korrelation zwischen Cisplatinsensitivität und Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie nachweisen (Burger *et al.*, 1997). Ebenso kontrovers wird die Rolle des Proteins p53 bei der Cisplatinsensitivität diskutiert. Auffällig ist die allgemein geringe Mutationsrate von p53 in Keimzelltumoren (Peng *et al.*, 1993; Fleischhacker *et al.*, 1994). Zwar lies sich bei vielen TKZT

darüber hinaus – im Gegensatz zu den meisten anderen malignen Tumoren – eine Überexpression dieses Wildtyp-p53 zeigen, jedoch weisen einige Untersuchungen darauf hin, dass der p53-Signalweg in Keimzelltumoren verändert oder p53 partiell inaktiviert ist. So kann eine gesteigerte Aktivität von p53, die lange Zeit als verantwortlich für die Cisplatinempfindlichkeit galt, nicht mehr als alleinige Begründung herangezogen werden (Guillou *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 2001; Kersemaekers, 2002; Spierings *et al.*, 2003).

Die Beobachtung, dass die Bindung von Cisplatin an die DNA in TKZT-Zellen sehr lange persistiert, führte zu der Annahme, dass möglicherweise eine verringerte Reparaturkapazität die hohe Sensitivität bedingt (Köberle *et al.*, 1997). Als wichtigstes Instrument der Zelle bei der Beseitigung Cisplatin-induzierter Schäden steht dabei vor allem ein Funktionsverlust des NER-Mechanismus im Vordergrund. Ein Vergleich verschiedener Tumorentitäten zeigte für TKZT auffällig geringe Konzentrationen des *xeroderma pigmentosum group A protein* (XPA) sowie des ERCC1-XPF-Komplexes, beides wichtige Komponenten im Reparaturprozess des NER (Welsh *et al.*, 2004). Die deutliche Steigerung der Reparaturkapazität nach Zugabe dieser Faktoren unterstreicht deren Bedeutung (Köberle *et al.*, 1999). Weiterhin weisen TKZT Besonderheiten bei der Erkennung von fehlerhaften DNA-Abschnitten auf. *High mobility group* (HMG)-Proteine sind in der Lage, durch Cisplatin hervorgerufene Schäden zu erfassen und deren Reparatur zu blockieren (Huang *et al.*, 1994). TKZT exprimieren zahlreiche spezifische Proteine der HMG-Proteinfamilie, wie tsHMG (*testis specific HMG-domain protein*), welches durch eine Bindung an die DNA-Schäden die Initiierung des NER verhindern und somit zu einer erhöhten Apoptoserate führen könnte (Zamble *et al.*, 2002). Insgesamt wird gegenwärtig eine Kombination verschiedener, spezifischer Merkmale als Ursache für die Cisplatinempfindlichkeit angesehen, jedoch scheinen die Veränderungen in den Reparatursystemen im Vordergrund zu stehen.

Auch über die Prozesse, die bei einigen TKZT zu einer Resistenz gegenüber der Cisplatintherapie führen, ist wenig bekannt. Zunächst ist auffällig, dass bei nichtseminomatösen TKZT die (extra-)embryonale Differenzierung mit dem Auftreten der Cisplatinresistenz assoziiert ist. Eine Rolle könnte daher der Verlust von Transkriptionsfaktoren wie Oct3/4 spielen (Mueller *et al.*, 2006). Da zwischen sensitiven und resistenten Tumoren keine Unterschiede im p53-Gehalt festgestellt werden konnten und eine Inaktivierung von p53 bei sensitiven Tumoren nicht zur Entstehung einer Resistenz führt, ist die Bedeutung des p53-Status für die Entwicklung der Cisplatinresistenz in TKZT fraglich (Burger *et al.*, 1999; Kersemaekers, 2002). Einen Hinweis auf einen Einfluss von Veränderungen im MMR gibt das vermehrte Vorkommen von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in Proben resistenter Tumoren (Mayer *et al.*, 2002; Honecker *et al.*, 2009). Unterstützt wird diese These durch weitere Studien, die eine schlechtere Überlebenschancen und höhere Rezidivquote bei Patienten mit MSI-positiven Tumoren sowie eine Korrelation zwischen dem Nachweis eines hohen Gehalts

des MMR-Proteins hMLH1 und der Überlebenszeit zeigten (Velasco *et al.*, 2008). Ein weiteres Merkmal einiger resistenter TKZT ist die erhöhte Inzidenz der BRAF V600E-Mutation, deren Nachweis darüber hinaus mit einer geringeren Expression von hMLH1 sowie dem Auftreten von MSI korreliert (Honecker *et al.*, 2009). Daneben werden Mechanismen diskutiert, die Einfluss auf die Apoptoseinduktion haben. Zum einen konnte eine verminderte Aktivierung der Caspase 9 in einer resistenten Zelllinie sowie die Erzeugung einer Resistenz in vorher sensitiven Zellen durch Inhibition dieser Caspase gezeigt werden (Mueller *et al.*, 2003). Andere Untersuchungen fanden eine signifikant höhere Expression von CCND1 (Cyclin D1) in TKZT-Zelllinien mit artifiziell induzierter Cisplatinresistenz (Noel *et al.*, 2010).

Obwohl die Ursachen für die Resistenzentwicklung also weiterhin nicht abschließend geklärt sind, wurden neben den etablierten Protokollen bereits zahlreiche Therapieversuche mit dem Ziel der Überwindung der Cisplatinresistenz durchgeführt. Diese führten jedoch meist zu ernüchternden Ergebnissen (Kollmannsberger *et al.*, 2008).

1.3 Zielgerichtete Therapie in der Onkologie

Im Rahmen der Onkologie fasst der Begriff der zielgerichteten Therapie eine Vielzahl neuartiger Therapiekonzepte zusammen, die speziell auf individuelle Eigenschaften des Tumorgewebes ausgerichtet sind. Dazu gehört unter anderem der Einsatz von Antikörpern und sogenannter *small molecules*, die an Rezeptoren oder andere Proteine binden und diese so inaktivieren können. Häufig handelt es sich dabei um Proteine, deren Funktion für das Überleben des Tumors essentiell oder durch Überexpression oder Mutationen verändert ist. Ziel des Einsatzes dieser neuen Medikamente, die auch als *targeted drugs* bezeichnet werden, ist eine individualisierte und dadurch effektivere Therapie von Tumorerkrankungen sowie die Verringerung von Nebenwirkungen.

1.3.1 Hemmung von mTOR durch RAD001

Die Serin/Threoninkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ist in eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege integriert und dient als eine Art Schalter zwischen anaboler und kataboler Stoffwechsellage. Dabei ist mTOR als Bestandteil von zwei Komplexen (mTORC1 und mTORC2) mit verschiedenen Proteinen assoziiert. Neben mTOR besteht mTORC1 aus den Proteinen mLST8, Raptor und PRAD40, der Komplex mTORC2 aus mLST8, Rictor, mSin1 und Protor (Sabatini, 2006; Pearce *et al.*, 2007; Vander Haar *et al.*, 2007). Diese Komplexe haben durch die Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern unterschiedliche Funktionen in der Zelle. So kann mTORC1 durch die Regulierung von 4EBP1 und S6K1 die Proteinsynthese beeinflussen sowie indirekt über S6K1 den PI3K/AKT-*pathway* inhibieren (Takano *et al.*, 2001; Hay, 2004). Die Rolle von mTORC2 ist weniger gut verstanden, eine direkte Aktivierung von AKT gilt jedoch als gesichert (Sarbasov *et al.*, 2005). Somit scheint mTOR in Abhängigkeit

von den assoziierten Proteinen eine unterschiedliche Substratspezifität zu zeigen und teilweise gegenteilige Funktionen zu haben.

Veränderungen in diesen mTOR-abhängigen Prozessen konnten in zahlreichen malignen Tumoren beobachtet werden. Zwar sind derzeit keine Mutationen von mTOR selbst bekannt, jedoch konnte in verschiedenen Neoplasien, wie beispielsweise kolorektalen und endometrialen Karzinomen, eine Aktivierung des mTOR-Signalweges nachgewiesen werden (Faivre *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2010). Darüber hinaus kann mTOR indirekt durch regulatorische Proteine oder Rezeptoren wie EGFR und IGF-1R aktiviert werden. Diese sind in einigen Tumoren mutiert oder werden überexprimiert (Faivre *et al.*, 2006). Da p53 die Funktion von mTOR hemmt, kann auch die in entarteten Zellen häufig beobachtete Inaktivierung von p53 zu einer Aktivierung von mTOR führen (Feng *et al.*, 2005). Folglich stellen mTOR und die assoziierten Signalwege ein potentielles Ziel onkologischer Therapiekonzepte dar. Medikamente, die die Funktion von mTOR hemmen, sind bereits seit vielen Jahren im Einsatz und dienen vor allem als Immunsuppressiva sowie zur Beschichtung koronarer Stents (Faivre *et al.*, 2006). Aufgrund der schlechten pharmakologischen Eigenschaften von Rapamycin, dem ältesten bekannten Wirkstoff, wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche neue, auch oral verfügbare Substanzen entwickelt, darunter RAD001 (Everolimus, Abbildung 2) und CCI-779 (Temsirolimus) (Sedrani *et al.*, 1998). Dieses wurde 2003 zur Prävention von Transplantatabstoßungen in Europa zugelassen (Atkins *et al.*, 2009).

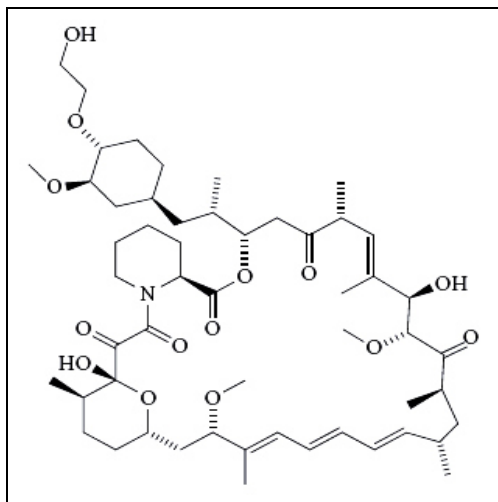


Abbildung 2: Strukturformel von RAD001 (Atkins *et al.*, 2009)

Rapamycin und seine Analoga bilden in der Zelle zunächst einen Komplex mit FKBP12, welcher anschließend an mTOR bindet und die Formierung des mTORC1 verhindert. Da Raptor kein Bestandteil des mTORC2 ist, steht die Inhibition der Wirkung des mTORC1 im Vordergrund, allerdings konnte in einigen Zelllinien auch eine Hemmung von mTORC2 beobachtet werden. Durch die folgende Hemmung der Proteinsynthese wird das Zellwachstum

gehemmt, gleichzeitig bedingt die durch den Funktionsverlust von mTORC1 wegfallende Hemmung von AKT einen antiapoptotischen Stimulus (Sabatini, 2006). Insgesamt überwiegt jedoch die zytostatische Wirkung. Durch eine verringerte Expression von Cyclin D1 und p27 kommt es zum Zellzyklusarrest (Faivre *et al.*, 2006). Darüber hinaus aktiviert Rapamycin autophagische Prozesse (Kroemer und Jäätelä, 2005). Im normalen Zellstoffwechsel kann mTOR durch eine Stabilisierung von HIF-1 α die Expression des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) und somit die Angiogenese steigern. Eine Blockade von mTOR wirkt daher zusätzlich der Bildung neuer Blutgefäße zur Versorgung eines Tumors entgegen (Humar *et al.*, 2002).

In verschiedenen Untersuchungen konnte eine Inhibition der Zellproliferation durch Rapamycin und seine Analoga in unterschiedlichen humanen Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2010). Klinische Studien zeigten ein teilweises Ansprechen, unter anderem von Nierenzellkarzinomen und Mantelzelllymphomen (Easton und Houghton, 2006). Zurzeit sind sowohl Everolimus als auch Temsirolimus für die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen (Kramer *et al.*, 2011).

1.3.2 Hemmung von IGF-1R durch AEW541

Der *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) ist ein ubiquitär exprimierter, transmembranöser Rezeptor, der als Dimer aus zwei gleichen Anteilen aufgebaut ist. Diese bestehen jeweils aus einer extrazellulären α -Untereinheit, die zur Bindung der Liganden dient, sowie einer β -Untereinheit, die die Tyrosinkinasedomäne beinhaltet und in der Zellmembran verankert ist. Der Insulinrezeptor (IR) zeigt große strukturelle Ähnlichkeiten, sodass die Bildung von Hybridrezeptoren möglich ist. Der IGF-1-Rezeptor kann durch verschiedene Moleküle aktiviert werden, jedoch gilt der *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) als wichtigster Ligand. IGF-2 zeigt eine leicht geringere, Insulin eine deutlich schwächere Affinität (Baserga, 2000; Hartog *et al.*, 2007).

Durch die Bindung der Liganden kommt es zur Autophosphorylierung der β -Untereinheit und anschließend zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege. Der aktivierte MAPK-Signalweg führt zu einem gesteigerten Zellwachstum, während die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges antiapoptotische Wirkung hat und die Proteinsynthese verstärkt (Gallagher und LeRoith, 2011). Das IGF-System reguliert zahlreiche Funktionen, sowohl auf parakriner als auch auf endokriner Ebene. Es ist für wichtige Bereiche der neonatalen Entwicklung und für das postnatale Wachstum verantwortlich, darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese sowie Regenerations- und Umbauprozessen und beeinflusst die neuronale Plastizität (Zumkeller, 2002; Annunziata *et al.*, 2011). Diese zentrale Stellung in der Regulation des Zellwachstums lässt eine wichtige Rolle des IGF-Systems bei der Pathogenese von Tumorerkrankungen vermuten. Die Ergebnisse zahlreicher Studien zum

Einfluss von IGF-1 auf die Entstehung von Tumoren legen eine Korrelation zwischen der IGF-1-Konzentration im Blut und dem Risiko einer Krebserkrankung nahe (Pollak *et al.*, 2004). Bei einer Untersuchung verschiedener solider sowie hämatologischer Neoplasien zeigte sich eine universelle Expression des IGF-1R in allen getesteten Zelllinien, in Analysen von Tumorproben unterschiedlicher Entität wiesen diese teilweise eine Überexpression auf (Mitsiades *et al.*, 2004; Hartog *et al.*, 2007). Experimente an Mäusen mit einem IGF-1R-*knockout* bzw. einer reduzierten Expression von IGF-1R konnten zudem die Notwendigkeit eines intakten IGF-Signalweges für die maligne Transformation gesunder Zellen, das Tumorwachstum sowie die Metastasierung nachweisen (Yakar *et al.*, 2005; Sell *et al.*, 1993).

Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte eine Blockierung des IGF-1R das Wachstum von Tumoren, deren Zellstoffwechsel vom IGF-Signalweg abhängt, hemmen und somit einen Ansatzpunkt für die gezielte Therapie dieser Tumoren bieten. Zu diesem Zweck wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt und bereits in Studien getestet. So führte beispielsweise der Antikörper Figitumumab bei einem Teil von Patienten mit einem Ewing-Sarkom zur Reduktion oder Stabilisierung der Tumorgöße (Olmos *et al.*, 2010). Komplikationen ergeben sich allerdings aus der starken strukturellen Ähnlichkeit zwischen IGF-1R und IR, da nichtselektive Substanzen durch Bindung an den IR zu schweren Hyperglykämien führen können, die Entwicklung selektiver Medikamente sich jedoch schwierig gestaltet. Ein solcher selektiver, oral verfügbarer Tyrosinkinaseinhibitor ist AEW541, der zur Familie der Pyrrolo[2,3-d]-Pyrimidine gehört, eine etwa 27fach höhere Affinität zum IGF-1R im Vergleich zum IR hat und zu einer effektiven Hemmung der Phosphorylierung der β -Untereinheit, assoziiert mit einer reduzierten Aktivierung von AKT, führt (Abbildung 3) (García-Echeverría *et al.*, 2004). Die Substanz ist aktuell nicht zur klinischen Anwendung zugelassen, jedoch zeigte sich *in vitro* sowie im Mausmodell eine Aktivität gegenüber Ewing-Sarkomen und dem Multiplen Myelom. Darüber hinaus konnten bei zusätzlicher Gabe von AEW541 zur Chemotherapie bei diesen Tumoren und beim hepatozellulären Karzinom additive Effekte beobachtet werden (Scotlandi *et al.*, 2005; Höpfner *et al.*, 2006; Maiso *et al.*, 2008).

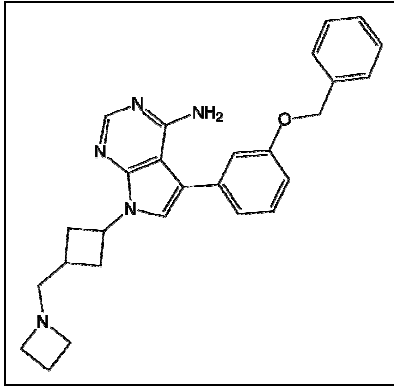


Abbildung 3: Strukturformel von AEW541 (Novartis Pharma)

1.3.3 Hemmung von EGFR, HER2/neu und VEGFR durch AEE788

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR, c-erbB-1, Her-1) und HER2/neu (c-erbB-2) gehören zur Familie der c-erbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Diese umfasst insgesamt vier Rezeptoren, welche Gemeinsamkeiten in ihrer Struktur und ähnliche Funktionen aufweisen. Sie bestehen aus einem extrazellulären Anteil zur Bindung der Liganden, dem intrazellulären Anteil mit der Tyrosinkinasedomäne sowie einem transmembranösen Bereich. Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren zweier Rezeptoren, Internalisierung des Dimers sowie der Phosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne. Diese ist wiederum in der Lage, eine Vielzahl intrazellulärer Proteine zu binden, durch Phosphorylierung zu aktivieren und somit Signalkaskaden zu starten (Citri und Yarden, 2006). Der EGFR kann durch verschiedene Liganden aktiviert werden, der wichtigste scheint jedoch der *epidermal growth factor* (EGF) zu sein. Auffällig ist, dass HER2/neu auf die Bindung an einen der drei anderen erbB-Rezeptoren angewiesen ist, da es über keine eigenen Liganden verfügt, die mit ausreichender Affinität binden. Allerdings kommt es aufgrund der Konformation von HER2/neu bevorzugt zur Bildung eines solchen Heterodimers. Dieses besitzt darüber hinaus im Vergleich zu den anderen möglichen Dimeren eine deutlich stärkere Kinase- und Signalaktivität (Gutierrez und Schiff, 2011). Wichtige Signalwege, die durch Rezeptoren der c-erbB-Familie aktiviert werden, sind der Ras/Raf- sowie der PI3K/AKT-*pathway*. Beide spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression, Zellproliferation sowie der Angiogenese und können somit bei einer Aktivierung auch die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren begünstigen (Herbst, 2004). Dies wird unterstützt durch Untersuchungen, die eine Überexpression des EGFR in zahlreichen Tumoren, darunter Magen-, Kolon- und Lungenkarzinome, Glioblastome sowie Kopf-Hals-Tumoren, zeigen (Salomon *et al.*, 1995). Auch HER2/neu ist in vielen soliden Neoplasien, wie zum Beispiel in Ovarial- und Lungenkarzinomen überexprimiert, am besten erforscht ist jedoch seine Bedeutung beim Mammakarzinom (Slamon *et al.*, 1989; Berchuck *et al.*, 1990; Kern *et al.*, 1990). Zu Vorkommen und Aktivität beider Rezeptoren beim TKZT gibt es zahlreiche Untersuchungen

mit unterschiedlichen Ergebnissen, jedoch konnte in einigen Proben eine verstärkte Expression nachgewiesen werden (Mándoky *et al.*, 2004; Moroni *et al.*, 2001; Soule *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008; Ghavamnasiri *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Substanzen entwickelt, die zielgerichtet die Signalübertragung durch den EGFR und HER2/neu blockieren. Einige dieser Medikamente, beispielsweise die Antikörper Cetuximab bei Kolon- und Kopf-Hals-Tumoren und Trastuzumab beim Mammakarzinom sowie der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib bei NSCLC und Pankreaskarzinomen, sind bereits für die klinische Anwendung zugelassen (Modjtahedi und Essapen, 2009).

Unter dem Oberbegriff VEGF (*vascular endothelial growth factor*) werden fünf Wachstumsfaktoren zusammengefasst (VEGF-A – VEGF-E), meist bezieht sich die Bezeichnung jedoch nur auf den VEGF-A. Die Moleküle interagieren mit drei ähnlichen Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4). Von großer Bedeutung ist die Bindung von VEGF-A an den Rezeptor VEGFR-2, die unter anderem die Aktivierung des PI3K/AKT- sowie des Raf/MEK/ERK-Signalweges bewirkt und für die proangiogenetische und mitogene Wirkung von VEGF-A verantwortlich ist. Zur Steigerung der Expression und Ausschüttung von VEGF-A kommt es vor allem unter hypoxischen Bedingungen über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α , aber auch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren wie EGF und IGF können die Freisetzung bewirken. Die VEGF-Rezeptoren werden vor allem von Endothelzellen exprimiert, sodass deren Aktivierung direkt zur Proliferation und anschließenden Neovaskularisation führt (Connolly *et al.*, 1989; Ferrara *et al.*, 2003). Da Tumoren ab einer gewissen Größe auf eine eigene Blutversorgung und daher auf die Bildung neuer Blutgefäße angewiesen sind, stellt dieses System einen weiteren Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie dar. In verschiedenen Untersuchungen konnte eine verstärkte Expression der VEGF-mRNA in der Mehrzahl der analysierten Tumorproben festgestellt werden, darunter Lungen-, Mamma-, Nieren- und Ovarialkarzinome (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Auch TKZT zeigen eine gesteigerte Ausschüttung von VEGF und Expression von VEGFR-1 und 2 (Viglietto *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1999; Nitzsche *et al.*, 2010). Nachdem im Mausmodell eine Reduktion der Vaskularisierung des Tumorgewebes und der Metastasierung sowie eine Wachstumsinhibition durch Hemmung des VEGF bzw. VEGFR nachgewiesen konnte, sind derzeit sowohl ein Antikörper gegen VEGF-A (Bevacizumab) als auch Tyrosinkinaseinhibitoren (Sorafenib und Sunitinib) für die Therapie diverser maligner Tumoren zugelassen (Crawford und Ferrara, 2009; de Leite Oliveira *et al.*, 2011).

Bei der Substanz AEE788 handelt es sich ebenfalls um einen Tyrosinkinaseinhibitor, der jedoch multiple Zielproteine hat und sowohl EGFR und HER2/neu als auch die Rezeptoren für den VEGF (VEGFR-1 und 2) hemmt (Abbildung 4) (Traxler, 2004). Aufgrund der teilweise identischen Zielmoleküle und Signalkaskaden, die durch die unterschiedlichen

Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden, kann die Blockade eines Rezeptortyps durch die verstärkte Aktivierung eines anderen Rezeptors kompensiert und somit die Wirkung des Inhibitors aufgehoben werden. Die simultane Hemmung mehrerer Tyrosinkinasen kann dieser Resistenzentwicklung entgegen wirken und die Effektivität der Medikamente erhöhen. So führt AEE788 über die Wirkung am EGFR sowie an HER2/neu direkt zu einer Reduktion des Tumorwachstums, darüber hinaus hemmt es über die verringerte Vaskularisation indirekt die Ausbreitung des Tumors.

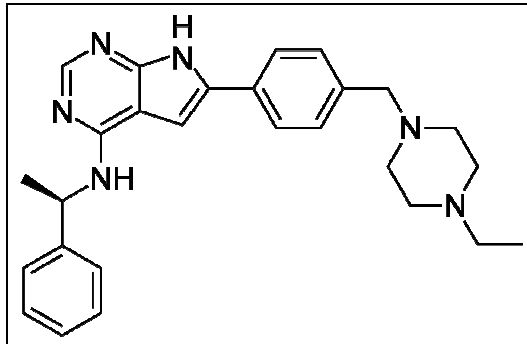


Abbildung 4: Strukturformel von AEE788 (Novartis Pharma)

Die derzeitige klinische Anwendung der meisten Antikörper und TKI erfolgt jedoch vorrangig in Kombination mit „klassischen“, zytotoxischen Chemotherapeutika, da sich durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen additive und synergistische Effekte erzielen lassen und Resistenzen überwunden werden können. Beispiele hierfür sind die zusätzliche Gabe des HER2/neu-Antikörpers Trastuzumab bei Patientinnen mit HER2/neu-überexprimierenden Mammakarzinomen sowie die Kombination von Irinotecan mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab bei refraktären Kolonkarzinomen. Beide Therapiekonzepte führen zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens (Slamon *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2004). Der gezielte Einsatz dieser *targeted drugs* bietet daher einen wichtigen Ansatzpunkt für die Verbesserung der Therapie bislang schwer behandelbarer maligner Tumorerkrankungen.

2 ZIELSTELLUNG

Zwar konnte die Therapie der TKZT in den vergangenen Jahrzehnten stetig verbessert und die Überlebensraten so auf über 90 % gesteigert werden, jedoch kommt es bei einigen Patienten zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber dem gebräuchlichsten, normalerweise hoch wirksamen Chemotherapeutikum Cisplatin. Diese zumeist jungen Patienten haben trotz intensiver Behandlung noch immer eine sehr schlechte Prognose. Aufgrund der zahlreichen neuen Entwicklungen im Bereich der *targeted drugs* und teilweise großen Erfolge in der Therapie anderer Tumorentitäten war es Ziel dieser Arbeit, *in vitro* die Wirksamkeit einiger dieser Substanzen in TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher Cisplatinsensitivität und Differenzierung zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

- 1) Charakterisierung der TKZT-Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin und den verwendeten *targeted drugs* RAD001, AEW541 und AEE788
- 2) Untersuchung der Effekte einer Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und einzelnen *targeted drugs* auf die Cisplatinsensitivität der TKZT
- 3) Untersuchung der Effekte einer Kombinationsbehandlung aus verschiedenen *targeted drugs* auf die Wirksamkeit der Substanzen in einzelnen TKZT-Zelllinien
- 4) Charakterisierung der TKZT-Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression von EGFR, HER2/neu, IGF-1R und mTOR sowie des Phosphorylierungsstatus dieser Proteine
- 5) Überprüfung der spezifischen Wirkweise der *targeted drugs* durch Untersuchung ihres Einflusses auf den Phosphorylierungsstatus der jeweiligen Zielproteine

Vor dem Hintergrund der geschilderten Resistenzproblematik galt dabei dem Verhalten der cisplatinresistenten Zelllinien ein besonderes Interesse.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Zelllinien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die in Tabelle 1 aufgeführten, etablierten Zelllinien aus nichtseminomatösen TKZT verwendet.

Tabelle 1: TKZT-Zelllinien mit ursprünglicher Lokalisation, Histologie und Referenzen

Zelllinie	Patientenhistologie und Lokalisation	Histologie des Nacktmaus-Xenograftes	Referenzen
H12.1	EC, CC, TE, S (Testes)	EC, IT, STGC	(Casper <i>et al.</i> , 1987)
H12.1RA	differenzierte H12.1		
H12.1ODMneu	differenzierte H12.1		(Mueller <i>et al.</i> , 2006)
1411HP	EC, TE, YST (Retroperitoneale Metastase)	EC, YST	(Vogelzang <i>et al.</i> , 1985)
GCT72F	TC (Testes)	YST	(Pera <i>et al.</i> , 1987)
1777NR	EC (Retroperitoneale Metastase)	EC, IT	(Bronson <i>et al.</i> , 1984)

Abkürzungen: EC – Embryonales Karzinom, CC – Chorionkarzinom, IT – Unreifes Teratom, S – Seminom, STGC – Synzytiotrophoblastische Riesenzellen, TC – Teratokarzinom, TE – Teratom, YST – Dottersacktumor.

Die Zelllinie H12.1RA konnte aus der Linie H12.1 durch Behandlung mit ATRA (all-trans-Retinolsäure) und Kultivierung in konditioniertem Medium der Zelllinie GCT72F abgeleitet und isoliert werden (unveröffentlicht, persönliche Mitteilung Dr. T. Müller).

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen (25-75 cm²) und unter Standardkulturbedingungen (Temperatur 37°C, 5 % CO₂, ≥ 95 % Luftfeuchtigkeit). Als Nährmedium wurde RPMI-1640 versetzt mit 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Neben einer täglichen lichtmikroskopischen Kontrolle des Zellwachstums sowie einem Wechsel des Nährmediums erfolgte alle 2 bis 4 Tage die Passagierung der Zellen. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Nährmedium entfernt, die Zellen mit Spülmedium gewaschen und schließlich mit Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend im Nährmedium suspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 in neue Flaschen gegeben. Eine genaue Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

3.3 SRB-Zytotoxizitäts-Assay

Die Untersuchung der Sensitivität der untersuchten Zelllinien gegenüber den verwendeten Medikamenten sowie der Effekte einer Kombination dieser Wirkstoffe erfolgte mithilfe des SRB-Zytotoxizitäts-Assays (Skehan *et al.*, 1990). Dabei handelt es sich um eine schnelle und sensitive Methode zur Bestimmung des zellulären Proteingehaltes, basierend auf der Bindung des Farbstoffes Sulforhodamin B an zelluläres Protein bei saurem pH-Wert. Der nichtgebundene Farbstoff kann anschließend unter sauren Bedingungen ausgewaschen und der gebundene Anteil des Farbstoffs unter basischen Bedingungen freigesetzt werden. Danach erfolgt die photometrische Messung, wobei die Menge des freigesetzten Farbstoffes mit der Zellzahl korreliert.

Die Durchführung des Assays erfolgte in 96-Lochplatten. Die Waschvorgänge wurden maschinell und somit standardisiert durchgeführt. Für jede Kombination aus Behandlung und Zelllinie wurden jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Zelllinien-spezifischen Zellzahlen pro Loch (*well*) waren im Labor auf Grundlage von zuvor ermittelten Wachstumskinetiken bereits etabliert und sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Zelllinien-spezifische Zellzahlen für den SRB-Assay

Zelllinie	Zellzahl pro <i>well</i>	Zelllinie	Zellzahl pro <i>well</i>
H12.1	3000	1411HP	6000
H12.1RA	8000	GCT72F	3500
H12.1ODMneu	8000	1777NR	3000

3.3.1 Sensitivitätsbestimmung gegenüber einzelnen Substanzen

Für die Bestimmung der Sensitivität der Zelllinien gegenüber den einzelnen Substanzen wurde folgendes Verfahren durchgeführt:

- Bestücken der 96-Lochplatte mit einer zuvor bestimmten, für jede Zelllinie spezifischen Zellzahl in 100 µl pro *well* und Kultivierung der Zellen für 24 h bei 37°C
- Herstellung einer Verdünnungsreihe des zu testenden Medikamentes (unter Berücksichtigung des schon vorhandenen Mediums Herstellung in doppelter Konzentration)
- Zugabe von Nährmedium zur ersten Reihe (unbehandelte Kontrolle) sowie des mit dem Medikament versetzten Mediums in aufsteigender Konzentration zu den übrigen Reihen der Lochplatte (100 µl / *well*)
- Kultivierung der Zellen für 96 h bei 37°C unter täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums

- Abstoppen des Zellwachstums durch Entfernen des Mediums und Fixierung der Zellen mit Trichloressigsäure-Fixierlösung (100 μ l / well, mind. 2 h Einwirkzeit bei 4°C)
- 4 x Waschen mit Aqua dest., Entfernung nicht adhärenter Zellen
- Zugabe von SRB-Färbelösung (100 μ l / well, 45 min Einwirkzeit)
- 4 x Waschen mit 1 % Essigsäure, Entfernung nicht gebundenen Farbstoffes
- Lochplatten trocknen lassen
- Zugabe von Tris-Pufferlösung (100 μ l / well, 20 min Einwirkzeit)
- Schütteln der Platten zur Durchmischung der Farbstofflösung und photometrische Messung der OD bei 570 nm
- Berechnung der arithmetischen Mittelwerte aus den acht Messwerten pro Wirkstoffkonzentration
- Umrechnung der Mittelwerte in Prozentwerte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100 %)
- Darstellung des konzentrationsabhängigen Wachstumsverhaltens im Diagramm

Als Vergleichsgröße diene der IC50-Wert, welcher aus den Dosis-Wirkungskurven abgelesen sowie aus den erhaltenen Messwerten berechnet werden kann. Er gibt an, bei welcher Konzentration des eingesetzten Medikamentes das Wachstum der Zellen – im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle – um 50 % inhibiert wird.

3.3.2 Sensitivitätsbestimmung gegenüber einer Kombination der Substanzen

Für die Untersuchung der Effekte einer Kombination aus 2 oder mehr Medikamenten war die Bestückung von zwei 96-Lochplatten pro Zelllinie (Platte 1 und Platte 2) und zu untersuchender Kombination nötig. Zunächst wurden aus den Sensitivitätsuntersuchungen die IC30-Werte bestimmt. Unter Auslassung einer Reihe, welche als unbehandelte Kontrolle diene, wurde zu den Zellen in Platte 1 zuerst Nährmedium mit einer dem IC30-Wert entsprechenden Konzentration des Medikamentes A gegeben. Anschließend wurden beide Platten mit einer Verdünnungsreihe des Medikamentes B bestückt. Wiederum diene eine Reihe als unbehandelte Kontrolle. Eine weitere Reihe auf Platte 1 wurde ebenfalls nicht mit Medikament B bestückt, um eine Kontrolle der Wachstumsinhibition durch Medikament A sowie die Beurteilung des Effektes der Kombination zu ermöglichen. Die weitere Behandlung erfolgte wie beschrieben (Kap. 3.3.1).

Für die Auswertung wurde eine Dosis-Wirkungskurve für Medikament B (Platte 2) sowie die Kombination aus Medikament A und B (Platte 1) unter Abzug der durch Medikament A hervorgerufenen Wachstumsinhibition erstellt. Der Vergleich der aus diesen beiden Kurven erhaltenen IC50-Werte ermöglichte die Beurteilung der Wirksamkeit einer Kombination.

3.4 Western Blot-Analysen

3.4.1 Proteinisolierung

Vor der Analyse der Proteinexpression erfolgte die Isolierung des Gesamtproteins aus der Zellkultur mit folgendem Vorgehen:

- Herstellung einer Einzelzellsuspension durch Trypsinierung und anschließende Zentrifugation der Zellen
- Abgießen des Überstandes und Waschen der Zellen in PBS, anschließend erneut Zentrifugieren
- Abgießen des Überstandes und ggf. Lagerung der Probe bei -20°C

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

- Zellen in Isolationspuffer lysieren
- Homogenisierung der Lysate mittels 27G-Kanüle und Inkubation für mind. 20 min
- Zentrifugation der Proben (15 min, 13.000 rpm)
- Überführen des Überstandes in neues Reaktionsgefäß und Lagerung bei -20°C

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) wie folgt:

- Herstellung des Ansatzes: 798 µl Aqua dest., 2 µl proteinhaltiger Überstand, 200 µl Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay)
- Messung der Absorption am BioSpec-1601E bei 595 nm
- Berechnung der Proteinkonzentration und gegebenenfalls Angleichung der Konzentrationen durch Zugabe von RIPA-Puffer

3.4.3 Western Blotting

Der Western Blot dient der qualitativen Analyse der Proteinexpression. Dazu werden die Proteine zunächst mittels der diskontinuierlichen SDS-Gel-Elektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend können sie durch Antikörper markiert und diese Markierung über spezielle Sekundärantikörper durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Herstellung der Gele: 8 %iges Trenngel (Konzentration entsprechend der Größe der nachzuweisenden Proteine), Überschichtung des festen Trenngels mit Sammelgel
- Vorbereitung der Proben: Zugabe von Ladepuffer zu den aliquotierten Proteinproben (mind. 20 µg Protein pro Slot), Denaturierung der Proteine durch Erhitzen (10 min bei 99°C)

- Auftrennung der Proteine: Übertragung der Proben sowie der Marker zur Bestimmung der Proteingröße, Auftrennung der Proteine bei konstant 200 V
- Blotting: Schichtung von Gel und Nitrozellulosemembran zwischen Filtermembranen, Transfer im Tank-Blot-System (konst. 100 mA, etwa 24 h)
- Antikörperinkubation:
 - Kontrolle der Gleichmäßigkeit der Banden nach 2 min Färbung in Ponceau S
Die folgenden Schritte erfolgten unter ständiger Bewegung der Membranen.
 - Blocken der Membran mit Trockenmilch (60 min)
 - Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (Tabelle 3; gelöst in BSA oder Trockenmilch, etwa 24 h)
 - Spülen der Membran mit PBST (2 x 10 min und 3 x 5 min)
 - Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 3; gelöst in PBST, 60 min)
 - Spülen der Membran mit PBST (3 x 5 min)
- Detektion: Erzeugung der Chemilumineszenz durch Inkubation der Membran mit RotiLumin (1 min), anschließend Belichtung und Entwicklung des Röntgenfilms

3.5 Statistik

Alle Versuche zur Analyse der Wachstumskinetiken mittels SRB-Assay wurden mindestens 3-mal durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung der gemessenen Absorption mittels der Tabellenkalkulationssoftware Excel® (Microsoft®). Nach Berechnung der arithmetischen Mittelwerte und der Standardabweichung für die 8 Einzelwerte einer Spalte der 96-Loch-Platte erfolgte die Ermittlung der IC-Werte der einzelnen Chemotherapeutika mittels linearer Interpolation der benachbarten Messwerte. Abschließend wurden aus den Werten der Einzelversuche die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet. Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte mithilfe des Student's t-Test, eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

Zur Ermittlung des Effektes in den Kombinationsversuchen wurden zunächst die IC50-Werte wie beschrieben berechnet und anschließend der Quotient aus den IC50-Werten der Kontrolle und der Kombination bestimmt. Ein Quotient = 1 entspricht daher einem additiven, ein Quotient < 1 einem antagonistischen und ein Quotient > 1 einem synergistischen Effekt.

3.6 Materialauflistung

3.6.1 Zellkultur

- Kulturmedium RPMI-1640
+ 10 % FKS
+ 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 1 mg/ml Streptomycin)
- Puffer 1 x PBS verdünnt aus 10 x Stammlösung
- Trypsin-EDTA 0,5 mg/ml Trypsin + 0,2 mg/ml EDTA

3.6.2 Medikamente

- Cisplatin 20 mM Cisplatin (Sigma) in DMF
(Aufbewahrung bei 4°C)
- RAD001 20 mM RAD001 (Novartis) in DMSO
(Aufbewahrung bei -20°C)
- AEW541 10 mM AEW541 (Novartis) in DMSO
(Aufbewahrung bei -20°C)
- AEE788 10 mM AEE788 (Novartis) in DMSO
(Aufbewahrung bei -20°C)

3.6.3 SRB-Zytotoxizitäts-Assay

- TCA-Fixierlösung 10 % Trichloressigsäure
Aqua dest.
- SRB-Färbelösung 0,4 % Sulforhodamin B
1 % Essigsäure
Aqua dest.
- Tris-Pufferlösung 10 mM Tris-Base
Aqua dest.

3.6.4 Proteinbestimmung

- RIPA-Puffer 50 mM Tris
100 mM NaCl
0,5 % Igepal/NP40
0,5 % Desoxycholat
0,5 % SDS
Aqua dest.

- Isolationspuffer RIPA-Puffer
pro 1ml RIPA-Puffer: 10 µl PMSF (100 mM)
10 µl DTT (10 mM)
10 µl Protease-Inhibitor
10 µl Phosphatase-Inhibitor

- Trenngel 4,6 ml Aqua dest.
(10 ml, 8 %-Gel) 2,7 ml Acrylamid (30 %)
2,5 ml Tris (1,5 M) bei pH 8,8
0,1 ml SDS (10 %)
0,05 ml APS
0,006 ml TEMED

- Sammelgel 2,87 ml Aqua dest.
(5 ml) 0,832 ml Acrylamid (30 %)
1,25 ml Tris (1,5 M) bei pH 8,8
0,05 ml SDS (10 %)
0,025 ml APS
0,006 ml TEMED

- Ladepuffer 3,8 ml Aqua dest.
(8 ml, 4fach konz.) 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl
0,8 ml Glycerol
1,6 ml 10 % SDS
0,4 ml 2β-Mercaptoethanol
0,4 ml 0,05 % Bromphenolblau

- Laufpuffer 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS
pH 8,3

- Blotting-Puffer 20 mM Tris
150 mM Glycin
0,05 % SDS
20 % Methanol
Aqua dest.

- PBS 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄*12 H₂O
1,76 mM KH₂PO₄

pH 6,8

- PBST (0,1 %) PBS + 0,1 % Tween-20
- Trockenmilch 5 % Trockenmilchpulver in PBST
- BSA 5 % BSA in PBST

3.6.5 Antikörper

In Tabelle 3 sind die im Western Blot genutzten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 3: Primäre und sekundäre Antikörper im Western Blot

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Anti-Goat-Ig		Santa Cruz Biotechnology	1:5000
Anti-Mouse-Ig		Santa Cruz Biotechnology	1:2500
Anti-Rabbit-Ig		Santa Cruz Biotechnology	1:2500
Aktin	C-11	Santa Cruz Biotechnology	1:4000
EGFR	Klon 13	BD Transduction Laboratories	1:500
EGFR akt.	Klon 74	BD Transduction Laboratories	1:500
HER2/neu	29D8	Cell Signaling Technology	1:1000
HER2/neu akt. (Tyr1221/1222)	6B12	Cell Signaling Technology	1:1000
IGF-1R		Cell Signaling Technology	1:1000
IGF-1R akt. (Tyr1131) / IR akt. (Tyr1146)		Cell Signaling Technology	1:1000
mTOR		Cell Signaling Technology	1:1000
mTOR akt. (Ser2448)		Cell Signaling Technology	1:1000
mTOR akt. (Ser2481)		Cell Signaling Technology	1:1000
VEGFR-2	55B11	Cell Signaling Technology	1:1000
VEGFR-2 akt. (Tyr951)	7H11	Cell Signaling Technology	1:1000

3.6.6 Firmenverzeichnis

Firma	Produkt
B. Braun, Melsungen, D	Aqua dest.
Biochrom AG, Berlin, D	EDTA, Fetales Kälberserum
Bio-Rad Laboratories Inc., München, D	Protein Assay Färbereagenz, Glasplatten, Tank-Blot-System, TEMED, Gelelektrophorese-Apparatur
Brand GmbH, Wertheim, D	Küvetten
Carl Zeiss AG, Jena, D	Mikroskope (Axiovert 25 CA, Axiovert 40 CFL)
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D	Acrylamid, BSA, Trichloressigsäure, Methanol, Roti-Lumin 1+2, Tris, Albumin Fraktion V, Protease-Inhibitor, Rotiphorese-Gel
Eppendorf AG, Hamburg, D	Pipetten, Pipettenzubehör
GE Healthcare GmbH, Solingen, D	Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL), Filterpapier, Nitrozellulosemembran
Heraeus Instruments, Hanau, D	Zentrifugen (Biofuge fresco Heraeus, Labofuge 400)
PAA Laboratories GmbH, Pasching, D	Dulbecco's PBS, Penicillin/Streptomycin, Trypsin-EDTA
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, D	Zählkammer
Saliter, Obergünzburg, D	Trockenmilchpulver
Shimadzu, Duisburg, D	BioSpec-1601 E
Sigma-Adrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D	Ponceau S, RPMI-1640, Sulforhodamin B, Tween-20, Dithiothreitol (DTT), Ethanol 96 %, Cisplatin (CDDP), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Tecan LabInstruments GmbH, Crailsheim, D	Plattenwaschgerät (Plate Washer 96 PW), Mikroplatten-Reader (SpectraFluor Plus)
Thermo Scientific, Braunschweig, D	Phosphatase-Inhibitor
TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, CH	96-Loch-Mikrotiterplatten, serologische Pipetten, Zentrifugenröhrchen, Zellkulturflaschen

Weitere eingesetzte Geräte und Verbrauchsmittel entsprechen den üblichen Laborstandards und werden nicht aufgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Sensitivität der TKZT-Zelllinien gegenüber den getesteten Substanzen

Die Bestimmung der Sensitivität der TKZT-Zelllinien gegenüber Cisplatin, RAD001, AEW541 und AEE788 erfolgte durch eine Behandlung mit der jeweiligen Substanz über 96 h und der anschließenden Messung des Zellwachstums im SRB-Zytotoxizitäts-Assay. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen wurden in einer Dosis-Wirkungskurve halblogarithmisch dargestellt und die Wirksamkeit anhand der IC50- und IC90-Werte verglichen.

Bei der Behandlung mit Cisplatin zeigte sich eine relative Resistenz der Zelllinien H12.1RA, H12.1ODMneu, 1411HP und 1777NR im Vergleich zur sensitiven Zelllinie H12.1. Auch die Zelllinie GCT72F war gegenüber Cisplatin sensitiv (Abbildung 5).

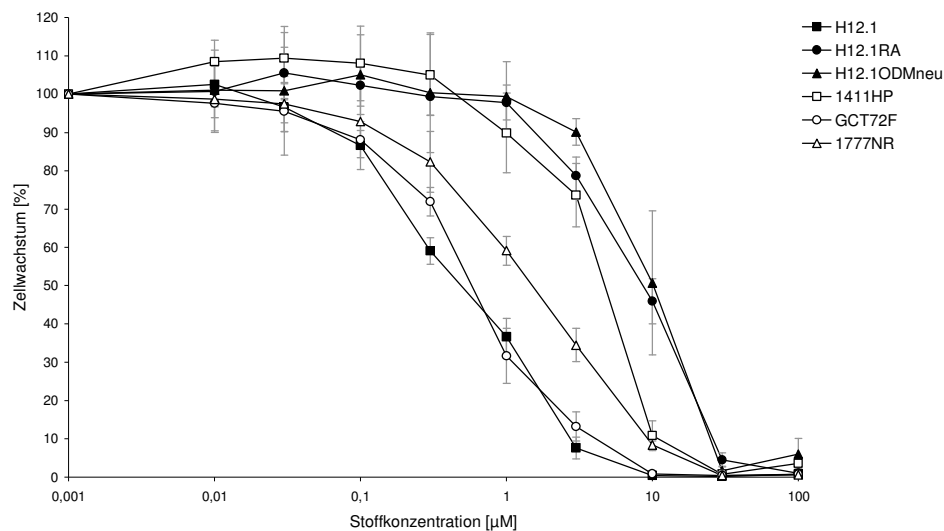


Abbildung 5: Dosis-Wirkungsbeziehung von Cisplatin im SRB-Assay nach 96 h Behandlung (n=3, MW ± STABW)

Die Dosis-Wirkungskurven für die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 zeigten für alle Zelllinien ein Wachstumsplateau, welches stets ab einer Stoffkonzentration von 0,001 µM und somit vor bzw. etwa im Bereich des IC50-Wertes auftrat. Daher erwies sich die IC50 als unzureichender Parameter für die Sensitivität der Zellen gegenüber der Substanz. Eine sinnvolle Aussage zur Zelllinien-spezifischen Wirksamkeit ermöglichte ein Vergleich der bei der Stoffkonzentration von 0,001 µM erreichten Wachstumsinhibition, angegeben als korrespondierender IC-Wert.

Dabei zeigte sich eine geringere Sensitivität der Zelllinien 1411HP und H12.1ODMneu. Bei diesen Linien entsprachen 0,001 µM des Wirkstoffes dem IC20- (1411HP) bzw. IC30-Wert (H12.1ODMneu), während die Konzentration von 0,001 µM bei den übrigen untersuchten Zelllinien etwa dem IC50-Wert entsprach (Abbildung 6).

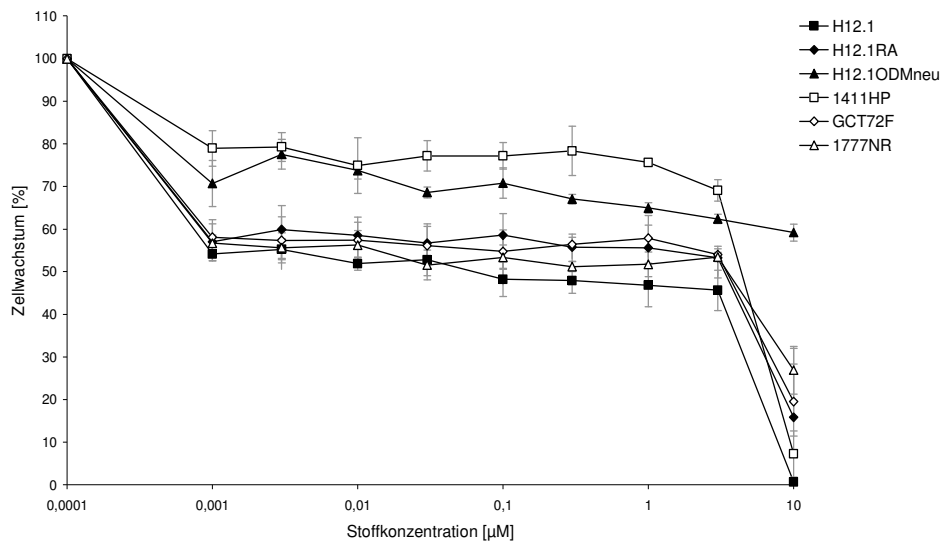


Abbildung 6: Dosis-Wirkungsbeziehung von RAD001 im SRB-Zytotoxizitäts-Assay nach 96 h Behandlung (n=3, MW \pm STABW)

Die Ergebnisse der Behandlung mit AEW541 sind in Abbildung 7 dargestellt. Dabei zeigten sich anhand der IC50-Werte keine massiven Unterschiede in der Sensitivität der Zelllinien gegenüber diesem IGF-1R-Inhibitor. Als besonders sensitiv erwiesen sich die Zelllinien H12.1RA und 1777NR, während bei der 1411HP die geringste Wachstumsinhibition zu beobachten war. Die übrigen Zelllinien H12.1, H12.1ODMneu und GCT72F zeigten einen ähnlichen Verlauf mit mittlerer Sensitivität.

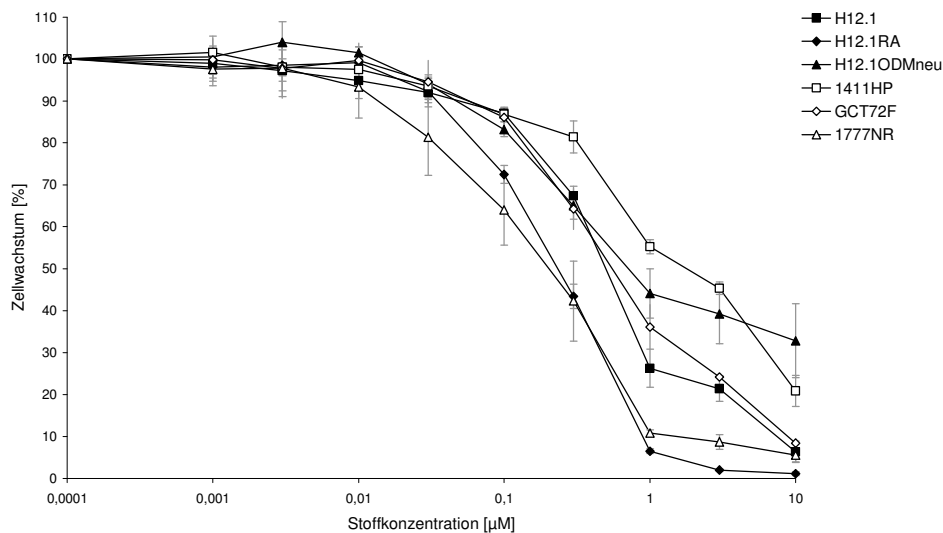


Abbildung 7: Dosis-Wirkungsbeziehung von AEW541 im SRB-Zytotoxizitäts-Assay nach 96 h Behandlung (n=3, MW \pm STABW)

Bei der Behandlung mit AEE788 erwies sich die Linie H12.1RA als besonders sensitiv im Vergleich zu den übrigen Zelllinien. Auffällig war weiterhin die relative Resistenz der weiteren untersuchten Zelllinien, welche erst ab einer Konzentration über 1 μM einen deutlichen Abfall des Zellwachstums zeigten. So konnte bei der H12.1ODMneu im Rahmen der verwendeten Substanzkonzentrationen lediglich eine maximale Wachstumsinhibition auf 55 % erreicht werden (Abbildung 8).

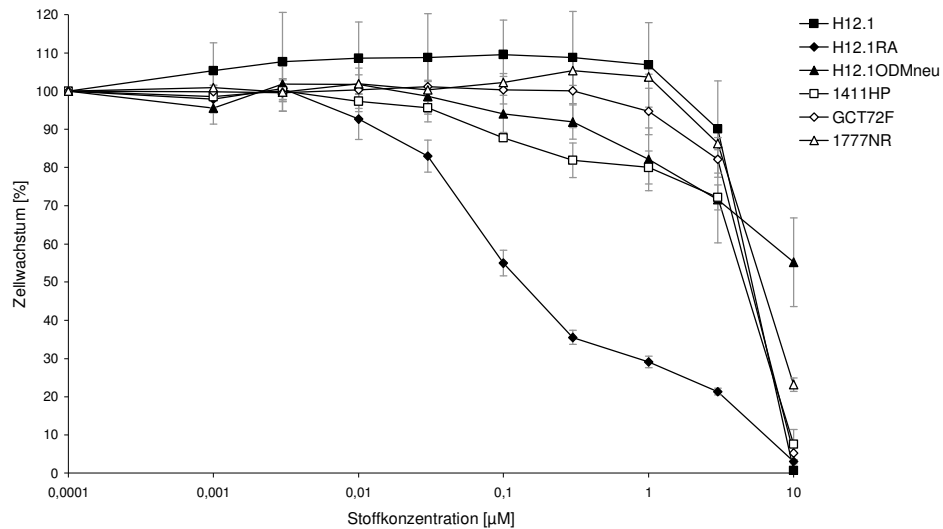


Abbildung 8: Dosis-Wirkungsbeziehung von AEE788 im SRB-Zytotoxizitäts-Assay nach 96 h Behandlung ($n=3$, $\text{MW} \pm \text{STABW}$)

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die wichtigsten IC-Werte der verwendeten Substanzen bei 96 h Behandlung der verschiedenen Zelllinien.

Tabelle 4: IC-Werte der im Rahmen der Arbeit verwendeten Substanzen. In einigen Fällen konnte der IC50 oder IC90 mit den eingesetzten Konzentrationen nicht erreicht werden. (n=3, MW \pm STABW)

	CDDP		
	IC30	IC50	IC90
H12.1	0,19 (\pm 0,01) μ M	0,5 (\pm 0,11) μ M	2,74 (\pm 0,30) μ M
H12.1RA	4,19 (\pm 0,76) μ M	8,68 (\pm 1,76) μ M	25,83 (\pm 1,59) μ M
H12.1ODMneu	6,20 (\pm 1,47) μ M	10,45 (\pm 3,28) μ M	24,27 (\pm 2,81) μ M
1411HP	3,10 (\pm 0,56) μ M	4,70 (\pm 0,44) μ M	24,27 (\pm 2,83) μ M
GCT72F	0,31 (\pm 0,04) μ M	0,58 (\pm 0,04) μ M	4,05 (\pm 1,13) μ M
1777NR	0,65 (\pm 0,32) μ M	1,64 (\pm 0,74) μ M	9,15 (\pm 1,30) μ M
	RAD001		
	IC30	IC50	IC90
H12.1	0,0007 (\pm 0,0001) μ M	0,17 (\pm 0,23) μ M	7,79 (\pm 0,24) μ M
H12.1RA	0,0007 (\pm 0,0001) μ M	3,43 (\pm 0,42) μ M	-
H12.1ODMneu	0,02 (\pm 0,01) μ M	-	-
1411HP	2,54 (\pm 0,60) μ M	4,37 (\pm 0,29) μ M	-
GCT72F	0,0007 (\pm 0,0001) μ M	3,34 (\pm 0,74) μ M	-
1777NR	0,0007 (\pm 0,0001) μ M	3,54 (\pm 0,27) μ M	-
	AEW541		
	IC30	IC50	IC90
H12.1	0,26 (\pm 0,03) μ M	0,50 (\pm 0,05) μ M	7,57 (\pm 1,62) μ M
H12.1RA	0,11 (\pm 0,01) μ M	0,24 (\pm 0,02) μ M	0,89 (\pm 0,02) μ M
H12.1ODMneu	0,23 (\pm 0,04) μ M	0,83 (\pm 0,33) μ M	-
1411HP	0,51 (\pm 0,05) μ M	1,80 (\pm 0,19) μ M	-
GCT72F	0,27 (\pm 0,21) μ M	0,85 (\pm 0,82) μ M	7,34 (\pm 2,63) μ M
1777NR	0,07 (\pm 0,05) μ M	0,21 (\pm 0,10) μ M	1,89 (\pm 1,28) μ M
	AEE788		
	IC30	IC50	IC90
H12.1	3,91 (\pm 0,51) μ M	5,11 (\pm 0,49) μ M	8,80 (\pm 0,20) μ M
H12.1RA	0,05 (\pm 0,01) μ M	0,13 (\pm 0,02) μ M	6,33 (\pm 0,17) μ M
H12.1ODMneu	3,78 (\pm 3,01) μ M	-	-
1411HP	3,06 (\pm 0,27) μ M	4,54 (\pm 0,24) μ M	-
GCT72F	3,62 (\pm 0,17) μ M	4,96 (\pm 0,18) μ M	9,29 (\pm 0,30) μ M
1777NR	4,09 (\pm 0,12) μ M	5,99 (\pm 0,18) μ M	-

4.2 Veränderungen in der Wirksamkeit durch Kombination der Substanzen

4.2.1 Einfluss der Kinaseinhibitoren auf die Cisplatin sensitivität

In weiteren SRB-Assays wurden die Zellen mit einer Kombination aus Cisplatin und jeweils einem Kinaseinhibitor behandelt, um mögliche Effekte dieser Substanzen auf die durch Cisplatin hervorgerufene Wachstumsinhibition zu überprüfen. Je Ansatz wurden dafür jeweils eine Platte mit der Kombination beider Medikamente und eine Kontrollplatte mit Cisplatin bestückt. Die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren entsprechen den IC₃₀-Werten aus Tabelle 4, während Cisplatin in einer Verdünnungsreihe mit ansteigender Konzentration aufgetragen wurde. Die Auswertung erfolgte durch die gemeinsame Darstellung der Dosis-Wirkungskurve der Cisplatinbehandlung sowie einer berechneten Kurve, welche den Effekt der Kombinationsbehandlung abzüglich der nur durch den Inhibitor erzeugten Wachstumsinhibition zeigt. Bei der Betrachtung dieser Diagramme ist daher eine Linksverschiebung des Graphen für die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Cisplatinbehandlung als synergistischer, eine Rechtsverschiebung als antagonistischer und ein etwa gleichförmiger Kurvenverlauf als additiver Effekt des Inhibitors auf die Cisplatinwirkung zu bewerten. Ein Beispiel für eine solche Darstellung ist in Abbildung 9 anhand der Behandlung der Zelllinie 1411HP mit Cisplatin und RAD001 gegeben.

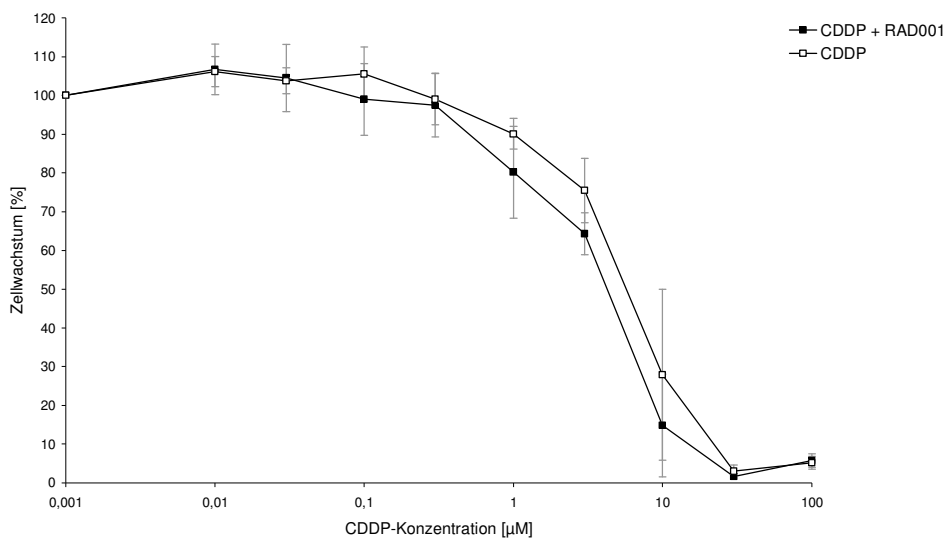


Abbildung 9: Dosis-Wirkungsbeziehung von CDDP im Vergleich zur Kombination aus CDDP und RAD001 im SRB-Zytotoxizitäts-Assay nach 96 h Behandlung der Zelllinie 1411HP (n=3, MW ± STABW)

Es wurden für jede Zelllinie Kombinationsversuche mit Cisplatin und den drei untersuchten Inhibitoren (RAD001, AEW541 und AEE788) durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die zuvor bestimmten IC₃₀-Werte der Kinaseinhibitoren konnten dabei über die stets mitgeführte Kontrolle ohne Cisplatin bestätigt werden. Als Parameter zum Vergleich

der erzielten Wachstumsinhibition dienten wiederum die durchschnittlichen IC50-Werte aus drei unabhängigen Versuchen, welche aus den in Abbildung 9 beispielhaft dargestellten Diagrammen berechnet wurden. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels Student's t-Test. Die Probenwerte wurden ab einem p-Wert < 0,05 als signifikant betrachtet. Da lediglich zwei Versuchsreihen signifikante Unterschiede zwischen Kombinations- und Cisplatinbehandlung zeigten, sind die übrigen Effekte als additiv zu betrachten und es können lediglich Tendenzen zur Verstärkung oder Abschwächung der Wirkung von Cisplatin aus den Versuchen abgeleitet werden.

Tabelle 5: Ergebnisse der Kombinationsversuche mit Cisplatin. Angegeben sind jeweils die IC50-Werte der CDDP- und der Kombinationsbehandlung sowie der Quotient aus beiden Werten. Ein Quotient < 1 entspricht einer antagonistischen, ein Quotient > 1 einer synergistischen Tendenz. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied. (n=3, MW ± STABW)

	CDDP	CDDP + RAD001	Quotient
H12.1	0,56 (±0,09) µM	0,83 (±0,21) µM	0,67
H12.1RA	12,82 (±1,63) µM	12,05 (±1,17) µM	1,06
H12.1ODMneu	13,97 (±1,72) µM	13,71 (±1,88) µM	1,02
1411HP	6,37 (±2,23) µM	4,33 (±0,73) µM	1,47
GCT72F	0,79 (±0,13) µM	0,57 (±0,15) µM	1,39
1777NR	1,54 (±1,03) µM	2,41 (±1,40) µM	0,64
	CDDP	CDDP + AEW541	Quotient
H12.1	0,58 (±0,07) µM	0,48 (±0,06) µM	1,21
H12.1RA	7,26 (±1,13) µM	7,99 (±1,11) µM	0,91
H12.1ODMneu	12,67 (±1,24) µM	16,88 (±0,31) µM	0,75 (*)
1411HP	2,54 (±1,26) µM	3,68 (±0,90) µM	0,69
GCT72F	0,69 (±0,27) µM	0,36 (±0,06) µM	1,92
1777NR	1,84 (±0,60) µM	1,43 (±0,27) µM	1,29
	CDDP	CDDP + AEE788	Quotient
H12.1	0,56 (±0,09) µM	0,65 (±0,09) µM	0,86
H12.1RA	12,31 (±2,24) µM	15,26 (±1,13) µM	0,81
H12.1ODMneu	13,71 (±1,41) µM	26,71 (±5,78) µM	0,51 (*)
1411HP	4,81 (±2,49) µM	5,03 (±2,04) µM	0,96
GCT72F	0,69 (±0,15) µM	0,56 (±0,25) µM	1,23
1777NR	1,22 (±0,97) µM	2,30 (±1,45) µM	0,53

4.2.2 Effekte einer Kombination der Kinaseinhibitoren

Ein weiteres Ziel war es, mögliche Effekte des mTOR-Inhibitors RAD001 auf die Sensitivität der Zelllinien gegenüber den Tyrosinkinaseinhibitoren AEW541 und AEE788 zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden erneut SRB-Assays durchgeführt, diesmal beschränkt auf die RAD001- und cisplatin-sensitive Zelllinie H12.1 sowie die gegenüber Cisplatin resistente und gegenüber RAD001 im Vergleich zur H12.1 weniger sensitive Linie 1411HP. Dabei wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von AEW541 oder AEE788 mit einer dem IC₃₀ entsprechenden Konzentration von RAD001 kombiniert und die Wirkung anhand des IC₅₀ der Einzelbehandlung sowie der berechneten Kurve für die Kombinationsbehandlung abzüglich des alleinigen Effektes von RAD001 verglichen.

Wie Abbildung 10 exemplarisch am Beispiel der Zelllinie H12.1 verdeutlicht, erwies sich der IC₅₀-Wert als Vergleichsparameter bei den Versuchen mit AEE788 als ungeeignet, da der Verlauf der Kurven sowohl bei der H12.1 als auch der 1411HP in diesem Bereich nur geringe, bei niedrigeren Substanzkonzentrationen jedoch vergleichsweise große Unterschiede zeigt. Daher wurden neben den IC₅₀-Werten zusätzlich die IC₂₀-Werte verglichen, wobei sich jeweils deutlichere synergistische Tendenzen zeigten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

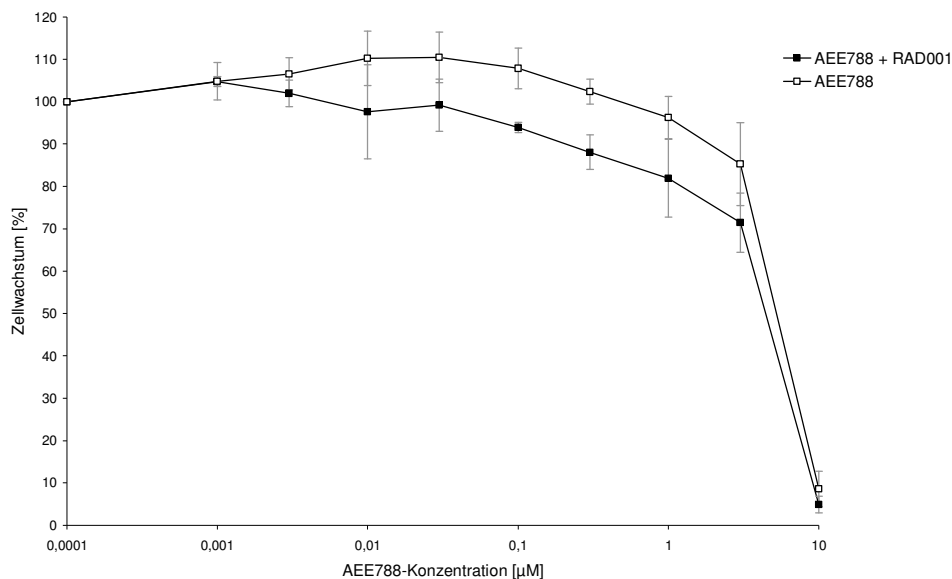


Abbildung 10: Dosis-Wirkungsbeziehung von AEE788 im Vergleich zur Kombination aus AEE788 und RAD001 im SRB-Zytotoxizitäts-Assay nach 96 h Behandlung der Zelllinie H12.1 (n=3, MW ± STABW)

Tabelle 6: Ergebnisse der Kombinationsversuche mit RAD001. Angegeben sind die IC20- und IC50-Werte der AEW541- bzw. AEE788- und der Kombinationsbehandlung sowie der Quotient aus beiden Werten. Ein Quotient < 1 entspricht einer antagonistischen, ein Quotient > 1 einer synergistischen Tendenz; signifikante Unterschiede konnten nicht erreicht werden. (n=3, MW \pm STABW)

		AEW541	AEW541 + RAD001	Quotient
H12.1	IC50	0,53 (\pm 0,08) μ M	0,48 (\pm 0,08) μ M	1,11
1411HP	IC50	1,57 (\pm 1,06) μ M	1,18 (\pm 0,36) μ M	1,33
		AEE788	AEE788 + RAD001	Quotient
H12.1	IC20	3,04 (\pm 0,83) μ M	1,46 (\pm 0,89) μ M	2,08
	IC50	5,21 (\pm 0,55) μ M	4,41 (\pm 0,41) μ M	1,18
1411HP	IC20	0,96 (\pm 1,07) μ M	0,47 (\pm 0,55) μ M	2,03
	IC50	4,60 (\pm 0,54) μ M	4,22 (\pm 0,62) μ M	1,09

4.3 Proteinexpressionsanalyse im Western Blot

Die Wirkweise der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *targeted drugs* beruht auf der Inhibition der Phosphorylierung spezifischer Proteine. Mit dem Ziel, die Expressionsmuster dieser relevanten Zielproteine in den unterschiedlichen Zelllinien zu bestimmen und untereinander vergleichen zu können, wurden Western Blots durchgeführt. Durch die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der Proteine sowohl in unbehandeltem Zustand als auch nach Inkubation mit den entsprechenden Medikamenten konnten darüber hinaus Aussagen zur Aktivierung der Proteine sowie deren Hemmung durch die eingesetzten Substanzen gewonnen werden.

Über den Nachweis eines ubiquitär und gleichmäßig exprimierten Proteins, wie beispielsweise Aktin oder Tubulin, wurde stets eine Ladekontrolle durchgeführt und somit die für den Vergleich der Expression anhand der Bandenintensität notwendige Auftragung einheitlicher Proteinmengen gewährleistet.

4.3.1 Analyse der Rezeptorexpression und Rezeptorphosphorylierung in humanen TKZT-Zelllinien

Um einen Vergleich zwischen den verwendeten Zelllinien zu ermöglichen, wurde zunächst die Expression der durch AEE788 inhibierten Rezeptoren EGFR, HER2/neu und VEGFR, des durch AEW541 gehemmten Rezeptors IGF-1R sowie des Zielproteins von RAD001, mTOR, analysiert. Es wurde jeweils sowohl die Expression der Proteine als auch deren Aktivierung durch Nachweis der phosphorylierten Form untersucht. Vor der Expressionsanalyse wurden die Tumorzellen passagiert und in Nährmedium suspendiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Nährmediums und nach weiteren 24 h wurde das Gesamtprotein aus der Zellkultur isoliert.

Dabei exprimierten alle Zelllinien den Rezeptor EGFR, Banden mit höherer Intensität – als Hinweis auf eine verstärkte Expression – wurden bei den Zelllinien H12.1RA und 1777NR detektiert. Bei diesen zeigte sich außerdem eine deutliche Phosphorylierung des Rezeptors. HER2/neu konnte ebenfalls bei allen untersuchten Tumorzelllinien nachgewiesen werden, wobei die Linien H12.1, H12.1RA und H12.1ODMneu eine verstärkte Expression zeigten. Die phosphorylierte Form des Proteins fand sich bei den Zelllinien H12.1RA, H12.1ODMneu und 1777NR. Bei der Untersuchung des ebenfalls durch AEE788 inhibierten VEGFR fällt besonders die starke Expression durch die Zellen der Linie H12.1ODMneu auf, daneben fand sich der Rezeptor lediglich bei der 1777NR. Für diese beiden Zelllinien konnte darüber hinaus das Vorhandensein der aktivierten Form gezeigt werden (Abbildung 11).

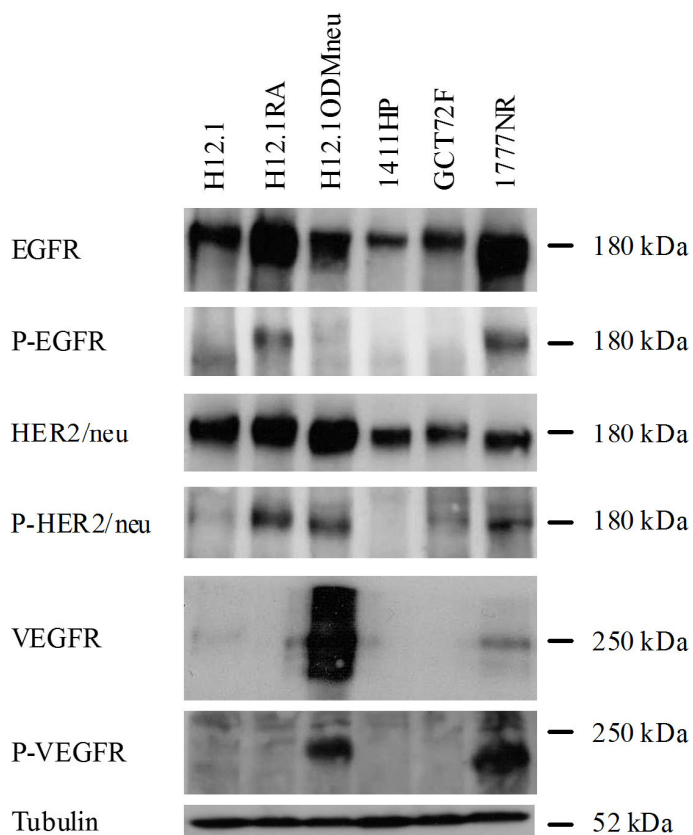


Abbildung 11: Expression und Phosphorylierungsstatus der Rezeptoren EGFR, HER2/neu und VEGFR

Der IGF-1-Rezeptor ließ sich in allen untersuchten Zelllinien nachweisen, wobei die stärkste Expression in den Linien H12.1, H12.1RA und H12.1ODMneu detektiert wurde. Auffallend war die Entstehung multipler Banden, was die Beurteilung der Ergebnisse erschwerte. Im phosphorylierten Zustand ließ sich der Rezeptor in der Western Blot Methode nicht ausreichend darstellen (Abbildung 12).

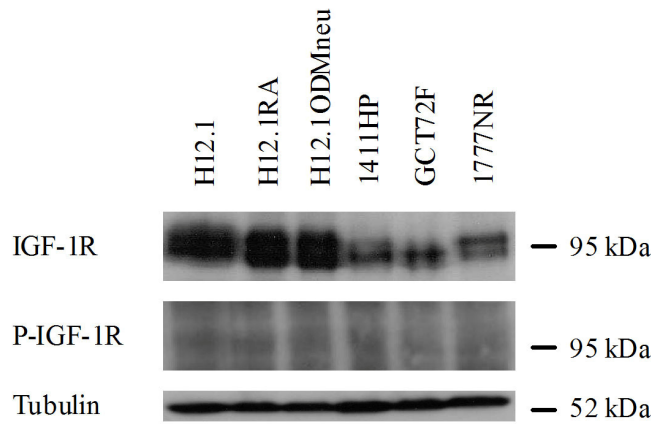


Abbildung 12: Expression und Phosphorylierungsstatus des Rezeptors IGF-1R

Die Western Blot-Analysen des Proteins mTOR zeigten eine gleichmäßige Expression in allen Zelllinien. Da mTOR an mehreren Stellen, unter anderem S2448 und S2481, phosphoryliert werden kann, wurden zwei verschiedene Antikörper gegen jeweils eine dieser Phosphorylierungsstellen eingesetzt. Beide aktivierten Zustände von mTOR konnten in allen Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 13).

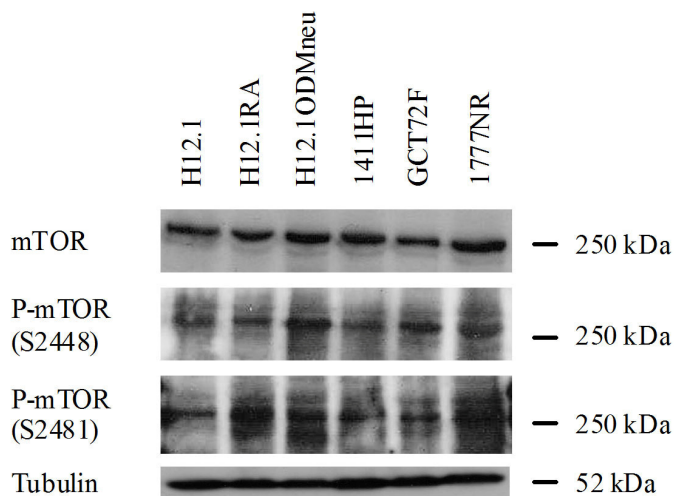


Abbildung 13: Expression und Phosphorylierungsstatus von mTOR

4.3.2 Analyse der Auswirkungen einer Behandlung mit Kinaseinhibitoren auf die Rezeptorphosphorylierung

In weiteren Untersuchungen wurde die Veränderung der Rezeptorphosphorylierung durch die Behandlung der Zelllinien mit den jeweiligen Kinaseinhibitoren analysiert. Zu diesem Zweck erfolgte die Behandlung der Tumorzelllinien mit den verschiedenen Inhibitoren (IC30) über 72 h. Die Tumorzellen wurden zunächst passagiert, in Nährmedium suspendiert und für 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Kinaseinhibitoren in einer der

IC30 entsprechenden Konzentration für weitere 24, 48 und 72 Stunden, ebenso wurde jeweils eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Anschließend erfolgte die Isolation des Gesamtproteins aus der Zellkultur. Die Expressionsanalysen wurden jeweils nur mit den Zelllinien durchgeführt, die in den vorangegangenen Analysen eine deutliche Expression der entsprechenden Zielproteine gezeigt hatten.

In den Zelllinien H12.1RA, H12.1ODMneu und 1777NR wurde die Expression der Rezeptoren EGFR und HER2/neu zu keiner Zeit durch die Behandlung mit AEE788 beeinflusst. Es zeigte sich jeweils eine gleichbleibende, mit der unbehandelten Kontrolle identisch starke Expression über die gesamte Zeit der Exposition. Ebenso führte die Behandlung mit AEE788 zu keiner Veränderung der Expression von VEGFR in den Zelllinien H12.1ODMneu und 1777NR. Eine Verringerung der Rezeptorphosphorylierung von HER2/neu durch die Behandlung mit AEE788 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zeigte sich in den Zelllinien H12.1RA und H12.1ODMneu, eine Veränderung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ließ sich jedoch nicht nachweisen. Ebenso erfolgte eine Hemmung der Rezeptorphosphorylierung von EGFR durch Exposition gegenüber AEE788 in der 1777NR, auch hier zeigte sich allerdings keine zeitabhängige Veränderung. Im Unterschied zu anderen Versuchsreihen konnte in den Zelllinien H12.1RA und H12.1ODMneu EGFR im aktivierten Zustand und in der 1777NR der phosphorylierte HER2/neu-Rezeptor nicht nachgewiesen werden. Auf die Phosphorylierung von VEGFR hatte die Behandlung mit AEE788 in keiner der Zelllinien einen Einfluss (Abbildung 14).

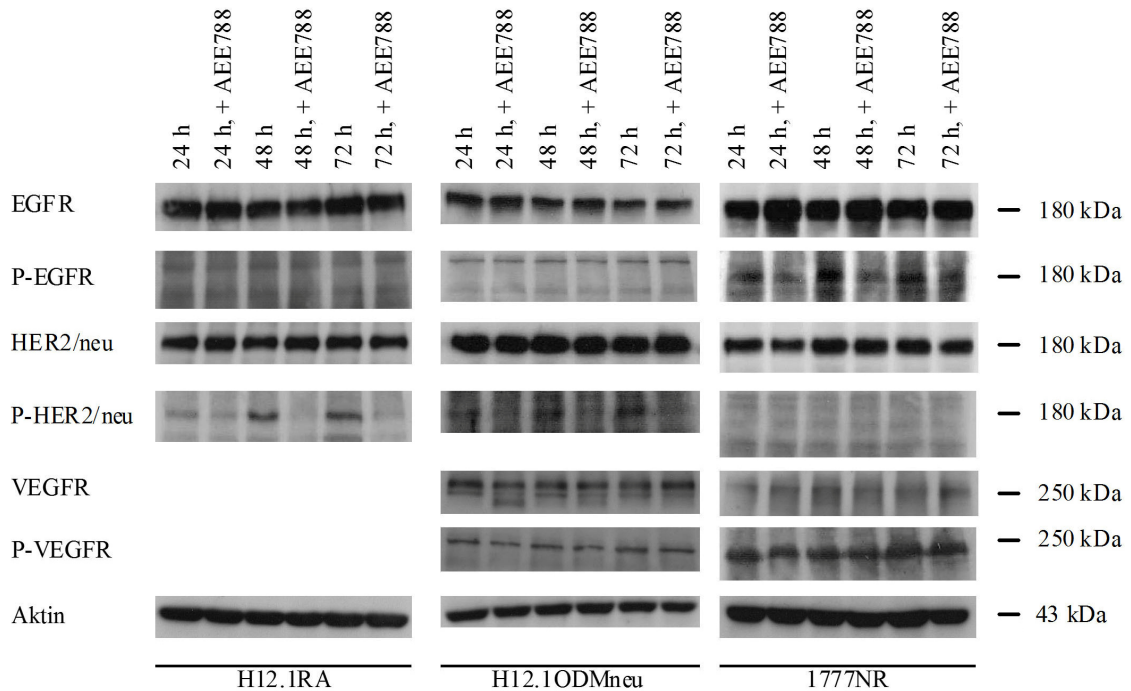


Abbildung 14: Expression und Phosphorylierungsstatus von EGFR, HER2/neu und VEGFR in den Zelllinien H12.1RA, H12.1ODMneu und 1777NR nach einer Behandlung mit AEE788 über 24, 48 und 72 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen

Die Expression von mTOR blieb in allen Zelllinien von der Exposition gegenüber RAD001 unbeeinflusst. Eine der IC₃₀ entsprechende Konzentration von RAD001 konnte auch die Phosphorylierung der Kinase nicht inhibieren. Vermutlich methodisch bedingt konnte der phosphorylierte Zustand von mTOR im Rahmen dieser Versuche teilweise kaum detektiert werden (Abbildung 15). Durch eine Behandlung mit RAD001 in einer einheitlichen Dosis von 30 nM konnte in allen Zelllinien eine Inhibition der Phosphorylierung an beiden Phosphorylierungsstellen (Ser2481 und Ser2448) dargestellt werden. Bemerkenswert ist darüber hinaus die verminderte Aktivierung von mTOR in einigen Zelllinien nach einer Behandlung mit AEE788. Aufgrund des wiederholt schlechten Wachstums der GCT72F in der Zellkultur konnten nicht alle Expressionsanalysen für diese Zelllinie durchgeführt werden (Abbildung 16).

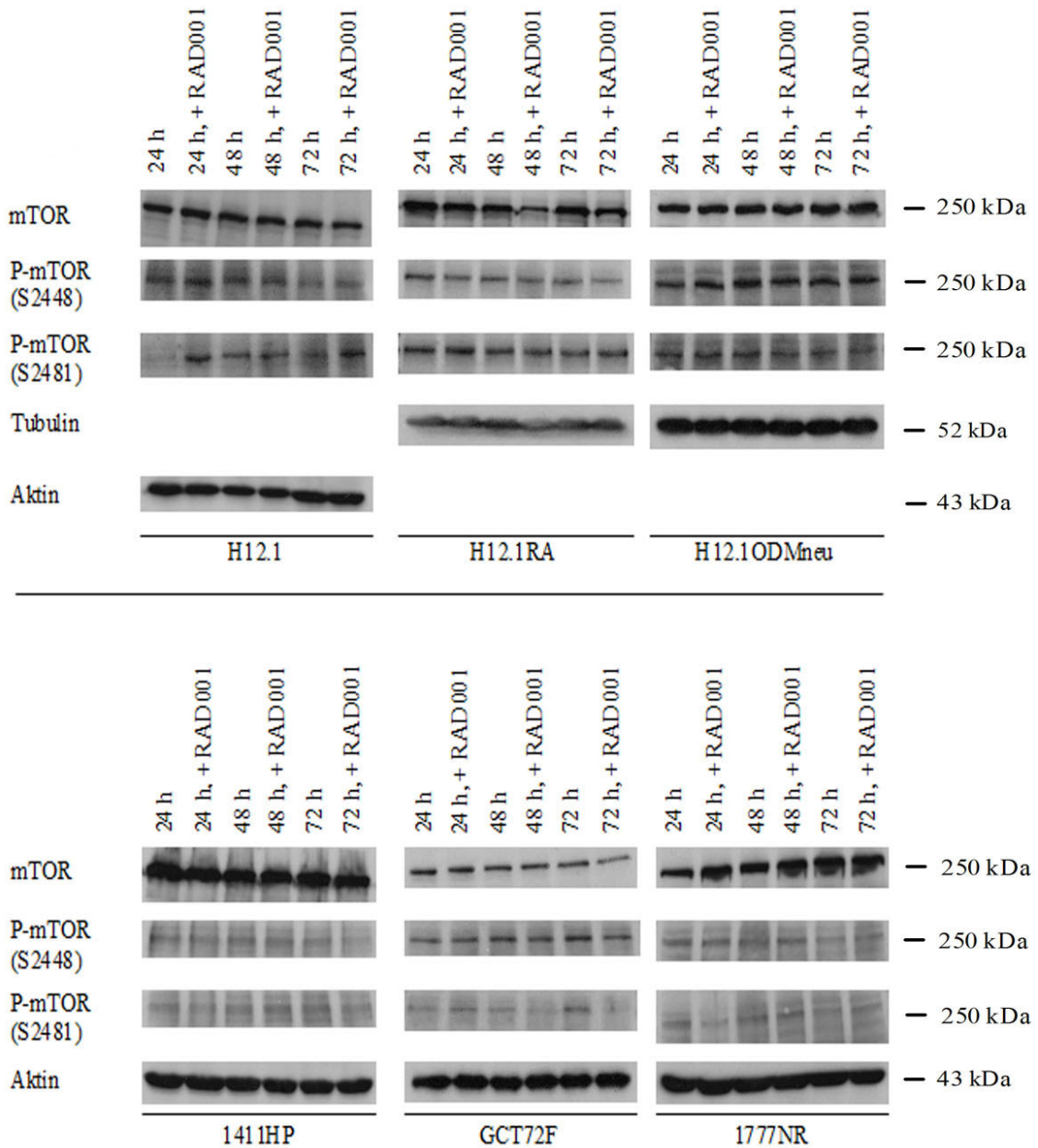


Abbildung 15: Expression und Phosphorylierungsstatus von mTOR nach einer Behandlung mit RAD001 (IC30) über 24, 48 und 72 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen

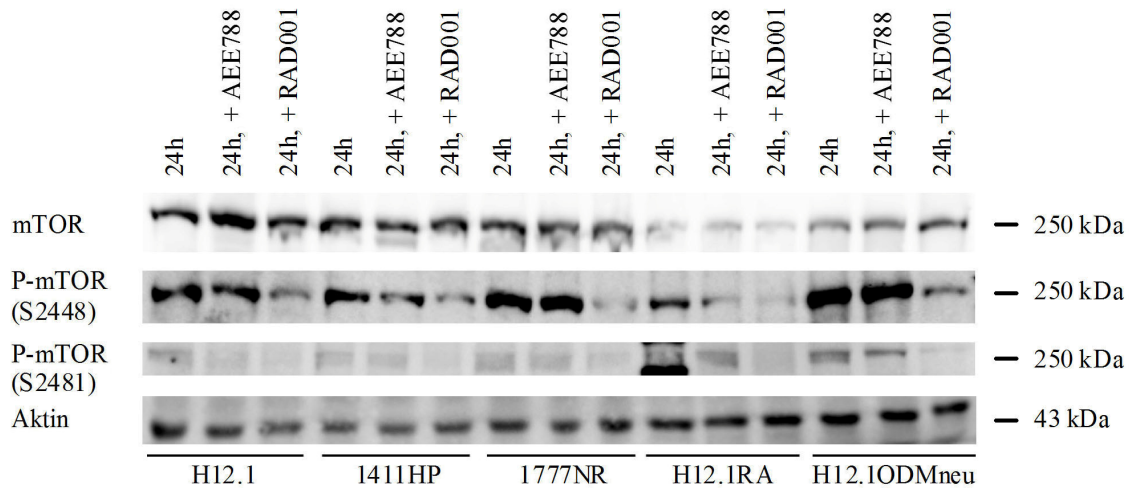


Abbildung 16: Expression und Phosphorylierungsstatus von mTOR nach einer Behandlung mit AEE788 (IC30) und RAD001 (30 nM) über 24 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die zusätzliche Bande bei P-mTOR S2481 (H12.1RA, 24 h) ist durch den mitgeführten Marker bedingt.

5 DISKUSSION

Testikuläre Keimzelltumoren zeichnen sich vor allem durch ihre außergewöhnliche Sensitivität gegenüber konventionellen Chemotherapeutika und einer damit verbundenen hohen Überlebensrate der Patienten aus. In bis zu einem Drittel der Betroffenen kann durch die Standardtherapie jedoch keine Heilung erzielt werden; bei einigen dieser Patienten entwickelt sich eine Cisplatinresistenz, welche die weiteren Therapiemöglichkeiten deutlich einschränkt (Einhorn, 1990; Kollmannsberger *et al.*, 2008). Während die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen noch nicht vollständig verstanden sind, liegt ein Schwerpunkt der Forschung auf der Entwicklung neuer Therapieansätze mit dem Ziel, die Cisplatinsensitivität zu erhöhen bzw. die Resistenz komplett zu überwinden.

Bei der Entwicklung neuer Medikamente im Bereich der Onkologie liegt seit einigen Jahren ein besonderes Augenmerk auf den sogenannten *targeted drugs*. Unter diesem Begriff werden sowohl monoklonale Antikörper als auch sogenannte „*small molecules*“ zusammengefasst, welche durch die Beeinflussung extra- und intrazellulärer Signalwege direkt in die Regulationsmechanismen der Zelle eingreifen und sich daher sowohl in ihrem Wirkmechanismus als auch in ihrem Nebenwirkungsprofil entscheidend von den konventionellen Zytostatika unterscheiden. Aus diesem Grund gelten diese zielgerichteten Substanzen als vielversprechender Kombinationspartner für die klassischen Chemotherapeutika. Während monoklonale Antikörper vor allem durch die extrazelluläre Bindung an Signalstoffe sowie deren Rezeptoren Wachstumssignale hemmen, können die *small molecules* auch intrazelluläre Signalwege direkt beeinflussen. In der Zelle dient die Aktivierung von Tyrosinkinase über nachgeschaltete Signalkaskaden der Regulierung zahlreicher zellulärer Funktionen, der Zelldifferenzierung und –proliferation, der Angiogenese und der Apoptose. Durch spezifische Kinaseinhibitoren, welche die Phosphorylierung von Kinasen inhibieren und infolgedessen die weitere Signaltransduktion unterbinden, kann somit das Zellwachstum gehemmt werden. Aus Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten ist bekannt, dass einige Tumorzellen Rezeptoren und Tyrosinkinase wie beispielsweise EGFR, HER2/neu und IGF-1R überexprimieren und daher deren spezifische Inhibition einen erfolgversprechenden Therapieansatz bietet. So konnte in zahlreichen Tumorzelllinien eine Wachstumsinhibition durch den Einsatz von Kinaseinhibitoren nachgewiesen werden (Grünwald und Hidalgo, 2003; Harari, 2004). Für die Kombination aus konventionellen Chemotherapeutika und den *targeted drugs* zeigte sich sowohl in präklinischen als auch in einer zunehmenden Zahl klinischer Studien, dass eine Verstärkung der Zytostatikawirkung mit additiven und synergistischen Effekten möglich ist (Mahipal *et al.*, 2014; Funakoshi *et al.*, 2014).

Ziel dieser Dissertation war es daher zunächst, die zytotoxische Aktivität der Kinaseinhibitoren RAD001, AEW541 und AEE788 in den unterschiedlichen Keimzelltumorklinen zu charakterisieren und anschließend die Effekte einer

Kombinationsbehandlung der genannten Substanzen mit Cisplatin sowie einer Kombination der Kinaseinhibitoren miteinander zu untersuchen. Zur Erklärung möglicher zytotoxischer Effekte und Interaktionen erfolgte anschließend eine Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression von mTOR, IGF-1R, EGFR, HER2/neu und VEGFR sowie des Phosphorylierungsstatus dieser Proteine und die Untersuchung des Einflusses der Kinaseinhibitoren auf die Expression und den Phosphorylierungsstatus der jeweiligen Zielproteine.

5.1 Charakterisierung der TKZT-Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin und den *targeted drugs* RAD001, AEW541 und AEE788

5.1.1 Cisplatin

Aus zahlreichen präklinischen und klinischen Untersuchungen ist sowohl die Cisplatinsensitivität von Keimzelltumoren als auch die Problematik der Resistenzentwicklung gegenüber dieser Substanz bekannt.

Zur Charakterisierung der verwendeten, nichtseminomatösen TKZT-Zelllinien hinsichtlich ihrer Zelllinien-spezifischen Sensitivität gegenüber Cisplatin wurden SRB-Assays durchgeführt. Anschließend konnte für jede Zelllinie ein IC₅₀-Wert ermittelt und auf Grundlage dessen die Einordnung in eine cisplatinresistente und eine cisplatinsensitive Gruppe erfolgen. Für die Zelllinien H12.1RA, H12.1ODMneu, 1411HP und 1777NR konnte eine relative Resistenz im Vergleich zur sensitiven Zelllinie H12.1 gezeigt werden; auch die Zelllinie GCT72F erwies sich als cisplatinsensitiv (Abbildung 5, Tabelle 4). Die ermittelten IC-Werte für die Zelllinien H12.1, H12.1ODMneu, 1411HP und 1777NR sind dabei mit zuvor veröffentlichten Daten vergleichbar (Mueller *et al.*, 2006).

Im Hinblick auf die unterschiedlichen histologischen Subtypen der nichtseminomatösen Keimzelltumoren im Allgemeinen und der untersuchten Zelllinien lässt sich eine Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad und der Cisplatinsensitivität vermuten. So ist aus einigen klinischen Studien bekannt, dass Dottersacktumore häufiger eine Chemotherapieresistenz zeigen oder im Laufe der Behandlung entwickeln (Logothetis *et al.*, 1984; Saxman *et al.*, 1991). Darüber hinaus zeigen auch reife Teratome eine Resistenz gegenüber klassischen Zytostatika, es handelt sich dabei allerdings um Tumoren mit einem benignen Charakter und einer vollständigen somatischen Differenzierung. Die Chemotherapieresistenz entspricht daher dem Verhalten von gesundem, differenziertem Gewebe. Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Zelllinien H12.1, 1411HP und 1777NR zeigen sowohl im Ursprungsgewebe als auch im Nacktmaus-Xenograft eine gemischte Histologie bestehend aus sowohl undifferenzierten (EC-Zellen) als auch somatisch (TE) oder extra-embryonal (YST, CC) differenzierten Komponenten, sodass die Histologie allein keine Rückschlüsse auf die Cisplatinsensitivität zulässt.

In den Untersuchungen an den genannten Zelllinien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von Oct-3/4 mit der Cisplatinempfindlichkeit korreliert (Mueller *et al.*, 2006). Oct-3/4 ist ein embryonaler Transkriptionsfaktor, welcher ausschließlich von Keimzelltumoren exprimiert wird und dessen Expression sich dabei auf die undifferenzierten EC-Zellen beschränkt; extraembryonal differenzierte Dottersack- und Chorionkarzinomzellen und somatisch differenzierte Teratomzellen zeigen hingegen keine Expression (Looijenga *et al.*, 2003). Während die cisplatinempfindliche Zelllinie H12.1 Oct-3/4 stark exprimiert, lässt sich eine Expression in den cisplatinresistenten Zelllinien 1411HP und 1777NR nicht beobachten. Obwohl sich in der histologischen Analyse der Ursprungsgewebe und von Xenograften der Zelllinien H12.1, 1411HP und 1777NR EC-Komponenten nachweisen lassen, konnte nur in den H12.1-Tumoren eine starke Oct-3/4-Expression gezeigt werden. Dies lässt auf die Existenz einer Oct-3/4 negativen, cisplatinresistenten Population von EC-Zellen schließen. Auch in der ebenfalls resistenten Zelllinie H12.1ODMneu, welche durch Behandlung mit einem Differenzierungsinduzierendem Medium (Kulturmedium mit FKS, Dexamethason, β -Glycerolphosphat und Ascorbinsäure) aus der H12.1 abgeleitet und isoliert werden konnte, ist diese Zellpopulation nachweisbar (Mueller *et al.*, 2006).

Die Zelllinie H12.1RA konnte durch Behandlung mit ATRA (all-trans-Retinolensäure) aus der Linie H12.1 abgeleitet werden. Die Behandlung von EC-Zelllinien mit ATRA führt zu einer somatischen, neuronalen Differenzierung der Zellen unter Verlust der charakteristischen Zelloberflächenmarker SSEA-3 und SSEA-4 (*stage-specific embryonic antigen-3* und *4*) (Andrews, 1984; Andrews, 2002). Auch hier führt die Differenzierung der EC-Zellen zur Entwicklung einer Cisplatinresistenz. Die cisplatinempfindliche Zelllinie GCT72F wurde aus einem Teratokarzinom gewonnen, welche definitionsgemäß aus EC- und Teratomkomponenten bestehen. Dies konnte durch den Nachweis von SSEA-3 und SSEA-4 bestätigt werden. Die Oct-3/4-Expression wurde in dieser Zelllinie bislang nicht untersucht (Pera *et al.*, 1987; Andrews, 2002).

Insgesamt bestätigen die durch die Zytotoxizitätsassays mit Cisplatin erhobenen Daten die Hypothese, dass in TKZT-Zelllinien neben den cisplatinresistenten, somatisch oder extraembryonal differenzierten Komponenten zwei EC-Zellpopulationen – eine Oct-3/4-positive, cisplatinempfindliche Population und Oct-3/4-negative, cisplatinresistente Population – unterschieden werden können.

5.1.2 RAD001

RAD001 ist ein oral verfügbarer Proteinkinaseinhibitor, welcher zu einer Hemmung der Serin/Threoninkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) führt. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg dient vor allem der Regulation des Zellzyklus und somit der Zellproliferation. Veränderungen in diesem *pathway* konnten in zahlreichen Tumoren nachgewiesen werden,

sodass die Inhibition von mTOR einen vielversprechenden Angriffspunkt für zielgerichtete Therapiekonzepte darstellt. Neben Sirolimus, welches als Immunsuppressivum zur Prophylaxe der Organabstoßung nach Transplantationen zugelassen ist, sind derzeit mit Temsirolimus und Everolimus (RAD001) zwei mTOR-Inhibitoren für die Therapie verschiedener Tumorentitäten, beispielsweise des metastasierten Nierenzellkarzinoms sowie fortgeschrittener oder metastasierter neuroendokriner Pankreastumoren, zugelassen (Battelli und Cho, 2011; Yao *et al.*, 2013).

In den zur Bestimmung der spezifischen Sensitivität der untersuchten TKZT-Zelllinien gegenüber RAD001 durchgeführten SRB-Assays führte die Hemmung von mTOR zu einer Wachstumsinhibition in allen getesteten Tumorzelllinien mit einer geringfügig verminderten Sensitivität der Zelllinien 1411HP und H12.1ODMneu. Es zeigte sich für alle Zelllinien ein Wachstumsplateau ab einer Stoffkonzentration von 0,001 μM . Dieser Kurvenverlauf ist auch für zahlreiche Zelllinien anderer Tumorentitäten beschrieben (O'Reilly und McSheehy, 2010).

Im Vergleich zu *in vitro*-Versuchen mit Zelllinien anderer Tumorentitäten zeigte sich eine relative Resistenz der untersuchten Keimzelltumorzelllinien gegenüber RAD001. In einer Untersuchung an 48 unterschiedlichen Tumorzelllinien wiesen 71 % der behandelten Zelllinien einen IC50 von kleiner 0,1 μM auf (O'Reilly und McSheehy, 2010). In sensitiven Nierenzellkarzinomzelllinien sind IC50-Werte von $0,78 \pm 0,23$ nM beschrieben (Juengel *et al.*, 2014). Die sensitivste Zelllinie H12.1 wies einen IC50 von 170 nM auf, für die H12.1ODMneu wurde der IC50 gar nicht erreicht. Wie bereits bei der Darstellung der Ergebnisse erläutert, erlaubt der charakteristische Kurvenverlauf jedoch nur einen eingeschränkten Vergleich der IC50-Werte, da das Wachstumsplateau vor oder etwa im Bereich der IC50 erreicht wird. Ab einer Stoffkonzentration von 3 μM wird das Plateau verlassen und es zeigt sich erneut eine deutliche Wachstumsinhibition, welche aufgrund der hohen Dosis eher auf unspezifische Effekte zurückzuführen ist.

In der Literatur sind derzeit keine Veränderungen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in testikulären Keimzelltumoren beschrieben. Lediglich für primär intrakranielle Keimzelltumoren konnten Mutationen im AKT/mTOR-*pathway* nachgewiesen werden, welche zu einer gesteigerten Expression von AKT1 führen (Wang *et al.*, 2014). Die insgesamt geringen Unterschiede in der Sensitivität der untersuchten Zelllinien gegenüber RAD001 spiegeln sich in der gleichmäßigen Expression von mTOR in unbehandelten TKZT-Zellen wider. Zur abschließenden Beurteilung der Aktivität des gesamten Signalweges in den Keimzelltumorzelllinien wäre allerdings eine Untersuchung der übrigen Komponenten (PI3K und AKT) notwendig. Auch bei der Phosphorylierung an S2448 und S2481 und somit der Aktivierung von mTOR zeigen sich nur geringe Unterschiede, lediglich die Expression von phospho-mTOR S2448 ist in der 1411HP im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien geringfügig vermindert. Obwohl die Daten nur eingeschränkt übertragbar sind, konnten Li *et al.*

in ihrer Studie an Nierenzellkarzinomen eine Korrelation zwischen der Expression von phosphoryliertem mTOR S2448 und dem klinischen Ansprechen auf eine Therapie mit RAD001 nachweisen (Li *et al.*, 2014). Die relative Resistenz der 1411HP gegenüber RAD001 bestätigt diese Korrelation.

Außer der verminderten Expression von phospho-mTOR S2448 in der 1411HP zeigen sich weder Unterschiede in der Sensitivität gegenüber RAD001 noch in der Expression und Phosphorylierung von mTOR zwischen cisplatinsensitiven und cisplatinresistenten Zelllinien. Demgegenüber konnte für cisplatinresistente Ovarialkarzinome eine verstärkte Aktivierung von mTOR sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber RAD001 nachgewiesen werden (Mabuchi *et al.*, 2009). Diese Unterschiede könnten auf die verschiedenen Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in den einzelnen Tumorentitäten zurückzuführen sein.

Um die verringerte Aktivierung von mTOR durch eine Behandlung mit RAD001 nachzuweisen, wurden nach Inkubation der Zelllinien mit dem Wirkstoff die Expression und der Phosphorylierungsstatus von mTOR untersucht. Die Inhibition der mTOR-Expression sowie der Phosphorylierung an S2448 durch RAD001 konnte unter anderem bereits für Ösophagus- und Mammakarzinomzelllinien gezeigt werden, die Inhibition der Phosphorylierung an S2481 beispielsweise an Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms (Wang *et al.*, 2010; Grabinski *et al.*, 2012; Jordan *et al.*, 2014). Andererseits zeigte sich bei *in vitro*-Versuchen mit Osteosarkomzellen nach Behandlung mit RAD001 eine verstärkte Phosphorylierung von S2481 (Pignochino *et al.*, 2013). In den untersuchten Keimzelltumorklinen blieb die Expression von mTOR nach einer Inkubation mit RAD001 unbeeinflusst. Die für eine Konzentration von 30 nM beobachtete Inhibition der beiden Phosphorylierungsstellen S2448 und S2481 von mTOR beweist jedoch die spezifische Wirkung von RAD001. Für geringere Wirkstoffkonzentrationen konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Da der Wirkmechanismus von Rapamycin und seiner Analoga vorrangig auf einer Inhibition von mTORC1 mit der Phosphorylierungsstelle S2448 beruht, ist eine verminderte Expression von phospho-mTOR S2448 nach Behandlung mit RAD001 zu erwarten. Die Ursache für die darüber hinaus gezeigte Hemmung der Phosphorylierung von S2481, Bestandteil des lange Zeit als Rapamycin-insensitiv beschriebenen Komplexes mTORC2, liegt vermutlich in der langen Inkubationszeit von RAD001. An verschiedenen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Exposition (24 h) gegenüber RAD001 zu einer verringerten Phosphorylierung von S2481 führt (Copp *et al.*, 2009).

5.1.3 AEW541

In präklinischen Untersuchungen konnte die Wirksamkeit des gegen den IGF-1-Rezeptor gerichteten Tyrosinkinaseinhibitors AEW541 in verschiedenen Tumormodellen gezeigt werden.

So führte die Behandlung mit AEW541 in *in vitro*-Versuchen unter anderem zur Wachstumsinhibition in Zelllinien des Ewing-Sarkoms, Multiplen Myeloms sowie gastrointestinaler Stromatumoren (Scotlandi *et al.*, 2005; Tarn *et al.*, 2008; Maiso *et al.*, 2008). Trotz zahlreicher Studien mit diversen Tyrosinkinaseinhibitoren (z.B. NVP-ADW742, BMS-554417, AG102) und verschiedenen Antikörpern (z.B. AMG 479, CP-751, AVE1642/EM164, IMC-A12) steht derzeit, auch aufgrund teilweise schwerwiegender unerwünschter Wirkungen, die klinische Zulassung für eine gegen den IGF-1R gerichtete Substanz noch aus (Hewish *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012). In der Literatur finden sich aktuell keine Daten zur Rolle von IGF-1R oder der Wirkung von IGF-Inhibitoren in Keimzelltumoren, sodass die Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nur durch den Vergleich mit anderen Tumorentitäten und daher nur eingeschränkt möglich ist.

In den Zytotoxizitätsassays konnte durch die alleinige Behandlung mit AEW541 eine Wachstumsinhibition in allen untersuchten TKZT-Zelllinien erreicht werden. Dabei zeigte sich ein homogenes Ansprechen der untersuchten Zelllinien, die IC50-Werte lagen zwischen 0,21 μM (1777NR) und 1,8 μM (1411HP). In Analysen an Pankreaskarzinomzellen konnten mit IC50-Werten zwischen 0,34 μM und 2,73 μM ähnliche Ergebnisse erzielt werden, in Ovarialkarzinomzellen konnte eine Wachstumsinhibition mit IC50-Werten zwischen 5 und 15 μM erreicht werden (Gotlieb *et al.*, 2006; Ioannou *et al.*, 2013).

Da die untersuchten Zelllinien ein vergleichbares Ansprechen auf eine Inhibition von IGF-1R durch AEW541 aufwiesen, lag die Hypothese nahe, dass dies mit einer gleichmäßigen Expression des Rezeptors in den Zellen korrelieren könnte. Jedoch zeigte sich im Western Blot eine stärkere Expression von IGF-1R in den Zelllinien H12.1, H12.1RA und H12.1ODMneu im Vergleich zu den Linien 1411HP, GCT72F und 1777NR. Die phosphorylierte Form des IGF-1-Rezeptors konnte in keiner der Zelllinien nachgewiesen werden, auch die Inhibierung der Phosphorylierung durch AEW541 lies sich daher nicht zeigen.

Zur Korrelation zwischen Expression und Phosphorylierungsstatus und dem Ansprechen auf eine Behandlung mit AEW541 finden sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. So zeigte sich in den Untersuchungen an Mammakarzinomzelllinien von Browne *et al.* eine Assoziation zwischen Expression und Phosphorylierungsstatus von IGF-1R und der Sensitivität gegenüber AEW541 mit höheren IC50-Werten bei verstärkter Expression und Aktivierung des Rezeptors (Browne *et al.*, 2012). Andererseits sahen Mukohara *et al.* – ebenfalls in Untersuchungen an Mammakarzinomzelllinien – keinen Zusammenhang zwischen der Expression von IGF-1R und phospho-IGF-1R und der Sensitivität gegenüber AEW541. In ihren Versuchen konnten sie jedoch eine Korrelation zwischen der Expression von IRS-1 und dem Ansprechen auf den IGF-1R-Inhibitor nachweisen, sodass – zumindest in den Untersuchungen von Mukohara *et al.* – die Expression von IRS-1 einen Marker für das Ansprechen auf AEW541 darstellt, unabhängig von der IGF-1R-Expression und -Aktivierung (Mukohara *et al.*, 2009).

Dies könnte das homogene Ansprechen der Keimzelltumorklinien trotz unterschiedlicher Expression von IGF-1R erklären.

Der ausbleibende Nachweis der phosphorylierten Form von IGF-1R trotz Expression des Rezeptors und Sensitivität gegenüber AEW541 ist vermutlich methodisch bedingt. So gelang es der Arbeitsgruppe um Tarn *et al.* in ihren Untersuchungen an gastrointestinalen Stromatumoren trotz ausgeprägter IGF-1R-Expression erst nach vorheriger Stimulation mit IGF-1, die phosphorylierte Form des Rezeptors nachzuweisen. Anschließend konnte auch eine Inhibierung der Expression von phospho-IGF-1R nach Exposition gegenüber AEW541 gezeigt werden (Tarn *et al.*, 2008). Moser *et al.* konnten diese Abhängigkeit der Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors von der Stimulierung durch IGF-1 unter *in vitro* Bedingungen an Pankreaskarzinomzelllinien zeigen (Moser *et al.*, 2008).

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit 10 %igem Serum durchgeführt wurden. In ihren Untersuchungen an AML-Zellen konnten Tazzari *et al.* zum einen zeigen, dass zwar die Expression von IGF-1R durch AEW541 unbeeinflusst bleibt, die Phosphorylierung des Rezeptors jedoch reduziert wird. Zum anderen resultierte eine Veränderung in der Konzentration des Serums (10 % vs. 2 %) in einer gesteigerten Aktivität von AEW541 im geringer konzentrierten Serum. Dies führten die Autoren vorrangig auf die im fetalen Kälberserum enthaltenen Wachstumsfaktoren zurück, welche durch die Stimulation von antiapoptischen Signalwegen die Effektivität von AEW541 verringern (Tazzari *et al.*, 2007). Durch eine Kultivierung in Medium mit geringer konzentriertem Serum könnte daher zumindest unter Laborbedingungen ein besseres Ansprechen der TKZT-Zelllinien auf eine Inhibition des IGF-1-Rezeptors erreicht werden.

Darüber hinaus ist auch eine vom IGF-1R unabhängige Wirkung von AEW im TKZT-Modell möglich. Zahlreiche IGF-1R-Inhibitoren zeigen aufgrund der ausgeprägten Ähnlichkeit im Aufbau der Kinasedomänen von IGF-1R und dem Insulinrezeptor keine hohe Spezifität für den IGF-1-Rezeptor. Obwohl zumindest auf zellulärer Ebene eine hohe Selektivität von AEW541 für IGF-1R gezeigt werden konnte ($IC_{50_{IGF-1R}} = 0,09 \mu M$, $IC_{50_{IR}} = 2,30 \mu M$), könnte das zytotoxische Potential zumindest in höheren Dosierungen teilweise auch auf einer Inhibition der Phosphorylierung des Insulinrezeptors beruhen und damit ebenfalls die fehlende Korrelation zwischen IGF-1R-Expression und dem Ansprechen erklären (García-Echeverría *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2012).

Unterschiede zwischen cisplatin sensitiven und cisplatin resistenten Zelllinien waren weder in den Zytotoxizitätsassays noch in den Expressionsanalysen nachweisbar. Die Tatsache, dass beispielsweise in Ovarialkarzinomzellen eine Korrelation zwischen Cisplatinresistenz und Expression von IGF-1R gezeigt werden konnte, unterstreicht die Limitationen eines Vergleiches mit Untersuchungen an cisplatin resistenten Zelllinien anderer Tumorentitäten (Eckstein *et al.*, 2009).

5.1.4 AEE788

Der duale Tyrosinkinaseinhibitor AEE788 führt zu einer Inhibition der über die EGF-, HER2/neu- und VEGF-Rezeptoren vermittelten Signaltransduktion (Traxler, 2004). Der Einsatz von EGFR-, HER2/neu- und VEGF(R)-Inhibitoren ist seit einigen Jahren fester Bestandteil der Therapiekonzepte zahlreicher solider Tumoren, insbesondere bei Kolon-, Kopf-Hals-, Bronchial- und Mammakarzinomen. Dementsprechend stellen diese Rezeptoren auch ein mögliches *target* in nichtseminomatösen Keimzelltumoren dar.

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Keimzelltumorkulturen zeigten in der Zellkultur eine Inhibition des Zellwachstums durch AEE788, jedoch wiesen sie – mit Ausnahme der H12.1RA – mit IC₅₀-Werten zwischen 4,54 μ M und > 10 μ M eine relative Resistenz gegenüber einer Behandlung mit AEE788 auf. So konnten Park *et al.* in Untersuchungen an Plattenkarzinomzellen der Haut eine Wachstumsinhibition durch AEE788 mit IC₅₀-Werten zwischen 0,12 μ M und 0,96 μ M nachweisen (Park *et al.*, 2005). Ab einer Konzentration von 3 μ M zeigte sich darüber hinaus ein deutlicher Abfall der Dosis-Wirkungs-Kurve, sodass in diesem Konzentrationsbereich von einer Zunahme unspezifischer Effekte auf das Zellwachstum auszugehen ist. In Analysen mit Lapatinib, einem TKI gegen EGFR und HER2/neu, konnte eine Wachstumsinhibition von Keimzelltumoren durch eine Blockade dieser Rezeptoren auch *in vivo* im Mausmodell gezeigt werden (Juliachs *et al.*, 2013).

Auffällig war die Sensitivität der Linie H12.1RA mit einem IC₅₀ von 0,13 μ M. Aufgrund des hohen zytotoxischen Potentials von AEE788 in dieser Zelllinie könnte man eine vermehrte Expression und Aktivierung der inhibierten Rezeptoren EGFR, HER2/neu und VEGFR in den Expressionsanalysen mittels Western Blot vermuten. Insgesamt exprimierten alle untersuchten Zelllinien die Rezeptoren EGFR und HER2/neu, dabei lies sich erwartungsgemäß eine vermehrte Expression von EGFR und HER2/neu in der Zelllinie H12.1RA nachweisen, doch auch Zellen der Linie 1777NR zeigten eine Überexpression von EGFR im Vergleich zu den übrigen Zelllinien. In der AEE788-resistenten Zelllinie H12.1ODMneu fiel darüber hinaus eine vermehrte Expression von HER2/neu sowie eine deutliche Überexpression von VEGFR auf. Eine – deutliche geringere – Expression dieses Rezeptors lies sich darüber hinaus nur in der 1777NR nachweisen. Der Nachweis einer Aktivierung der Rezeptoren gelang nicht in allen Zelllinien, jedoch zeigte sich teilweise eine Korrelation zwischen Expression und Aktivierung. So konnte die aktivierte Form des EGF-Rezeptors in den Linien H12.1RA und 1777NR, die Aktivierung von HER2/neu in der H12.1RA, H12.1ODMneu und 1777NR und eine Phosphorylierung des VEGFR in der H12.1ODMneu und 1777NR nachgewiesen werden.

Die Datenlage zur Expression und Aktivität von EGFR und HER2/neu in TKZT ist sehr widersprüchlich. Zwar konnten zahlreiche Arbeitsgruppen die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren in testikulären Keimzelltumoren nachweisen, jedoch fand sich kein

klarer Hinweis auf eine relevante Überexpression dieser Rezeptoren (Moroni *et al.*, 2001; Soule *et al.*, 2002). In Bezug auf die erhobenen Daten sind vor allem die Untersuchungen von Mandoky *et al.*, in welchen eine Beschränkung der HER2/neu-Expression auf die Teratom- und Chorionkarzinomkomponenten gemischter Keimzelltumoren gezeigt werden konnte, interessant, da es sich bei der H12.1RA ebenfalls um eine differenzierte Keimzelltumorkomponente handelt (Mandoky *et al.*, 2003). Andererseits konnten Juliachs *et al.* die Expression von EGFR und HER2/neu in allen Tumorkomponenten testikulärer Keimzelltumoren, unabhängig von der histologischen Differenzierung, nachweisen. Weder die von den Autoren gezeigte relative Überexpression von EGFR in Chorionkarzinomzellen noch die vermehrte Expression von HER2/neu in embryonalen Karzinomen lies sich in der vorliegenden Arbeit bestätigen; die Zelllinien H12.1 (Komponenten von CC in der Patientenhistologie) und 1777NR (vorrangig EC) zeigten keine relevante Überexpression von EGFR bzw. HER2/neu (Juliachs *et al.*, 2013).

Zur Rolle von VEGF in Keimzelltumoren finden sich nur wenige Untersuchungen, unter anderem von Nitzsche *et al.*, die durch eine selektive Blockade von VEGFR-2 eine signifikante Wachstumsinhibition in VEGFR-2 exprimierenden TKZT-Zelllinien erzielen konnten (Nitzsche *et al.*, 2010). Eine verstärkte Expression von VEGF in Keimzelltumoren im Vergleich zu normalem testikulärem Gewebe konnten Fukuda *et al.* zeigen, die VEGFR-Expression in diesen Tumoren wurde dabei nicht untersucht (Fukuda *et al.*, 1999). Besonders mit Blick auf die deutlich vermehrte Expression von VEGFR in der AEE788-resistenten Tumorzelllinie H12.1ODMneu könnte eine Analyse der VEGF-Expression eine Aussage über eine eventuell fehlende autokrine Stimulation ermöglichen. Insgesamt scheinen VEGFR-assoziierte *pathways* jedoch keine entscheidende Rolle für die Proliferation dieser Zelllinie zu spielen.

Zur Charakterisierung des Wirkmechanismus von AEE788 in den TKZT-Zelllinien erfolgte darüber hinaus die Untersuchung des Expressions- und Phosphorylierungsstatus von EGFR, HER2/neu und VEGFR in Abhängigkeit von der Exposition gegenüber dem TKI. Die Expression der Rezeptoren blieb dabei unbeeinflusst, es zeigte sich jedoch eine Inhibition der Phosphorylierung von HER2/neu durch AEE788 in den Zelllinien H12.1RA und H12.1ODMneu. In der 1777NR konnte die Rezeptorphosphorylierung von EGFR durch AEE788 gehemmt werden, aufgrund der relativen Resistenz der 1777NR im Vergleich zur H12.1RA scheint eine Unterdrückung der EGFR-getriggerten Signalkaskaden die Proliferation jedoch nur leicht zu inhibieren. Dies lässt darauf schließen, dass der Effekt einer Inhibition der Rezeptorphosphorylierung von HER2/neu und EGFR durch AEE788 in den einzelnen Keimzelltumorkomponenten in Abhängigkeit von der Relevanz der Wachstumssignale für den Zellstoffwechsel und weitere *downstream targets* variiert. Eine Inhibition der Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors konnte weder in der H12.1ODMneu noch in der 1777NR nachgewiesen werden. Dies lässt sich möglicherweise durch die eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen begründen. In ihren Untersuchungen an unterschiedlichen soliden

Tumoren im Rahmen einer Phase I-Studie konnten Baselga *et al.* zeigen, dass klinisch relevante Serumkonzentrationen von 0,05 bis 0,13 μM die Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors nicht beeinflussen (Baselga *et al.*, 2012).

Zwischen den cisplatin sensitiven und cisplatin resistenten Zelllinien ließen sich keine Unterschiede in der Expression und Phosphorylierung der Rezeptoren nachweisen. Dies unterstützt die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Kollmannsberger *et al.*, welche in einigen der von ihnen analysierten nichtseminomatösen Keimzelltumoren eine Expression von EGFR und HER2/neu, jedoch keine Unterschiede zwischen cisplatin sensitiven und cisplatin resistenten Tumoren und insbesondere keine vermehrte Expression in resistenten Phänotypen zeigen konnten. Die Autoren schlossen daraus, dass eine Überexpression dieser Wachstumsfaktorrezeptoren nicht zur Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in Keimzelltumoren beiträgt (Kollmannsberger *et al.*, 2002).

5.2 Effekte einer Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und einzelnen *targeted drugs* auf die Cisplatin sensitivität der testikulären Keimzelltumoren

5.2.1 RAD001

In zahlreichen *in vitro* Versuchen an anderen Tumorentitäten konnte bereits eine Effektivität der Kombination von RAD001 und Cisplatin gezeigt werden. So führte eine Kombination der beiden Substanzen zu einer erhöhten Zytotoxizität von Cisplatin in pleuralen Mesotheliomzellen und Ovarialkarzinomzellen (Mabuchi *et al.*, 2009; Onen *et al.*, 2014). Im Tiermodell mit Xenograften von Lungen-, Zervix- und Kolonkarzinomen konnten O'Reilly *et al.* eine synergistische Wirkung von RAD001 und Cisplatin nachweisen (O'Reilly *et al.*, 2011).

In den Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob diese synergistischen Effekte auch auf das TKZT-Modell übertragbar sind und somit zur Überwindung eventueller Cisplatinresistenzen genutzt werden könnten. Die untersuchten Zelllinien zeigten sich ein sehr divergentes Ansprechen auf eine Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und RAD001. Während in den Linien H12.1 und 1777NR eher eine antagonistische Tendenz sichtbar wurde, zeigten sich bei der H12.1RA und H12.1ODMneu additive, bei 1411HP und GCT72F synergistische Tendenzen. Anders als Onen *et al.*, welche eine sequentielle Exposition von RAD001 und Cisplatin wählten, erfolgte die Behandlung der Keimzelltumorklinien mit den beiden Substanzen parallel (Onen *et al.*, 2014). Da Kinaseinhibitoren häufig zu einem Zellzyklusarrest führen, könnte die Applikationssequenz eine wichtige Rolle für die Effektivität einer Kombination spielen. Weiterhin nutzten O'Reilly *et al.* bei den Kombinationsversuchen nicht die IC₃₀, sondern die IC₅₀ von RAD001, was eventuell zu einer Veränderung des Effektes führen könnte (O'Reilly *et al.*, 2011). Obwohl ein Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Daten nur sehr eingeschränkt möglich ist, ist die für die Zelllinien H12.1, H12.1RA, GCT72F und 1777NR in der vorliegenden Arbeit verwendete

Konzentration von 0,7 nM etwas geringer als der empfohlene RAD001-Plasmaspiegel von 5 – 15 ng/ml (6 – 14 nM) (Krueger *et al.*, 2013). Da sich in vier Zelllinien trotzdem zumindest eine additive Wirkung zeigte, könnte durch eine höhere Konzentration von RAD001 gegebenenfalls dieser Effekt verstärkt werden.

Ein besonderes Interesse dieser Arbeit galt der Möglichkeit, durch Kombination von Cisplatin mit den verschiedenen Kinaseinhibitoren die Chemotherapieresistenz der cisplatinresistenten TKZT-Zelllinien zu überwinden. Dies ist beispielsweise für cisplatinresistente Magenkarzinomzellen beschrieben (Ying *et al.*, 2014). Obwohl die Linie 1411HP bei einer alleinigen Behandlung mit RAD001 den höchsten IC₅₀ der verwendeten Zelllinien aufweist, konnte bei der Kombinationsbehandlung ein – jedoch nicht signifikanter – synergistischer Effekt erzielt werden. In den weiteren untersuchten resistenten Zelllinien konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden, dennoch ergibt sich in der Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-*pathways* eventuell ein Ansatz für die Überwindung der Cisplatinresistenz in Keimzelltumoren. In ihren Untersuchungen an Lungenkarzinomzellen konnten Beuvink *et al.* zeigen, dass durch RAD001 die Cisplatin-induzierte Induktion von p21 durch p53 gehemmt wird. Somit werden bei Vorliegen eines p53-Wildtyps sowohl der p21-induzierte Zellzyklusarrest als auch die Inhibierung proapoptotischer Caspasen (Procaspase 3, Caspase 8) durch p21 verhindert (Beuvink *et al.*, 2005). Aufgrund der geringen Mutationsrate von p53 in Keimzelltumoren ist dieser Mechanismus eventuell auf Keimzelltumoren übertragbar und bietet Möglichkeiten für weitere Untersuchungen (Peng *et al.*, 1993).

5.2.2 AEW541

Ogleich IGF-1R-Inhibitoren derzeit weder zur Monotherapie noch in Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen zur Anwendung zugelassen sind, haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit dem Einfluss dieser Substanzen auf die Wirksamkeit von Cisplatin in unterschiedlichen Tumorentitäten beschäftigt. In Endometriumkarzinomzellen konnte die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität durch Kombination mit dem IGF-1R-Antikörper MK-0646 erhöht werden, in kleinzelligen Bronchialkarzinomen führte die Kombination von Cisplatin mit dem Antikörper R1507 zu additiven und synergistischen Effekten (Ferte *et al.*, 2013; Bitelman *et al.*, 2013). Die Wirkung einer Kombinationsbehandlung von AEW541 mit Cisplatin scheint sich entitätenabhängig auszuprägen. So konnte im Ewing-Sarkom eine antagonistische und im Ovarialkarzinom eine synergistische Wirkung auf die Zytotoxizität von Cisplatin beobachtet werden (Scotlandi *et al.*, 2005; Gotlieb *et al.*, 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass selbst innerhalb einer Entität der Effekt von AEW541 auf die Cisplatinempfindlichkeit nicht homogen ist. Während für die Linie H12.1ODMneu ein signifikanter antagonistischer Effekt gezeigt werden konnte, war für die GCT72F eine synergistische Tendenz erkennbar. Aufgrund der schwachen Datenlage zur

Rolle von IGF-1R in Keimzelltumoren, speziell in cisplatinresistenten Zelllinien, kann über die Ursache dieses divergenten Verhaltens trotz ähnlicher Sensitivität gegenüber AEW541 nur spekuliert werden. Ferté *et al.* konnten zeigen, dass durch den IGF-1R-Antikörper R1507 in Bronchialkarzinomzellen der Mechanismus der *nucleotide excision repair* (NER) herabreguliert wird (Ferte *et al.*, 2013). Da dieser Reparaturmechanismus eine wichtige Rolle bei der Beseitigung Cisplatin-induzierter DNA-Schäden spielt, könnte eine verringerte Reparaturkapazität und damit verbundene höhere Apoptoserate eine synergistische Wirkung begründen. In Untersuchungen an cisplatinresistenten Bronchialkarzinomzellen, in denen die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität durch Inhibition des IGF-1-Rezeptors ebenfalls verstärkt wurde, konnte durch Stimulation mit Insulin eine stärkere Induktion von IGF-1R im Vergleich zu sensitiven Zelllinien beobachtet werden. Sun *et al.* schlossen daher auf eine größere Abhängigkeit der cisplatinresistenten Zellen von IGF-1R-abhängigen Signalwegen (Sun *et al.*, 2012). Auch der Nachweis einer direkten Apoptoseinduktion durch AEW541 sowohl in Ovarialkarzinomzellen als auch in Kolonkarzinomzelllinien legt eine synergistische Wirkung von Cisplatin und der IGF-1R-Inhibition nahe (Höpfner *et al.*, 2006; Gotlieb *et al.*, 2006).

Auffällig in den vorliegenden Untersuchungen ist die antagonistische Tendenz in den cisplatinresistenten Zelllinien H12.1RA, H12.1ODMneu und 1411HP. Zur Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen sollte vor allem die Rolle des IGF-1R-Signalweges und seiner *downstream targets* in diesen TKZT-Zelllinien sowie die Auswirkungen auf die Apoptoseinduktion durch Cisplatin näher untersucht werden. Auch eine Analyse der Expression von IGF-1 und IGF-2 durch die TKZT-Zellen könnte Aufschlüsse über eventuelle autokrine Aktivierungsmechanismen geben.

5.2.3 AEE788

Infolge des hervorragenden Ansprechens von Tumoren unterschiedlicher Entität auf die Blockade von EGFR, HER2/neu und VEGFR durch Antikörper und TKI wurden zahlreiche Studien zur Wirksamkeit einer Kombination mit klassischen Zytostatika initiiert. Inzwischen sind Kombinationstherapien mit den konventionellen Chemotherapeutika beispielsweise für Lungen- (EGFR-Inhibitoren), Kolon- (EGFR- und VEGFR-Inhibitoren) sowie Mammakarzinome (HER2/neu-Inhibition) etabliert. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die Inhibition dieser Rezeptoren die Sensitivität verschiedener Tumorzellen gegenüber Cisplatin steigern kann (Schrader *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013).

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in anderen Tumorentitäten wurden trotz der relativen Resistenz der untersuchten Keimzelltumorklinien gegenüber AEE788 die Effekte einer Kombinationsbehandlung in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dabei konnte in den meisten Zelllinien eine Abschwächung der Cisplatinwirkung beobachtet werden, lediglich für die Zelllinien 1411HP und GCT72F zeigte sich eine additive Wirkung. In Untersuchungen an

Speicheldrüsenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass AEE788 auch in Zellen mit einer geringen Sensitivität gegenüber AEE788 ($IC_{50} = 8,2 \mu M$) die Wirkung von Cisplatin verstärken kann. In diesen Zellen konnte jedoch zuvor eine Inhibition der Phosphorylierung von sowohl EGFR als auch VEGFR durch AEE788 nachgewiesen werden (Younes *et al.*, 2006). Auch in Analysen von Perry *et al.* beeinflusste die Inhibition von EGFR und HER2/neu durch Lapatinib die Cisplatinwirkung weder in cisplatin sensitiven noch in cisplatinresistenten Keimzelltumorzelllinien (Perry *et al.*, 2010).

Einen Erklärungsansatz für die antagonistische Wirkung von AEE788 und Cisplatin in einigen der untersuchten TKZT-Zelllinien könnte die Arbeit von Yamaguchi *et al.* an nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen bieten. Sie konnten zeigen, dass durch die Inhibition des EGFR-Signalweges mittels Gefitinib der durch Cisplatin ebenfalls hervorgerufene Caspase-unabhängige Zelltod gehemmt wird. Da zuvor eine Aktivierung von EGFR sowie dessen *downstream targets* AKT und ERK durch Cisplatin belegt werden konnte, postulierten die Autoren, dass Cisplatin über EGFR-assoziierte *pathways* den Caspase-unabhängigen Zelltod induziert und diese Mechanismen durch eine EGFR-Inhibition gehemmt werden (Yamaguchi *et al.*, 2013).

Weiterhin konnte an Urothelkarzinomzellen gezeigt werden, dass die Kombinationseffekte von EGFR- und HER2/neu-Inhibition durch Lapatinib und klassischen Zytostatika eine Abhängigkeit von der Applikationssequenz aufweisen. Die stärkste Erhöhung der Zytotoxizität von Cisplatin konnte dabei durch eine vorherige Applikation von Lapatinib erzielt werden (McHugh *et al.*, 2007). Vermutlich bewirkt die Inhibition der Wachstumsrezeptoren einen Zellzyklusarrest und erhöht somit die Cisplatin sensitivität. Ob eine sequentielle Applikation von AEE788 und Cisplatin zu anderen Ergebnissen führt und welchen Einfluss AEE788 auf den Zellzyklus der TKZT-Zellen hat, könnte in weiteren Analysen untersucht werden.

5.3 Effekte einer Kombinationsbehandlung aus RAD001 und AEW541 bzw. AEE788

Die Serin/Threoninkinase mTOR nimmt in der Regulation von Zellstoffwechsel und -wachstum eine zentrale Rolle ein. Dabei ist es ein wichtiges *downstream target* zahlreicher Wachstumsfaktorrezeptoren wie IGF-1R, EGFR, HER2/neu und VEGFR. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine isolierte Inhibition einzelner Mediatoren innerhalb solcher Signalkaskaden über eine verstärkte Aktivierung ihrer *upstream targets* umgangen und die Wirksamkeit spezifischer Inhibitoren daher verringert wird. Durch eine kombinierte Blockade mehrerer Kinasen auf unterschiedlichen Ebenen der Signalwege könnten diese kompensatorischen Mechanismen ausgeschaltet und die Effektivität der Substanzen erhöht werden. Sowohl für eine Kombination von RAD001 mit AEW541 als auch mit AEE788 konnte dies bereits gezeigt werden. So führte eine simultane Gabe von AEW541 und RAD001 zu additiven und

synergistischen Effekten sowohl in Myelomzellen als auch in hepatozellulären Karzinomzellen (Baumann *et al.*, 2009; Ou *et al.*, 2014). In den vorliegenden Untersuchungen an TKZT-Zelllinien konnten ebenso additive Effekte nachgewiesen werden. Da eine Inhibition von IGF-1R durch AEW541 häufig auch zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT führt, entsteht durch die Applikation von mTOR und AEW541 eine doppelte Blockade des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges, welche die beobachteten additiven Effekte erklären könnte (Gotlieb *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2010).

Auch für die Kombination aus RAD001 und AEE788 finden sich in der Literatur zahlreiche Untersuchungen, unter anderem an Nierenzell- und Prostatakarzinomzellen sowie an Glioblastomen, die additive bis synergistische Effekte dieser Wirkstoffe beschreiben (Goudar *et al.*, 2005; Juengel *et al.*, 2009; Wedel *et al.*, 2011). In den Zytotoxizitätsassays zeigte sich sowohl in der H12.1 als auch in der 1411HP ein additiver Effekt, vor allem in den niedrigeren Dosisbereichen (IC₂₀) war auch eine synergistische Tendenz nachweisbar. Dies könnte durch das Überwiegen unspezifischer, zytotoxischer Effekte bei höheren Wirkstoffkonzentrationen bedingt sein. In den durchgeführten Western Blots wird deutlich, dass AEE788 auch die Phosphorylierung von mTOR inhibiert und daher ebenfalls in den PI3K/AKT/mTOR-*pathway* eingreift. Darüber hinaus konnten Mabuchi *et al.* an Ovarialkarzinomzellen zeigen, dass die Expression von VEGF u. a. durch mTOR reguliert und daher über eine RAD001-vermittelte Inhibition vermindert wird (Mabuchi *et al.*, 2007). Auch in diesem Fall wird durch die Kombination der beiden Wirkstoffe also eine vertikale Blockade des Signalweges erreicht.

Die Kombination unterschiedlicher *targeted drugs* kann neben der Steigerung der Effektivität jedoch auch zu einer Verstärkung der Nebenwirkungen führen. So konnte bei Glioblastompatienten nach simultaner Gabe von RAD001 und AEE788 eine signifikante Thrombozytopenie beobachtet werden, welche eine Dosisreduktion nötig machte (Reardon *et al.*, 2012). Gerade aufgrund der bereits bekannten, teilweise schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen von AEW541 könnte eine Verstärkung der Wirkung durch RAD001 auch in diesem Fall zu intolerablen Nebenwirkungen führen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Zielsetzung der Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation war es, die Wirksamkeit der Tyrosinkinaseinhibitoren AEW541 (IGF-1R) und AEE788 (EGFR, HER2/neu und VEGFR) sowie des Serin/Threoninkinase-Inhibitors RAD001 (mTOR) an humanen Keimzelltumorklinen mit unterschiedlicher Differenzierung und Cisplatinempfindlichkeit sowie den Einfluss dieser Substanzen auf die Effektivität von Cisplatin *in vitro* zu untersuchen.

Zunächst erfolgte die Einordnung der Keimzelltumorklinen anhand ihrer Cisplatinempfindlichkeit, dabei konnten die Zelllinien H12.1RA und GCT72F als cisplatinempfindlich, die Linien H12.1RA, H12.1ODMneu, 1411HP und 1777NR als cisplatinresistent charakterisiert werden und damit zuvor gewonnene Daten bestätigt werden. In den Versuchen konnte durch eine alleinige Behandlung mit den untersuchten *targeted drugs* eine Wachstumsinhibition in allen TKZT-Zelllinien erreicht werden. Für RAD001 und AEW541 zeigte sich ein homogenes Ansprechen aller Zelllinien, im Vergleich zu Untersuchungen an anderen Tumorentitäten war jedoch eine relative Resistenz gegenüber RAD001 nachweisbar. Während AEE788 insgesamt über ein eher geringes zytotoxisches Potential in den Keimzelltumorklinen verfügte, zeichnete sich die durch Behandlung mit ATRA aus der H12.1 abgeleitete Zelllinie H12.1RA durch eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber dieser Substanz aus.

Eine Korrelation zwischen der Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber den Kinaseinhibitoren und der Expression und Aktivierung der Wachstumsfaktorrezeptoren konnte dabei nur vereinzelt nachgewiesen werden. Die verminderte Phosphorylierung von mTOR in der 1411HP korrelierte mit einem etwas schwächeren Ansprechen auf RAD001, wobei die prognostische Aussagekraft der mTOR-Phosphorylierung in der Literatur nur vereinzelt beschrieben ist. Die AEE788-empfindliche Zelllinie H12.1RA zeigte eine vermehrte Expression und Aktivierung von EGFR und HER2/neu, jedoch konnte dieses Expressionsmuster auch in anderen Zelllinien (H12.1ODM, 1777NR) nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die assoziierten Signalkaskaden für die Regulation der Zellproliferation in den Zelllinien von unterschiedlicher Relevanz sind. Auch konnte in diesen drei Zelllinien die Inhibition der Rezeptorphosphorylierung von EGFR und HER2/neu durch AEE788 nachgewiesen und damit der spezifische Wirkmechanismus belegt werden. Der VEGF-Rezeptor scheint in den untersuchten TKZT nur eine untergeordnete Rolle zu spielen und lies sich nur in der H12.1ODMneu und 1777NR nachweisen. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse sind jedoch auch stets die methodenbedingten Einschränkungen der Expressionsanalyse mittels Western Blot zu berücksichtigen.

Durch Kombination von Cisplatin mit den Kinaseinhibitoren gelang es nicht, die Cisplatinempfindlichkeit der Keimzelltumorklinen zu überwinden. Für die Kombinationsbehandlung in den cisplatinresistenten Zelllinien zeigten sich dabei meist additive oder antagonistische

Effekte, einzig in der 1411HP konnte durch RAD001 ein synergistischer, jedoch nicht signifikanter Effekt erzielt werden.

Trotz der Erfolge in der Therapie anderer Tumorentitäten stellt der Einsatz der untersuchten *targeted drugs* daher keinen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung cisplatinrefraktärer nichtseminomatöser Keimzelltumoren dar.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, Christen RD, Boland CR, Koi M, Fishel R, Howell SB (1996) Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 56:3087–3090.
- Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, Horwich A, Laguna MP (2011) EAU Guidelines on Testicular Cancer: 2011 Update. *European Urology* 60:304–319.
- Andrews PW (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol* 103:285–293.
- Andrews PW (2002) From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 357:405–417.
- Annunziata M, Granata R, Ghigo E (2011) The IGF system. *Acta Diabetol* 48:1–9.
- Atkin N, Baker M (1982) Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *The Lancet* 320:1349.
- Atkins MB, Yasothan U, Kirkpatrick P (2009) Everolimus. *Nat Rev Drug Discov* 8:535–536.
- Barry MA, Behnke CA, Eastman A (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol* 40:2353–2362.
- Baselga J, Mita AC, Schoffski P, Dumez H, Rojo F, Tabernero J, DiLea C, Mietlowski W, Low C, Huang J, Dugan M, Parker K, Walk E, van Oosterom A, Martinelli E, Takimoto CH (2012) Using Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data in Early Decision Making Regarding Drug Development: A Phase I Clinical Trial Evaluating Tyrosine Kinase Inhibitor, AEE788. *Clinical Cancer Research* 18:6364–6372.
- Baserga R (2000) The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* 19:5574–5581.
- Battelli C, Cho DC (2011) mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy* 8:359–367.
- Baumann P, Hagemeyer H, Mandl-Weber S, Franke D, Schmidmaier R (2009) Myeloma cell growth inhibition is augmented by synchronous inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor by NVP-AEW541 and inhibition of mammalian target of rapamycin by Rad001. *Anti-Cancer Drugs* 20:259–266.
- Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere FL, Albiol S, Guillem V, Gallardo E, Carles J, Mendez P, La Cruz JJ de, Taron M, Rosell R, Baselga J (2007) Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann. Oncol* 18:522–528.
- Ben David Y, Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Friedman E, Beck BD, Beller U, Ben-Baruch G, Fishman A, Levavi H, Lubin F, Menczer J, Piura B, Struewing JP, Modan B (2002) Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J. Clin. Oncol* 20:463–466.
- Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P (1990) Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50:4087–4091.
- Bernstein C (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 511:145–178.

- Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, O'Reilly T, Natt F, Hall J, Lane HA, Thomas G (2005) The mTOR Inhibitor RAD001 Sensitizes Tumor Cells to DNA-Damaged Induced Apoptosis through Inhibition of p21 Translation. *Cell* 120:747–759.
- Beyer J, Kramar A, Mandanas R, Linkesch W, Greinix A, Droz JP, Pico JL, Diehl A, Bokemeyer C, Schmoll HJ, Nichols CR, Einhorn LH, Siegert W (1996) High-dose chemotherapy as salvage treatment in germ cell tumors: a multivariate analysis of prognostic variables. *J. Clin. Oncol* 14:2638–2645.
- Bitelman C, Sarfstein R, Sarig M, Attias-Geva Z, Fishman A, Werner H, Bruchim I (2013) IGF1R-directed targeted therapy enhances the cytotoxic effect of chemotherapy in endometrial cancer. *Cancer Letters* 335:153–159.
- Boisen KA, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE (2001) Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 948:90–99.
- Boring CC, Squires TS, Tong T (1993) Cancer statistics, 1993. *CA Cancer J Clin* 43:7–26.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248–254.
- Braun RE (1998) Every sperm is sacred—or is it? *Nat Genet* 18:202–204.
- Bronson D, Vessella R, Fraley E (1984) Differentiation potential of human embryonal carcinoma cell lines. *Cell Differentiation* 15:129–132.
- Browne BC, Eustace AJ, Kennedy S, O'Brien NA, Pedersen K, McDermott MSJ, Larkin A, Ballot J, Mahgoub T, Sclafani F, Madden S, Kennedy J, Duffy MJ, Crown J, O'Donovan N (2012) Evaluation of IGF1R and phosphorylated IGF1R as targets in HER2-positive breast cancer cell lines and tumours. *Breast Cancer Res Treat* 136:717–727.
- Burger H, Nooter K, Boersma AW, Kortland CJ, Stoter G (1997) Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int. J. Cancer* 73:592–599.
- Burger H, Nooter K, Boersma AW, van Wingerden KE, Looijenga LH, Jochemsen AG, Stoter G (1999) Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines. *Int. J. Cancer* 81:620–628.
- Casper J, Schmoll HJ, Schnaidt U, Fonatsch C (1987) Cell lines of human germinal cancer. *Int. J. Androl* 10:105–113.
- Chresta CM, Masters JR, Hickman JA (1996) Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 56:1834–1841.
- Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 7:505–516.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest* 84:1470–1478.
- Copp J, Manning G, Hunter T (2009) TORC-Specific Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Phospho-Ser2481 Is a Marker for Intact mTOR Signaling Complex 2. *Cancer Research* 69:1821–1827.
- Crawford Y, Ferrara N (2009) VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res* 335:261–269.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab

- plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med* 351:337–345.
- Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'incalci M, Broggin M (2001) Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia* 3:10–16.
- Datta MW, Macri E, Signoretti S, Renshaw AA, Loda M (2001) Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression. *Mod. Pathol* 14:437–442.
- Dieckmann K, Pichlmeier U (2004) Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J Urol* 22:2–14.
- Eastman A (1987) The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & Therapeutics* 34:155–166.
- Easton JB, Houghton PJ (2006) mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 25:6436–6446.
- Eckstein N, Servan K, Hildebrandt B, Politz A, Jonquieres Gv, Wolf-Kummeth S, Napierski I, Hamacher A, Kassack MU, Budczies J, Beier M, Dietel M, Royer-Pokora B, Denkert C, Royer H (2009) Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor I Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research* 69:2996–3003.
- Einhorn EH (1997) Testicular cancer: an oncological success story. *Clin. Cancer Res* 3:2630–2632.
- Einhorn LH (1990) Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J. Clin. Oncol* 8:1777–1781.
- Einhorn LH (2002) Inaugural Article: Curing metastatic testicular cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:4592–4595.
- Einhorn LH, Donohue J (1977) Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann. Intern. Med* 87:293–298.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495–516.
- Erovcic BM, Pelzmann M, Grasl MC, Pammer J, Kornek G, Brannath W, Selzer E, Thurnher D (2005) Mcl-1, vascular endothelial growth factor-R2, and 14-3-3sigma expression might predict primary response against radiotherapy and chemotherapy in patients with locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Cancer Res* 11:8632–8636.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5:671–688.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102:8204–8209.
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev* 18:4–25.
- Ferrara N, Gerber H, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med* 9:669–676.
- Ferte C, Lorient Y, Clemenson C, Commo F, Gombos A, Bibault J, Fumagalli I, Hamama S, Auger N, Lahon B, Chargari C, Calderaro J, Soria J, Deutsch E (2013) IGF-1R Targeting Increases the Antitumor Effects of DNA-Damaging Agents in SCLC Model: An Opportunity to Increase the Efficacy of Standard Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 12:1213–1222.
- Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24:707–713.

- Fijolek J, Wiatr E, Rowińska-Zakrzewska E, Giedronowicz D, Langfort R, Chabowski M, Orłowski T, Roszkowski K (2006) p53 and HER2/neu expression in relation to chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Markers* 21:81–87.
- Fleischhacker M, Strohmeyer T, Imai Y, Slamon DJ, Koeffler HP (1994) Mutations of the p53 gene are not detectable in human testicular tumors. *Mod. Pathol* 7:435–439.
- Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y, Tsushima T, Ohmori H, Kayajima T, Take S, Nishiyama K, Yonezawa S, Akiba S, Akiyama S, Ohi Y (1999) Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer* 85:1323–1330.
- Funakoshi T, Latif A, Galsky MD (2014) Safety and efficacy of addition of VEGFR and EGFR-family oral small-molecule tyrosine kinase inhibitors to cytotoxic chemotherapy in solid cancers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treatment Reviews* 40:636–647.
- Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y (2002) Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 62:4899–4902.
- Gallagher EJ, LeRoith D (2011) Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology* 152:2546–2551.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G (2011) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*.
- Gao J, Chang YS, Jallal B, Viner J (2012) Targeting the Insulin-like Growth Factor Axis for the Development of Novel Therapeutics in Oncology. *Cancer Research* 72:3–12.
- García-Echeverría C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggen J, Capraro H, Cozens R, Evans DB, Fabbro D, Furet P, Porta DG, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Ruetz S, Hofmann F (2004) In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 5:231–239.
- Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D (2005) Epidemiology of testicular cancer: an overview. *Int. J. Cancer* 116:331–339.
- Ghavamnasiri MR, Saeedi Saedi H, Shahid Sales S, Ghafarzadegan K (2010) Clinical relevance of HER-2/neu overexpression in patients with testicular nonseminomatous germ cell tumor. *Urol J* 7:26–29.
- Giwerzman A, Müller J, Skakkebaek NE (1991) Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes from 399 men who died suddenly and unexpectedly. *J. Urol* 145:77–80.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol* 59:657–663.
- Gotlieb WH, Bruchim I, Gu J, Shi Y, Camirand A, Blouin M, Zhao Y, Pollak MN (2006) Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol* 100:389–396.
- Goudar RK, Shi Q, Hjelmeland MD, Keir ST, McLendon RE, Wikstrand CJ, Reese ED, Conrad CA, Traxler P, Lane HA, Reardon DA, Cavenee WK, Wang X, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN (2005) Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition. *Mol. Cancer Ther* 4:101–112.
- Grabinski N, Ewald F, Hofmann BT, Staufer K, Schumacher U, Nashan B, Jücker M (2012) Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 11:85.

- Grünwald V, Hidalgo M (2003) Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst* 95:851–867.
- Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, Hurlimann J, Kurt AM, Mettez G, Iggo R, Gray AC, Jichlinski P, Leisinger HJ, Benhattar J (1996) Germ cell tumors of the testis overexpress wild-type p53. *Am. J. Pathol* 149:1221–1228.
- Guo XF, Zhu XF, Zhong GS, Deng BG (2013) Lapatinib, a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2, potentiates the antitumor effects of cisplatin on esophageal carcinoma. *Diseases of the Esophagus* 26:487–495.
- Gutierrez C, Schiff R (2011) HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med* 135:55–62.
- Han J, Hong EK, Choi BG, Park JN, Kim KW, Kang JH, Jin J, Park SY, Hong YS, Lee KS (2003) Death receptor 5 and Bcl-2 protein expression as predictors of tumor response to gemcitabine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Med. Oncol* 20:355–362.
- Harari PM (2004) Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr. Relat. Cancer* 11:689–708.
- Harris CC, Hollstein M (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med* 329:1318–1327.
- Hartog H, Wesseling J, Boezen HM, van der Graaf WT (2007) The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: Old focus, new future. *European Journal of Cancer* 43:1895–1904.
- Hay N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 18:1926–1945.
- Herbst R (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation OncologyBiologyPhysics* 59:S21.
- Hewish M, Chau I, Cunningham D (2009) Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4:54–72.
- Holzer AK, Howell SB (2006) The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res* 66:10944–10952.
- Honecker F, Stoop H, Mayer F, Bokemeyer C, Castrillon DH, Lau YC, Looijenga LHJ, Oosterhuis JW (2006) Germ cell lineage differentiation in non-seminomatous germ cell tumours. *J. Pathol* 208:395–400.
- Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJM, Stoop H, van Gurp RJLM, Oechsle K, Steyerberg E, Hartmann JT, Dinjens WNM, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LHJ (2009) Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J. Clin. Oncol* 27:2129–2136.
- Höpfner M, Huether A, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H (2006) Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol* 71:1435–1448.
- Horwich A, Shipley J, Huddart R (2006) Testicular germ-cell cancer. *The Lancet* 367:754–765.
- Houldsworth J, Korkola JE, Bosl GJ, Chaganti RSK (2006) Biology and Genetics of Adult Male Germ Cell Tumors. *Journal of Clinical Oncology* 24:5512–5518.
- Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A (1994) HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91:10394–10398.

- Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Bategay EJ (2002) Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB J* 16:771–780.
- Ioannou N, Seddon AM, Dalglish A, Mackintosh D, Modjtahedi H (2013) Treatment with a combination of the ErbB (HER) family blocker afatinib and the IGF-IR inhibitor, NVP-AEW541 induces synergistic growth inhibition of human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 13:41.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99:14298–14302.
- Jordan NJ, Dutkowski CM, Barrow D, Mottram HJ, Hutcheson IR, Nicholson RI, Guichard SM, Gee JMW (2014) Impact of dual mTORC1/2 mTOR kinase inhibitor AZD8055 on acquired endocrine resistance in breast cancer in vitro. *Breast Cancer Res* 16:R12.
- Juengel E, Engler J, Natsheh I, Jones J, Mickuckyte A, Hudak L, Jonas D, Blaheta RA (2009) Combining the receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 and the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor RAD001 strongly inhibits adhesion and growth of renal cell carcinoma cells. *BMC Cancer* 9:161.
- Juengel E, Nowaz S, Makarevi J, Natsheh I, Werner I, Nelson K, Reiter M, Tsaor I, Mani J, Harder S, Bartsch G, Haferkamp A, Blaheta RA (2014) HDAC-inhibition counteracts everolimus resistance in renal cell carcinoma in vitro by diminishing cdk2 and cyclin A. *Mol Cancer* 13:152.
- Juliachs M, Castillo-Ávila W, Vidal A, Piulats J, Garcia del Muro X, Condom E, Hernández-Losa J, Teixidó C, Pandiella A, Graupera M, Casanovas O, Germà J, Villanueva A, Viñals F (2013) ErbBs inhibition by lapatinib blocks tumor growth in an orthotopic model of human testicular germ cell tumor. *Int. J. Cancer* 133:235–246.
- Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo Y, Rochdi M, Howell SB (2002) Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 62:6559–6565.
- Kawai H, Kiura K, Tabata M, Yoshino T, Takata I, Hiraki A, Chikamori K, Ueoka H, Tanimoto M, Harada M (2002) Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. *Lung Cancer* 35:305–314.
- Kelland LR (2000) Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 59 Suppl 4:1-8; discussion 37-8.
- Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, Robinson RA (1990) p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 50:5184–5187.
- Kersemakers AF (2002) Role of P53 and MDM2 in Treatment Response of Human Germ Cell Tumors. *Journal of Clinical Oncology* 20:1551–1561.
- Köberle B, Grimaldi KA, Sunter A, Hartley JA, Kelland LR, Masters JR (1997) DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int. J. Cancer* 70:551–555.
- Köberle B, Masters JR, Hartley JA, Wood RD (1999) Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr. Biol* 9:273–276.
- Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B (2010) Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1806:172–182.
- Kollmannsberger C, Honecker F, Bokemeyer C (2008) Pharmacotherapy of relapsed metastatic testicular cancer. *Expert Opin Pharmacother* 9:2259–2272.

- Kollmannsberger C, Mayer F, Pressler H, Koch S, Kanz L, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ, Bokemeyer C (2002) Absence of c-KIT and members of the epidermal growth factor receptor family in refractory germ cell cancer. *Cancer* 95:301–308.
- Kramer MW, Merseburger AS, Peters I, Waalkes S, Kuczyk MA (2011) Systemische und operative Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms. *Urologe A*.
- Kroemer G, Jäättelä M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5:886–897.
- Krueger DA, Care MM, Agricola K, Tudor C, Mays M, Franz DN (2013) Everolimus long-term safety and efficacy in subependymal giant cell astrocytoma. *Neurology* 80:574–580.
- Kuribayashi K, Krigsfeld G, Wang W, Xu J, Mayes PA, Dicker DT, Wu GS, El-Deiry WS (2008) TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biol. Ther* 7:2034–2038.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lebwohl D, Canetta R (1998) Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer* 34:1522–1534.
- Leite Oliveira R de, Hamm A, Mazzone M (2011) Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol. Aspects Med* 32:71–87.
- Li MC, Whitmore WF, Golbey R, Grabstald H (1960) Effects of combined drug therapy on metastatic cancer of the testis. *JAMA* 174:1291–1299.
- Li S, Kong Y, Si L, Chi Z, Cui C, Sheng X, Guo J (2014) Phosphorylation of mTOR and S6RP predicts the efficacy of everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 14:376.
- Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J, Lage H (2003) Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J. Invest. Dermatol* 121:172–176.
- Lin X, Trang J, Okuda T, Howell SB (2006) DNA polymerase zeta accounts for the reduced cytotoxicity and enhanced mutagenicity of cisplatin in human colon carcinoma cells that have lost DNA mismatch repair. *Clin. Cancer Res* 12:563–568.
- Livneh Z (2001) DNA Damage Control by Novel DNA Polymerases: Translesion Replication and Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 276:25639–25642.
- Logothetis CJ, Samuels ML, Trindade A, Grant C, Gomez L, Ayala A (1984) The prognostic significance of endodermal sinus tumor histology among patients treated for stage III nonseminomatous germ cell tumors of the testes. *Cancer* 53:122–128.
- Looijenga LHJ, Stoop H, Leeuw HPC de, Gouveia Brazao CA de, Gillis AJM, van Roozendaal KEP, van Zoelen EJJ, Weber RFA, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW (2003) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 63:2244–2250.
- Maase H von der, Rørth M, Walbom-Jørgensen S, Sørensen BL, Christophersen IS, Hald T, Jacobsen GK, Berthelsen JG, Skakkebaek NE (1986) Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. *Br Med J (Clin Res Ed)* 293:1398–1401.
- Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, Hensley HH, Schilder RJ, Ozols RF, Testa JR (2007) RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clin. Cancer Res* 13:4261–4270.

- Mabuchi S, Kawase C, Altomare DA, Morishige K, Sawada K, Hayashi M, Tsujimoto M, Yamoto M, Klein-Szanto AJ, Schilder RJ, Ohmichi M, Testa JR, Kimura T (2009) mTOR Is a Promising Therapeutic Target Both in Cisplatin-Sensitive and Cisplatin-Resistant Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Clinical Cancer Research* 15:5404–5413.
- Maecker HL, Koumenis C, Giaccia AJ (2000) p53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance. *Cancer Res* 60:4638–4644.
- Mahipal A, Kothari N, Gupta S (2014) Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age. *Cancer Control* 21:74–79.
- Maiso P, Ocio EM, Garayoa M, Montero JC, Hofmann F, García-Echeverría C, Zimmermann J, Pandiella A, San Miguel JF (2008) The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 141:470–482.
- Mandoky L, Geczi L, Bodrogi I, Toth J, Bak M (2003) Expression of HER-2/neu in testicular tumors. *Anticancer Res* 23:3447–3451.
- Mándoky L, Géczi L, Bodrogi I, Tóth J, Csuka O, Kásler M, Bak M (2004) Clinical relevance of HER-2/neu expression in germ-cell testicular tumors. *Anticancer Res* 24:2219–2224.
- Manecksha RP, Fitzpatrick JM (2009) Epidemiology of testicular cancer. *BJU International* 104:1329–1333.
- Mannuel HD, Mitikiri N, Hussain A (2011) Update on testicular germ cell tumors. *Current Opinion in Oncology* 23:265–270.
- Masters JR, Köberle B (2003) Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 3:517–525.
- Mayer F, Gillis AJM, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LHJ (2002) Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 62:2758–2760.
- McHugh LA, Kriajevskaja M, Mellon JK, Griffiths TR (2007) Combined treatment of bladder cancer cell lines with lapatinib and varying chemotherapy regimens--evidence of schedule-dependent synergy. *Urology* 69:390–394.
- Mellish KJ, Kelland LR, Harrap KR (1993) In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *Br. J. Cancer* 68:240–250.
- Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, Groshen S, Salonga D, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Konda B, Leichman L (1998) ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol* 16:309–316.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, Hideshima T, Chauhan D, Joseph M, Libermann TA, García-Echeverría C, Pearson MA, Hofmann F, Anderson KC, Kung AL (2004) Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 5:221–230.
- Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293–299.
- Modjtahedi H, Essapen S (2009) Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities. *Anticancer Drugs* 20:851–855.
- Moffitt KL, Martin SL, Walker B (2010) From sentencing to execution--the processes of apoptosis. *J. Pharm. Pharmacol* 62:547–562.

- Moroni M, Veronese S, Schiavo R, Carminati O, Sorensen BS, Gambacorta M, Siena S (2001) Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumors. *Clin. Cancer Res* 7:2770–2775.
- Moser C, Schachtschneider P, Lang SA, Gaumann A, Mori A, Zimmermann J, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2008) Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) using NVP-AEW541, a small molecule kinase inhibitor, reduces orthotopic pancreatic cancer growth and angiogenesis. *European Journal of Cancer* 44:1577–1586.
- Mueller T, Mueller LP, Luetzkendorf J, Voigt W, Simon H, Schmoll H (2006) Loss of Oct-3/4 Expression in Embryonal Carcinoma Cells Is Associated with Induction of Cisplatin Resistance. *Tumor Biol* 27:71–83.
- Mueller T, Voigt W, Simon H, Fruehauf A, Bulankin A, Grothey A, Schmoll H (2003) Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* 63:513–521.
- Mukohara T, Shimada H, Ogasawara N, Wanikawa R, Shimomura M, Nakatsura T, Ishii G, Park JO, Jänne PA, Saijo N, Minami H (2009) Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression. *Cancer Letters* 282:14–24.
- Murphy D, McGown AT, Crowther D, Mander A, Fox BW (1991) Metallothionein levels in ovarian tumours before and after chemotherapy. *Br. J. Cancer* 63:711–714.
- Nitzsche B, Gloesenkamp C, Schrader M, Ocker M, Preissner R, Lein M, Zakrzewicz A, Hoffmann B, Höpfner M (2010) Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br. J. Cancer* 103:18–28.
- Noel EE, Yeste-Velasco M, Mao X, Perry J, Kudahetti SC, Li NF, Sharp S, Chaplin T, Xue L, McIntyre A, Shan L, Powles T, Oliver RTD, Young BD, Shipley J, Berney DM, Joel SP, Lu Y (2010) The Association of CCND1 Overexpression and Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors and Other Cancers. *The American Journal of Pathology* 176:2607–2615.
- O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ, Kohn KW (1997) Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57:4285–4300.
- Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon J, Tursz T, Le Chevalier T, Soria J (2006) DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med* 355:983–991.
- Olmos D, Postel-Vinay S, Molife LR, Okuno SH, Schuetze SM, Paccagnella ML, Batzel GN, Yin D, Pritchard-Jones K, Judson I, Worden FP, Gualberto A, Scurr M, Bono JS de, Haluska P (2010) Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol* 11:129–135.
- Onen H, Yilmaz A, Alp E, Celik A, Demiroz S, Konac E, Kurul I, Menevse E (2014) EF24 and RAD001 potentiates the anticancer effect of platinum-based agents in human malignant pleural mesothelioma (MSTO-211H) cells and protects nonmalignant mesothelial (MET-5A) cells. *Hum Exp Toxicol*.
- Oosterhuis JW, Kersemaekers AMF, Jacobsen GK, Timmer A, Steyerberg EW, Molier M, van Weeren PC, Stoop H, Looijenga LHJ (2003) Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report. *APMIS* 111:32-40; discussion 41-2.
- Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (2005) Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5:210–222.

- O'Reilly T, McSheehy PM (2010) Biomarker Development for the Clinical Activity of the mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001): Processes, Limitations, and Further Proposals. *Translational Oncology* 3:65–79.
- O'Reilly T, McSheehy PM, Wartmann M, Lassota P, Brandt R, Lane HA (2011) Evaluation of the mTOR inhibitor, everolimus, in combination with cytotoxic antitumor agents using human tumor models in vitro and in vivo. *Anti-Cancer Drugs* 22:58–78.
- Ou D, Lee B, Lin L, Liou J, Liao S, Hsu C, Cheng A (2014) Vertical blockade of the IGFR-PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of hepatocellular carcinoma: the role of survivin. *Mol Cancer* 13:2.
- Park YW, Younes MN, Jasser SA, Yigitbasi OG, Zhou G, Bucana CD, Bekele BN, Myers JN (2005) AEE788, a dual tyrosine kinase receptor inhibitor, induces endothelial cell apoptosis in human cutaneous squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res* 11:1963–1973.
- Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AFM, Gourlay R, Magnuson MA, Alessi DR (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J* 405:513–522.
- Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BL, Bulbul M, Jewett M, Buchanan J, Goss PE (1993) Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 53:3574–3578.
- Pera MF, Blasco Lafita MJ, Mills J (1987) Cultured stem-cells from human testicular teratomas: the nature of human embryonal carcinoma, and its comparison with two types of yolk-sac carcinoma. *Int. J. Cancer* 40:334–343.
- Perez RP (1998) Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur. J. Cancer* 34:1535–1542.
- Perry J, Ghazaly E, Kitromilidou C, McGrowder EH, Joel S, Powles T (2010) A Synergistic Interaction between Lapatinib and Chemotherapy Agents in a Panel of Cell Lines Is Due to the Inhibition of the Efflux Pump BCRP. *Molecular Cancer Therapeutics* 9:3322–3329.
- Pignochino Y, Dell'Aglio C, Basirico M, Capozzi F, Soster M, Marchio S, Bruno S, Gammaitoni L, Sangiolo D, Torchiario E, D'Ambrosio L, Fagioli F, Ferrari S, Alberghini M, Picci P, Aglietta M, Grignani G (2013) The Combination of Sorafenib and Everolimus Abrogates mTORC1 and mTORC2 Upregulation in Osteosarcoma Preclinical Models. *Clinical Cancer Research* 19:2117–2131.
- Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4:505–518.
- Porcu P, Bhatia S, Sharma M, Einhorn LH (2000) Results of treatment after relapse from high-dose chemotherapy in germ cell tumors. *J. Clin. Oncol* 18:1181–1186.
- Rajpert-De Meyts E (2006) Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Human Reproduction Update* 12:303–323.
- Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, Bartek J, Skakkebaek NE (2003) The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *APMIS* 111:267-78; discussion 278-9.
- Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE (1994) Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int. J. Androl* 17:85–92.
- Reardon DA, Cloughesy T, Rich J, Alfred Yung WK, Yung L, DiLea C, Huang J, Dugan M, Mietlowski W, Maes A, Conrad C (2012) Pharmacokinetic drug interaction between AEE788 and RAD001 causing thrombocytopenia in patients with glioblastoma. *Cancer Chemother. Pharmacol* 69:281–287.

- Rodriguez E, Houldsworth J, Reuter VE, Meltzer P, Zhang J, Trent JM, Bosl GJ, Chaganti RS (1993) Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 8:230–236.
- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205:698–699.
- Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature* 222:385–386.
- Rosenberg C, van Gurp RJ, Geelen E, Oosterhuis JW, Looijenga LH (2000) Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* 19:5858–5862.
- Sabatini DM (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6:729–734.
- Safaei R (2006) Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* 234:34–39.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 19:183–232.
- Samuels ML, Lanzotti VJ, Holoye PY, Boyle LE, Smith TL, Johnson DE (1976) Combination chemotherapy in germinal cell tumors. *Cancer Treat. Rev* 3:185–204.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098–1101.
- Saxman S, Nichols CR, Williams SD, Loehrer PJ, Einhorn LH (1991) Mediastinal yolk sac tumor. The Indiana University experience, 1976 to 1988. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 102:913–916.
- Schottenfeld D, Warshauer ME, Sherlock S, Zauber AG, Leder M, Payne R (1980) The epidemiology of testicular cancer in young adults. *Am. J. Epidemiol* 112:232–246.
- Schrader C, Boehm A, Reiche A, Dietz A, Diet A, Mozet C, Wichmann G (2012) Combined effects of lapatinib and cisplatin on colony formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 32:3191–3199.
- Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, Lollini P, Lukas S, Benini S, Croci S, Perdichizzi S, Zambelli D, Serra M, García-Echeverría C, Hofmann F, Picci P (2005) Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer Res* 65:3868–3876.
- Sedrani R, Cottens S, Kallen J, Schuler W (1998) Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant. Proc* 30:2192–2194.
- Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R (1993) Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:11217–11221.
- Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265–7279.
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A (2011) Cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61:212–236.
- Skakkebaek NE (1972) Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 2:516–517.
- Skakkebaek NE (2004) Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. *Int. J. Androl* 27:189–191.

- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst* 82:1107–1112.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707–712.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med* 344:783–792.
- Soule S, Baldrige L, Kirkpatrick K, Cheng L, Gilbert JL, Smith LR, Thurston VC, Vance GH, Einhorn L, Miller K (2002) HER-2/neu expression in germ cell tumours. *J. Clin. Pathol* 55:656–658.
- Spierings DCJ, Vries EGE de, Vellenga E, Jong S de (2003) The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli. *J. Pathol* 200:137–148.
- Sun Y, Zheng S, Torossian A, Speirs CK, Schleicher S, Giacalone NJ, Carbone DP, Zhao Z, Lu B (2012) Role of Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling Pathway in Cisplatin-Resistant Lung Cancer Cells. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 82:e563.
- Swerdlow AJ, Higgins CD, Pike MC (1997) Risk of testicular cancer in cohort of boys with cryptorchidism. *BMJ* 314:1507–1511.
- Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M, Kobayashi M (2001) Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol. Cell. Biol* 21:5050–5062.
- Tarn C, Rink L, Merkel E, Fliedler D, Pathak H, Koumbi D, Testa JR, Eisenberg B, Mehren M von, Godwin AK (2008) Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:8387–8392.
- Tazzari PL, Tabellini G, Bortul R, Papa V, Evangelisti C, Grafone T, Martinelli G, McCubrey JA, Martelli AM (2007) The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells exhibiting autocrine insulin-like growth factor-I secretion. *Leukemia* 21:886–896.
- Thorup J, McLachlan R, Cortes D, Nation TR, Balic A, Southwell BR, Hutson JM (2010) What is new in cryptorchidism and hypospadias—a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. *Journal of Pediatric Surgery* 45:2074–2086.
- Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, Keppler BK (2006) Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem. Rev* 106:2224–2248.
- Trama A, Mallone S, Nicolai N, Necchi A, Schaapveld M, Gietema J, Znaor A, Ardanaz E, Berrino F (2011) Burden of testicular, paratesticular and extragonadal germ cell tumours in Europe. *European Journal of Cancer*.
- Traxler P (2004) AEE788: A Dual Family Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB2 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity. *Cancer Research* 64:4931–4941.
- Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG (1998) The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* 58:3579–3585.

- van de Geijn GM, Hersmus R, Looijenga LHJ (2009) Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 87:96–113.
- Vander Haar E, Lee S, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol* 9:316–323.
- Velasco A, Corvalan A, Wistuba II, Riquelme E, Chuaqui R, Majerson A, Leach FS (2008) Mismatch repair expression in testicular cancer predicts recurrence and survival. *Int. J. Cancer* 122:1774–1777.
- Viglietto G, Romano A, Maglione D, Rambaldi M, Paoletti I, Lago CT, Califano D, Monaco C, Mineo A, Santelli G, Manzo G, Botti G, Chiappetta G, Persico MG (1996) Neovascularization in human germ cell tumors correlates with a marked increase in the expression of the vascular endothelial growth factor but not the placenta-derived growth factor. *Oncogene* 13:577–587.
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 12:385–392.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307–310.
- Vogelzang NJ, Bronson D, Savino D, Vessella RL, Fraley EF (1985) A human embryonal-yolk sac carcinoma model system in athymic mice. *Cancer* 55:2584–2593.
- Wang H, Zhang S, Wang S, Lu J, Wu W, Weng L, Chen D, Zhang Y, Lu Z, Yang J, Chen Y, Zhang X, Chen X, Xi C, Lu D, Zhao S (2009) REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: the potential of its RNAi for synergistic therapy. *Neuro-oncology* 11:790–802.
- Wang L, Yamaguchi S, Burstein MD, Terashima K, Chang K, Ng H, Nakamura H, He Z, Doddapaneni H, Lewis L, Wang M, Suzuki T, Nishikawa R, Natsume A, Terasaka S, Dauser R, Whitehead W, Adekunle A, Sun J, Qiao Y, Marth G, Muzny DM, Gibbs RA, Leal SM, Wheeler DA, Lau CC (2014) Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. *Nature* 511:241–245.
- Wang X, Zhang S, MacLennan GT, Biermann K, Foster RS, Beck SD, Cheng L (2008) Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in the chemorefractory metastatic embryonal carcinoma. *Mod Pathol* 22:7–12.
- Wang ZG, Fukazawa T, Nishikawa T, Watanabe N, Sakurama K, Motoki T, Hatakeyama S, Omori O, Ohara T, Tanabe S, Fujiwara Y, Takaoka M, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Tanaka N, Naomoto Y (2010) RAD001 offers a therapeutic intervention through inhibition of mTOR as a potential strategy for esophageal cancer. *Oncol. Rep* 23:1167–1172.
- Wedel S, Hudak L, Seibel J, Juengel E, Tsaour I, Haferkamp A, Blaheta RA (2011) Combined targeting of the VEGFr/EGFr and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway delays cell cycle progression and alters adhesion behavior of prostate carcinoma cells. *Cancer Lett* 301:17–28.
- Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JRW, Wood RD, Köberle B (2004) Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 110:352–361.
- Williams J, Lucas PC, Griffith KA, Choi M, Fogoros S, Hu YY, Liu JR (2005) Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol. Oncol* 96:287–295.
- Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ (1987) Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N. Engl. J. Med* 316:1435–1440.
- Winter C, Albers P (2011) Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 7:43–53.

- Wolf S, Lorenz J, Mössner J, Wiedmann M (2010) Treatment of biliary tract cancer with NVP-AEW541: mechanisms of action and resistance. *World J. Gastroenterol* 16:156–166.
- Wu GS, Burns TF, McDonald ER, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G, el-Deiry WS (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet* 17:141–143.
- Yakar S, LeRoith D, Brodt P (2005) The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:407–420.
- Yamaguchi H, Hsu JL, Chen C, Wang Y, Hsu M, Chang S, Du Y, Ko H, Herbst R, Hung M (2013) Caspase-Independent Cell Death Is Involved in the Negative Effect of EGF Receptor Inhibitors on Cisplatin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* 19:845–854.
- Yao JC, Lagunes DR, Kulke MH (2013) Targeted therapies in neuroendocrine tumors (NET): clinical trial challenges and lessons learned. *Oncologist* 18:525–532.
- Ying L, Zu-an Z, Qing-hua L, Qing-yan K, Lei L, Tao C, Yong-ping W (2014) RAD001 can reverse drug resistance of SGC7901/DDP cells. *Tumor Biol* 35:9171–9177.
- Younes MN, Park YW, Yazici YD, Gu M, Santillan AA, Nong X, Kim S, Jasser SA, El-Naggar AK, Myers JN (2006) Concomitant inhibition of epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases reduces growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Mol. Cancer Ther* 5:2696–2705.
- Zamble DB, Mikata Y, Eng CH, Sandman KE, Lippard SJ (2002) Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J. Inorg. Biochem* 91:451–462.
- Zhou H, Luo Y, Huang S (2010) Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* 10:571–581.
- Zumkeller W (2002) The insulin-like growth factor system in hematopoietic cells. *Leuk. Lymphoma* 43:487–491.

8 THESEN

- 1 Die untersuchten testikulären Keimzelltumorzelllinien weisen eine unterschiedliche Cisplatinempfindlichkeit auf.
- 2 Die Kinaseinhibitoren RAD001, AEW541 und AEE788 zeigen *in vitro* in den verschiedenen Keimzelltumorzelllinien ein unterschiedliches zytotoxisches Potential.
- 3 Die Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung als spezifischer Wirkmechanismus der untersuchten *targeted drugs* lässt sich im Western Blot nur für RAD001 und AEE788 belegen.
- 4 Eine Korrelation zwischen der Expression und Aktivierung der Zielproteine und der Sensitivität der einzelnen Zelllinien gegenüber den Kinaseinhibitoren ist nur vereinzelt nachweisbar.
- 5 Durch die Kombination von Cisplatin mit RAD001, AEW541 und AEE788 gelingt es nicht, die Cisplatinresistenz der untersuchten resistenten testikulären Keimzelltumorzelllinien zu überwinden. In der cisplatinresistenten Zelllinie 1411HP zeigt sich jedoch ein additiver Effekt mit synergistischer Tendenz.
- 6 Die Kombination von RAD001 mit AEW541 oder AEE788 zeigt in der cisplatinresistenten Zelllinie 1411HP additive Effekte.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Judith Schaffrath
geboren am 13.10.1986 in Neuhaus am Rennweg
wohnhaft in Halle (Saale)
ledig

SCHULE

1993 - 1997	Staatliche Grundschule Neuhaus am Rennweg
1997 - 2001	Staatliches Gymnasium Neuhaus am Rennweg
2001 - 2003 und 2004 - 2006	Goetheschule Ilmenau Staatliches Gymnasium mit mathematisch-naturwissenschaftlichen Spezialklassen
2003 - 2004	Silverado High School, Las Vegas, NV (USA)
2006	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

2006 - 2013	Studium der Humanmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2009 - 2013	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
2009 - 2013	Experimentelle Arbeit im Rahmen der Promotion Landeszentrum für Zell- und Gentherapie, Klinik für Innere Medizin IV Universitätsklinikum Halle (Saale)
2012 - 2013	Praktisches Jahr Innere Medizin: Hämatologie und Onkologie, HELIOS Klinikum Erfurt Chirurgie: Allgemein Chirurgie, Krankenhaus Bozen (Italien) Wahlfach: Strahlentherapie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
2013	2. Staatsexamen und Approbation

BERUF

seit 2013	Ärztin in Weiterbildung Klinik für Innere Medizin IV – Hämatologie und Onkologie Universitätsklinikum Halle (Saale)
-----------	---

Halle (Saale) im März 2016

Judith Schaffrath

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in den Jahren 2009 bis 2013 im Hämatologisch-onkologischen Forschungslabor der Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin IV an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen unter Angabe der Autoren als solche gekennzeichnet und vollständig angegeben wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachte Dienstleistungen als solche aufgeführt.

Halle (Saale) im März 2016

Judith Schaffrath

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift an keiner anderen Universität oder Hochschule zur Promotion eingereicht wurde. Weiterhin versichere ich, dass an keiner anderen Medizinischen Fakultät ein Promotionsverfahren anhängig ist oder war.

Halle (Saale) im März 2016

Judith Schaffrath

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mich während der Entstehung der vorliegenden Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Umsetzung dieser Arbeit im Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, sowie Herrn Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow für die fortwährende Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Müller für seine jederzeit interessierte, hilfreiche und freundliche Betreuung im gesamten Verlauf dieser Arbeit und seine fachliche Unterstützung bei allen inhaltlichen und methodischen Fragen.

Herrn PD Dr. Lutz P. Müller danke ich für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die anhaltende Motivation.

Ein großes Dankeschön geht an Franziska Reipsch, Katrin Nerger, Miriam Widder und Dr. Henrike Caysa für ihre Hilfsbereitschaft – und Geduld – beim Erlernen der praktischen Fähigkeiten, bei der Durchführung der Versuche und der Auswertung der Daten, vor allem aber für die stets herzliche, humorvolle und lockere Atmosphäre im Labor.

Meinen lieben Freunden danke ich für das entgegengebrachte Verständnis, das Ertragen meiner Launen und die kleinen Ablenkungen zur rechten Zeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets gefördert und mir so meinen Weg ermöglicht haben. Ich danke Euch für Eure jahrelange, bedingungslose Unterstützung, Eure ganz praktische Hilfe in allen Lebenslagen, Eure schier endlose Geduld und Euer uneingeschränktes Vertrauen.