

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München - Campus Großhadern

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

***In vitro*-Untersuchungen zur vertikalen AKT-mTOR-Inhibition
in Kombination mit Hyperthermie in humanen Sarkomzelllinien**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Ismann

aus

München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Lars H. Lindner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Roland Dürr
Prof. Dr. med. Markus Guba

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Eric Kampmann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2016

1. Inhaltsverzeichnis

2. Abbildungsverzeichnis.....	3
3. Tabellenverzeichnis.....	4
4. Abkürzungsverzeichnis.....	5
5. Einleitung	9
5. 1. Weichteilsarkome.....	9
5.1.1. Epidemiologie.....	9
5.1.2. Stadieneinteilung der Weichteilsarkome	10
5.1.3. Prognostische Faktoren.....	11
5.1.4. Therapie des Weichteilsarkoms.....	12
5. 2. AKT-mTOR-Signaltransduktionsweg.....	15
5.2.1. Aktivierung und Funktion des AKT-mTOR-Signaltransduktionsweges.....	15
5.2.2. Die Proteinkinase AKT und die mTOR-Komplexe 1 und 2.....	16
5.2.3. Weitere downstream targets von AKT	17
5.2.4. Dysfunktionen von AKT-mTOR-Signalwegkomponenten in Malignomen.....	18
5.2.5. Rapamycin-induzierte AKT-Aktivierung	20
5. 3. Alkylphosphocholine	21
5.3.1. Chemische Struktur	21
5.3.2. Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine.....	23
5.3.3. Klinische Anwendung	24
5. 4. mTOR-Inhibitoren	26
5.4.1. Wirkmechanismen der mTOR-Inhibitoren.....	26
5.4.2. Klinische Anwendung	27
5.4.3. Temsirolimus (CCI-779).....	28
5.4.4. Everolimus (RAD001).....	29
5. 5. Regionale Hyperthermie	30
6. Zielsetzung.....	34
7. Material und Methoden.....	35
7.1. Materialien	35
7.1.1. Chemikalien.....	35
7.1.2. Gerätschaften.....	36
7.1.3. Weitere Materialien	37
7.1.4. Kits.....	37
7.1.5. Software	37
7.1.6. Proteinmarker	37
7.1.7. Puffer und Lösungen	38

7.2. Zellkultur	39
7.2.1. Allgemeine Zellkultur	39
7.2.2. Kultivierung der verwendeten Zelllinien	40
7.2.3. Kryokonservierung.....	41
7.2.4. Auftauen.....	41
7.2.5. Hitzeschock.....	41
7.3. Viabilitätsassay WST-1	41
7.4. Klonogener Assay.....	42
7.5. mTOR-Inhibitoren und Alkylphosphocholine	43
7.5.1 mTOR-Inhibitoren.....	43
7.5.2. Alkylphosphocholine.....	43
7.6. Western Blot	44
7.7. Statistik.....	46
8. Ergebnisse	47
8.1. WST1-Assay.....	47
8.1.1. WST1-Assay: Sensitivität von SW-872 gegenüber den Einzelsubstanzen.....	47
8.1.2. WST1-Assay: Sensitivität von weiteren Sarkomzelllinien gegenüber den mTOR-Inhibitoren	49
8.1.3. WST1-Assay: Sensitivitäten der Zelllinien SW-982, Skut-1, MRC-5 und BN-175 gegenüber Perifosin und Erufosin in den im Rahmen der Voruntersuchungen ermittelten Konzentrationen	50
8.1.4. WST1-Assay: Kombination von AKT- und mTOR-Inhibition.....	52
8.2. Klonogene Assays	57
8.2.1. Klonogene Assays zur Überprüfung der Beobachtungen im WST1-Assay	57
8.2.2. Klonogene Assays mit Hyperthermie	61
8.3. Western blots.....	64
9. Diskussion.....	70
9.1. Diskussion der Ergebnisse.....	71
9.1.1. WST-1 Assays.....	71
9.1.2. Klonogene Assays ohne Hyperthermie.....	76
9.1.3. Klonogene Assays mit Hyperthermie	78
9.1.4. Western blots	81
10. Zusammenfassung und Ausblick.....	83
11. Literaturverzeichnis	85
12. Danksagung	104

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Von aktivem (phosphoryliertem) AKT ausgehende Signaltransduktion	18
Abbildung 2: Strukturformeln von Lysophosphatidylcholin (links) und den APC's: Erucylphosphohomocholin (Erufosin) (Mitte) sowie Perifosin (rechts)	22
Abbildung 3: Behandlungsschema WST1-Viabilitätsassay	47
Abbildung 4: Viabilitäten von SW-872 Zellen im WST-1 Assay; Liniendiagramm.....	48
Abbildung 5: Viabilitäten von SW-872-Zellen im WST1-Assay nach Erufosinbehandlung; Liniendiagramm.....	49
Abbildung 6: Viabilitäten von MRC-5, SW-982, Skut-1, BN-175 nach mTOR-Inhibition; Liniendiagramm.....	50
Abbildung 7: Viabilitäten von SW-982, Skut-1, MRC-5 und BN-175 nach AKT-Inhibition mittels Perifosin und Erufosin; Balkendiagramme	52
Abbildung 8: Reaktionsmuster eins im WST-1 Assay auf Kombination von mTOR- und AKT-Inhibition; Liniendiagramm.....	53
Abbildung 9: Reaktionsmuster zwei im WST-1 Assay auf Kombination von mTOR- und AKT-Inhibition; Liniendiagramm.....	55
Abbildung 10: Reaktionsmuster drei im WST-1 Assay auf Kombination von mTOR- und AKT-Inhibition; Liniendiagramm.....	57
Abbildung 11: Zeitlicher experimenteller Aufbau der klonogenen Assays	58
Abbildung 12: Klonogenes Überleben von SW-872, Skut-1, BN-175 nach Behandlung mit Alkylphosphocholinen; Balkendiagramm	58
Abbildung 13: Klonogenes Überleben von SW872, Skut-1, BN-175 nach Behandlung mit Everolimus (RAD001); Liniendiagramm.....	59
Abbildung 14: Klonogenes Überleben von SW-872 (A), Skut-1 (B) und BN-175 nach Behandlung mit Everolimus und Perifosin beziehungsweise Everolimus und Erufosin; Liniendiagramme	60
Abbildung 15: Zeitlicher experimenteller Aufbau der klonogenen Assays mit Hitzeschock ..	61
Abbildung 16: Klonogenes Überleben von SW-872, Skut-1, BN-175 nach 90-minütigem Hitzeschock; Liniendiagramm.....	62
Abbildung 17: Klonogenes Überleben von SW-872, Skut-1 und BN-175 nach verschiedenen Behandlungskombinationen; Liniendiagramme.	63
Abbildung 18: Zeitlicher experimenteller Aufbau der Western Blot Analysen	64
Abbildung 19: Western blot von p-AKT(Ser473) und p-S6 bei Skut-1 Zellen; A) Repräsentativer Western blot; B) Balkendiagramm.	66
Abbildung 20: Western blot von phospho-GSK3 α (Ser21) bei Skut-1 Zellen A) Repräsentativer Western blot; B) Balkendiagramm.	68

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subtypen der Weichteilsarkome beim Erwachsenen.....	10
Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Sarkome nach UICC/AJCC 2010.....	11
Tabelle 3: UICC-Klassifikation der Sarkome nach UICC 2002.....	11
Tabelle 4: Bestandteile des AKT-mTOR-Signalweges (links), welche als Produkte von Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen an der Tumorgenese diverser Tumoren (rechts) beteiligt sind und häufigste Dysfunktionen (Mitte).....	19
Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.....	39
Tabelle 6: Antikörper für <i>Western blots</i> (<i>Cell signalling</i> ®):.....	46

4. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ; deutsch: Varianzanalyse
APC	Alkylphosphocholin
APS	Ammoniumpersulfat
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> ; deutsch: Bicinchoninsäure
BRCA2	<i>Breast Cancer early onset 2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> ; deutsch: Rinderserumalbumin
CT	Computertomographie
CTP	Cytidintriphosphat
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modifies eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbisaminoethylethertetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extacellular signal-regulated kinase</i>
ErPC3	Erucylphosphohomocholin
4E-BP1	<i>Eukaryotic initiation factor 4E binding protein</i>
eIF-4B	<i>Eukaryotic initiation factor 4B</i>
eIF-4E	<i>Eukaryotic initiation factor 4E</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>

EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> ; deutsch: Fetales Kälberserum
FKBP	<i>FK506 binding protein</i>
FKBP12	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
FNCLCC	<i>Fédération Nationale des Centres de Lutte le Cancer</i>
GSK3 α	Glykogensynthasekinase-3 α
GTP	Guanosintriphosphat
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HPF	<i>High-power fields</i>
HSP	Hitzeschockprotein
LC50/25	Letale Konzentration 50/25
IGF1/2	<i>Insuline like growth factor 1/2</i>
IGF-R1	<i>Insuline-like growth factor receptor 1</i>
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
i.v.	Intravenös
JNK	<i>C-Jun amino-terminal kinases</i>
kD	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEME	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
MLST8	<i>Mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
mRNS	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
mSIN1	<i>Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mTOR	<i>Mammalian/Mechanistic target of rapamycin</i>

mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
p70S6K	p70 Ribosomale Protein S6 Kinase 1
PARP	Poly-adenosindiphosphat-ribose-polymerase
PBS	<i>Dulbecco's Phosphat buffered saline</i>
PDK-1/2	<i>Phosphoinositide-dependent kinase - 1/2</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat
PRAS40	<i>Proline-rich AKT1 substrate 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin</i>
RNS	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAPK	<i>Stress-activated protein kinases</i>

S6K1	Ribosomale Protein S6 Kinase 1
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNS	<i>Short interfering Ribonukleinsäure</i>
S-Phase	Synthese-Phase
STS	<i>Soft tissue Sarcoma</i> ; deutsch: Weichteilsarkom
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis complex 1/2</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UPS	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WST	<i>Water-soluble tetrazolium salt</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

5. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden *in vitro* Daten zur kombinierten Inhibition (Doppelinhibition) des AKT-mTOR-Signalweges in Sarkomzelllinien unter Verwendung von Rapamycinderivaten und Alkylphosphocholinen präsentiert. Des Weiteren werden erstmalig Daten zu dieser Doppelinhibition in Kombination mit Hyperthermiebehandlungen vorgestellt.

5. 1. Weichteilsarkome

5.1.1. Epidemiologie

Weichteilsarkome sind eine seltene und heterogene Gruppe von malignen Tumoren. Als Weichteilsarkome werden alle malignen nicht-epithelialen und extraskelettalen Tumoren bezeichnet. Ausgenommen hiervon sind die Tumoren der Glia und des retikuloendothelialen Systems (Fletcher 2014, Fletcher et al. 2013).

Weichteilsarkome, kurz *STS* für die englische Bezeichnung „*soft tissue sarcomas*“, gehören zu den seltenen Krebserkrankungen (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014). Die Inzidenz der Weichteilsarkome beträgt etwa 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, Samartzis et al. 2013). Damit machen die Weichteilsarkome bei den Krebserkrankungen des Erwachsenen nur etwa 1%, bei denen des Kindesalters etwa 15% aus (Jemal et al. 2010). Für ihr Auftreten gibt es nur wenige bekannte Risikofaktoren. Zu diesen gehört die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und damit auch eine stattgehabte Strahlentherapie (Brady et al. 1992, Samartzis et al. 2013). Ein weiterer bekannter Risikofaktor ist eine Erkrankung an Neurofibromatose vom Typ 1. Bei Patienten mit diesem autosomal dominant vererbten neurokutanem Syndrom besteht ein stark erhöhtes Risiko für das Auftreten von malignen peripheren Nervenscheidentumoren, einer Subentität der Weichteilsarkome mit insgesamt schlechter Prognose (Ferner and Gutmann 2002). Ebenso geht das Li-Fraumeni-Syndrom mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Erkrankung an Weichteil- oder Knochensarkomen einher (Frank 2004).

Weichteilsarkome können am gesamten Körper auftreten (Clark et al. 2005). Spezifische Frühsymptome gibt es nicht. Sarkome treten klinisch meist durch eine lokale, nur teilweise schmerzhaft Schwellung oder durch lokale Beschwerden infolge Kompression oder Destruktion benachbarter anatomischer Strukturen wie Nerven, Blutgefäßen oder Hohlorganen in Erscheinung. Etwa 60% der Sarkome sind an den Extremitäten lokalisiert. Am häufigsten ist die untere Extremität, gefolgt von der oberen, betroffen. Weitere Manifestationsorte sind der Körperstamm und das Retroperitoneum. Etwa 35 % der Sarkome

treten hier auf. Der Rest der Sarkome wird im Kopf-Hals-Bereich oder dem Mediastinum beobachtet (Clark et al. 2005, Lawrence et al. 1987).

Die WHO-Klassifikation der Weichgewebs- und Knochentumoren von 2013 unterscheidet insgesamt weit mehr als 100 Tumoren des Weichgewebes (Fletcher et al. 2013). Darunter fallen auch die Weichteilsarkome (Petersen 2013). Die verschiedenen Subtypen der Weichteilsarkome treten hierbei mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Die drei häufigsten Subtypen sind das Leiomyosarkom, das Liposarkom und das undifferenzierte pleomorphe Sarkom (Lawrence et al. 1987). Die undifferenzierten pleomorphen Sarkome umfassen hierbei eine Vielzahl von histologischen Subtypen, welche mittels immunhistochemischer Untersuchungen keiner Liniendifferenzierung zugeordnet werden können. Zu ihnen zählt unter anderem die früher als malignes fibröses Histiozytom bezeichnete Neoplasie (Petersen 2013). Einen Überblick über die häufigsten Subtypen der Weichteilsarkome gibt Tabelle 1:

Tabelle 1: Subtypen der Weichteilsarkome beim Erwachsenen (Ducimetiere et al. 2011, Lawrence et al. 1987)

Subtyp	Relative Häufigkeit
Leiomyosarkom	15%
Undifferenziertes pleomorphes Sarkom (UPS)	15%
Liposarkom	10 - 15%
Synoviales Sarkom	5%
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	3 - 5%
Angiosarkom	3%
Rhabdomyosarkom	3%
Myxofibrosarkom	2%
Klarzellsarkom	1%
Alveoläres Weichteilsarkom	1%

5.1.2. Stadieneinteilung der Weichteilsarkome

Die Angabe des Erkrankungsstadiums bei Sarkomen kann anhand der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 2) und der auf der TNM-Klassifikation aufbauenden *Union internationale contre le cancer* (UICC) Klassifikation (Tabelle 3) erfolgen (Clark et al. 2005, von Mehren et al. 2014).

Sarkome zeichnen sich als maligne Tumoren neben ihrem lokal infiltrativen und destruierenden Wachstum, vor allem durch ihre Fähigkeit aus, hämatogen und lymphogen zu metastasieren. Der häufigste Ort für das Auftreten von hämatogenen Fernmetastasen ist

die Lunge, aber auch alle anderen Organe können von einer Metastasierung betroffen sein. Eine lymphogene Metastasierung kann vorkommen, ist jedoch wesentlich seltener als bei Karzinomen. Bei Vorliegen von Fernmetastasen verschlechtert sich die Prognose erheblich (van Glabbeke et al. 1999).

Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Sarkome nach UICC/AJCC 2010 (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014)

TX	Fehlende Beurteilbarkeit des Primarius
T0	Kein Nachweis eines Primarius
T1 a/b*	Tumordurchmesser < 5 cm
T2 a/b*	Tumordurchmesser > 5 cm
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	Fernmetastasen

* a: oberflächliche Lage bezogen auf lokale Faszie * b: tiefe Lage jeweils bezogen auf lokale Faszie

Tabelle 3: UICC-Klassifikation der Sarkome nach UICC 2002 (Clark et al. 2005, ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014)

UICC-Stadium	UICC-Grading	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
Stadium I A	G 1, 2	T 1 a/b	N 0	M 0
Stadium I B	G 1, 2	T 2 a/b	N 0	M 0
Stadium II A	G 3, 4	T 1 a/b	N 0	M 0
Stadium II B	G 3, 4	T 2 a	N 0	M 0
Stadium III	G 3, 4	T 2 b T 2 b	N 0 N 1	M 0 M 0
Stadium IV	jedes G	jedes T	jedes N	M1

5.1.3. Prognostische Faktoren

Prognostische Bedeutung bei Weichteilsarkomen haben unter anderem die Tumorgröße (T1 oder T2 nach TNM) und die Lage des Tumors zur Faszie (a oder b nach TNM), wobei hierbei zwischen oberflächlich (a) und tief (b) unterschieden wird (Clark et al. 2005). Ein weiterer

entscheidender prognostischer Faktor ist das sogenannte histopathologische *Grading* (Coindre 2006, van Glabbeke et al. 1999). Das dreistufige *Grading*-System der FNCLCC (*Fédération Nationale des Centres de Lutte le Cancer*) berücksichtigt hierbei drei Kriterien, welche im Rahmen der histopathologischen Begutachtung des exzidierten Sarkomes oder einer repräsentativen Tumorbiopsie bewertet werden. Diese sind die Anzahl der Mitosen pro 10 *high-power fields* (Hauptgesichtsfelder), das heißt der durch ein Mikroskop sichtbare Ausschnitt eines Präparates bei 400-facher Vergrößerung, das prozentuale Ausmaß an Nekrosen und zuletzt der histologische Subtyp des Sarkomes (Coindre 2006). Für jedes Kriterium werden definierte Punktzahlen vergeben. Die Punkte werden anschließend addiert. Je höher die Punktezahl, desto höher das *Grading* des betreffenden Sarkoms (Coindre 2006). Das Risiko einer Metastasierung ist bei G2 und G3 Sarkomen signifikant höher als bei G1 Sarkomen (Coindre 2006). G1 Tumoren haben verglichen mit G2 und G3 Tumoren eine bessere Prognose. Die Prognose der G2 Tumoren ist wiederum besser als die der G3 Tumoren (Kattan et al. 2002, Zagars et al. 2003). Liegen in einem Tumor unterschiedlich zu bewertende Areale vor, so wird zur G-Klassifizierung des Tumors das Areal mit dem entsprechend höchstem *Grading* herangezogen (Clark et al. 2005). Weitere prognostische Faktoren sind das Patientenalter sowie der Sicherheitsabstand nach einer erfolgten operativen Resektion (Gronchi et al. 2010).

Ein hohes *Grading*, das heißt G2 oder G3 nach FNCLCC, eine Tumorgöße von über 5 cm (T2) und eine tiefe Lage im Bezug zur Faszie (b) stellen Risikofaktoren für einen prognostisch ungünstigen Verlauf der Erkrankung dar (Clark et al. 2005, Kattan et al. 2002). Es lässt sich in dieser Situation selbst bei einem nicht metastasierten Weichteilsarkom von einer Erkrankung mit hohem Risiko für einen ungünstigen prognostischen Verlauf sprechen (Clark et al. 2005, Issels et al. 2010, Pisters et al. 1996). Hier besteht die Indikation zu einem intensivierten multimodalen therapeutischen Vorgehen unter Einbeziehung von Strahlentherapie, Chemotherapie, Operation und optional der regionalen Hyperthermie (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, Issels et al. 2010, von Mehren et al. 2014).

5.1.4. Therapie des Weichteilsarkoms

Die Therapie von Weichteilsarkomen ist primär abhängig vom Erkrankungsstadium (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Die Therapie sollte aufgrund der Seltenheit der Erkrankung in einem spezialisierten interdisziplinären Zentrum erfolgen. Die Therapieoptionen beinhalten neben der Chirurgie die Strahlentherapie und die medikamentöse Tumorthherapie (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014).

Im Stadium I nach UICC ist eine chirurgische Resektion im Gesunden (R0-Resektion) die Therapie der Wahl. Sollte nur eine R1- oder R2-Situation erfolgt sein, das heißt, dass der Tumor mikroskopisch bis an den Absetzungsrand des Resektates heranreicht (R1), oder gar ein makroskopischer Tumorrest *in situ* verblieben ist (R2), ist bei fehlender Möglichkeit einer Nachresektion eine postoperative Strahlentherapie indiziert (Alektiar et al. 2000, Kraybill et al. 2010, Kraybill et al. 2006).

Essenzieller Bestandteil der Therapie beim Hochrisikoweichteilsarkom im Stadium II und III ist die Strahlentherapie (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Die präoperative Strahlentherapie unterscheidet sich hierbei hauptsächlich hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen von der postoperativen (O'Sullivan et al. 2002). In bestimmten Situationen, wie beim retroperitonealen oder intraabdominellen Weichteilsarkom, ist eine präoperative Strahlentherapie durchzuführen, da nach einer Operation strahlenempfindliche Organe wie etwa der Dünndarm im Strahlenfeld befindlich sein können und damit eine absolute Kontraindikation für eine Strahlentherapie darstellen könnten. Beim Hochrisikoweichteilsarkom im Stadium II und III ist neben der Strahlentherapie eine neoadjuvante Chemotherapie heutzutage eine leitliniengerechte Therapieoption (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Untersucht wurden in prospektiven wie retrospektiven Studien unterschiedliche Kombinationstherapien, welche die Zytostatika Doxorubicin, Ifosfamid, Etoposid, Dacarbazin oder Cyclophosphamid enthielten (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, Gortzak et al. 2001, Issels et al. 2010, Kraybill et al. 2006, Pisters et al. 1997). Durch die neoadjuvante Therapie soll im besten Falle im Rahmen eines Therapieansprechens eine partielle oder komplette Remission, also eine Verkleinerung des Tumors, und damit eine leichtere Operabilität und somit ein besseres Operationsergebnis erreicht werden. Zumindest soll durch die neoadjuvante Chemotherapie ein lokaler und systemischer Progressionsarrest erreicht werden. Ein weiteres Ziel der neoadjuvanten Chemotherapie ist die Behandlung und Eradikation radiologisch nicht detektierbarer Mikrometastasen. Unter der neoadjuvanten Chemotherapie besteht jedoch stets ein gewisses Risiko einer Krankheitsprogression. Das Ausmaß dieses Risikos ist hierbei abhängig von den verwendeten Zytostatika (Gortzak et al. 2001, Issels et al. 2010, Kraybill et al. 2006).

Der Stellenwert einer adjuvanten Chemotherapie ist aufgrund der bestehenden Datenlage derzeit ein kontrovers diskutiertes Thema. Eine große Metaanalyse von 18 Studien mit insgesamt 1953 Patientin ergab einen statistisch signifikanten, jedoch nur geringfügigen Vorteil einer adjuvanten Kombinationstherapie mittels Doxorubicin und Ifosfamid bezüglich des lokalen progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens (Pervaiz et al. 2008). Eine weitere Metaanalyse sowie eine groß angelegte retrospektive Analyse zeigten ebenfalls

nur geringfügige Vorteile einer adjuvanten Chemotherapie bezüglich des Gesamtüberlebens für Patienten mit Extremitätensarkomen oder G3 Tumoren (Italiano et al. 2010, SMAC 1997). Die neueste prospektive Studie zu diesem Thema zeigte bei einer adjuvanten Chemotherapie mittels 5 Zyklen Doxorubicin und Ifosfamid keine Vorteile bezüglich der Endpunkte Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben. Eine in diese Arbeit integrierte Metaanalyse zeigte jedoch vor allem für die Patientensubgruppen mit großen Tumoren und G3-Tumoren Überlebensvorteile durch eine adjuvante Chemotherapie (Woll et al. 2012). In den aktuellen Leitlinien der *European Society of Medical oncology* (ESMO) und des *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) wird die adjuvante Chemotherapie derzeit nicht als Standard empfohlen (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014).

Eine Chemotherapie mittels Ifosfamid, Adriamycin und Etoposid in der Neoadjuvanz und der Adjuvanz beim Hochrisikoweichteilsarkom im UICC-Stadium II oder III zeigte in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie im Rahmen einer randomisierten Phase III Studie der EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) Vorteile beim lokalen progressionsfreien Überleben sowie beim krankheitsfreien Überleben (Issels et al. 2010). Die zugehörigen Langzeitanalysen, welche 2015 auf dem ESMO-Kongress präsentiert wurden, ergaben im Hyperthermiearm auch Vorteile im Gesamtüberleben (Issels et al. 2015). Daher gilt die Kombination der Chemotherapie mit der regionalen Hyperthermie als mögliche Therapieoption und hat Aufnahme in die aktuellen ESMO- und NCCN-Leitlinien gefunden (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Die Prognose des Hochrisikoweichteilsarkoms ist jedoch auch nach Abschluss einer derartigen multimodalen Therapie ernst. Die 5-Jahresüberlebensraten liegen abhängig von der Lokalisation bei nur 50% (Retroperitoneum) bis 75% (Extremitäten) (Issels et al. 2001).

Im Stadium IV ist der Therapieansatz beim Weichteilsarkom in der überwiegenden Zahl der Fälle palliativer Natur. Bei oligo-metastasierter Erkrankung kann versucht werden, in kurativer Intention Metastasen radikal zu reseziieren. Pulmonale Metastasen werden hierbei entweder primär oder nach präoperativer Chemotherapie, extrapulmonale bevorzugt nach einer präoperativen Chemotherapie reseziert (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014). Bei Vorliegen von multiplen Metastasen ohne Möglichkeit einer kompletten und onkologisch sinnvollen R0-Resektion ist der Therapieansatz stets palliativer Natur. Hier spielen die medikamentöse palliative Chemotherapie, palliative Strahlentherapie und supportive Maßnahmen die Hauptrollen. In der Erstlinie wird Doxorubicin als Monosubstanz verwendet (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Bei hohem Remissionsdruck kann Doxorubicin kombiniert mit Ifosfamid eingesetzt werden.

Hierbei bestehen höhere Chancen auf eine partielle Remission und Vorteile im progressionsfreien Überleben verglichen mit einer Doxorubicinmonotherapie. Eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens wird durch die Kombinationstherapie nicht erreicht (Judson et al. 2014, Verma et al. 2008). Beim seltenen Angiosarkom spielt Paclitaxel als nicht zugelassene *off-label* Therapie ebenfalls eine wichtige Rolle (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, Penel et al. 2008). In der Zweitlinie finden sequenziell je nach Subentität des Sarkoms die in den aktuellen Leitlinien der ESMO empfohlenen Zytostatika Gemcitabin und Docetaxel (Maki et al. 2007) oder die Einzelsubstanzen Ifosfamid (Le Cesne et al. 1995), Trabectedin (Blay et al. 2014, Demetri et al. 2009), Pazopanib (van der Graaf et al. 2012) oder Dacarbazin (Fayette et al. 2009) Anwendung (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014). Als weitere Optionen stehen speziell für Patienten mit ausgeprägten Komorbiditäten oder nach Ausschöpfen der oben genannten Therapien gut verträgliche metronomisch, dies bedeutet regelmäßig täglich, verabreichte orale Therapien mittels Trofosfamid (Kollmannsberger et al. 1999) oder Cyclophosphamid und Prednisolon (Mir et al. 2011) zur Verfügung. Die klinische Erprobung weiterer Substanzen zur Therapie des Weichteilsarkomes ist derzeit weiter im Gange. Im Rahmen einer randomisierten Phase II Studie zeigte beispielsweise das Zytostatikum Eribulin gute Wirksamkeit (Schöffski et al. 2011). Im Rahmen einer daraufhin durchgeführten randomisierten Phase III Studie zeigte sich für Eribulin eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens im Vergleich zu Dacarbazin bei Patienten mit metastasierten Liposarkomen und Leiomyosarkomen (Schöffski et al. 2015).

Im metastasierten Stadium liegt das mediane Überleben abhängig vom histologischen Subtyp nur bei etwa 12 Monaten (van Glabbeke et al. 1999). Deshalb ist die Suche nach alternativen und neuen Behandlungsstrategien von großer Bedeutung. Im Rahmen diverser Studien wurden zu diesem Zwecke neben Inhibitoren der Proteinkinase mTOR auch die unter anderem als AKT-Inhibitoren wirksamen Alkylphosphocholine untersucht.

5. 2. AKT-mTOR-Signaltransduktionsweg

5.2.1. Aktivierung und Funktion des AKT-mTOR-Signaltransduktionsweges

Beim AKT-mTOR-Signalweg handelt es sich um einen pro-mitogenen Signaltransduktionsweg mit weitreichendem Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel. Zentrale Schlüsselproteine des Signalweges sind die beiden Kinasen AKT, auch Proteinkinase B genannt, und mTOR (Wan and Helman 2007).

Am Beginn steht, neben anderen Rezeptortyrosinkinasen, der Insulin-ähnliche Wachstumsrezeptor 1 (IGF-R1). Diese transmembranäre Rezeptortyrosinkinase besteht aus einer extrazellulär lokalisierten, ligandenbindenden α - sowie einer transmembranär und intrazellulär lokalisierten β -Untereinheit. Die Bindung der Liganden IGF1, IGF2 oder Insulin an den Rezeptor stellt das auslösende Ereignis für die Aktivierung mannigfaltiger intrazellulärer Signaltransduktionswege dar. Zu diesen Signalwegen gehört der AKT-mTOR-Signalweg (Martins et al. 2011). Diese Signaltransduktionskaskade weist bei malignen Neoplasien, insbesondere den Sarkomen, häufig einen dysregulierten Zustand auf. Eine gesteigerte Aktivität dieses Signalweges ist mit einer erhöhten Überlebensfähigkeit der Tumorzellen, sowie mit einem progressiven Tumorwachstum assoziiert (Baird et al. 2005, Blay 2011, Kelleher and Thomas 2012) und neben anderen Malignomen unter anderem bei Leiomyosarkomen (Hernando et al. 2007) und Myxofibrosarkomen (Takahashi et al. 2014) beschrieben.

Die Bindung von Liganden an die α -Einheit des IGF-R1 führt zu dessen Dimerisierung, gefolgt von trans-Autophosphorylierungen der intrazellulär gelegenen β -Untereinheiten und unter anderem unter Vermittlung des Adapterproteins IRS, zur Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktion über die heterodimere PI3-Kinase. Die Phosphorylierung des membrangebundenen PIP2 zum *second messenger* PIP3 durch die katalytische Untereinheit p110 der PI3-Kinase führt zur Rekrutierung der PDK-1 sowie von AKT an die Zellmembran. Die nun über PIP3 mit der Membran assoziierte PDK-1 phosphoryliert im Anschluss AKT am Threonin 308 und aktiviert es so teilweise. AKT ist als ein Bestandteil von mehreren Signaltransduktionskaskaden indirekt an der Aktivierung der beiden Komplexe mTORC1 und mTORC2 beteiligt. Wichtigster Gegenspieler der PI3-Kinase und damit der AKT-Aktivierung ist der Tumorsuppressor PTEN, welcher PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert und somit den Stimulus zur AKT-Phosphorylierung beendet (Populo et al. 2012, Wullschleger et al. 2006).

5.2.2. Die Proteinkinase AKT und die mTOR-Komplexe 1 und 2

AKT besitzt drei Untereinheiten, eine N-terminale PH-Domäne, welche mit PIP3 interagiert und damit die Rekrutierung von AKT an die Zellmembran vermittelt, eine zentrale Kinase-Domäne sowie eine C-terminale regulatorische Domäne, die den Threoninrest 308 enthält (Populo et al. 2012, Wullschleger et al. 2006). Die vollständige Aktivierung von AKT erfolgt erst im Zuge der Phosphorylierung am Serinrest 473, unter anderem durch den mTORC2 (Sarbasov et al. 2005, Wullschleger et al. 2006).

Zu den Zielstrukturen von AKT zählen TSC1 und TSC2. TSC2 wird AKT-abhängig phosphoryliert und dadurch in seiner Funktion gehemmt. Als Folge der Inhibition der von

TSC2 vermittelten Hemmung des monomeren G-Proteins Rheb, erfolgt über dieses die Aktivierung von mTORC1. Weitere Inhibitoren von TSC2 und damit mTORC1-Aktivatoren sind der Wnt- und der Ras-Signaltransduktionsweg (Powell et al. 2012, Saleiro and Platania 2015). Die 289 kD Serin/Threoninkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) liegt in zwei Komplexen im Zytosol vor. Zum einen als mTOR-Komplex 1, bestehend aus den Proteinen mTOR, RAPTOR, mLST8, PRAS40 und DEPTOR und zum anderen als mTOR Komplex 2, bestehend aus mTOR, Rictor, DEPTOR, mSin1 und mLST8. Die assoziierten Proteine übernehmen die Funktion von positiven oder negativen Regulatoren der Kinasedomäne von mTOR (Populo et al. 2012, Sarbassov et al. 2005). Die Eigenschaften der beiden mTOR-Komplexe sind unterschiedlich. Einerseits ist der Komplex 1 gegenüber der Inhibition durch Rapamycin und dessen Derivaten sensitiv, während der Komplex 2 durch Vertreter dieser Wirkstoffklasse nicht zu inhibieren ist. Zum anderen haben die beiden Komplexe unterschiedliche Zielproteine (Blay 2011, Wan and Helman 2007).

mTORC1 ist entscheidend an der Signaltransduktion downstream von AKT beteiligt. Seine Zielproteine sind 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein*) und die Protein S6-Kinase. Diese beiden Proteine leisten einen direkten Beitrag zu Zellwachstum und -Proliferation. Das 4E-BP1 bindet als Translationsrepressor den eukaryontischen Initiationsfaktor 4E. Erst durch die von mTORC1 katalysierte Hyperphosphorylierung des Proteins dissoziiert dieses vom Initiationsfaktor ab und erlaubt diesem die Ausübung seiner Funktion, nämlich die Bindung an die Cap-Struktur der eukaryontischen mRNA. Als Initiationsfaktor ist aktives eIF-4E mitverantwortlich für die Translation der mRNA diverser Proto-Onkogene. Auch das zweite Zielprotein von mTORC1, die p70S6-Kinase, ist durch die Phosphorylierungen des ribosomalen Proteins S6 sowie des eIF-4B aktiv an der Translation der mRNA verschiedenster Gene beteiligt. Die gesteigerte Translation der Genprodukte von Proto-Onkogenen wie C-Myc, Cyclin D1 oder HIF-1 α führt letztlich zu vermehrtem Zellwachstum, zu gesteigerter Zellproliferation sowie zu einer Zunahme der Expression anti-apoptotisch wirksamer Proteine (Populo et al. 2012, Wullschleger et al. 2006).

mTORC2 ist unter anderem an der Phosphorylierung von AKT an der zweiten und entscheidenden Phosphorylierungsstelle Serin 473 beteiligt. Damit ist der mTORC2 Teil einer positiven Rückkopplungs-Schleife, welche eine gesteigerte AKT-Signalgebung bewirkt. Die genauen Mechanismen dieser positiven Rückkopplungsschleife wurden bisher jedoch nicht abschließend aufgeklärt (Blay 2011, Martins et al. 2011).

5.2.3. Weitere *downstream targets* von AKT

Wichtig für das Verständnis der Bedeutung von AKT ist die Tatsache, dass der Einfluss der Kinase weit über eine Beteiligung am AKT-mTOR-Signalweg hinausgeht. AKT ist als

Serin/Threoninkinase mit vielfältigen Zielstrukturen an etlichen weiteren intrazellulären Signaltransduktionskaskaden und Vorgängen beteiligt (Manning and Cantley 2007).

Die bekanntesten dieser Signaltransduktionskaskaden sind die MAP-Kinase-Signalwege wie der ERK- und der JNK-Signaltransduktionsweg (Zimmermann and Moelling 1999). Über diese Signaltransduktionskaskaden übt AKT, neben seiner Beteiligung am mTOR-Signaltransduktionsweg, jeweils einen stimulierenden Einfluss auf Zellwachstum und -Proliferation aus (Manning and Cantley 2007, She et al. 2005). Auch unabhängig von Signaltransduktionswegen nimmt AKT positiven Einfluss auf das Zellüberleben und Inhibition der Apoptose. Beispielsweise wirkt AKT auch indirekt durch die Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins BAD der Apoptose entgegen (She et al. 2005).

AKT greift als regulatorische Proteinkinase des Weiteren in ausgeprägtem Maße in den zellulären Glukosemetabolismus (Elstrom et al. 2004) und die zelluläre Glukoseaufnahme ein (Calera et al. 1998, Kohn et al. 1996). Ein Ziel der Kinaseaktivität von AKT in diesem Kontext ist die GSK-3 α (Glykogensynthasekinase-3 α) (Cross et al. 1995). Diese wird durch die Phosphorylierung an der Position Serin 21 in ihrer Funktion inhibiert. So wird es der Glykogensynthase durch AKT ermöglicht, ihre Funktion ungehemmt auszuüben. Die Folge ist eine gesteigerte Glykogensynthese und damit die Auffüllung der intrazellulären Glykogenspeicher (Cross et al. 1995, Elstrom et al. 2004).

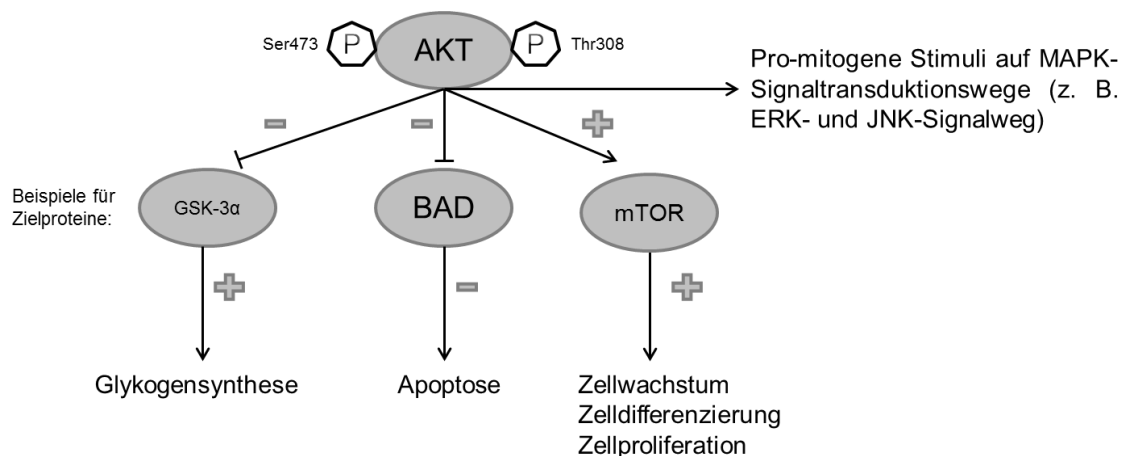


Abbildung 1: Von aktivem (phosphoryliertem) AKT ausgehende Signaltransduktion

5.2.4. Dysfunktionen von AKT-mTOR-Signalwegkomponenten in Malignomen

Viele der Gene der an oben beschriebener Signaltransduktionskaskade beteiligten Proteine, oberhalb oder unterhalb der mTOR-Ebene, sind Proto-Onkogene oder Tumorsuppressoren

und somit in manchen Fällen ursächlich beteiligt an der Pathogenese von neoplastischen Erkrankungen. Diese Neoplasien schließen auch diverse Sarkome mit ein. Beschrieben wurden beispielsweise ein Funktionsverlust von PTEN mit gesteigerter AKT-mTOR-Aktivität in Leiomyosarkom- und Myxofibrosarkomzellen (Hernando et al. 2007, Takahashi et al. 2014), sowie eine Überexpression von IGF-R1 in Synovialsarkomzelllinien und Rhabdomyosarkomzelllinien (Friedrichs et al. 2008, Martins et al. 2011). Die Aktivierung des Signalweges stellte sich zudem als ein negativer prognostischer Faktor dar (Blay 2011, Petricoin et al. 2007, Wan and Helman 2007). Ein Überblick wird in Tabelle 4 verschafft:

Tabelle 4: Bestandteile des AKT-mTOR-Signalweges (links), welche als Produkte von Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen an der Tumorgenese diverser Tumoren (rechts) beteiligt sind und häufigste Dysfunktionen (Mitte); Abkürzungen: PI3K: PI3-Kinase; PTEN: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten eIF-4E eukaryotic initiation factor 4E; S6K1: Protein S6 kinase 1 (Blay 2011, Wan and Helman 2007)

Protein	Dysfunktion	Tumorentität
IGF-R1	Amplifikation	Synovial-, Rhabdomyo-, Ewingsarkom
P110 Untereinheit von PI3K	Amplifikation oder aktivierende Mutation	Ovarial-, Endometriums-, Magen-Hepatozelluläres und Kolorektales Karzinom
P85 Untereinheit von PI3K	Aktivierende Mutation	Kolorektales und Ovarialkarzinom
PTEN	Aktivierende Mutation, Depletion oder Promotormethylierung	Leiomyosarkom, Harnblasen-, Mamma-, Prostata- Endometriumskarzinom, ZNS-Tumoren
AKT/Protein-kinase B	Amplifikation von <i>AKT1/2/3</i>	Versch. Tumoren
eIF-4E	Amplifikation	Versch. Tumoren
S6K1	Amplifikation	Versch. Tumoren

Angesichts dieser Bedeutung von Komponenten des AKT-mTOR-Signalweges für die Onkogenese unter anderem von Sarkomen, lässt sich leicht nachvollziehen, dass dieser Signalweg ein sinnvoll ausgewähltes molekularbiologisches Ziel zur Therapie dieser Gruppe von Malignomen darstellt. Die Inhibition des mTORC1 mittels Rapamycinderivaten, stellt ein logisches Konzept im Sinne einer gezielten Therapie zur Behandlung von Sarkompatienten dar. Die mTOR-Inhibitoren vom Rapamycintyp hemmen Zellwachstum und -proliferation. Sie induzieren des Weiteren einen Zellzyklusarrest (Blay 2011, Gallicchio et al. 2003, Juengel et al. 2009, Wan and Helman 2007).

5.2.5. Rapamycin-induzierte AKT-Aktivierung

Neben den Effekten auf Zellzyklus und Proliferation ist jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine durch Rapamycinderivate induzierte vermehrte AKT-Phosphorylierung an Position Serin 473 und damit eine Steigerung der AKT-Aktivität beschrieben worden (Imura et al. 2014). Diese AKT-Aktivierung wurde in etlichen Zelllinien von Malignomen sowie *in vivo* nach einer Therapie mittels Rapamycinderivaten nachgewiesen (Chen et al. 2010, O'Reilly et al. 2006, Sun et al. 2005). Es wird angenommen, dass es sich bei diesem Phänomen um ein in maligne transformierten Zellen gängiges Reaktionsmuster auf eine Behandlung mittels Rapamycinderivaten handelt. Diverse *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführte Untersuchungen bestätigen dieses Reaktionsmuster von malignen Zellen auf eine mTOR-Inhibition (Duan et al. 2014, Martin et al. 2007, Sun et al. 2005).

Die Inhibition des mTORC1, entweder durch Rapamycinderivate oder auch alternativ durch einen mittels siRNS induzierten *knockdown*, ist der Auslöser dieser positiven Rückkopplungsschleife (Wan and Helman 2007). Die beschriebene AKT-Hyperphosphorylierung ließ sich hierbei durch eine Hemmung der PI3-Kinase mittels LY294002 als auch durch Inaktivierung von IGFR-1 verhindern. Die beiden physiologischen AKT-Aktivatoren sind also an der beschriebenen Hyperphosphorylierung mit beteiligt (Sun et al. 2005, Wan and Helman 2007).

Ebenfalls an der Rückkopplungsschleife beteiligt zu sein, scheint das Adapterprotein IRS-1. Etliche an unterschiedlichsten Zelllinien durchgeführte Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass IRS-1 sowohl nach Behandlung mittels Rapamycin (Duan et al. 2014) als auch Temsirolimus (Shi et al. 2005) die beobachtete kompensatorische AKT-Aktivierung und Phosphorylierung mit vermittelt. Gezeigt werden konnte in diesem Kontext, dass eine mTOR-Inhibition die physiologische durch mTORC1- und S6K1-vermittelte Degradation von IRS-1 verminderte. Eine direkte Folge war eine vermehrte Aktivität der durch IRS-1 physiologischerweise aktivierten PI3-Kinase und konsekutiv eine vermehrte Aktivität von AKT (Martin et al. 2007).

Zahlreiche Studien haben sich mit dem Phänomen dieser kompensatorischen AKT-Phosphorylierung beschäftigt. Eine komplette Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus ist bislang allerdings nicht gelungen (Chen et al. 2010, Duan et al. 2014, O'Reilly et al. 2006, Sun et al. 2005, Wan and Helman 2007).

Die Folgen einer gesteigerten AKT-Aktivität im Zuge der genannten Rückkopplungsschleife mit Verstärkung der von AKT abhängigen Signalgebung sind vielfältig. Es resultiert zumindest eine Aktivierung der oben geschilderten, von AKT abhängigen pro-mitogenen

Signaltransduktionswege (Sun et al. 2005). Eine zumindest partielle Resistenz gegenüber einer mTORC1-Inhibition könnte bei den betroffenen Zellen in diesen apoptosehemmenden und proliferationsstimulierenden Signaltransduktionswegen begründet liegen.

Als relevant sei an dieser Stelle exemplarisch erneut das AKT-Substrat BAD genannt. An Position Serin 136 durch AKT phosphoryliertes BAD ist, im Gegensatz zur nicht-phosphorylierten Form, nicht an der Induktion des programmierten Zelltodes beteiligt. Eine durch Phosphorylierung bedingte BAD-Inaktivierung als Folge einer gesteigerten AKT-Phosphorylierung trägt möglicherweise mit zu einer Resistenz von malignen Zellen gegenüber mTOR-Inhibition durch Rapamycinderivate bei (She et al. 2005).

Zwar sind die molekularen Mechanismen der Rückkopplungsschleife bisher nicht abschließend aufgeklärt, die Überlegung jedoch, diesen kompensatorischen Mechanismus durch eine Inhibition von AKT zu überwinden, gaben den Anlass zur Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente.

5. 3. Alkylphosphocholine

Neben Wirkstoffen wie Edelfosin, Miltefosin, Ilmophosin und Oleoylphosphocholin gehören das oral applizierbare Perifosin (D-21266) sowie das intravenös applizierbare Erufosin (ErPC3, Erucylphosphohomocholin) zur Gruppe der antineoplastisch wirksamen Alkylphosphocholine (APC) (Chiarini et al. 2008, Fiegl et al. 2008, van Blitterswijk and Verheij 2008). Die beiden letztgenannten APC's fanden für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente als AKT-Inhibitoren Verwendung.

5.3.1. Chemische Struktur

Das Glycerophospholipid Phosphatidylcholin (Lecithin) ist neben Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin ein Hauptbestandteil eukaryontischer Zellmembranen. Glycerophospholipide enthalten stets den namensgebenden Grundbaustein Glycerin. Bei Phosphatidylcholin ist dessen Kohlenstoffatom an Position 1 mittels einer Phosphatgruppe mit dem Alkohol Cholin verbunden. Die Kohlenstoffatome an den Positionen 2 und 3 sind mittels Estherbindungen jeweils mit einer Fettsäure verknüpft, das Molekül enthält also zwei lange hydrophobe Acylketten. In der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran liegen die hydrophoben Acylketten nach innen gewandt und die hydrophilen Reste nach außen gewandt vor (van Blitterswijk and Verheij 2008).

Bei den Alkylphosphocholinen Perifosin und Erufosin handelt es sich um chemisch stabile Derivate des Lysophosphatidylcholins. Lysophosphatidylcholin entsteht aus dem

Membranlipid Phosphatidylcholin durch Hydrolyse der Estherbindung an Position 2 des Glyceringrundgerüsts. Dieses Glyceringrundgerüst fehlt bei beiden APC's (van Blitterswijk and Verheij 2008). Bestandteil von Perifosin und Erufosin ist, wie bei allen APC's, daher eine einzelne hydrophobe Acylkette, welche beim Perifosin eine Länge von 18, beim Erufosin eine von 22 Kohlenstoff-Atomen aufweist (Jendrossek et al. 2002, van Blitterswijk and Verheij 2008).

Neben dem Längenunterschied im hydrophoben Molekülanteil weist Erufosin (ErPC3), ein Derivat des Erucylphosphocholins (ErPC2), in der Acylkette eine einzelne *cis*-Doppelbindung auf. Außerdem besteht ein verlängerter Abstand zwischen dem einwertigen und polaren Alkohol Cholin und der Phosphatgruppe. Die sonst bei den APC's stark ausgeprägten hämolytischen Eigenschaften sind bei Erufosin aufgrund dieser beiden eine höhere Hydrophobizität bedingenden Eigenschaften stark reduziert. Die Folge der hohen Hydrophobizität und der großen Länge der Acylkette ist eine starke Tendenz zur Bildung von lamellaren Strukturen. Der Wirkstoff ist daher, im Gegensatz zu dem eine höhere Viskosität aufweisenden und daher nicht zur i.v.-Applikation geeigneten Erucylphosphocholin, das einzige sinnvollerweise i.v.-applizierbare APC (Berger et al. 1998, Jendrossek et al. 2002, van Blitterswijk and Verheij 2008).

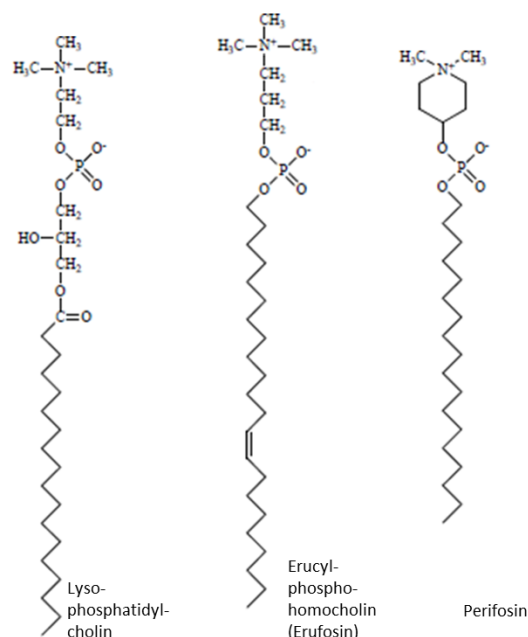


Abbildung 2: Strukturformeln von Lyso-phosphatidylcholin (links) und den APC's: Erucylphosphohomocholin (Erufosin) (Mitte) sowie Perifosin (rechts) (van Blitterswijk and Verheij 2008)

Neben dem hydrophoben Anteil enthalten alle APC's auch einen polaren und damit hydrophilen Anteil. Das bedeutet, dass die Vertreter dieser Substanzgruppe einen

amphiphilen Charakter besitzen. Bei Erufosin besteht der hydrophile Teil aus dem Alkohol Homocholin. Bei Perifosin aus einer heterozyklischen Piperidingruppe. Bei beiden APC's fehlt die Glycerolkomponente des Lysophosphatidylcholines oder Phosphatidylcholines (siehe Abbildung 2) (van Blitterswijk and Verheij 2008).

5.3.2. Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine

Im Gegensatz zu den meisten klassischen Chemotherapeutika zur antineoplastischen Therapie sind die molekularen Zielstrukturen von Perifosin und Erufosin, ebenso wie die der anderen APC's, nicht die DNS-Stränge, sondern zelluläre Membranen. Die in allen APC's enthaltene Alkylkette ermöglicht es dieser Gruppe von Molekülen, sich in die Zellmembranlipiddoppelschicht einzulagern. Über zwei Mechanismen erfolgt anschließend zum einen eine Translokation des APC von dem extrazellulär lokalisierten in den zytoplasmatisch lokalisierten Monolayer der Lipiddoppelschicht, zum anderen eine Internalisierung des APC. Ersteres geschieht durch Translokation vom äußeren in den inneren Monolayer, entweder durch spontanes oder enzymatisch katalysiertes ATP-abhängiges „*Flipping*“, zweiteres durch Endozytose von APC-haltigen Membranvesikeln (Chiarini et al. 2008, van Blitterswijk and Verheij 2008, van Der Luit et al. 2003).

Durch oben genannte Mechanismen in die Zelle aufgenommen, interagieren die APC's unter anderem mit dem AKT-mTOR-Signalweg. Der bedeutendste Wirkmechanismus von Perifosin scheint die beschriebene Inhibition der AKT-Aktivierung zu sein (Kondapaka et al. 2003).

Die Wirkung von Perifosin auf den AKT-mTOR-Signalweg beruht auf einer reversiblen Blockade der PIP3-abhängigen Rekrutierung von AKT an die Zellmembran. Diese ist für die Aktivierung der Kinase unerlässlich. Dieses Modell wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der antiproliferative und pro-apoptotische Effekt von Perifosin durch konstitutiv an die Zellmembran gebundenes AKT gemindert wird (van Blitterswijk and Verheij 2008). Neben einer verminderten Bildung von membranständigem PIP3 als Folge einer verminderten Phosphatidylcholinsynthese, interagiert Perifosin mit der regulatorischen, PIP3-bindenden PH-Domäne von AKT und ist ursächlich für die Aufhebung der Rekrutierung von AKT zur Zellmembran. Ohne diese Rekrutierung an die Zellmembran wird AKT in seiner Funktion als Kinase nicht aktiv und fällt somit als pro-mitogener Signalgeber aus (Chiarini et al. 2008, Kondapaka et al. 2003, Ruiters et al. 2003, van Blitterswijk and Verheij 2008).

Eine Inaktivierung von AKT wirkt sich im Sinne eines in Richtung Apoptose geneigten Gleichgewichtes auf etliche AKT-Effektormoleküle aus. Des Weiteren resultiert eine AKT-

Inhibition in einer verminderten Aktivierung der für das Zellüberleben wichtigen *downstream*-Effektoren mTORC1 und mTORC2 (Ruiter et al. 2003, van Blitterswijk and Verheij 2008).

Eine weitere bedeutende Auswirkung der APC's ist, nach ihrer durch Endozytose ermöglichten Verteilung in subzelluläre membranumschlossene Kompartimente, die Hemmung der Biosynthese des bei Eukaryonten essenziellen Membranlipides Phosphatidylcholin (Boggs et al. 1998). Diese ist die Folge einer Inhibition der CTP-Phosphocholin-Cytidyltransferase in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums. Das Fehlen von Phosphatidylcholin, einem für Membranbildung und damit Proliferation notwendigen Baustein, welcher des Weiteren nötiges Substrat zur Bildung des *second messengers* Diacylglycerin sowie des Membranlipides Sphingomyelin ist, führt über bislang nicht endgültig charakterisierte Mechanismen zur Induktion der Apoptose (Boggs et al. 1998, van Blitterswijk and Verheij 2008).

Neben den geschilderten Effekten kommt es durch APC's zur Inhibition des anti-apoptotischen ERK-Signalweges. Neben AKT fällt damit ein weiterer Inhibitor des pro-apoptotischen Proteins BAD aus. Zusätzlich erfolgt eine Aktivierung der pro-apoptotischen SAPK- und JNK-Signaltransduktionswege mit daraus resultierender Steigerung der Caspase 8- und 9- Aktivität und Degradation von PARP als Zeichen der stattfindenden Apoptose (Chiarini et al. 2008, van Blitterswijk and Verheij 2008, Yosifov et al. 2009).

Aufgrund der beschriebenen Wirkmechanismen sind insbesondere stark proliferativ aktive Gewebe empfindlich gegenüber den pro-apoptotischen Eigenschaften der Alkylphosphocholine. Ruhende und mitotisch inaktive Zellen hingegen sind gegenüber den Wirkstoffen dieser Gruppe weitestgehend resistent. Dieses Charakteristikum erklärt die anti-neoplastische Potenz der Alkylphosphocholine (Chiarini et al. 2008, van Blitterswijk and Verheij 2008).

5.3.3. Klinische Anwendung

5.3.3.1 Perifosin

Perifosin ist ein oral applizierbarer Vertreter der APC's und zeigt wie bereits erwähnt *in vitro* ausgeprägtes antineoplastisches Potenzial. Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte die Erprobung in diversen klinischen Phase I Studien. Als akute Nebenwirkungen ergaben sich eine dosisabhängige gastrointestinale Toxizität mit Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen. Die beschriebenen Nebenwirkungen ließen sich mit Hilfe von Antiemetika und Loperamid symptomatisch gut kontrollieren (van Ummersen et al. 2004). Schwerwiegendere

Nebenwirkungen waren gastrointestinale Blutungskomplikationen. Des Weiteren wurden Arthralgien und Cephalgien beobachtet. Toxische Auswirkungen auf das blutbildende System im Sinne einer Myelosuppression wurden im Gegensatz zu klassischen Zytostatika nicht beobachtet (Crul et al. 2002, Pal et al. 2010, van Ummersen et al. 2004, Vink et al. 2006).

Van Ummersen *et al.* berichteten von einer systemisch mittels verschiedenen Zytostatika vorbehandelten Patientin mit histologisch gesichertem Leiomyosarkom, welche unter Therapie mittels Perifosin eine partielle Remission erreichte. Diese Beobachtung gab Anlass zur Durchführung von Phase II Studien bei Patienten mit fortgeschrittenen Weichteilsarkomen (van Ummersen et al. 2004). Bailey *et al.* beobachteten im Rahmen einer Phase II Studie ein Gesamtüberleben von 64% nach 6 Monaten und von 36% nach 12 Monaten. Von 22 Patienten zeigten fünf über einen mittleren Zeitraum von 3,5 Monaten eine stabile Erkrankung, jedoch erlitten alle Patienten letzten Endes eine Krankheitsprogression. Das APC erfüllte die Erwartungen hinsichtlich seiner Wirksamkeit bei der Therapie von Sarkompatienten nicht. Das beobachtete Nebenwirkungsprofil entsprach dem vorbeschriebenen (Bailey et al. 2006).

Eine weitere Phase II Studie zum Einsatz von Perifosin als Einzelsubstanz bei metastasierten oder lokal fortgeschrittenen Weichteilsarkomen wurde von Knowling *et al.* durchgeführt. 4 von 15 Patienten zeigten über einen mittleren Zeitraum von 2,5 Monaten eine stabile Erkrankung, 11 erfuhren innerhalb dieses Zeitraumes eine Progression. Auch diese Studie zeigte somit keine durchbrechenden Therapieerfolge (Knowling et al. 2006).

Weitere Phase II Studien beschäftigten sich mit Perifosin als Monotherapie bei anderen Malignomen. Bei metastasierten Prostatakarzinomen (Posadas et al. 2005), metastasierten Melanomen (Ernst et al. 2005), metastasierten und rezidivierenden Kopf-Hals-Karzinomen (Argiris et al. 2006), metastasierten Mammakarzinomen (Leighl et al. 2008), metastasierten Pankreaskarzinomen (Marsh Rde et al. 2007) sowie metastasierten Nierenzellkarzinomen (Cho et al. 2012) konnten im Rahmen dieser Studien keine Therapieerfolge erzielt werden. Eine auf Perifosin basierte Monotherapie des Morbus Waldenström jedoch zeigte erfolgversprechende Ergebnisse mit vier partiellen Remissionen und 20 stabilen Erkrankungen bei einer Gesamtzahl von 37 Patienten (Ghobrial et al. 2010). Ebenso zeigte sich bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie durch eine Monotherapie mittels Perifosin eine hohe Rate an Krankheitsstabilisierungen (Friedman et al. 2014).

Perifosin wurde des Weiteren als Kombinationspartner für andere antineoplastisch wirksame Substanzen klinisch evaluiert. Im Rahmen einer Phase I Studie zeigte sich Perifosin als ein

vielversprechender Kombinationspartner für Lenalidomid und Dexamethason bei der Behandlung des Multiplen Myeloms (Jakubowiak et al. 2012). 2011 bis 2014 wurden Ergebnisse von drei Phase II Studien zur Verwendung von Perifosin in der antineoplastischen Kombinationstherapie veröffentlicht. Die Kombination von Perifosin mit Bortezomib und Dexamethason einerseits und von Perifosin mit Capecitabin andererseits zeigte vielversprechende Therapieergebnisse beim Multiplen Myelom (Richardson et al. 2011) beziehungsweise beim metastasierten Kolonkarzinom (Bendell et al. 2011). Phase III Studien zu beiden Therapieregimen sind geplant. Bei Patienten mit rezidivierenden oder refraktären Hodgkin-Lymphomen und chronisch lymphatischen Leukämien zeigte Perifosin in Kombination mit Sorafenib im Rahmen einer Phase II Studie vielversprechende Wirksamkeit (Guidetti et al. 2014).

5.3.3.2. Erufosin

Erufosin ist der bisher einzige intravenös applizierbare Vertreter der APC's (Lindner et al. 2008, van Blitterswijk and Verheij 2008). Die hämolytischen Eigenschaften des APC sind im Vergleich zu den anderen Vertretern stark vermindert, was eine gefahrlose parenterale Applikation zulässt. Die Hauptnebenwirkung von Perifosin und den anderen APC's, die dosislimitierende gastrointestinale Toxizität, ist bei diesem neueren Vertreter der APC's daher weniger stark ausgeprägt (Erdlenbruch et al. 1999, Lindner et al. 2008, van Blitterswijk and Verheij 2008). Bisher existieren zu Erufosin nur wenige klinische Daten. Daten einer am Klinikum der Universität München (PD Dr. med. L. Lindner, Klinikum der Universität München) durchgeführten Phase I Studie zum Einsatz der Substanz sind bisher nicht publiziert.

5. 4. mTOR-Inhibitoren

5.4.1. Wirkmechanismen der mTOR-Inhibitoren

In der vorliegenden Arbeit wurden die Rapamycinderivate Everolimus (RAD001) und Temsirolimus (CCI-779) als Inhibitoren von mTOR verwendet. Der Prototyp der Substanzklasse der mTOR-Inhibitoren ist der Wirkstoff Rapamycin, auch Sirolimus genannt. Bei Rapamycin handelt es sich um ein Makrolidantibiotikum mit antimykotischer Aktivität, welches als natürliches Stoffwechselprodukt des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus* erstmals beschrieben und nach dem Fundort, den Osterinseln (Rapa nui), benannt wurde (Vezina et al. 1975). Seit langem erfolgt der Einsatz von Rapamycin und dessen Derivaten als Immunsuppressiva nach Organtransplantationen (Krenzien et al. 2015). Ein Einsatz in der antineoplastischen Therapie hingegen erfolgt erst weniger lang.

Der Wirkmechanismus der Rapamycinderivate ist stets gleich. Der Unterschied zwischen den Einzelsubstanzen besteht lediglich in chemischen Modifikationen, welche sich auf die Pharmakokinetik auswirken (Wan and Helman 2007). Rapamycin und dessen Derivate formen im Zytosol einen Komplex mit dem Protein FKBP12 (Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase). Dieser Komplex bindet anschließend mit hoher Affinität mTOR und behindert die Bindung von RAPTOR an seine spezifischen Bindungsstellen. Die direkte Folge ist eine Inhibition der korrekten Interaktion zwischen diesen beiden Bestandteilen von mTORC1. Die Kinasefunktion des mTOR-Komplexes 1 ist dadurch aufgehoben, konsekutiv findet keine Phosphorylierung der Zielproteine z.B. S6-Kinase und 4E-BP1 mehr statt. Durch fehlende Aktivierung der Effektorproteine 4E-BP1 und Protein S6-Kinase kommen die pro-mitogenen Auswirkungen von mTOR nicht zum Tragen. Die mTOR-Inhibitoren wirken daher antiproliferativ, insbesondere auf Zellen mit gesteigerter Aktivität des mTOR-Signalweges. *In vitro* zeigen Rapamycinderivate eine breite antineoplastische Potenz gegenüber einer Vielzahl von Tumorzelllinien (Banaszynski et al. 2005, Gallicchio et al. 2003, Juengel et al. 2009).

Die Wirkung *in vitro* scheint vor allem durch einen Zellzyklusarrest vermittelt zu sein. Durch eine verminderte Expression von Cyclin D1 kommt es zu einem G0/1-Arrest oder G2/M-Arrest und damit zum Stopp der Proliferation (Imura et al. 2014, Yu et al. 2014). Des Weiteren scheint *in vivo* eine Hemmung der Angiogenese einen weiteren Teil zur Wirksamkeit gegenüber malignen Tumoren beizusteuern (Guba et al. 2002). Im Rahmen verschiedener Publikationen zu *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass Rapamycin und seine Derivate zu einer Verminderung der VEGF- und HIF1 β -Synthese führen und dadurch einen hemmenden Einfluss auf die Angiogenese ausüben können (Guba et al. 2002, Zhong et al. 2000, Zhong et al. 2001).

5.4.2. Klinische Anwendung

Der Einsatz verschiedener Rapamycinderivate wie zum Beispiel des oral applizierbaren Everolimus (RAD001) und des oral als auch intravenös anwendbaren Temsirolimus (CCI-779), erfolgt in der klinischen Routine sowie im Rahmen von Studien auch in der antineoplastischen Therapie.

Die beiden Wirkstoffe verfügen, verglichen mit Rapamycin, über bessere pharmakokinetische Eigenschaften bei nur geringfügigen chemischen Modifikationen (Wan and Helman 2007). Im Rahmen von klinischen Studien wurden beide Substanzen auch auf ihre Wirksamkeit bei verschiedenen Sarkomen getestet. Zu Temsirolimus und Everolimus existieren einige im Rahmen von Phase I und II Studien generierte Daten zum Einsatz bei Sarkomen. Die am häufigsten beobachteten und klinisch relevanten Nebenwirkungen waren

ausgeprägte Fatigue-Symptomatik und Stomatitiden. An hämatologischen Nebenwirkungen traten vor allem Anämien und Thrombozytopenien in Erscheinung. Klinisch bedeutsam zeigten sich des Weiteren metabolische Veränderungen im Sinne von Hyperglykämien im Rahmen diabetischer Stoffwechsellagen und Hyperlipidämien (Ganesan et al. 2014, Okuno et al. 2011, Verschraegen et al. 2013).

Der mTOR-Inhibitor Ridaforolimus zeigte als Erhaltungstherapie im Rahmen einer großen Placebo-kontrollierten Phase III Studie mit 711 Patienten beim metastasierten Weichteilsarkom nur unbefriedigende Ergebnisse. Das progressionsfreie Überleben als primärer Studienendpunkt nach zuvor durch Chemotherapie erreichtem Tumoransprechen oder einer Krankheitsstabilisierung zeigte sich im Ridaforolimusarm zwar signifikant, aber nur geringfügig verlängert im Vergleich zur Placebogruppe (17,7 vs. 14,6 Wochen) (Demetri et al. 2013). Aus diesem Grunde wurde auf die Anwendung von Ridaforolimus in den Experimenten für die vorliegende Arbeit verzichtet.

5.4.3. Temsirolimus (CCI-779)

Temsirolimus ist ein wasserlöslicher Esther von Sirolimus und ist zur intravenösen Applikation geeignet. Der Wirkstoff ist derzeit zur Therapie des Mantelzellymphomes im Rezidiv oder bei Therapierefraktarität zugelassen. Im Rahmen einer multizentrischen Phase III Studie mit 162 Patienten konnte gezeigt werden, dass Temsirolimus dosisabhängig im Vergleich zu anderen zugelassenen Substanzen zu einer Verbesserung sowohl des progressionsfreien Überlebens, als auch des Gesamtüberlebens führte (Hess et al. 2009). Zudem ist Temsirolimus zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinomes zugelassen (Escudier et al. 2014, Kwitkowski et al. 2010).

Im Rahmen einer Phase II Studie zum Einsatz von Temsirolimus als Monosubstanz bei fortgeschrittenen Weichteilsarkomen zeigte sich bei nur 2% der Patienten eine partielle Remission. Der Rest der insgesamt 41 Patienten zeigte unter der Therapie rasch eine Krankheitsprogression (Okuno et al. 2011). Insgesamt lässt sich beim alleinigen Einsatz von Temsirolimus beim Weichteilsarkom daher nur von einer geringen Aktivität ausgehen. Weitere Studien untersuchten den Einsatz von Temsirolimus in der Kombinationstherapie bei Sarkomen. Es zeigten sich im Allgemeinen die bereits beschriebenen Toxizitäten.

Verschraegen *et al.* beobachteten im Rahmen ihrer Phase I Studie zur Kombination aus Irinotecan mit Temsirolimus bei nur 2 von insgesamt 17 Patienten mit fortgeschrittenen Weichteilsarkomen eine stabile Erkrankung (Verschraegen et al. 2013).

In Kombination mit dem IGFR-1-Inhibitor Cixutumumab zeigte sich im Rahmen einer Phase II Studie bei 31-39% der erwachsenen Patienten, abhängig von der Subentität, nach 12

Wochen eine stabile Erkrankung (Schwartz et al. 2013). Eine Phase II Studie zu derselben Kombination bei Kindern und jungen Erwachsenen mit rezidivierenden oder chemotherapieresistenten Sarkomen zeigte insgesamt weniger gute Ergebnisse. Nur 16% der Patienten waren nach 12 Wochen progressionsfrei, ein objektives Ansprechen konnte in keinem Falle beobachtet werden (Wagner et al. 2015).

Zusammenfassend muss daher davon ausgegangen werden, dass die Monosubstanz Temsirolimus bei Weichteilsarkomen eine nur unzureichende Aktivität, und auch in der Kombination mit anderen Substanzen wie beispielsweise Cixutumumab eine nur geringe Aktivität zeigt.

5.4.4. Everolimus (RAD001)

Everolimus wird beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom in der Zweitlinientherapie nach Versagen von Sunitinib oder Sorafenib eingesetzt (Escudier et al. 2014). Im Vergleich zu Placebo zeigte sich eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (Motzer et al. 2008). Zudem erfolgt der Einsatz von Everolimus bei der Therapie des hormonrefraktären Mammakarzinoms (Andre et al. 2014) und *off-label* als Option bei den wesentlich selteneren perivaskulären epitheloidzelligen Tumoren (von Mehren et al. 2014).

Im Rahmen einer Phase II Studie erhoben Yoo *et al.* Daten zum Einsatz von Everolimus bei Patienten mit rezidivierenden Sarkomen (Knochen- und Weichteilsarkome) nach Versagen von Anthrazyklinen und Ifosfamid. Hier zeigte sich, abhängig vom histologischen Subtyp, eine mäßige antineoplastische Aktivität. Die Progressionsfreiheit nach 16 Wochen als primärer Studienendpunkt war mit 27% insgesamt gering. Das mediane progressionsfreie Überleben belief sich auf 1,9 Monate (Yoo et al. 2013).

Im Rahmen einer Phase I Studie mit 21 Patienten wurde der Kombinationseinsatz von Everolimus und dem IGFR-1-Inhibitor Figitumumab bei fortgeschrittenen Sarkomen und anderen soliden Tumoren untersucht. Die Studienpopulation war hierbei bei insgesamt 10 verschiedenen Krankheitsentitäten sehr heterogen. Es zeigte sich bei 71% der Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung. Eine partielle Remission konnte nur bei einem Patienten mit einem solitären fibrösen Tumor beobachtet werden (Quek et al. 2011).

Eine Phase II Studie zur Kombination aus Everolimus und Sorafenib bei nicht resektablen und metastasierten Osteosarkomen zeigte mit einer Progressionsfreiheit von 45% nach 6 Monaten unbefriedigende Ergebnisse (Grignani et al. 2015).

Die beiden Substanzen Everolimus und Temsirolimus zeigen, wie der oben zitierten Literatur zu entnehmen, als Monosubstanzen nur eine geringe Aktivität beim klinischen Einsatz gegen

Sarkome. Angesichts der oben geschilderten Rationale entschlossen wir uns zur Durchführung der *in vitro* Experimente zum Einsatz von mTOR-Inhibitoren in Kombination mit Substanzen, welche unter anderem das vorgeschaltete Protein AKT inhibieren, um auf diese Weise die mögliche Resistenz gegenüber einer alleinigen mTOR-Inhibition zu überwinden.

5. 5. Regionale Hyperthermie

Die regionale Hyperthermie ist ein Verfahren, bei dem mittels elektromagnetischer Wellen zu therapeutischen Zwecken eine kontrollierte Erhöhung der Temperatur eines Tumors und des angrenzenden umgebenden Gewebes auf Werte zwischen 40° C und 43° C angestrebt wird. Die sinnvolle Anwendung des mittlerweile in der Klinik etablierten Verfahrens erfolgt ausschließlich in der Kombination mit anderen Therapieformen wie Radiotherapie, Chemotherapie oder kombinierter Radiochemotherapie. Die Dauer der regionalen Hyperthermie mittels Ringapplikatoren oder der Oberflächenhyperthermie mittels Oberflächenapplikatoren in der klinischen Routine beträgt für jede Behandlung 90 Minuten (Issels 2008, Wust et al. 2002).

In der Therapie der Weichteilsarkome handelt es sich bei der regionalen Hyperthermie um ein mittlerweile etabliertes Verfahren. Im Rahmen einer prospektiven, randomisierten EORTC Phase-III-Studie (*ClinicalTrials.gov*-Identifikationsnummer: NCT00003052) wurden 341 Patienten mit Hochrisikoweichteilsarkomen im Stadium II und III entweder in einen Therapiearm, bestehend aus Chemotherapie und regionaler Hyperthermie, oder einen Therapiearm mit alleiniger Chemotherapie randomisiert. Im Hyperthermiearm zeigte sich eine signifikante Verbesserung des lokalen progressionsfreien Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens. Ebenfalls signifikant höher zeigte sich im Hyperthermiearm die objektive Ansprechrates. Die Rate der Progressionen unter Therapie war im Hyperthermiearm des Weiteren signifikant geringer (Issels et al. 2010). Im Rahmen von Langzeitanalysen konnten auch Vorteile im Gesamtüberleben gezeigt werden (Issels et al. 2015). Aufgrund dieser Ergebnisse gehört die Hyperthermie in Kombination mit einer zytostatischen Chemotherapie derzeit zu den Standardoptionen bei der Behandlung des Hochrisikoweichteilsarkomes. Auch andere Studienergebnisse untermauern den Stellenwert der Hyperthermie beim Weichteilsarkom. So ließ sich beispielsweise durch die Kombination aus präoperativer Strahlentherapie und Hyperthermie im Rahmen einer Phase II Studie eine hohe Rate an lokaler Tumorkontrolle bei Extremitätensarkomen erzielen (Prosnitz et al. 1999). Aufgrund der positiven Studienergebnisse hat die Hyperthermie als Therapieoption

Eingang in die aktuellen ESMO- und NCCN-Leitlinien gefunden (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014).

Bei einigen anderen Entitäten wird oder wurde der Einsatz der Hyperthermie im Rahmen klinischer Studien oder im Rahmen retrospektiver Analysen evaluiert. Die Anwendung erfolgte bei Mamma-Karzinomen, Cervix-Karzinomen, Hals-Nasen-Ohrenkarzinomen, Gehirntumoren, Rektumkarzinomen, Bronchialkarzinomen, Ösophaguskarzinomen, Leberzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, Melanomen und Weichteilsarkomen (Bettaieb et al. 2013).

Hervorzuheben sind hierbei insbesondere die Anwendungen der Hyperthermie beim Mamma- und Cervixkarzinom. Eine randomisierte Studie zum Einsatz der Hyperthermie in Kombination mit Strahlentherapie im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen des kleinen Beckens zeigte im Hyperthermiearm und hier im speziellen bei der Subgruppe der Cervixkarzinome, signifikant höhere Tumorkontrollraten (van der Zee et al. 2000). Retrospektive Analysen zum Einsatz der Hyperthermie in Kombination mit Radiochemotherapie beim lokal fortgeschrittenen Cervixkarzinom (Heijkoop et al. 2012) zeigten ebenso vielversprechende Ergebnisse wie eine kombinierte Thermoradiotherapie von Brustwandrezidiven von Mammakarzinomen oder unzureichend chirurgisch versorgten Mammakarzinomen (Welz et al. 2005). Bei oberflächlichen Mammakarzinomen zeigte eine prospektive randomisierte Studie ebenfalls gute Wirksamkeit der Hyperthermie in Kombination mit einer Strahlentherapie (Jones et al. 2005). Die Hyperthermie findet aufgrund dieser vielversprechenden Daten Erwähnung in den Leitlinien der NCCN zum Thema Mammakarzinom (Kouloulis et al. 2015).

In der Praxis erfolgt eine Kontrolle der Temperatur entweder auf invasivem Weg über im Vorfeld implantierte Thermosonden oder auf nicht-invasivem Weg mittels Thermometern (Blasenkatheter, Rektumkatheter, Hautsonde) oder mittels parallel zur Behandlung stattfindender Magnetresonanztomographie. Das zuletzt genannte Temperaturmessungsverfahren erfordert den Einsatz eines sogenannten Hybridsystems, bestehend aus einem Hyperthermieapplikator und einem Magnetresonanztomographen. Insgesamt kann auch durch die modernen Hyperthermiegeräte eine nur heterogene Verteilung der Temperatur erreicht werden. Die Unterschiede in der Beschaffenheit der Gewebe bedingen diese Heterogenität (Issels 2008).

Die Hyperthermie hat auf verschiedenen Ebenen einen lokalen, also auf ihren Einwirkungsort begrenzten, Einfluss auf Tumorgewebe und Tumorzellen. Zum einen hat die erhöhte Temperatur auf Gewebeebene unter anderem eine gesteigerte Perfusion und damit Oxygenierung des Tumors zur Folge. Die gesteigerte Perfusion führt hierbei zu einer

gesteigerten Anflutung von Zytostatika (Bettaieb et al. 2013, Issels 2008, Issels et al. 2001, Issels et al. 2010). Diese verbesserte Oxygenierung erklärt, aufgrund der Eigenschaft von Sauerstoff als *Radiosensitizer* zu wirken, zumindest teilweise die zu verzeichnende höhere Strahlensensitivität der der Hyperthermie ausgesetzten Tumorzellen (Millar et al. 1980). Dies stellt eine der Rationalen zur Kombination mit einer Strahlentherapie dar. Eine weitere solche Rationale ist die weiter unten genauer beschriebene Inhibition von DNS-Reparaturmechanismen durch die Hyperthermie (Iliakis et al. 2008, Krawczyk et al. 2011).

Auf zellulärer Ebene kommt es durch die Einwirkung von Temperaturen über 41° C zu einer Denaturierung von Proteinen. Durch den Funktionsverlust und die Aggregation von denaturierten und damit fehlgefalteten Proteinen kommt es zu subletalen bis letalen Schäden (Lepock 2005, Zaarur et al. 2006). Darüber hinaus sind über verschiedenste Mechanismen induzierte Aktivierungen und Sensibilisierungen des Immunsystems gegenüber Tumorzellen, beschrieben, welche durch die Hyperthermie ausgelöst werden (Jolesch et al. 2012, Noessner et al. 2002).

Ein bereits oben erwähnter Mechanismus der durch Hyperthermie induzierten Zytotoxizität ist die Inhibition von DNS-Reparaturmechanismen. Dieser Wirkmechanismus legt insbesondere die Kombination der Hyperthermie mit DNS-schädigenden Therapieformen, wie der Strahlentherapie oder der konventionellen Zytostatikatherapie nahe (Iliakis et al. 2008, Kampinga 2006). Die durch die DNS-schädigende Therapie ausgelösten Schäden können in Zellen, welche einer Hyperthermiebehandlung ausgesetzt wurden, folglich nicht kompensiert werden. Gezeigt werden konnte beispielsweise eine Inhibition der homologen Rekombinationsreparatur durch eine Hyperthermieeinwirkung. Die von Krawczyk *et al.* beschriebene Degradation von BRCA2, einem Bestandteil dieses DNS-Reparatursystems, durch einen moderaten Hitzeschock von 41° C bis 42,5° C, bedingt die Inhibition dieses an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNS beteiligten Systems (Krawczyk et al. 2011).

Im Rahmen von *in vitro* Studien konnte über die oben genannten Mechanismen hinausgehend gezeigt werden, dass bestimmte Zytostatika durch Hyperthermie eine Steigerung ihrer Wirkung erfahren. Dies gilt insbesondere für die Platinderivate Cisplatin, Carboplatin, die Alkylantien Cyclophosphamid und Ifosfamid, für Anthrazykline sowie für Melphalan und Bleomycin (Bettaieb et al. 2013, Issels 2008, Kampinga 2006).

Ein spezieller Grund, die Hyperthermie im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Behandlungsmodalität zu untersuchen, ist die beschriebene Erkenntnis, dass ein Hitzeschock zu einer kompensatorischen Aktivierung von AKT durch eine vermehrte Phosphorylierung führt (Gao et al. 2013). Die Auswirkungen von Hyperthermie kombiniert mit

einer gleichzeitigen AKT-Inhibition wurden *in vitro* unter anderem von Tao *et al.* an einer Magenkarzinomzelllinie untersucht. Es wurde auch hier eine durch die Hyperthermie erhöhte AKT-Phosphorylierung nachgewiesen. In den mittels Hyperthermie und dem AKT-Inhibitor VIII behandelten Zellen zeigte sich des Weiteren eine höhere Apoptoserate als in den nur mittels Hyperthermie behandelten Zellen (Tao et al. 2013).

6. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit werden *in vitro* Daten zur Kombination einer AKT-mTOR-Doppelinhibition mit Hyperthermiebehandlungen bei humanen Weichteilsarkomen vorgestellt. Die Hyperthermie, die APC's Perifosin und Erufosin und die Rapamycinderivate Everolimus und Temsirolimus sind bereits in der Klinik im Rahmen von Studien beim Weichteilsarkom erprobt worden. Keine dieser drei genannten Therapieoptionen ist nach aktuellem Wissensstand als Monotherapie erfolgversprechend. Die Kombination einer AKT- und mTOR-Inhibition erscheint, aufgrund einer kompensatorischen AKT-Aktivierung durch eine alleinige mTOR-Inhibition, eine in der Theorie erfolgversprechende Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie beim Weichteilsarkom darzustellen. Als mögliche und sichere lokale Therapieform zur Ergänzung, bietet sich die in der Klinik bereits etablierte Hyperthermie an. Angesichts der Tatsache, dass nicht nur eine mTOR-Inhibition sondern auch eine alleinige Hyperthermiebehandlung eine kompensatorische AKT-Aktivierung induziert, sollte eine Kombination aller drei Verfahren im Vergleich zu den Einzelsubstanzen im Hyperthermieeinflussgebiet wesentlich höhere Effekte erzielen. Um zu evaluieren, ob eine wärmevermittelte AKT-mTOR-Aktivierung von Bedeutung für das zelluläre Überleben ist, wurden Kombinationsexperimente mit Hyperthermie unter gleichzeitiger kompletter vertikaler Inhibition des Signalweges auf Ebene von AKT und mTOR durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist anhand von den gezeigten Daten, gewonnen im Rahmen von zellkultur-basierten Experimenten, die Hypothese zu überprüfen, ob eine Kombination der AKT-mTOR-Inhibition mit einer Hyperthermie sinnvoll ist.

Im Rahmen eines Screenings wurden zunächst alle Zelllinien bezüglich ihrer Sensitivitäten gegenüber den Einzelsubstanzen im WST1-Assay charakterisiert. Anschließend erfolgten, in Abhängigkeit der gewonnen Erkenntnisse, ausgewählte Experimente unter Verwendung des Koloniebildungstests.

Im Rahmen von Western Blots erfolgte des Weiteren die Untersuchung der Auswirkungen der Behandlungen auf die AKT-mTOR-Signaltransduktionskaskade.

7. Material und Methoden

7.1. Materialien

7.1.1. Chemikalien

Albumin (Standard)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ammonium-Oxalat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entwicklerlösung f. Western blots	Calbe Chemie, Calbe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fixiererlösung	Calbe Chemie, Calbe
Glycin	Merck, Darmstadt
Halt™ Protease & Phosphatase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Milchpulver	BioRad, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	Gibco, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti® Load 1 (Ladepuffer SDS-PAGE)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel30 (Polyacrylamid 30%)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Western Blot Detektions-Reagenz	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Amersham™ ECL™ Prime	
Western Blot Detektions-Reagenz Verstärker	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce™ Western Blot Signal Enhancer	
Zell-Lysepuffer	Cell Signaling Technology, Frankfurt

Weitere im Rahmen der obigen Liste nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen und Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Chemikalien wurden hierbei im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen und angewendet.

7.1.2. Gerätschaften

Branson Sonifier 250	Branson, Dietzenbach
Brutschrank (37°C und 41,8°C)	Binder, Tuttlingen
Brutschrank (43°C) Hera <i>Cell</i>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Elektronische Thermometer	Greisinger Electronics, Regenstauf
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetischer Rührer	Heidolph, Schwabach
Mikroskop (konfokal) Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems, Wetzlar
Mini Trans-Blot [®] Cell	BioRad, München
Nassblot-Apparatur 422 Electro Eluter	BioRad, München
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC, Oberstenfeld
Pipetten (Pipetman)	Gilson, Middleton, WIS, USA
Plattenphotometer SPECTROStar Nano	BMG Labtech, Offenburg
Rollenmischgerät	Hecht, Sondheim
Spannungsquelle PowerPac 3000	BioRad, München
Sterilbank HeraSafe KSP18	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tiefkühler (-20°C)	Siemens, München
Tiefkühler (-80°C) HeraFreeze	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tischwaage	Kern, Balingen
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Sigma 2K15	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach
Zählstift E-count [™]	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

7.1.3. Weitere Materialien

Blotting-/Chromatographie-Papier Whatman	Roth, Karlsruhe
Deckgläser (18x18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Objektträger (76*26 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Pipettenspitzen	Gilson, Middleton, WIS, USA
Polypropylen-Reaktionsgefäße (15/50 ml)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
PVDF-Membranen	Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen (T75 und T25)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6/96 well)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Weitere in der obigen Liste nicht aufgeführte Materialien wie Kunststoffmaterialien wurden bezogen von den Firmen Bio Rad (München, Deutschland), Falcon (Franklin Lakes, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland), GE Healthcare (Buckinghamshire, UK), Thermo Fisher scientific (Waltham, USA), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Nunc GmbH (Rokkilde, Dänemark).

7.1.4. Kits

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
-------------------------------	-------------------------------------

7.1.5. Software

ImageJ Analysis Software	„Image processing in Java“, frei verfügbare Version 1.48v (19. April 2014)
EndNote X7	Thomson Reuters, Toronto, Kanada
Microsoft Office 2010	Microsoft, Unterschleißheim
SpectroStar® Nano Software	BMG Labtech, Offenburg

7.1.6. Proteinmarker

HiMark™ Pre-stained Protein Standard	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Precision Plus Protein™	BioRad, München

7.1.7. Puffer und Lösungen

Elektrophorese-Puffer	0,1% SDS 192 mmol/l Glycin 25 mmol/l Tris pH 8,3
Geltransfer-Puffer	20% Methanol 25 mmol/l Tris 192 mmol/l Glycin
Kristallviolett-Lösung	0,8% Ammoniumoxalat 20% Ethanol 2% Kristallviolett
PBS	1,06 mmol/l KH_2PO_4 2,96 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 155,17 mmol/l NaCl pH 7,4
PBS-T	PBS mit 0,05% Tween 20
SDS-Lösung 10%ig	1 g SDS in 10 ml H_2O
SDS-PAGE Sammelgel	2,7 ml dest. H_2O 0,5 ml Tris-HCl (pH 6,8) 40 μl SDS (10%) 40 μl APS (10%) 4 μl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (5; 6; 10; 12%)	(5,7; 5,3; 4,0; 3,3 ml) dest. H_2O (1,7; 2,0; 3,3; 4,0 ml) Acrylamid 2,5 ml Tris-HCl (pH 8,8) 100 μl SDS (10%) 100 μl APS (10%) (16; 8; 4; 4 μl) TEMED
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	0,2 mol/l Tris 1,5 mol/l NaCl pH 7,4
TBS-T	TBS mit 0,05% Tween 20
Zellysepuffer	20 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5) 150 mmol/l NaCl

1 mmol/l Na₂EDTA
 1 mol/l EGTA
 1% Triton X-100
 2,5 mmol/l Natriumpyrophosphat
 1 mmol/l β-Glycerophosphat
 1 mmol/l Na₃VO₄
 1 µg/ml Leupeptin

7.2. Zellkultur

7.2.1. Allgemeine Zellkultur

7.2.1.1. Medien und Zusatzstoffe

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Pan Biotech, Aidenbach
L-Glutamin (L-Glut)	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat (NaPyr)	PAA, Pasching, Österreich
NEAA (<i>Non Essential Amino Acids</i>)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco, Karlsruhe

7.2.1. Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Tumorentität	Kulturmedium mit Zusätzen	Bezugsquelle
SW-872	Humanes Liposarkom	DMEM + Glucose + L-Glutamin + 5% FCS-	Cell line Service (300405)
SW-982	Humanes Synovialsarkom	DMEM + Glucose, + L-Glutamin + 5% FCS	Cell Line Service (300404)
Skut-1	Humanes uterines Leiomyosarkom	MEME + 10% FCS + je 1% Natrium-Pyruvat + nicht essenzielle Aminosäuren + L-Glutamin	Cell Line Service (300455)
MRC-5	Humane Fibroblasten	DMEM + Glucose + L-Glutamin) + 5% FCS	Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum

			München
BN-175	Weichteilsarkom der Ratte	Medium RPMI-1640 + 5% FCS	bereitgestellt durch Timo ten Hagen, Erasmus MC, Rotterdam

7.2.2. Kultivierung der verwendeten Zelllinien

Die Kultivierung der adhärennten Zellen erfolgte in T-75 Zellkulturflaschen (Thermo Scientific) mit luftdurchlässigen Filterkappen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Bei Erreichen einer mit Hilfe eines konfokalen Lichtmikroskops (Leica TCS SP5 II) erkennbaren Konfluenz von 80 bis 100% bei zweimal wöchentlicher Kontrolle wurden die Zellen passagiert. Das Passagieren erfolgte unter sterilen Bedingungen wie nachfolgend dargestellt. Das Zellkulturmedium wurde entfernt, die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen um Zelltrümmer und abgestorbene, nicht adhärennte Zellen zu entfernen. Durch eine dreiminütige Inkubation bei 37°C mit 3 ml Trypsin wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Durch anschließende Zugabe von 9 ml FCS-haltigem Kulturmedium wurde das Trypsin verdünnt und inaktiviert. Die 21 ml Zellsuspension wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde nach Absaugen des überstehenden Mediums in 6 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer (Neubauer Improved, Optik Labor) ermittelt. Eine Million Zellen wurden gemeinsam mit 12 ml Medium zur Weiterkultur in eine weitere T-75 Flasche überführt.

Zum Zählen der Zellen und zur Bestimmung der Zellkonzentration pro Milliliter im Zuge der Weiterkultivierung, als auch bei der Zellzahlbestimmung für Experimente, diente die Neubauer-Zählkammer (Neubauer Improved, Optik Labor). Die mit einem Deckgläschen abgedeckte Zählkammer wurde mittels einer 10 µl-Pipette mit 10 µl der zuvor gründlich gemischten Zellsuspension unbekannter Zellkonzentration befüllt. Mikroskopisch erfolgte anschließend die Auszählung der 4 Eckquadranten. Aus der ermittelten Zellzahl wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Faktor 10.000 multipliziert um die Zellzahl pro Volumeneinheit (Milliliter) zu erhalten. Entsprechend der ermittelten Zellkonzentration konnte die Zellzahl in der vorliegenden Zellsuspension berechnet werden.

7.2.3. Kryokonservierung

Zur dauerhaften Aufbewahrung werden Zellen kryokonserviert (Lindl 2000). Hierfür wurden je 5 Millionen Zellen der entsprechenden Zelllinie in Nährmedium aufgenommen und mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt, um Zellschäden durch Eiskristallbildung zu vermeiden. Nach einer 24 stündigen Lagerung in einer isopropanolhaltigen Einfrierbox bei einer Temperatur von -80°C wurden die Zellen in einen auf -170°C gekühlten Stickstofftank überführt.

7.2.4. Auftauen

Vor Wiederverwendung der kryokonservierten Zellen wurden diese mittels 10 ml auf Raumtemperatur erwärmten Nährmediums langsam und schonend aufgetaut und in diesem resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert, der DMSO-haltige Überstand verworfen und das Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert. Die Zellzahl der Suspension wurde nach oben geschilderter Methode mittels Zählkammer ermittelt. Anschließend erfolgte eine Aussaat von etwa einer Million Zellen in die T75 Zellkulturflaschen zur Weiterkultur. Nach einer Ruhephase von 24 Stunden erfolgte ein weiterer Mediumwechsel zum Entfernen des restlichen DMSO.

7.2.5. Hitzeschock

Die Hitzeschockbehandlungen wurden in Brutschränken der Firmen Binder oder Thermo Scientific bei 41,8°C und 43°C bei 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre durchgeführt. Die Dauer des Hitzeschocks wurde analog den Behandlungen in der klinischen Routine auf 90 Minuten festgelegt. Die Kontrollen wurden bei 37° C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre ebenfalls in Brutschränken der oben genannten Hersteller kultiviert.

7.3. Viabilitätsassay WST-1

Zur Ermittlung der zytotoxischen Effekte der durchgeführten Behandlungen wurde die Viabilität der Zellen mittels WST-1 Assay bestimmt. Das Prinzip des WST-1 Assays beruht auf der Reduktion des Tetrazoliums Salzes WST durch Enzyme der Atmungskette vitaler Zellen zum wasserlöslichen Farbstoff Formazan. Nach Zugabe des WST-1-Reagenz und einer 90-minütigen Inkubation in zellkulturfähigen 96-well Platten wird hierbei die optische

Dichte bei 420-480 nm Wellenlänge quantifiziert. Die optische Dichte bei 420–480 nm korreliert mit der Zahl vitaler, stoffwechselaktiver Zellen und deren mitochondrialer Aktivität (Mosmann 1983).

Die Zellen wurden nach dem Absaugen des überstehenden Kulturmediums und einem Waschschrift mit PBS trypsinisiert und die Zellzahl wurde ermittelt. Durch Verdünnung der resultierenden Zellsuspension erfolgte die Herstellung einer Suspension mit einer Konzentration von 4000 Zellen pro 90 µl Kulturmedium.

In die *wells* der 96-*well*-Platte wurde anschließend dieses Volumen der Zellsuspension übertragen. Bei der gewählten Zellzahl konnte im *well* der 96-*well* Platte ein exponentielles Wachstum stattfinden (Daten nicht gezeigt).

Um eine Adhärenz der Zellen zu ermöglichen, erfolgte nach dem Ausplattieren eine 24-stündige Inkubation bei 37°C im Brutschrank mit anschließender lichtmikroskopischer Kontrolle. Es folgte die Behandlung der Zellen mit den durch entsprechendes Kulturmedium verdünnten Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen, jedoch stets mit einem Volumen von 10 µl, so dass sich ein einheitliches Gesamtvolumen 100 µl je *well* ergab.

Nach 48 Stunden Einwirkungszeit erfolgte die Zugabe von 10 µl WST-Zellproliferationsreagenz pro *well*. 90 Minuten nach Zugabe erfolgte die photometrische Messung mit dem ELISA-Reader um den Anteil vitaler Zellen in jedem *well* zu bestimmen (Carmichael et al. 1987, Mosmann 1983, Wasserman and Twentyman 1988).

7.4. Klonogener Assay

Zur Durchführung des klonogenen Assays, auch „*colony formation test*“ oder Koloniebildungstest genannt, wird eine bestimmte Anzahl von Zellen in einer definierten Menge Kulturmedium in eine zellkulturfähige Kulturplatte überführt. Anschließend erfolgt eine Behandlung mit der zu testenden Substanz. An die Behandlung schließt sich eine Inkubationszeit von etwa 7-14 Tagen an. So wird den teilungsfähigen Zellen die Zeit zur Bildung von Kolonien mit mehr als 50 Zellen gegeben. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgt das vorsichtige Abpipettieren des überstehenden Mediums und eine Färbung der entstandenen Zellkolonien mittels 2%-igem Kristallviolett. Durch den Vergleich der Koloniezahlen mit den Kontrollen können die zytotoxischen Effekte einer Substanz quantifiziert werden. Insbesondere misst der Test die Fähigkeit von Zellen *in vitro* zu proliferieren und damit Kolonien zu bilden. Die Kolonie ist hierbei definiert als eine Anzahl von ≥ 50 Zellen. Zur Quantifizierung von zytotoxischen Einflüssen, wie denen von

Zytostatika, eignet sich die Methode hervorragend. Der Koloniebildungstest misst hierbei auch, ob eine Behandlung die Fähigkeit einer Zelle zur Proliferation beeinträchtigt hat oder nicht (Franken et al. 2006).

Für die Experimente wurden je 400 Zellen pro *well* in Triplikaten in 6-*well*-Platten ausgesät. Diese Methode nach Franken *et al.* wird als „*plating before treatment*“, das heißt „Aussäen vor Behandlung“, bezeichnet (Franken et al. 2006). Nach einer 24-stündigen Ruhephase bei 37° C im Brutschrank, in welcher sich eine Adhärenz der Zellen entwickeln konnte, aber lichtmikroskopisch noch keine Koloniebildung stattfand, erfolgte eine 48-stündige Behandlung mit den Inhibitoren mit oder ohne Hitzeschock. Um die Inhibitoren anschließend wieder zu entfernen, wurde das Nährmedium schonend gewechselt. Nach etwa 10 Tagen und lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgte, nach vorsichtigem Abpipettieren des überstehenden Mediums, die Färbung der Kolonien im *well* mittels Kristallviolett sowie die lichtmikroskopische Auszählung der gebildeten Kolonien.

7.5. mTOR-Inhibitoren und Alkylphosphocholine

7.5.1 mTOR-Inhibitoren

Der mTOR-Inhibitor RAD001 oder Everolimus (LC Laboratories) wurde in sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und in Aliquots in der Konzentration von 10 mmol/l bei -20°C (Gefrierschrank) gelagert. CCI-779 oder Temsirolimus (Pfizer, bereitgestellt durch Prof. Dr. M. Dreyling, Arbeitsgruppe Maligne Lymphome, Klinikum der LMU München) wurde in sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) zu 100 mmol/l gelöst bereitgestellt und nach Verdünnung auf 10 mmol/l aliquotiert und bei -20°C gelagert.

7.5.2. Alkylphosphocholine

Perifosin (Octadecyl-(1,1-dimethyl-piperidino-4-yl)-phosphat, Selleck Chemicals,) stand gelöst in sterilem Wasser zu Konzentrationen von 2,2 mmol/l bereit und wurde bei -20°C gelagert. Erufosin (Erucylphosphohomocholin synthetisiert durch Prof. Dr. H. Eibl, bereitgestellt durch PD Dr. L. Lindner, Klinikum der LMU München) wurde gelöst in sterilem Wasser zu einer Konzentration von 19,85 mmol/l bereitgestellt und bei 4 °C gelagert.

7.6. Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode zum immunologischen spezifischen Nachweis von Proteinen. Im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Experimente wurden insbesondere phosphoryliertes AKT (Ser 473), phosphorylierte GSK3 α und phosphoryliertes Protein S6 nachgewiesen. Die Zellen wurden für die Experimente in T25 Zellkulturflaschen kultiviert und mit definierten Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellpopulationen.

Für die Proteinisolation wurden die Zellen nach den jeweiligen Behandlungen wie oben beschrieben geerntet und die Zellpellets wurden nach mehrmaligen Waschschrinen mit PBS in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die Zellkulturflaschen wurden hierfür auf Eis gelagert, um Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse zu unterbinden.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellpellets mit einem 1:10 verdünnten Lysispuffer unter Zugabe von 1% Protease- und Phosphataseinhibitor und EDTA versetzt und für 15 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zum Zwecke einer Komplettierung der Zellyse mittels des Ultraschallgerätes „Branson Sonifier 250“ (Output 5 bei 50% Leistung) für insgesamt 3 Sekunden sonifiziert. An diese Behandlung schloss sich eine weitere 10-minütige Inkubationszeit auf Eis an. Zur Entfernung von Zelldebris folgte ein Zentrifugationsschritt (13000xg, 10 min, 4°C) und der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorf®-Gefäß überführt.

Die Proteinkonzentration in der Lösung wurde mit Hilfe des Pierce BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay-Kits bestimmt. In 96-well Platten wurde zu einer Verdünnungsreihe von Kontroll-Standard mit bekannten Proteinkonzentrationen auch zu den Proben aus den gewonnenen Proteinlösungen ein Reagenz („*Working-Solution*“) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° C erfolgte mittels eines Photometers bei 562 nm die Messung der optischen Dichte der Proben sowie der Kontrollstandards. Anhand der generierten Standardkurve für die Kontrollstandards konnte für die Proben die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt werden.

Für die Weiterverarbeitung wurde die Proteinlösung mittels Lysispuffer (ohne Zusätze) auf eine Konzentration von 1 μ g Protein pro μ l verdünnt. Die Proteine wurden dann für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und mit einem vierfach konzentrierten Ladepuffer versetzt. Alle zu untersuchenden Proteinlösungen wurden somit auf dieselbe Konzentration gebracht und so für die Elektrophorese vorbereitet.

Es erfolgte anschließend die SDS (*sodium dodecyl sulfate*) Polyacrylamid Gel-Elektrophorese. Bei diesem Verfahren werden Stoffe nach ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli 1970). Nach Herstellung der aus zwei Komponenten, einem Sammel- und einem Trenngel bestehenden Gele mittels doppelt destilliertem Wasser, Acrylamid, Tris-HCL, SDS, APS und TEMED (Zusammensetzung siehe 7.1.7.) wurden diese, bereits in Elektrophoresepuffer gelagert, in den Aufnahmelücken mit Proben zu je 10-100 µg Protein pro Lücke bestückt. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde eine Mini Trans-Blot® Cell Anlage verwendet. Die Elektrophorese fand in einem Medium aus 25 mM Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 8,2 statt. Als Spannung wurden zunächst 75 Volt für 15 Minuten und abschließend 120 Volt für 105 Minuten angesetzt.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mit 0,45 µm Porendurchmesser *geblottet*. Hierfür wurde die Nassblott-Apparatur 422 Electro Eluter von BioRad verwendet. Die Nitrozellulose-Membran wurde im Vorfeld des *Blotting*-Verfahrens in einem Medium bestehend aus Tris-Puffer, Glycin und Methanol (siehe 7.1.7.) äquilibriert. In diesem Medium erfolgte auch das anschließende *Blotten*. Das Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese auf eine *blotting* Membran gebettet und diese beiden Bestandteile wurden, zwischen *blotting* Filterpapier gelagert, in der *blotting* Apparatur befestigt. Es wurde dann mittels einer Spannung von 80 Volt für 90 Minuten unter ständiger Kühlung mittels Kühlakkus der *Blot*, also die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose *blotting* Membran, durchgeführt.

Nach dem *Blotting* wurden die Membranen in einer TBS-Tween-Lösung (0.05% Tween, NaCl 0,05%, 0,2% Tris-Puffer 1,5 M) gewaschen und anschließend für 45 Minuten bei RT in TBS-Tween mit 5% Milchpulver inkubiert, um freie Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren.

Zur proteinchemischen Detektion von phosphoryliertem AKT (Ser 473), p-S6 und beta-Aktin wurden spezifische primäre Antikörper verwendet. Nachdem die Antikörper nach den Angaben des Herstellers in TBS-Tween (TBS mit 0,05% Tween) verdünnt wurden (siehe Tabelle 6), wurden sie zu den Membranen gegeben und für 24 Stunden bei 4°C in Falcon-Röhrchen auf einem Rollenmischgerät inkubiert. Anschließend wurden die Membranen nach mehrmaligen Waschschritten mit TBS-Tween mit dem Zweitantikörper, gelöst in TBS-Tween mit 5% Milchpulver, für eine Stunde bei RT inkubiert. Der mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Zweitantikörper ermöglichte hierbei die Proteindetektion mittels Chemolumineszenz. Verwendet wurde das Detektionsreagenz *Amersham™ ECL™ Prime*.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Membran in eine lichtdichte Entwicklungskassette übertragen und mit 1 ml Detektionsreagenz *Amersham™ ECL™*

Prime homogen überschichtet. Anschließend erfolgte in einer lichtgeschützten Entwicklerkammer eine Belichtung von Western blot Filmen. Verwendet wurde ein *Optima X-Ray Film Processor*. Je nach Stärke und Qualität des Signales wurden verschiedene Belichtungszeiten gewählt. Bei zu geringer Signalstärke erfolgte die Anwendung von Verstärkerlösung *Pierce™ Western Blot Signal Enhancer*, auch hier wurde die Belichtungszeit abhängig von der Signalstärke gewählt. Die verwendeten Antikörper wurden von der Firma *Cell Signalling* bezogen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Antikörper für *Western blots* (*Cell signalling*®):

Antikörper	Spezies	Verdünnung
Monoklonaler β -Actin-Antikörper (#8457)	Hase	1:1000
Monoklonaler Phospho-AKT (Ser473) Antikörper (#4051)	Maus	1:1000
Monoklonaler Antikörper S6 Ribosomales Protein (#2317)	Maus	1:1000
Monoklonaler Antikörper Phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9) (#9327)	Hase	1:1000
Monoklonaler Antikörper GAPDH (#2118)	Hase	1:1000
Anti-Maus IgG, HRP-linked (#7076)	Pferd	1:1000- 1:3000
Anti-Hase IgG, HRP-linkes (#7074)	Ziege	1:1000- 1:3000

Anschließend erfolgte eine densitometrische Auswertung und somit semiquantitative Analyse der Bandenintensität mit Hilfe der Freeware „*ImageJ*“® („*Image processing in Java*“). Verwendet wurde die frei erhältliche Version 1.48v vom 19. April 2014.

7.7. Statistik

Sämtliche Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Daten werden als Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten mit der zugehörigen positiven und negativen Standardabweichung dargestellt. Für die statistischen Untersuchungen bezüglich der Unterschiede zwischen den Kontrollen und den einzelnen Behandlungsbedingungen wurde jeweils ein Student's-T-Test durchgeführt. Der statistische Test wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel 2010 von *Microsoft*® durchgeführt. Bei Vorliegen eines p-Wertes von $< 0,05$ wird dies in den Graphiken mittels eines Sternchens über oder unter den Standardabweichungsbalken oder alternativ mit Hilfe einer unter der zugehörigen Graphik dargestellten Tabelle angezeigt.

8. Ergebnisse

8.1. WST1-Assay

Im Vorfeld durchgeführte Optimierungsexperimente ergaben für den WST1-Viabilitätsassay eine auszusäende Zellzahl von 4000 Zellen pro *well* der verwendeten 96-*well* Platten (nicht gezeigt). Unter dieser Bedingung war bei allen untersuchten Zelllinien die Möglichkeit eines exponentiellen Wachstums gegeben, wie es zur Interpretation des WST1-Assays Voraussetzung ist (Slavotinek et al. 1994). Das angesetzte Behandlungsschema ist Abbildung 3 zu entnehmen.

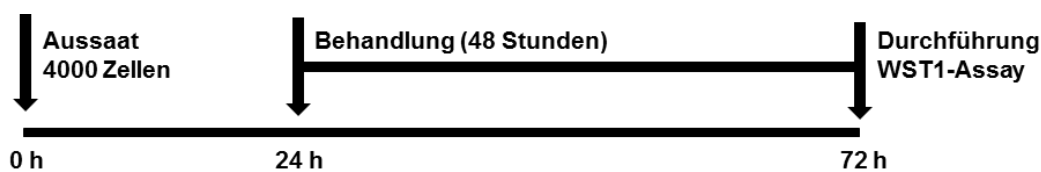


Abbildung 3: Behandlungsschema WST1-Viabilitätsassay

8.1.1. WST1-Assay: Sensitivität von SW-872 gegenüber den Einzelsubstanzen

In dieser Versuchsreihe wurde die Sensitivität von SW-872 Zellen gegenüber einer alleinigen mTOR-Inhibition mittels Everolimus beziehungsweise Temsirolimus und einer alleinigen AKT-Inhibition mittels Perifosin beziehungsweise Erufosin ermittelt. Im Speziellen wurden die einzusetzenden LC50- und LC25-Konzentrationen der genannten Substanzen zur Verwendung für die anschließenden Kombinationsversuche bestimmt. Als LC50 beziehungsweise LC25 wird hier die Konzentration eines Inhibitors bezeichnet, bei welcher *in vitro* 50% beziehungsweise 25% der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle absterben. Die Experimente erfolgten gemäß dem in Abbildung 3 aufgeführten Schema. Als Konzentrationen für die mTOR-Inhibitoren wurden zunächst 1, 10, 100 und 1000 nmol/l verwendet, für die AKT-Inhibitoren zunächst 5, 10, 15 und 20 µmol/l.

Es zeigte sich eine nur geringe Sensitivität bei SW-872 Zellen gegenüber einer alleinigen mTOR-Inhibition, die unabhängig vom Inhibitor mit einem gering ausgeprägten konzentrationsabhängigen Effekt auf das Zellüberleben einherging (Abbildung 4 A). Eine LC50 ließ sich trotz eines gering ausgeprägten dosisabhängigen Effektes durch die alleinige mTOR-Inhibition auch bei Konzentrationen von über 1000 nmol/l nicht erreichen (Daten nicht gezeigt). Bei 1000 nmol/l zeigte sich für den Inhibitor Temsirolimus eine Viabilität von 85% für den Inhibitor Everolimus eine Viabilität von 79%.

Für weitere Experimente, auch an anderen Zelllinien, wurde die Höchstdosis daher auf 1000 nmol/l festgelegt. Als sensitiv einer mTOR-Inhibition gegenüber wurden im Folgenden der Publikation von Moriceau *et al.* entsprechend diejenigen Zelllinien angesehen, bei welchen sich eine LC50 von unter 100 nmol/l mTOR-Inhibitor erreichen ließ. Die im Rahmen der Arbeit von Moriceau *et al.* verwendeten Osteosarkomzelllinien zeigten eine maximale Einschränkung des Überlebens nach einer Einwirkung von weniger als 100 nmol/l Everolimus. Auch Dosissteigerungen auf bis zu 1000 nmol/l Everolimus zeigten hier keine gesteigerten Effekte auf die Viabilität (Moriceau *et al.* 2010).

Bei den AKT-Inhibitoren Perifosin und Erufosin waren die Effekte vergleichsweise stärker ausgeprägt. Eine LC50 ließ sich bei Anwendung beider Inhibitoren erreichen (siehe Abbildungen 4 B). Bei der Verwendung von Erufosin zeigte sich bei niedrigen Konzentrationen (5 und 10 µmol/l) unerwarteterweise eine moderat gesteigerte Viabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zur genauen Charakterisierung der Sensitivität von SW-872 Zellen gegenüber Erufosin fand daher im Rahmen ergänzender Experimente eine größere Bandbreite an Konzentrationen Anwendung als bei Perifosin (siehe Abbildung 5). Bei 5 bzw. 10 µmol/l zeigte sich hier erneut die gesteigerte Viabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abbildung 5).

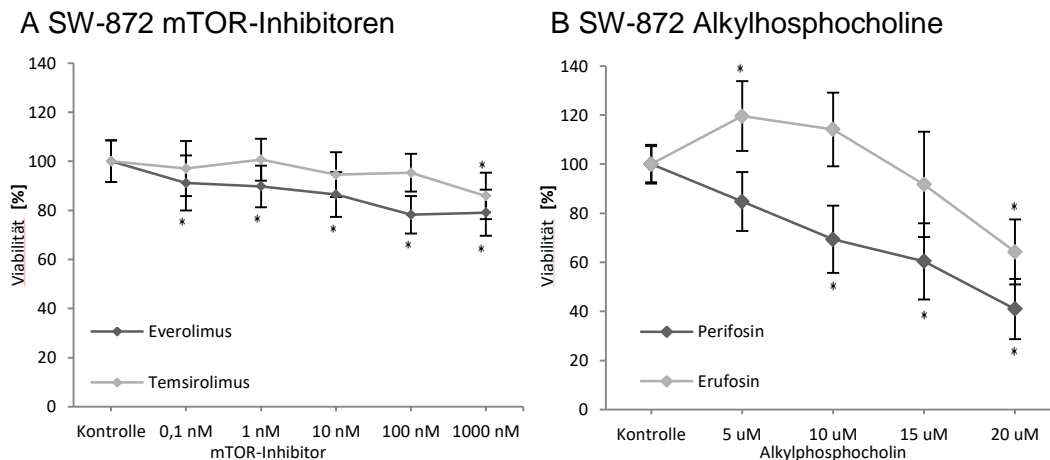


Abbildung 4: Viabilitäten von SW-872 Zellen im WST-1 Assay; Liniendiagramm; 48 Stunden Inkubation mit (A) Everolimus oder Temsirolimus und (B) Perifosin oder Erufosin; * p-Wert <0,05 im Vergleich zur Kontrolle

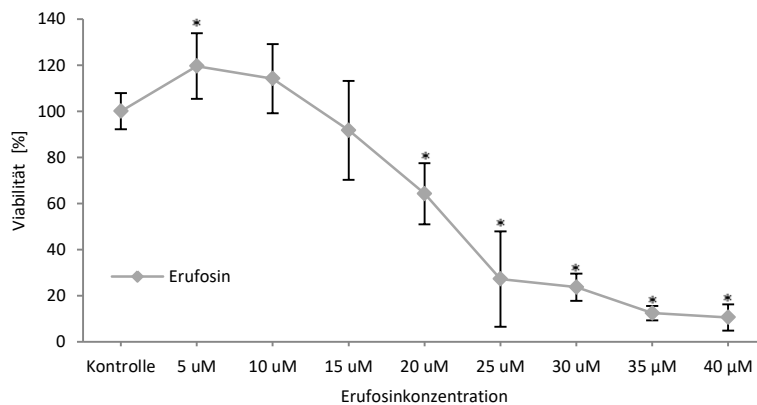
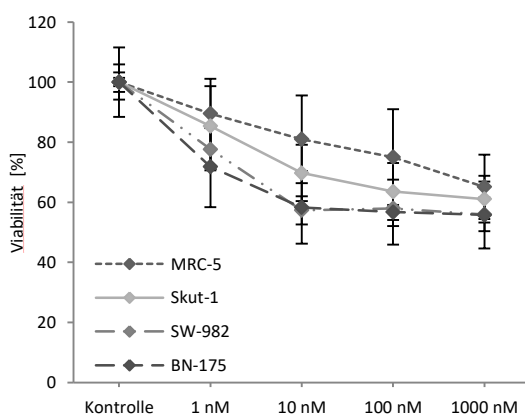


Abbildung 5: Viabilitäten von SW-872-Zellen im WST1-Assay; Liniendiagramm; 48 Stunden Inkubation mit Erufosin; * p-Wert <0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Die ermittelten LC25- bzw. LC50-Werte beliefen sich bei SW-872 für Perifosin auf 8 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 17,5 $\mu\text{mol/l}$ und für Erufosin auf 17,5 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 22 $\mu\text{mol/l}$. Diese Konzentrationen wurden für die folgenden Kombinationsexperimente eingesetzt. Bei einem klaren Dosisseffekt wurde entschieden, für die weiteren Experimente die an SW-872 Zellen ermittelten LC25- und LC50-Werte für Perifosin und Erufosin als Konzentrationen bei allen untersuchten Zellen einzusetzen.

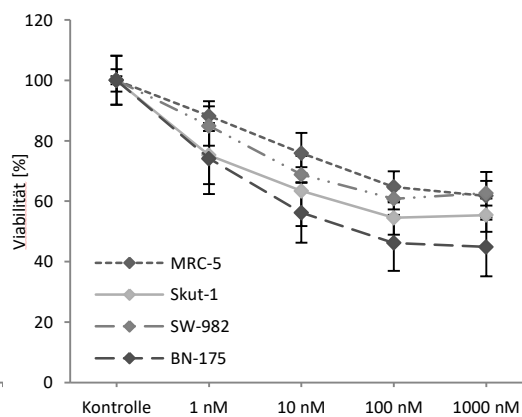
8.1.2. WST1-Assay: Sensitivität von weiteren Sarkomzelllinien gegenüber den mTOR-Inhibitoren

A Everolimus



A	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
MRC-5	*	*	*	*
Skut-1	*	*	*	*
SW-982	*	*	*	*
BN-175	*	*	*	*

B Temsirolimus



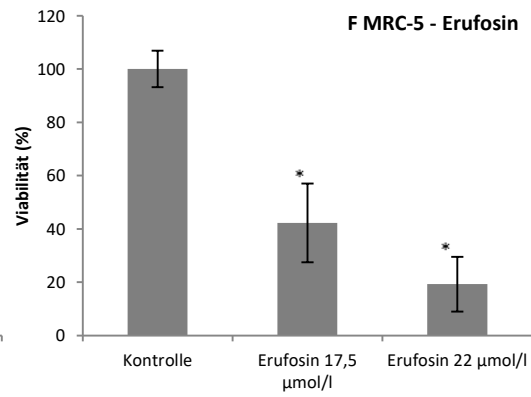
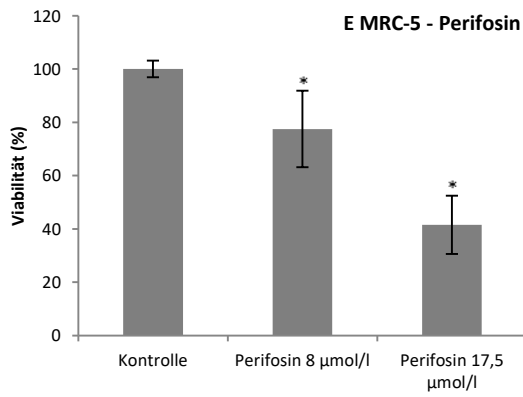
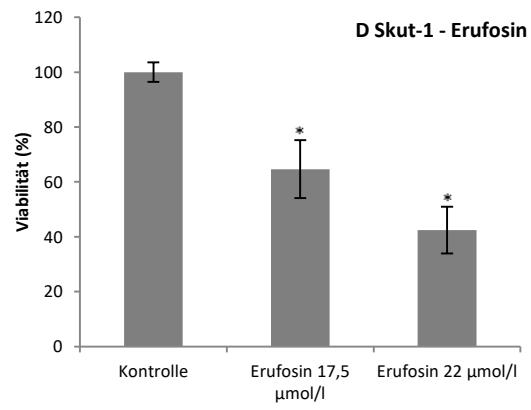
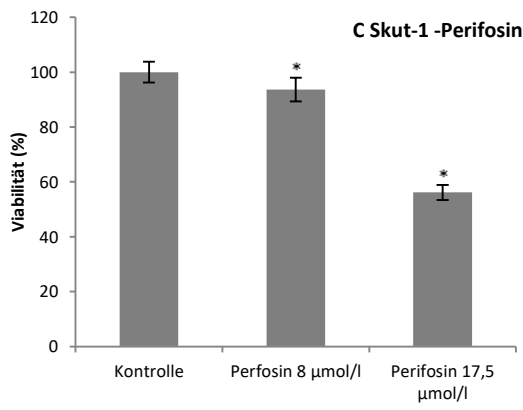
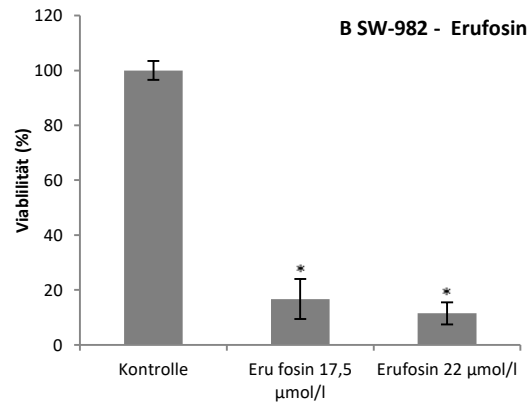
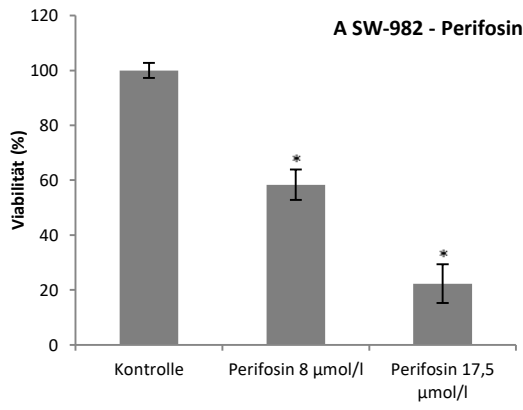
B	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
MRC-5	*	*	*	*
Skut-1	*	*	*	*
SW-982	*	*	*	*
BN-175	*	*	*	*

Abbildung 6: Viabilitäten von MRC-5, SW-982, Skut-1, BN-175 nach mTOR-Inhibition; Liniendiagramm; 48 Stunden Inkubation mit (A) Everolimus und (B) Temsirolimus; * in zugehöriger Tabelle p-Wert <0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Anhand der ermittelten Inhibitorkonzentrationen wurden die nachfolgenden Kombinationsversuche an den weiteren Zelllinien (SW-982, Skut-1, BN-175, MRC-5) durchgeführt. Im Vorfeld vor kombiniertem Einsatz der AKT- und mTOR-Inhibitoren wurde bei allen untersuchten Zelllinien zunächst die Prüfung der Sensitivität gegenüber einer alleinigen mTOR-Inhibition durchgeführt. Verwendet wurden die Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000 nmol/l (Abbildung 6). Auf die Anwendung höherer Konzentrationen wurde verzichtet, da im Rahmen der Vorversuche mit SW-872 durch weitere Dosissteigerungen auf über 1000 nmol/l Everolimus und Temsirolimus keine Zunahme der Zytotoxizität erreicht wurde. Die Reaktionsmuster aller Zelllinien zeigten sich ähnlich dem von SW-872 Zellen (Abbildung 6 A und B). MRC-5 und Skut-1 zeigten wie SW-872 eine geringe Sensitivität gegenüber einer alleinigen mTOR-Inhibition, bei insgesamt jedoch geringfügig höheren Sensitivitäten im Vergleich zu SW-872. SW-982 Zellen wiesen nach einer Behandlung mit Everolimus eine vergleichsweise höhere Sensitivität als MRC-5 und Skut-1 auf, es zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede zu diesen Zelllinien bei der Behandlung mit Temsirolimus. Bei BN-175 Zellen war die Viabilität nach der Inkubation mit beiden mTOR-Inhibitoren im Vergleich zu den anderen Zelllinien am ausgeprägtesten reduziert. Bei der Behandlung mittels Temsirolimus ließ sich bei BN-175 als einziger Zelllinie eine LC50 von <100 nmol/l erreichen (siehe Abbildung 6). Als einzige Zelllinie zeigte sich diese, analog der oben genannten Definition, als sensitiv gegenüber einer Behandlung mittels Temsirolimus.

8.1.3. WST1-Assay: Sensitivitäten der Zelllinien SW-982, Skut-1, MRC-5 und BN-175 gegenüber Perifosin und Erufosin in den im Rahmen der Voruntersuchungen ermittelten Konzentrationen

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen erfolgte zunächst die Testung der Sensitivitäten der Zelllinien SW-982, Skut-1, MRC-5 und BN-175 gegenüber den an SW-872 ermittelten LC25- und LC50-Konzentrationen von Perifosin und Erufosin (Kapitel 8.1.1.)



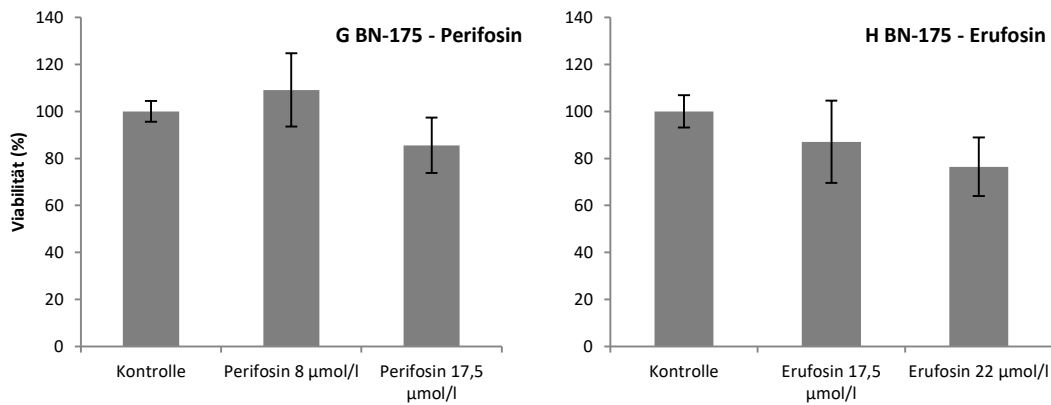


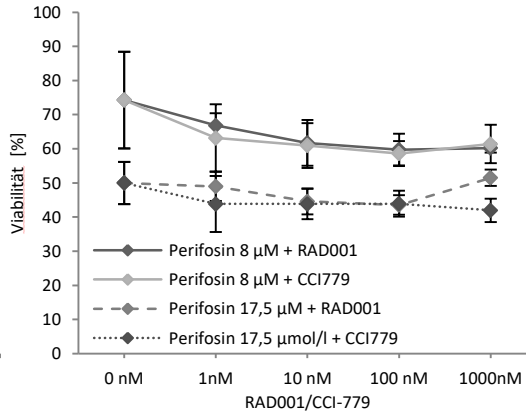
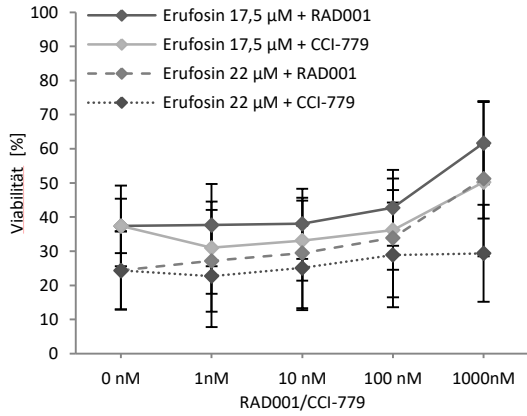
Abbildung 7: Viabilitäten von SW-982, Skut-1, MRC-5 und BN-175 nach AKT-Inhibition mittels Perifosin und Erufosin; Balkendiagramme; * p-Wert <0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Die Daten zeigen, dass sich insbesondere die Zelllinie SW-982 sensitiver gegenüber beiden APC's verhielt als die Liposarkomzelllinie SW-872 (Abbildung 7 A und B). BN-175 hingegen zeigte im Vergleich zu SW-872 und SW-982 eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber beiden APC's (Abbildung 7 G und H). Die Zelllinien MRC-5 und Skut-1 zeigten ähnliche Sensitivitäten gegenüber Perifosin und Erufosin (Abbildung 7 C, D, E, F).

8.1.4. WST1-Assay: Kombination von AKT- und mTOR-Inhibition

Zum Zweck einer übersichtlichen Darstellung und sinnvollen Interpretation der Ergebnisse der Kombinationsexperimente wurden diese in drei Reaktionsmuster der untersuchten Zelllinien eingeteilt. Reaktionsmuster eins zeigten SW-872 und SW-982 (Abbildung 8), Reaktionsmuster zwei MRC-5 und Skut-1 (Abbildung 9) und Reaktionsmuster drei BN-175 (Abbildung 10).

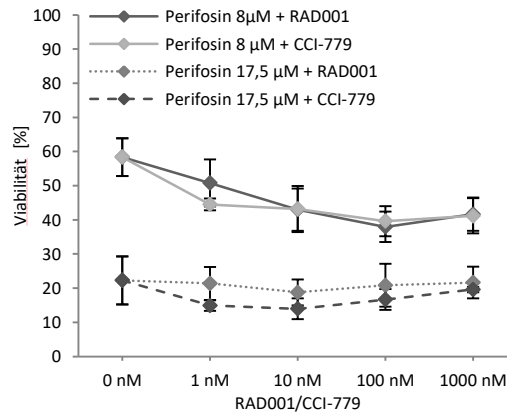
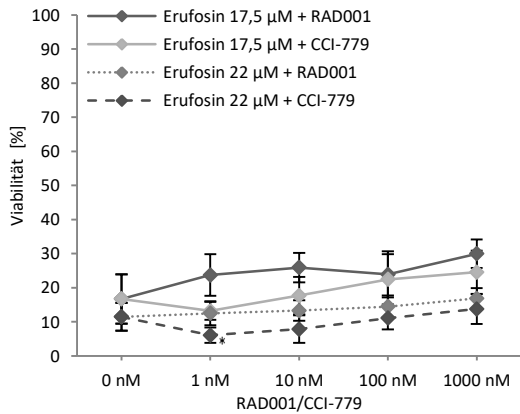
A SW-872



	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Eru 17,5 μM + RAD001				*
Eru 17,5 μM + CCI779				*
Eru 22 μM + RAD001				*
Eru 22 μM + CCI779				

	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Peri 8 μM + RAD001		*	*	*
Peri 8 μM + CCI779		*	*	*
Peri 17,5 μM + RAD001				
Peri 17,5 μM + CCI779				

B SW-982



	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Eru 17,5 μM + RAD001	*	*		*
Eru 17,5 μM + CCI779				*
Eru 22 μM + RAD001				
Eru 22 μM + CCI779				

	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Peri 8 μM + RAD001	*	*	*	*
Peri 8 μM + CCI779	*	*	*	*
Peri 17,5 μM + RAD001				
Peri 17,5 μM + CCI779	*	*	*	

Abbildung 8: Reaktionsmuster eines im WST-1 Assay auf Kombination von mTOR- und AKT-Inhibition; Liniendiagramm; 48 Stunden Inkubation der Zelllinien (A) SW-872 und (B) SW-982 mit Erufosin oder Perifosin alleine oder einer Kombination aus APC und mTOR-Inhibitor, * in zugehöriger Tabelle p-Wert <0,05 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mittels Erufosin bzw. Perifosin

Bei den Zelllinien SW-872 und SW-982 zeigten sich unter der Kombination der mTOR-Inhibitoren in aufsteigenden Konzentrationen mit Erufosin in beiden verwendeten Konzentrationen antagonistische Effekte im Sinne einer zunehmenden Viabilität (Abbildung 8 A und B). Der antagonistische Effekt zeigte sich etwas stärker ausgeprägt bei den SW-872 Zellen. Bei hohen Standardabweichungen bei beiden Zelllinien ist dieser protektive Effekt jedoch nicht mit Sicherheit zu postulieren.

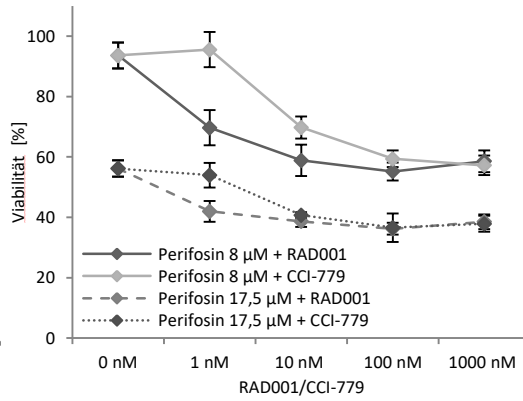
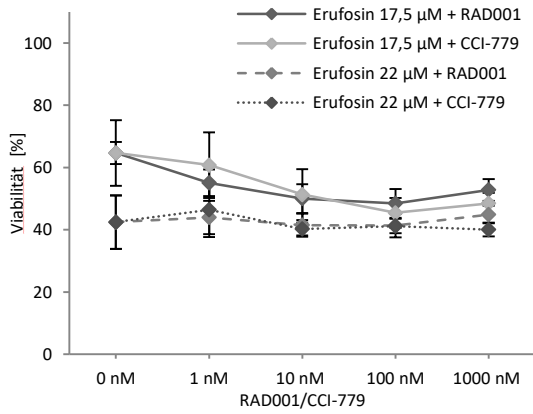
Bei der Kombination von Perifosin mit den APC's zeigte sich bei beiden Zelllinien im niedrigen Konzentrationsbereich von Perifosin (8 $\mu\text{mol/l}$) eine gering ausgeprägte zusätzliche Zytotoxizität, die unter zunehmender Konzentration der mTOR-Inhibitoren zunahm (siehe Abbildung 8 A und B). Diese zusätzliche Zytotoxizität konnte bei der höheren Perifosinkonzentration (17,5 $\mu\text{mol/l}$) nur andeutungsweise nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen erfolgte die Einteilung in das Reaktionsmuster eins.

Generell zeigte sich bei der Synovialsarkomzelllinie SW-982 eine insgesamt ausgeprägtere Sensitivität gegenüber den APC's (siehe Abbildung 8 B). Bei den SW-982 Zellen zeigte sich zudem nach der Kombination niedriger Konzentrationen Temsirolimus (1 nmol/l und 10 nmol/l) mit Erufosin ein geringer zusätzlicher zytotoxischer Effekt, der jedoch bei höheren Temsirolimuskonzentrationen wieder in oben beschriebenen antagonistischen Effekt umschlug (Abbildung 8 B).

Die zuvor bestimmten LC25- und LC50-Werte für Erufosin bei SW-872 Zellen ließen sich, im Gegensatz zu den entsprechenden Werten bei Perifosin, trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente nicht reproduzieren (siehe Abbildung 8 A). Es zeigte sich trotzdem ein deutlicher dosisabhängiger Effekt auf die Viabilität. Unter Einwirkung von 17,5 $\mu\text{mol/l}$ beziehungsweise 22 $\mu\text{mol/l}$ Erufosin lag die Viabilität bei 37 beziehungsweise 24%.

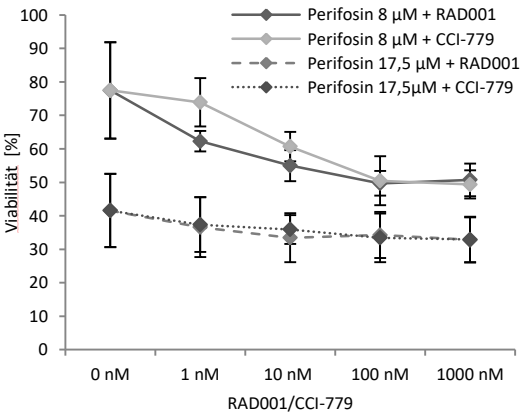
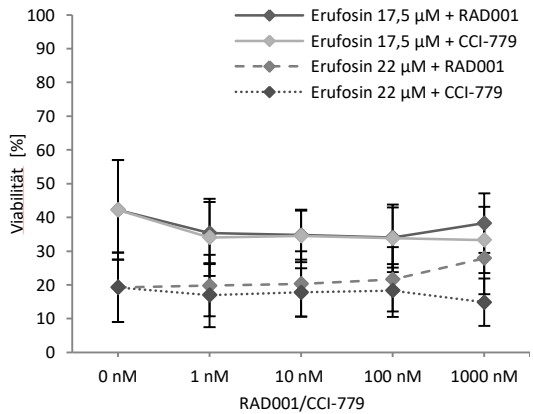
A SKUT-1



	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Eru 17,5 μM + RAD001	*	*	*	*
Eru 17,5 μM + CCI779		*	*	*
Eru 22 μM + RAD001				
Eru 22 μM + CCI779				

	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Peri 8 μM + RAD001	*	*	*	*
Peri 8 μM + CCI779		*	*	*
Peri 17,5 μM + RAD001	*	*	*	*
Peri 17,5 μM + CCI779		*	*	*

B MRC-5



	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Eru 17,5 μM + RAD001				
Eru 17,5 μM + CCI779				
Eru 22 μM + RAD001				
Eru 22 μM + CCI779				

	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Peri 8 μM + RAD001	*	*	*	*
Peri 8 μM + CCI779	*	*	*	*
Peri 17,5 μM + RAD001		*	*	*
Peri 17,5 μM + CCI779		*	*	*

Abbildung 9: Reaktionsmuster zwei im WST-1 Assay auf Kombination von mTOR- und AKT-Inhibition; Liniendiagramm; 48 Stunden Inkubation der Zelllinien (A) Skut-1 und (B) MRC- mit Erufosin oder Perifosin alleine oder einer Kombination aus APC und mTOR-Inhibitor, * in zugehöriger Tabelle p-Wert <0,05 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mittels Erufosin bzw. Perifosin

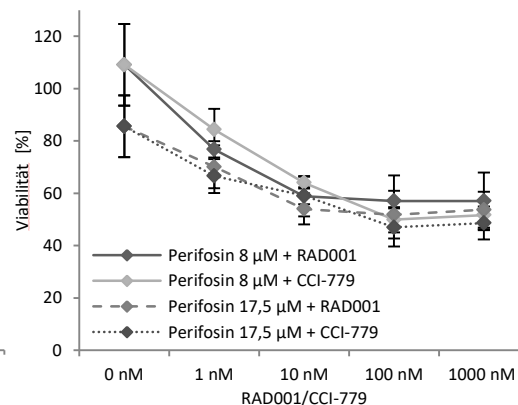
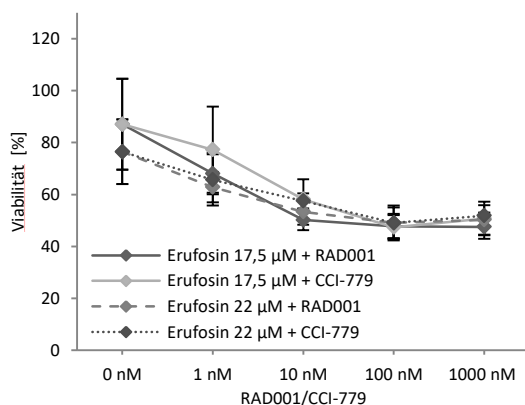
Die Zelllinien Skut-1 und MRC-5 zeigten bei Kombination der mTOR-Inhibitoren in aufsteigender Konzentration mit Perifosin jeweils einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt (siehe Abbildung 9). Weniger stark ausgeprägt zeigte sich der zusätzliche zytotoxische Effekt auch bei der Kombination der mTOR-Inhibitoren mit Erufosin. Diese Beobachtung ließ sich jedoch nur bei der niedrigen Dosierung von 17,5 µmol/l Erufosin machen.

Aufgrund der oben genannten Beobachtungen erfolgte die Einteilung in das Reaktionsmuster zwei.

Sowohl bei den Skut-1 als auch den MRC-5 Zellen kam es bei der jeweils niedriger gewählten Konzentration der APC's zu einer ausgeprägteren konzentrationsabhängigen Zytotoxizität durch den mTOR-Inhibitor als bei der höheren APC-Konzentration.

Insgesamt waren die zusätzlichen zytotoxischen Effekte der Kombinationsbehandlung von Erufosin mit den mTOR-Inhibitoren bei den MRC-5 Zellen am geringsten ausgeprägt; hier ergab sich kein statistisch signifikanter Effekt (Abbildung 9 B).

BN-175



	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Eru 17,5 µM + RAD001	*	*	*	*
Eru 17,5 µM + CCI779		*	*	*
Eru 22 µM + RAD001	*	*	*	*
Eru 22 µM + CCI779	*	*	*	*

	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
Peri 8 µM + RAD001	*	*	*	*
Peri 8 µM + CCI779	*	*	*	*
Peri 17,5 µM + RAD001	*	*	*	*
Peri 17,5 µM + CCI779	*	*	*	*

Abbildung 10: Reaktionsmuster drei im WST-1 Assay auf Kombination von mTOR- und AKT-Inhibition; Liniendiagramm; 48 Stunden Inkubation der Zelllinie BN-175 Erufosin oder Perifosin alleine oder einer Kombination aus APC und mTOR-Inhibitor, * in zugehöriger Tabelle p-Wert <0,05 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mittels Erufosin bzw. Perifosin

Die Fibrosarkomzelllinie BN-175 wurde als einzige dem Reaktionsmuster drei zugeordnet (Abbildung 10). Hier zeigte sich bei allen verwendeten Konzentrationen der APC's eine stark ausgeprägte zusätzliche Zytotoxizität durch eine zusätzliche mTOR-Inhibition (Abbildung 10). BN-175 Zellen zeigten sich im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, mit der Ausnahme SW-982, besonders sensitiv gegenüber einer mTOR-Inhibition und nur wenig sensitiv gegenüber einer Behandlung mit den APC's (Abb. 6 und Abb. 7). Die alleinige AKT-Inhibition mittels APC's hatte demnach erwartungsgemäß einen nur geringen Effekt bei BN-175 Zellen. Bei der Kombination der mTOR-Inhibitoren mit Erufosin und Perifosin zeigte sich bei beiden oben definierten Konzentrationen der APC's je eine stark ausgeprägte, konzentrationsabhängige zusätzliche Zytotoxizität durch die mTOR-Inhibition. Diese war unabhängig vom Inhibitor.

8.2. Klonogene Assays

8.2.1. Klonogene Assays zur Überprüfung der Beobachtungen im WST1-Assay

Angesichts der im Rahmen der WST1-Assays gewonnenen Erkenntnisse über die drei oben beschriebenen Reaktionsmuster einer kombinierten Behandlung, wurden die nachfolgenden Experimente exemplarisch an den Zelllinien SW-872, Skut-1 und BN-175 durchgeführt. Jede Zelllinie diente als Repräsentant für eines der drei Reaktionsmuster. Anstatt des WST-1 Assays wurden nun aufgrund deren höheren Sensitivität zur Bestätigung beziehungsweise genaueren Charakterisierung der Behandlungseffekte klonogene Assays durchgeführt.

Da sich besonders bei den niedrig gewählten Konzentrationen der APC's, insbesondere bei Skut-1 und BN-175 Zellen, ein erkennbarer zusätzlicher Effekt der mTOR-Inhibition zum APC bezüglich des gemessenen Überlebens gezeigt hatte, fanden diese niedrigen Konzentrationen (8 $\mu\text{mol/l}$ für Perifosin und 17,5 $\mu\text{mol/l}$ Erufosin) für die Kombinationsversuche im klonogenen Assay Verwendung. Aufgrund der im WST gezeigten ähnlichen Wirksamkeit der verwendeten mTOR-Inhibitoren wurde auf die Verwendung von Temsirolimus verzichtet. Die Versuche fanden zunächst bei 37° C statt. Die zeitlichen Bedingungen wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenfalls so gewählt, wie für die

vorangegangenen Versuche im WST1-Assay. Untersucht wurde das klonogene Überleben nach Applikation der Einzelsubstanzen Everolimus in den Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000 nmol/l, Erufosin und Perifosin in den Konzentrationen 17,5 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 8 $\mu\text{mol/l}$ sowie nach der Kombination in den genannten Konzentrationen.

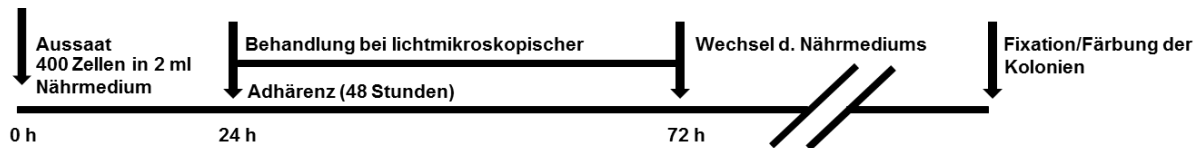


Abbildung 11: Zeitlicher experimenteller Aufbau der klonogenen Assays

Im Rahmen der Untersuchungen zeigten sich die Zelllinien wie bereits bekannt unterschiedlich sensitiv gegenüber einer Exposition mit den APC's (Abbildung 12). Bei SW-872 Zellen zeigte sich, dass die im Rahmen der WST-1-Assays als LC25 bestimmte Konzentration von 8 $\mu\text{mol/l}$ Perifosin in etwa mit der LC25 im klonogenen Assay übereinstimmte. Die als LC25 bestimmte Erufosinkonzentration von 17,5 $\mu\text{mol/l}$ erwies sich im klonogenen Assay als toxischer als im WST1-Assay (Abbildung 12).

Bei Skut-1 und BN-175 Zellen erwiesen sich die beiden verwendeten Konzentrationen ebenfalls als toxischer als im WST1-Assay (Abbildung 12).

Bei BN-175 Zellen zeigte sich zwischen beiden Substanzen in den gewählten Konzentrationen kein Unterschied bezüglich des klonogenen Überlebens (Abbildungen 12).

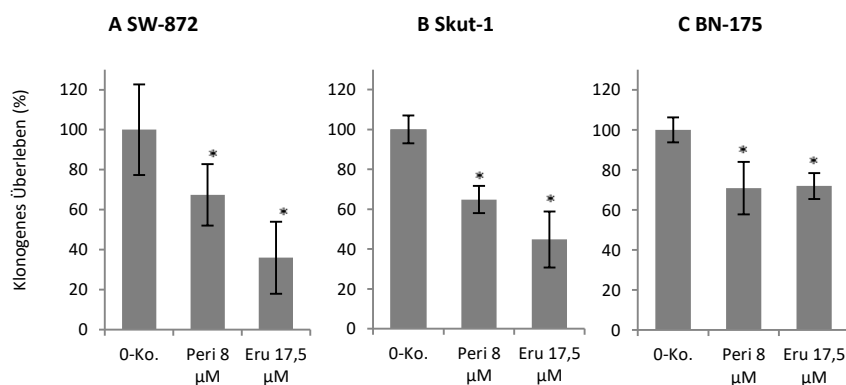
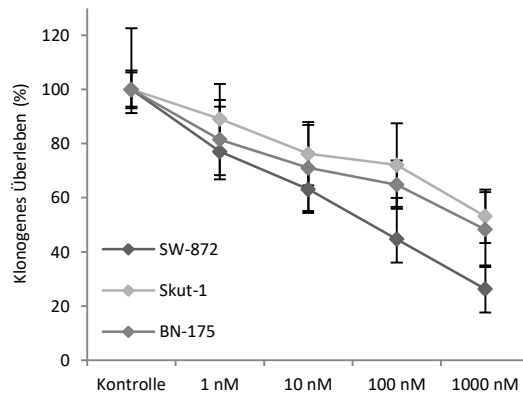


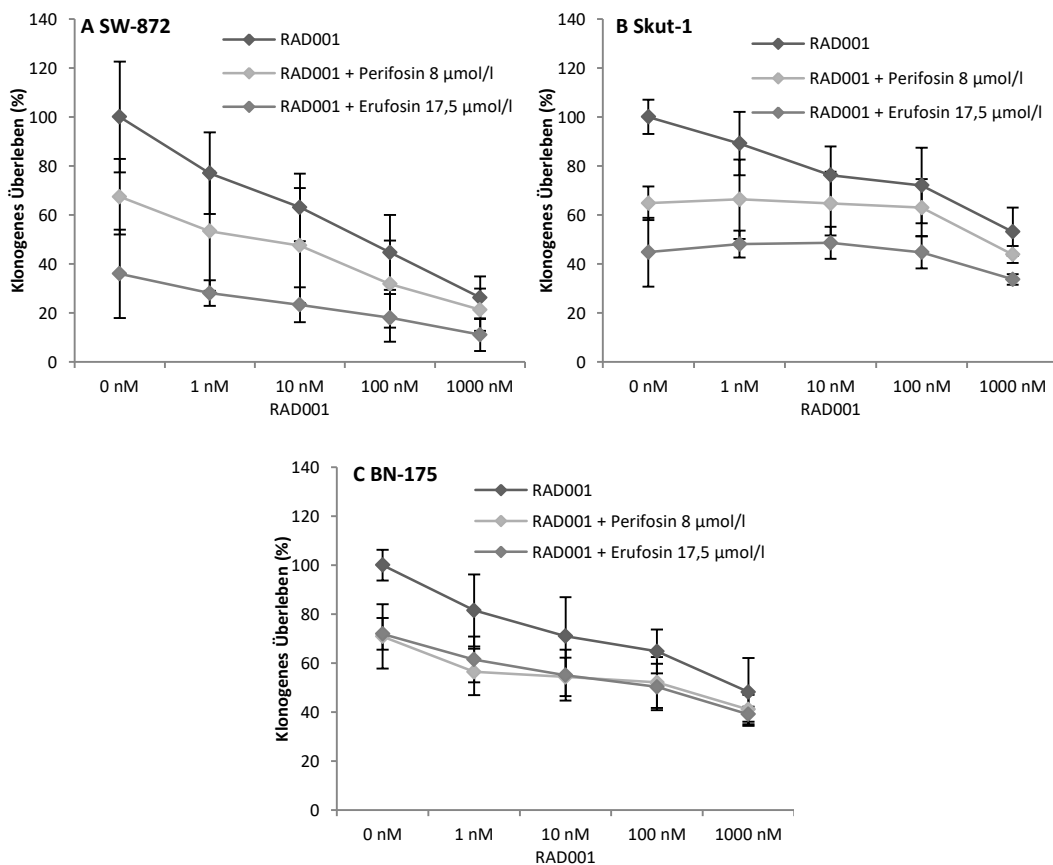
Abbildung 12: Klonogenes Überleben von A) SW-872, B) Skut-1, C) BN-175 nach Behandlung mit Alkylphosphocholinen; Balkendiagramm; 48 Stunden Inkubation bei 37° C mit Perifosin 8 $\mu\text{mol/l}$ (Mitte) oder Erufosin 17,5 $\mu\text{mol/l}$ (rechts); * p-Wert <0,05 im Vergleich zur Kontrolle



	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
SW-872	*	*	*	*
Skut-1	*	*	*	*
BN-175	*	*	*	*

Abbildung 13: Klonogenes Überleben von SW-872, Skut-1, BN-175 nach Behandlung mit Everolimus (RAD001); Liniendiagramm; 48 Stunden Inkubation bei 37° C; * in zugehöriger Tabelle p-Wert <0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Bei allen Zelllinien (SW-872, Skut-1, BN-175) war die Toxizität der alleinigen mTOR-Inhibition im klonogenen Assay stärker ausgeprägt als im WST-1 Assay. Besonders groß zeigte sich der Unterschied bei der Zelllinie SW-872 (Abbildung 13).



	A					B					C				
	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
RAD001		*	*	*	*		*	*	*	*		*	*	*	*
RAD001 + 8 µmol/l Perifosin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
RAD001 + 17,5 µmol/l Erufosin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Abbildung 14: Klonogenes Überleben von A) SW-872, B) Skut-1 und C) BN-175 nach Behandlung mit Everolimus, Everolimus und Perifosin beziehungsweise Everolimus und Erufosin; Liniendiagramme; 48 Stunden Behandlung bei 37° C; * in zugehöriger Tabelle p-Wert <0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 nmol/l RAD001)

Bei den klonogenen Assays zeigten sich bei allen Zelllinien Ähnlichkeiten in der gemessenen Zytotoxizität nach Hinzunahme eines mTOR-Inhibitors zur alleinigen Behandlung mittels APC (Abbildung 14). Durch den Zusatz des mTOR-Inhibitors in aufsteigender Dosierung zu der fixen APC-Dosis (Perifosin: 8 µmol/l, Erufosin: 17,5 µmol/l) zeigte sich bei allen Zelllinien im Gegensatz zu den Ergebnissen beim WST1-Assay eine steigende Reduktion des klonogenen Überlebens im Vergleich zur alleinigen APC-Behandlung (Abbildungen 13 und 14).

Die im Zusammenhang mit den WST1-Assays beschriebenen Reaktionsmuster 2 und 3, welche eine zusätzliche Zytotoxizität der mTOR-Inhibitoren zur Behandlung mittels APC gezeigt hatten, ließen sich somit bestätigen. Im Gegensatz hierzu, ließ sich das Reaktionsmuster 1, welches sich durch einen protektiven Effekt bei Kombination von Erufosin und mTOR-Inhibitoren ausgezeichnet hatte, im Rahmen der klonogenen Assays nicht bestätigen. Der mutmaßliche konzentrationsabhängige protektive Effekt durch die Kombination aus Erufosin und Everolimus ließ sich bei SW-872 Zellen im klonogenen Assay nicht beobachten (Abbildung 14 A).

Bei SW-872 und BN-175 führte bereits 1 nmol/l Everolimus zusätzlich zur APC-Behandlung zu einer messbaren Reduktion des klonogenen Überlebens. Bei Skut-1 Zellen waren hierzu 1000 nmol/l Everolimus nötig (Abbildungen 12 und 14). Bei den niedrigeren Dosierungen von Everolimus zeigte sich bei den Kombinationsbehandlungen bei dieser Zelllinie bis zu einer Konzentration von 100 nmol/l ein Plateau (Abbildung 14 B).

8.2.2. Klonogene Assays mit Hyperthermie

Um den Einfluss einer kontrollierten Temperaturerhöhung wie bei einer regionalen Tiefenhyperthermie oder Oberflächenhyperthermie zu untersuchen, wurde im weiteren Verlauf der Einfluss eines 90-minütigen Hitzeschocks von 41,8° C und 43° C auf das klonogene Überleben untersucht. Bei den Versuchen, bei welchen eine Kombination bestehend aus den Inhibitoren und einer Hyperthermie untersucht wurde, erfolgte der Hitzeschock unmittelbar nach der Applikation der Inhibitoren. Der zeitliche experimentelle Aufbau ist Abbildung 15 zu entnehmen.

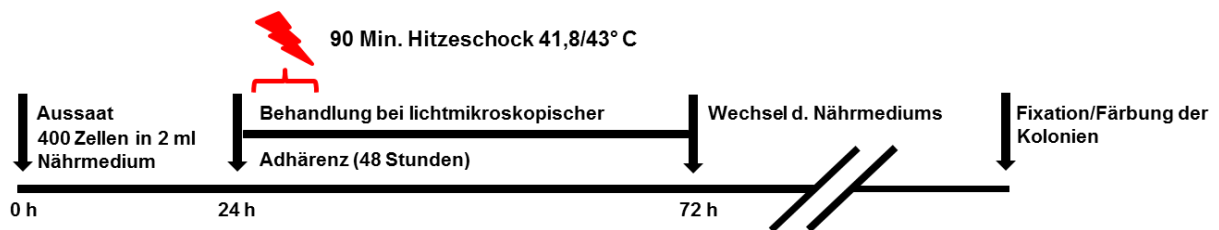


Abbildung 15: Zeitlicher experimenteller Aufbau der klonogenen Assays mit Hitzeschock

Untersucht wurde das klonogene Überleben der Zellen nach einer Behandlung mittels den Einzelsubstanzen Everolimus, Perifosin und Erufosin sowie nach Behandlung mit Everolimus und Perifosin beziehungsweise Erufosin. Die Versuche wurden zum einen bei konstant physiologischen Temperaturen von 37° C, sowie zum anderen mit einem zusätzlichen Hitzeschock (41,8° C oder 43 ° C, 90 min) durchgeführt. Die Behandlungsdauer mit den Inhibitoren betrug wie bei den vorangegangenen Experimenten 48 Stunden, danach erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. In dieser Experimentreihe wurde der mTOR-Inhibitor Everolimus lediglich in einer Konzentration von 100 nmol/l verwendet. Die Konzentrationen von Perifosin und Erufosin wurden wie zuvor auf 8 µmol/l bzw. 17,5 µmol/l festgelegt. Hier hatten sich in den zuvor durchgeführten Kombinationsbehandlungen die besten Effekte bezüglich einer zusätzlichen Zytotoxizität bei der Kombination mit einem mTOR-Inhibitor gezeigt (Abbildungen 8, 9, 10).

Zunächst erfolgte die Sensitivitätstestung der Zelllinien gegenüber einem isolierten Hitzeschock. Die drei Zelllinien zeigten eine insgesamt nur geringe Sensitivität gegenüber den Hitzeschockbehandlungen. Insbesondere bei Skut-1 und SW-872 zeigten sich die im klonogenen Assay gemessenen Überlebenskurven beinahe deckungsgleich (Abbildung 16). BN-175 zeigte ebenfalls eine geringe, insgesamt aber die höchste Sensitivität gegenüber den Hitzeschockbehandlungen (Abbildung 16).

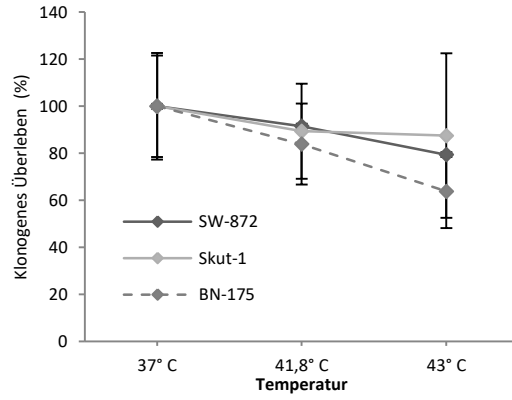
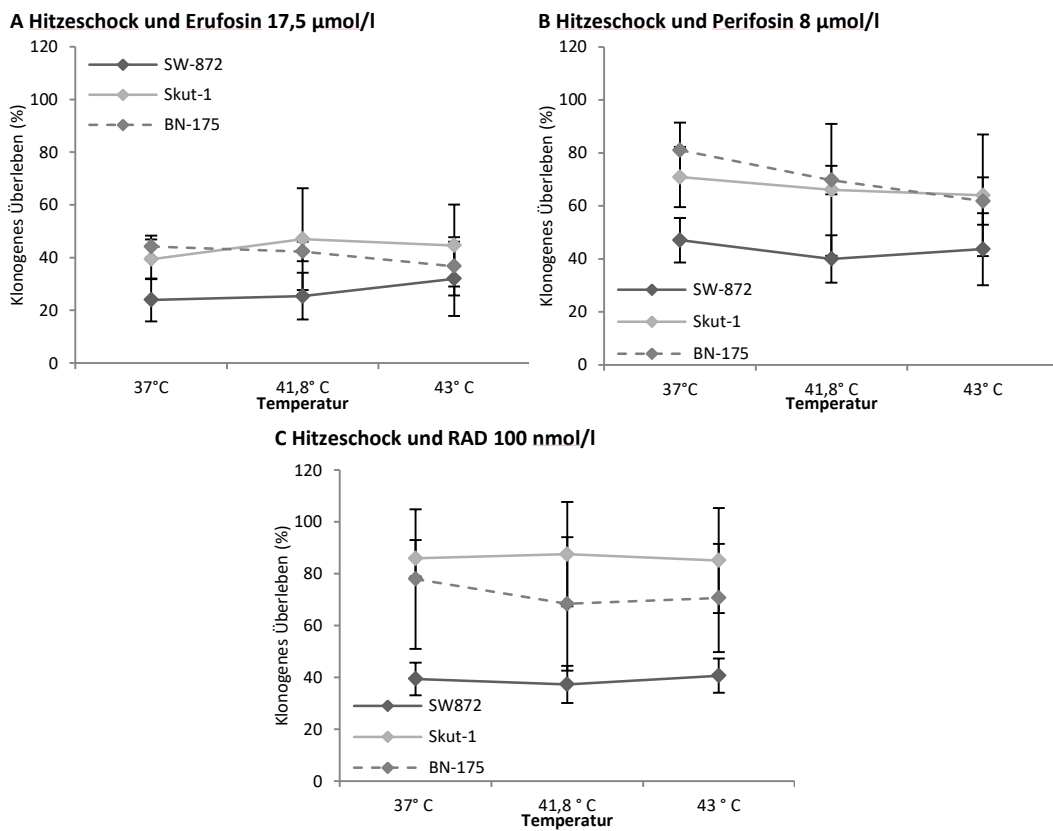


Abbildung 16: Klonogenes Überleben von SW-872, Skut-1, BN-175 nach 90-minütigem Hitzeschock; Liniendiagramm



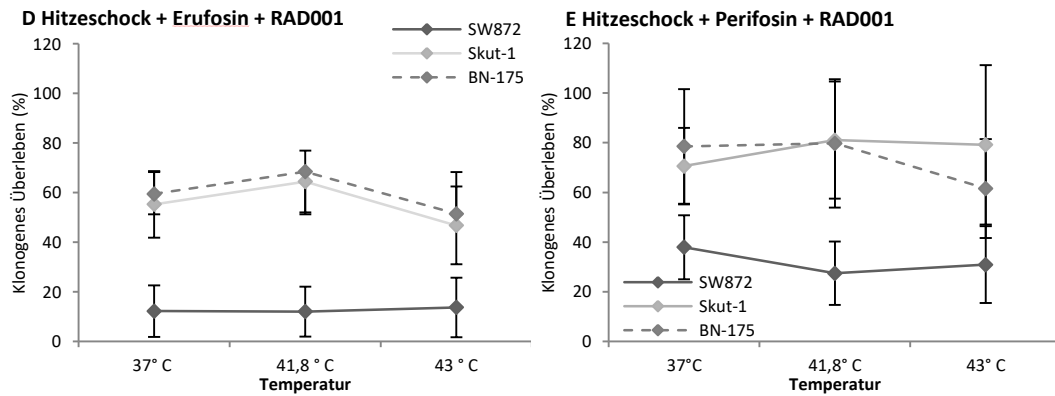


Abbildung 17: Klonogenes Überleben von SW-872, Skut-1 und BN-175 nach verschiedenen Behandlungskombinationen; Liniendiagramme; A) 48 h Erufosin (17,5 $\mu\text{mol/l}$) und 90 Minuten Hitzeschock (41,8° C oder 43° C, Kontrollen 37° C). B) 48 h Perifosin (8 $\mu\text{mol/l}$) und 90 Minuten Hitzeschock (41,8° C oder 43° C, Kontrollen 37° C). C) 48 h Everolimus (RAD001, 100 nmol/l) und 90 Minuten Hitzeschock (41,8° C oder 43° C, Kontrollen 37° C). D) 48 h Erufosin (17,5 $\mu\text{mol/l}$) in Kombination mit Everolimus (RAD001, 100 nmol/l) und 90 Minuten Hitzeschock (41,8° C oder 43° C, Kontrollen 37° C). E) 48 h Perifosin (8 $\mu\text{mol/l}$) in Kombination mit Everolimus (RAD001, 100 nmol/l) und 90 Minuten Hitzeschock (41,8° C oder 43° C, Kontrollen 37° C). Die Normierung erfolgte in jedem Experiment auf die Werte der Kontrollen mit 100% klonogenem Überleben (37° C, kein Inhibitor).

Generell zeigten sich bei den Überlebenskurven aller drei Zelllinien bei allen Behandlungsbedingungen vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 17 A – E). Als Gemeinsamkeit konnte festgestellt werden, dass das im klonogenen Assay gemessene Überleben nach Hitzeschock sich, unabhängig von den verwendeten Inhibitoren, sehr ähnlich dem gemessenen Überleben ohne Hitzeschock zeigte. Ein temperaturabhängiger Effekt auf das klonogene Überleben ließ sich nicht zeigen. Die Unterschiede fielen nur gering aus und werden im Folgenden erläutert.

Bei Einsatz von Erufosin als Kombinationspartner mit einem Hitzeschock zeigten sich keine, beziehungsweise bei BN-175 nur sehr geringe zusätzliche Einschränkungen des klonogenen Überlebens (Abbildung 17 A).

Bei Einsatz von Perifosin in Kombination mit einem Hitzeschock zeigte sich eine geringe temperaturabhängige Tendenz zur Verringerung des klonogenen Überlebens (Abbildung 17 B). Diese zeigte sich bei BN-175, der hitzesensitivsten Zelllinie (Abbildung 16), am deutlichsten ausgeprägt.

Ein zusätzlicher Hitzeschock zu einer Behandlung mit Everolimus (100 nmol/l) zeigte bei keiner Zelllinie einen verstärkenden Effekt bezüglich der Reduktion des klonogenen Überlebens (Abbildung 17 C).

Ein zusätzlicher Hitzeschock hatte keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zellen nach den Kombinationsbehandlungen. Beim Einsatz der Kombination aus Everolimus und Erufosin (Abbildung 17 D) einerseits und Everolimus und Perifosin (Abbildung 17 E) andererseits zeigte sich kein sicher zu postulierender Einfluss auf das klonogene Überleben durch einen Hitzeschock. Bei der Kombination aus Everolimus und Erufosin (siehe Abbildung 17 D) zeigte sich bei Skut-1 und BN-175 Zellen zwar eine zusätzliche Reduktion des klonogenen Überlebens nach Applikation eines Hitzeschocks bei 43° C, jedoch zeigten sich die Standardabweichungen im Rahmen der Experimente recht hoch. Daher kann nicht unbedingt ein zusätzlicher Effekt des Hitzeschockes angenommen werden. Bei SW-872 Zellen bewirkte ein Hitzeschock bei keiner Behandlungskombination einen zusätzlichen reduzierenden Effekt auf das klonogene Überleben (Abbildung 17 D und E).

Zusammenfassend erwies sich die Zelllinie BN-175 als die hitze-sensitivste Zelllinie. Dies zeigte sich sowohl in den alleinigen Hitzeschockexperimenten (Abbildung 16) als auch in den Experimenten zur Kombination von Inhibitoren mit Hitzeschockbehandlungen (Abbildung 17 A, B, C). Die Zelllinien SW-872 und Skut-1 zeigten bezüglich ihrer Hitzesensitivitäten keine Unterschiede. Beim Vergleich der Effekte der Einzelsubstanzen und der Inhibitorkombinationen zeigten sich auch bei diesen Experimenten nur geringste zusätzliche Zytotoxizitäten der Kombinationsbehandlungen.

8.3. Western blots

Um die Auswirkungen von Everolimus, Perifosin und Erufosin auf den AKT-mTOR-Signalweg zu untersuchen, wurde die Proteinexpression und –phosphorylierung spezifischer Signalwegkomponenten mittels Western blot untersucht. Der Proteinnachweis wurde exemplarisch an Skut-1 Zellen durchgeführt und erfolgte nach obigem Behandlungsschema (48 h Inkubation mit Inhibitoren). Ein weiteres Kriterium bei der Auswahl der Zelllinie war die Beobachtung, dass diese sich in den vorangegangenen Viabilitätsassays als nur gering sensitiv gegenüber einer Everolimusbehandlung mittels 100 nmol/l gezeigt hatte. Unmittelbar nach der 48 Stunden langen Inhibitorbehandlung wurden die Proteine für die anstehenden Western Blot Analysen isoliert.

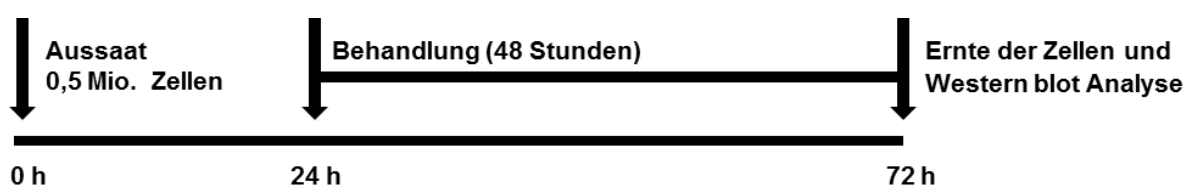
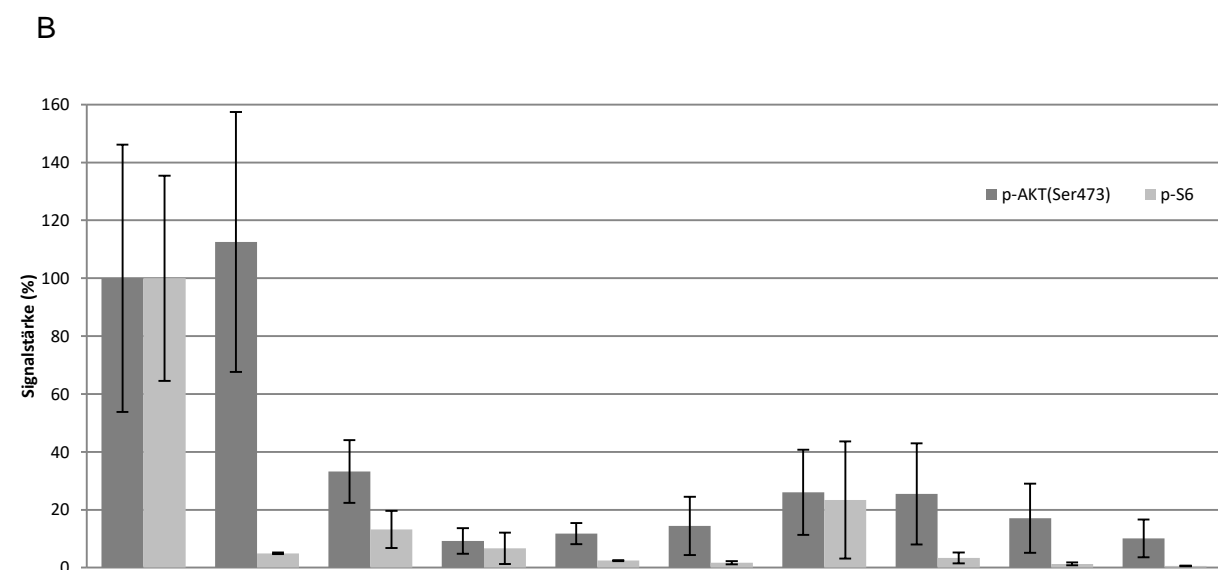
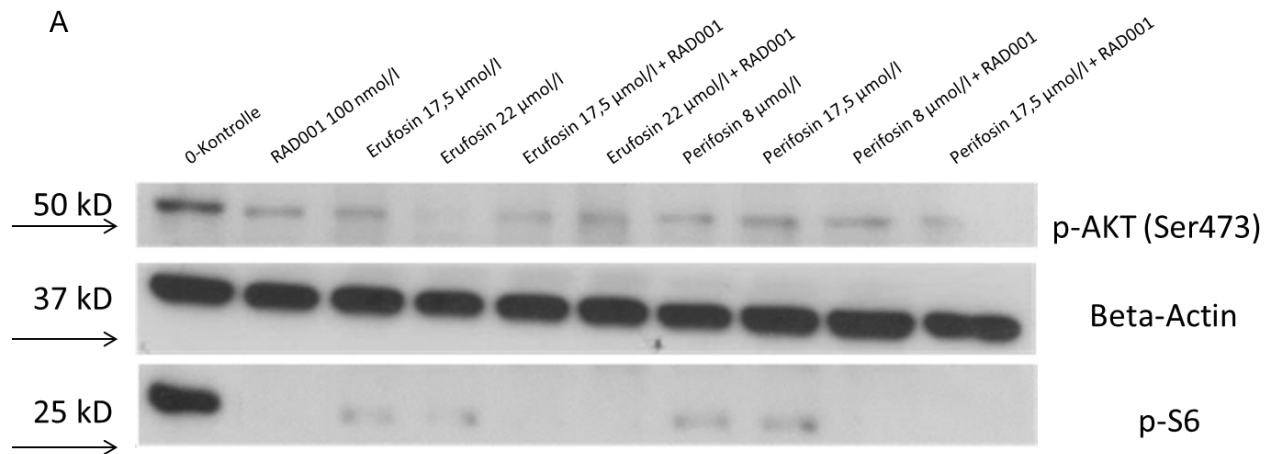


Abbildung 18: Zeitlicher experimenteller Aufbau der Western Blot Analysen

Verwendet wurden Everolimus (RAD001) (100 nmol/l), Erufosin (17,5 µmol/l sowie 22 µmol/l) und Perifosin (8µmol/l und 17,5 µmol/l). Hierbei wurde Everolimus erneut mit den APC's in beiden Konzentrationen kombiniert. Zusammen mit der unbehandelten Kontrolle ergaben sich dadurch zehn Behandlungsbedingungen (Abbildung 19).

Zielproteine der Untersuchung waren an Position Serin 473 phosphoryliertes AKT, phosphoryliertes ribosomales Protein S6 und phosphorylierte Glykogensynthasekinase 3α.

Der Phosphorylierungsstatus von AKT wurde untersucht, um zum einen die Auswirkung der APC's auf die entscheidende AKT-Phosphorylierungsstelle Serin 473 darzustellen, und zum anderen um den Einfluss einer alleinigen mTOR-Inhibition auf die Phosphorylierung von AKT zu untersuchen. Phosphoryliertes ribosomales Protein S6 wurde als indirektes Zielprotein von mTORC1 ausgewählt, um den Einfluss sowohl der APC's als auch den von Everolimus auf die Signaltransduktion ab mTORC1 zu untersuchen. Phosphoryliertes Protein S6 als Zielprotein der S6-Kinase kann als Marker für die Aktivität der Signaltransduktion von mTORC1 herangezogen werden. Die GSK3α wurde als AKT-Zielprotein untersucht. Als direktes Zielprotein der Kinaseaktivität von AKT erfolgt eine inhibierende Phosphorylierung der GSK3α an Serin 21 (Cross et al. 1995). Durch eine APC-vermittelte Inhibition von AKT sollten sich daher auch die Phosphorylierung der GSK3α und damit die Expression von Phospho-GSK3α im Western Blot reduzieren. Daher wurden die Auswirkungen von APC's, dem mTOR-Inhibitor Everolimus und dem jeweiligen Kombinationen auf die inhibierende Phosphorylierung der GSK3α an Serin 21 untersucht.



RAD001	-	100 nmol/l	-	-	100 nmol/l	100 nmol/l	-	-	100 nmol/l	100 nmol/l
Perifosin	-	-	-	-	-	-	8 µmol/l	17,5 µmol/l	8 µmol/l	17,5 µmol/l
Erufosin	-	-	17,5 µmol/l	22 µmol/l	17,5 µmol/l	22 µmol/l	-	-	-	-

Abbildung 19: Western blot von p-AKT(Ser473) und p-S6 bei Skut-1 Zellen; A) Repräsentativer Western blot; B) Balkendiagramm; Die nach Behandlung gewonnenen Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE (12% polyacrylamidhaltig Gele) aufgetrennt. Die Beladung erfolgte jeweils mit 20 µg Protein. Als Haushaltsgen diente β-Aktin. 0-Ko.: Unbehandelte Kontrolle, Eru = Erufosin, Peri = Perifosin, RAD001 = Everolimus (100 nmol/l). **A)** Repräsentativer Western Blot **B)** Balkendiagramm der Mittelwerte und Standardabweichungen der semiquantitativen densitometrischen Auswertung mittels ImageJ von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

Nach Behandlung mittels Everolimus zeigte sich eine Reduktion des Signals für phosphoryliertes ribosomales Protein S6 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19 A und B). Bei der Anwendung von 100 nmol/l des Inhibitors zeigte sich eine deutliche Verminderung bis hin zum kompletten Verschwinden des Signals für phosphoryliertes Protein S6, obwohl

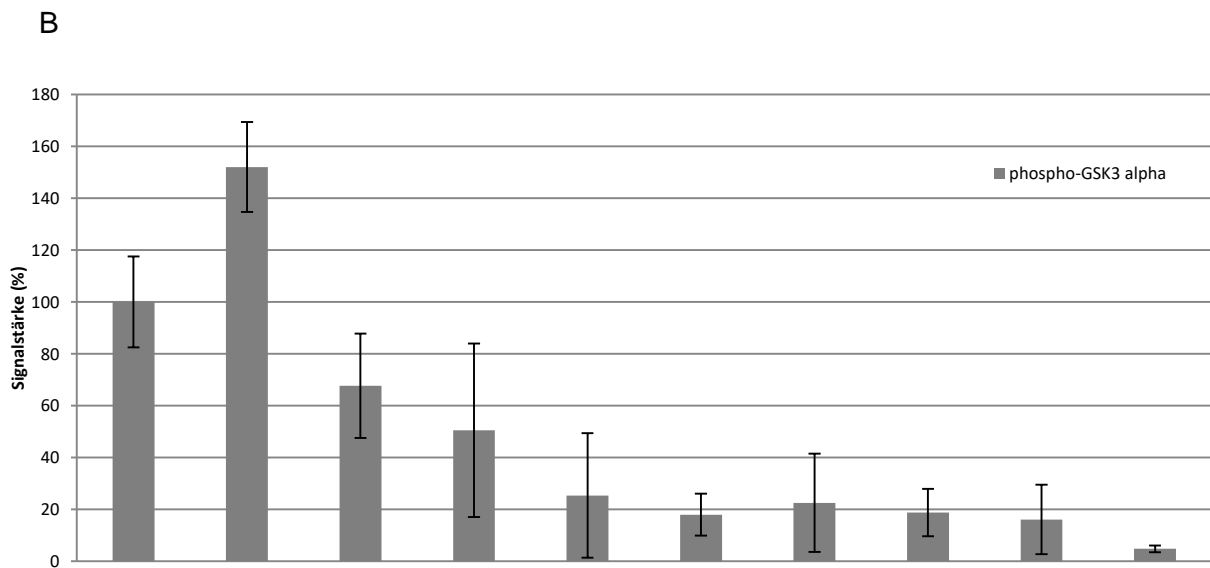
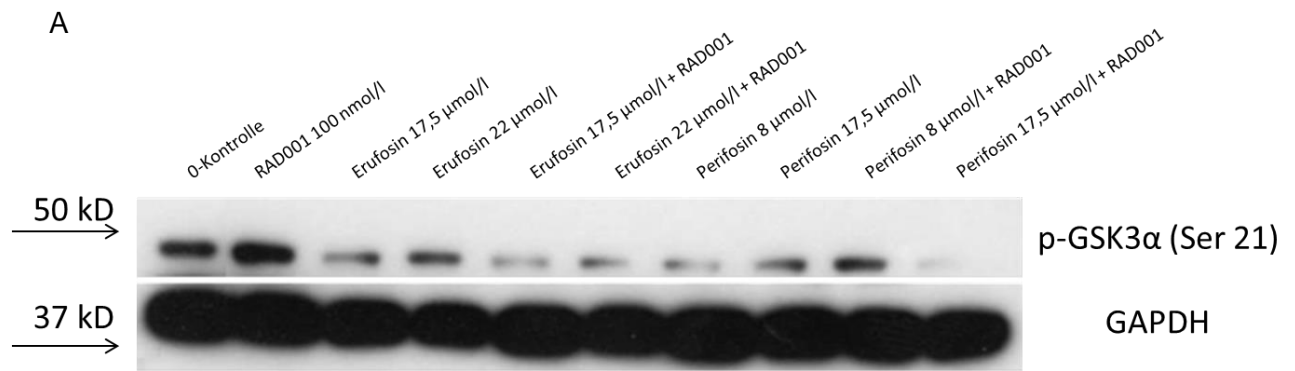
sich die Zelllinie in den vorangegangenen Experimenten gegenüber Everolimus als vergleichsweise resistent erwiesen hatte.

Eine scheinbar erhöhte Phosphorylierung von AKT an Ser 473 durch die Behandlung mit Everolimus kann aufgrund hoher Standardabweichung nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Durch die Inkubation mit den APC's kam es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ebenfalls zu einem reduzierten Signal für phosphoryliertes Protein S6 (Abbildung 19). Ein inhibitorischer Einfluss der APC's auf die *downstream*-Signaltransduktion von mTOR ist daher naheliegend.

Des Weiteren resultierte eine Behandlung mit APC's bei Skut-1 Zellen in einer deutlichen Reduktion der AKT-Phosphorylierung am Ser 473. Bezüglich dieses Effektes konnte bei Erufosin ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden. Bei Perifosin ließ sich kein solcher konzentrationsabhängiger Effekt zeigen (Abbildung 19 B). Scheinbar wurde durch die Einwirkung von APC's die Phosphorylierung von AKT an Serin 473 gehemmt.

Bei einer Kombination eines APC's mit Everolimus wurde erwartungsgemäß eine Reduktion von sowohl phosphoryliertem Protein S6 als auch von p-AKT(Ser473) beobachtet (Abbildung 19).



RAD 001	-	100 nmol/l	-	-	100 nmol/l	100 nmol/l	-	-	100 nmol/l	100 nmol/l
Perifosin	-	-	-	-	-	-	8 µmol/l	17,5 µmol/l	8 µmol/l	17,5 µmol/l
Erufosin	-	-	17,5 µmol/l	22 µmol/l	17,5 µmol/l	22 µmol/l	-	-	-	-

Abbildung 20: Western blot von phospho-GSK3α(Ser21) bei Skut-1 Zellen A) Repräsentativer Western blot; B) Balkendiagramm; Die nach Behandlung gewonnenen Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE (12% polyacrylamidhaltig Gele) aufgetrennt. Die Beladung erfolgte jeweils mit 20 µg Protein. Als Haushaltsgen diente GAPDH. 0-Ko.: Unbehandelte Kontrolle, Eru = Erufosin, Peri = Perifosin, RAD001 = Everolimus (100 nmol/l). A) Repräsentativer Western Blot B) Balkendiagramm der Mittelwerte und Standardabweichungen der semiquantitativen densitometrischen Auswertung mittels ImageJ von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

Die Kombinationsbedingungen bei den Western blots zur Untersuchung der GSK3 α entsprachen denen aus Abbildung 19. Es zeigte sich eine Reduktion von phospho-GSK3 α (Serin 21) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Inkubation mit APC's. Der Effekt war bei Erufosin weniger stark ausgeprägt als nach einer Perifosinbehandlung (Abbildung 20 A und B).

Die Behandlung mittels Everolimus führte stattdessen zu einer Vermehrung der Expression von phospho-GSK3 α (Serin 21) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zumindest indirekt zeigte sich anhand einer vermehrten Phosphorylierung von GSK3 α im Vergleich zu den Kontrollen ein Hinweis auf eine gesteigerte AKT-Kinaseaktivität durch die Einwirkung von 100 nmol/l Everolimus auf Skut-1 Zellen (Abbildung 20). Der direkte Nachweis einer kompensatorischen AKT-Hyperphosphorylierung (Abbildungen 20 A und B) konnte aufgrund hoher Standardabweichungen in den semiquantitativen Analysen der phospho-AKT Western blots nicht erbracht werden.

In der Kombination der APC's mit Everolimus zeigte sich ebenfalls eine herabgesetzte Nachweisbarkeit von phospho-GSK3 α im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Diese Reduktion war geringfügig stärker ausgeprägt als nach einer alleinigen Behandlung mit den APC's (Abbildung 20 A und B).

9. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Daten zu *in vitro* Untersuchungen zur Kombination einer AKT-Inhibition mittels den APC's Perifosin oder Erufosin sowie einer mTOR-Inhibition mittels den Rapamycinderivaten Temsirolimus oder Everolimus an Sarkomzelllinien gezeigt. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer kompletten Blockade dieses Signalweges auf Ebene von AKT und mTOR die Auswirkung einer Hyperthermieeinwirkung auf das klonogene Überleben untersucht. Weder mTOR-Inhibitoren noch APC's werden derzeit in der klinischen Routine beim Weichteilsarkom eingesetzt. Zudem existieren zu Erufosin bisher nur in sehr begrenztem Umfang publizierte klinische Daten (Lindner et al. 2008). Der Einsatz der Substanzgruppen als Mono- oder Kombinationstherapeutika beim Weichteilsarkom erfolgte jedoch im Rahmen klinischer Studien. Die bisher hierzu publizierten Daten legen jedoch keine ausreichende Wirksamkeit dieser Substanzen als Monotherapeutika beim fortgeschrittenen Weichteilsarkom nahe (Bailey et al. 2006, Knowling et al. 2006, Okuno et al. 2011, Yoo et al. 2013). Die alleinige Anwendung der genannten Substanzen scheint in Anbetracht dieser Ergebnisse keine Option zur Therapie des Weichteilsarkomes zu sein. Daher wurde unter anderem die Kombination der Substanzklassen im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* untersucht.

Die regionale Hyperthermie ist, anders als die APC's oder mTOR-Inhibitoren, in der Therapie des Weichteilsarkoms mittlerweile eine in die internationalen Leitlinien aufgenommene Therapieoption (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Sie ist eine nebenwirkungsarme und klinisch sichere Ergänzung zur Chemo- oder Strahlentherapie. Eine Anwendung in der Klinik in Ergänzung zu einer Therapie mittels mTOR-Inhibitoren oder APC's wäre somit theoretisch und praktisch unproblematisch durchführbar. Die Verstärkung des Wirkmechanismus bestimmter Zytostatika wie beispielsweise Ifosamid oder Cisplatin durch Hyperthermie ist bereits beschrieben, jedoch sind noch längst nicht alle antineoplastisch wirksamen und klinisch eingesetzten Agenzien diesbezüglich untersucht worden (Issels 2008, Urano et al. 1999). Die unter anderem von Gao *et al.* beschriebene Hitzeschock-induzierte AKT-Aktivierung (Gao et al. 2013) ist eine klare zusätzliche Rationale für die Hinzunahme der Hyperthermie zu den *in vitro* Experimenten in dieser Arbeit.

Aufgrund der fehlenden beziehungsweise sehr geringen Wirksamkeiten der hier untersuchten Wirkstoffe als Monotherapeutika beim Weichteilsarkom und aufgrund der Beobachtung, dass eine kompensatorische Aktivierung von AKT, im Sinne einer Hyperphosphorylierung an Serin(473) sowohl nach einer alleinigen mTOR-Inhibition (O'Reilly et al. 2006) als auch nach einer alleinigen Hyperthermieeinwirkung zu verzeichnen ist (Gao

et al. 2013, Sun et al. 2005), wurden in dieser Arbeit *in vitro* die Auswirkungen einer Ko-Inhibition beider Proteine in Kombination mit Hyperthermie untersucht.

Die Hyperthermie als auch die mTOR-Inhibitoren könnten im Rahmen dieser dreifachen Therapiestrategie besonders deshalb sinnvolle Kombinationspartner für APC's sein, da durch die APC's eine kompensatorische AKT-Aktivierung verhindert werden könnte und somit ein potenzieller Resistenzmechanismus gegenüber einer Hyperthermieeinwirkung und einer mTOR-Inhibition durchbrochen werden könnte.

9.1. Diskussion der Ergebnisse

9.1.1. WST-1 Assays

9.1.1.1. Anwendung der Einzelsubstanzen

9.1.1.1.1. mTOR-Inhibitoren

Der klinische Einsatz von mTOR-Inhibitoren ist derzeit auf wenige maligne Neoplasien wie beispielsweise das Mantelzelllymphom (Hess et al. 2009), das Nierenzellkarzinom (Kwitkowski et al. 2010) oder das Mamma-Karzinom (Andre et al. 2014) beschränkt. Außerdem werden sie als Immunsuppressiva nach Organtransplantationen eingesetzt. Die Therapie von Weichteilsarkomen durch mTOR-Inhibitoren erfolgte bisher nur im Rahmen klinischer Studien, deren Ergebnisse wenig Erfolg versprechend waren. Insbesondere die größte Studie beim Weichteilsarkom zu dieser Substanzgruppe, eine randomisierte Phase III Studie zum Einsatz von Ridaforolimus als Erhaltungstherapie nach Krankheitsstabilisierung durch Chemotherapie beim metastasierten Weichteilsarkom, zeigte nur eine sehr geringe Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um 3,1 Wochen im Vergleich zu Placebo (Demetri et al. 2013).

Der WST1-Assay diente im Rahmen der vorliegenden Arbeit als eine Methode zum Screening der Sensitivitäten gegenüber den verschiedensten Behandlungsbedingungen. Zur weiteren Charakterisierung der Zellsensitivitäten wurde der klonogene Assay verwendet.

In dieser Arbeit zeigte die mTOR-Inhibition beim Liposarkom (SW-872) mittels Everolimus und Temsirolimus im WST-1 Assay eine nur gering ausgeprägte Zytotoxizität. Wenig sensitiv zeigten sich, mit Ausnahme von BN-175, auch die anderen untersuchten Zelllinien (Abbildungen 4 und 6). Im Gegensatz hierzu beobachteten Imura *et al.* bei Zelllinien humaner epitheloider Sarkome (Asra-EPS und VAESBJ) im WST-1 Assay höhere Sensitivitäten gegenüber einer alleinigen mTOR-Inhibition mittels Everolimus. Die LC50-Werte der Asra-EPS und VAESBJ Zellen lagen nur gering unter 100 nmol/l (Imura et al.

2014). Moriceau *et al.* beobachteten bei den humanen Osteosarkomzelllinien OSGRA und MG63 ebenfalls LC50-Werte von unter 100 nmol/l Everolimus. Bei POS-1, einer weiteren Osteosarkomzelllinie, lag der LC50-Wert jedoch höher (Moriceau *et al.* 2010). Diese Beobachtungen implizieren eine höhere Sensitivität von epitheloiden Sarkom und Osteosarkomen gegenüber einer mTOR-Inhibition, als es bei den hier untersuchten Subtypen der Weichteilsarkome der Fall war. Wie in den Abbildungen 4 und 6 ersichtlich, zeigten sich bei den untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme von BN-175 bei der Anwendung von Temsirolimus, keine LC50-Werte von ≤ 100 nmol/l. Der klinische Einsatz von mTOR-Inhibitoren bei Weichteilsarkomen zeigte passend zu diesen Ergebnissen eine nur geringe Aktivität (Chawla *et al.* 2012, Demetri *et al.* 2013).

Neben der über IRS-1 vermittelten AKT-Aktivierung durch eine alleinige mTOR-Inhibition, welche die antineoplastische Potenz der mTOR-Inhibitoren aufheben könnte (O'Reilly *et al.* 2006), ist eine weitere mögliche Erklärung für die insgesamt geringe Wirksamkeit der mTOR-Inhibitoren deren Eigenschaft, bei maligne transformierten Zellen *in vitro* nicht Apoptose, sondern lediglich einen Zellzyklusarrest in der G1/0-Phase oder am G2/M-Kontrollpunkt zu induzieren. Diese Hauptauswirkung der Rapamycinderivate auf die Proliferationsfähigkeit von malignen Zellen *in vitro* wurde bereits im Rahmen zahlreicher Publikationen beschrieben (Imura *et al.* 2014, Yu *et al.* 2014).

Insgesamt zeigten die verwendeten mTOR-Inhibitoren im WST1-Assay eine nur mäßige zytotoxische Aktivität bei den untersuchten Sarkomzelllinien. Der Mechanismus der Induktion eines Zellzyklusarrestes wurde im Rahmen der hier gezeigten Experimente nicht untersucht. Angesichts der Tatsache, dass auch ein Zellzyklusarrest alleine eine Möglichkeit der effektiven Tumorkontrolle durch Krankheitsstabilisierung bieten könnte, wären weiterführende eigene Experimente hierzu gerechtfertigt.

9.1.1.1.2. Alkylphosphocholine

Ebenso wie bei mTOR-Inhibitoren ist der Einsatz von APC's beim Weichteilsarkom bisher nur im Rahmen klinischer Testungen erfolgt und bisher nicht in die klinische Routine eingegangen (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren *et al.* 2014). Eine Anwendung in der klinischen Routine erfolgt derzeit auch bei anderen onkologischen Erkrankungen nicht. Die APC's Erufosin und Perifosin zeigten bei den in dieser Arbeit untersuchten SW-872 (Liposarkom) Zellen einen höheren dosisabhängigen Effekt auf die Zytotoxizität als die verwendeten mTOR-Inhibitoren (Abbildungen 4 und 5). Im Rahmen der Experimente wurden für die beiden APC's jeweils die LC50 und LC25 bestimmt. Die fünf

untersuchten Zelllinien zeigten alle eine ähnliche Sensitivität gegenüber den APC's. Am sensitivsten zeigten sich SW-982, am wenigsten sensitiv BN-175. Verschiedene Autoren beobachteten bei Zelllinien von humanen kolorektalen Karzinomen (Kaleagasioglu and Berger 2014), Leukämien (Chiarini et al. 2008, Fiegl et al. 2008), Multiplen Myelomen (Hideshima et al. 2006, Yosifov et al. 2009), Plattenepithelkarzinomen (Kapoor et al. 2012), Prostatakarzinomen (Rudner et al. 2010) und Mamma-Karzinomen (Dineva et al. 2012) eine konzentrations- und zeitabhängige Wirksamkeit der APC's Erufosin oder Perifosin. Aufgrund von Unterschieden bezüglich der Analyseform, der verwendeten Zelllinien und dem zeitlichen experimentellen Aufbau ist ein direkter Vergleich der Resultate dieser Arbeiten mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen nicht möglich. Es bestätigt sich jedoch, dass APC's zumindest *in vitro* eine insgesamt breite antineoplastische Wirksamkeit besitzen. Zytotoxische Effekte auf MRC-5 durch Perifosin sind ebenfalls bekannt (Samartzis et al. 2014). Im Gegensatz zu mTOR-Inhibitoren induzieren APC's über verschiedenste Mechanismen Apoptose. Zu diesen zahlreichen Mechanismen zählen unter anderem die Inhibition der Membranlipidsynthese, die Inhibition des MAPK/ERK-Signalweges und des AKT-Signalweges, die Entemmung von BAD und p53 sowie die Aktivierung des SAPK/JNK-Signalweges (Bucan et al. 2011, van Blitterswijk and Verheij 2008, Yao et al. 2013). Beschrieben wurde die Induktion von Apoptose unter anderem bei der in dieser Arbeit verwendeten Liposarkomzelllinie SW-872 (Bucan et al. 2011) als auch bei unterschiedlichen Osteosarkomzelllinien (Yao et al. 2013). Im Rahmen der Arbeit von Yao *et al.* wurde ein konzentrations- und zelllinienabhängiger zytotoxischer Effekt von Perifosin bei den drei untersuchten Zelllinien U2Os, SaOs-2 und MG-63 beobachtet. Die drei Zelllinien erwiesen sich im MTT-Assay nach einer 48 stündigen Inkubation mit Perifosin (Yao et al. 2013) ähnlich sensitiv, wie die in dieser Arbeit untersuchten Zellen. Diese Ergebnisse fügen sich also gut in das Bild des insgesamt breit antineoplastisch wirksamen APC Perifosin ein.

Die Beobachtungen bei der Anwendung von niedrigen Konzentrationen von Erufosin an SW-872 Zellen erwiesen sich als unerwartet. Bei Konzentrationen von 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ wurden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen gesteigerte Viabilitäten der Zellen beobachtet (Abbildungen 4 B und 5). Dieses Phänomen wurde *in vitro* und *in vivo* bereits bei hämatopoetischen Zellen beschrieben. Bagley *et al.* beobachteten in klonogenen Assays eine signifikante Steigerung der Kolonienbildung bei Konzentrationen von 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Erufosin, welche stärker ausgeprägt war, als der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Effekt bei SW-872 Zellen. Nach einer Behandlung mit Perifosin und dem APC Miltefosin zeigte sich kein derartiger Effekt (Bagley et al. 2011). Es ist allgemein bekannt, dass Erufosin im Vergleich zu vielen klassischen Zytostatika eine nur geringe Myelotoxizität aufweist und in geringeren Konzentrationen auch *in vivo* zu einer Stimulation der Hämatopoese führt (Georgieva et al. 2002, Konstantinov et al. 2002, Konstantinov et al.

1998). Die Mechanismen hinter diesem Phänomen, welches sich am ehesten als protektiver oder stimulierender Effekt beschreiben lässt, und nun auch erstmals bei einer Liposarkomzelllinie beobachtet wurde, sind derzeit ungeklärt. Bei Dosissteigerungen, die über 10 µmol/l hinausgingen, kam es zu einer zunehmenden Zytotoxizität von Erufosin. Diese Beobachtung entspricht den durch Bagley *et al.* beschriebenen Reaktionen der hämatopoetischen Zellen. Hier führten 300 µmol/l Erufosin zu einer deutlich ausgeprägten Zytotoxizität (Bagley *et al.* 2011).

Bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit muss beachtet werden, dass die Standardabweichungen, insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich, relativ hoch lagen. Ein protektiver oder stimulierender Effekt ist daher auf Basis der Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente nur unpräzise zu beschreiben (Abbildungen 4 B und 5). Auch waren die Methoden der Arbeit von Bagley *et al.* andere, es fand nicht der WST1-Assay sondern ein klonogener Assay Anwendung. Die Einwirkungszeit von Erufosin betrug bei Bagley *et al.* 14-16 Tage. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Zellen der Substanz nur für zwei Tage ausgesetzt. Unter bestimmten, noch unbekanntem Voraussetzungen, scheinen also geringe Konzentrationen von Erufosin das Überleben stimulierende Effekte auf hämatopoetische Zellen und auf die Zellen der Zelllinie SW-872 zu haben. Erstmals konnte der Effekt auch für eine maligne solide Neoplasie *in vitro* gezeigt werden. Bekannt war dieser Effekt bislang nur für hämatopoetische Zellen. Es bedarf diesbezüglich im Rahmen zukünftiger Forschung weiterer Untersuchungen.

9.1.1.2. Zytotoxizität der Kombinationsbehandlungen

Im Rahmen der Kombinationsbehandlungen zeigten sich drei unterschiedliche Reaktionsmuster (Abbildungen 8, 9 und 10) auf die Kombination einer jeweils festen APC-Konzentration (17,5 µmol/l oder 22 µmol/l Erufosin und 8 oder 17,5 µmol/l Perifosin) mit Everolimus und Temsirolimus in aufsteigenden Dosierungen (1, 10, 100 und 1000 nmol/l).

Die Zelllinien SW-872 (Liposarkom) und SW-982 (Synovialsarkom) reagierten auf eine kombinierte Behandlung mit Erufosin und mTOR-Inhibition mit einer Zunahme der Viabilität im Vergleich zu einer alleinigen Erufosinbehandlung. Diese Beobachtung wurde zur Veranschaulichung als Reaktionsmuster eins bezeichnet (Kapitel 8.1.4.). Dieser Effekt steigerte sich mit zunehmender Dosis der mTOR-Inhibitoren. Unter der Annahme, dass eine kompensatorische AKT-Aktivierung nach mTOR-Inhibition (O'Reilly *et al.* 2006) durch eine Zugabe von Erufosin zu verhindern sei, erscheint diese Beobachtung zunächst paradox. Beispielsweise zeigten Kapoor *et al.* bei Zelllinien von oralen Plattenepithelkarzinomen eine

verminderte Phosphorylierung von phospho-AKT(Ser 473), phospho-mTOR(Ser2448) und den mTOR-Zielproteinen p70S6K und p-4E-BP1 unter einer Einwirkung von Erufosin. Ein *knockdown* von mTOR durch siRNS führte zu einer höheren Zytotoxizität von Erufosin (Kapoor et al. 2012). Umso verwunderlicher und neu ist daher die Beobachtung, dass sich bei simultanem Einwirken eines mTOR-Inhibitors gemeinsam mit Erufosin die Zytotoxizität bei SW-872 nicht erhöhte, sondern wie in den oben dargestellten Experimenten verminderte. Die Erkenntnisse von Carracedo *et al.* jedoch liefern eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen. Sowohl *in vitro*, in Mausmodellen und in Tumorbiopsien von Patienten zeigte sich eine gesteigerte Aktivität des pro-mitogenen MAPK-Signaltransduktionsweges nach einer Exposition bzw. Behandlung mit RAD001 (Carracedo et al. 2008). Diese Aktivierung, welche in der zitierten Arbeit anhand der Phosphorylierung von phospho-ERK(Thr202/Tyr204) gemessen wurde, könnte auch bei der Kombinationsbehandlung aus Erufosin mit einem mTOR-Inhibitor zu einer Resistenz gegenüber dieser Medikamentenkombination führen. Die Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges mittels des MEK-Inhibitors PD0325901 führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber RAD001. Die Autoren gehen zusammenfassend von einer durch mTOR-Inhibition induzierten Aktivierung des MAPK-Signalweges aus. So könnte bei SW-872 und SW-982 Zellen durch eine kompensatorische Aktivierung des MAPK-Signalweges durch Everolimus oder Temsirolimus eine mögliche Erklärung für die beobachtete konzentrationsabhängige Zunahme der Viabilität vorliegen, obwohl unter Erufosinbehandlung eine Depletion von phospho-AKT stattfindet. Der MAPK-Signaltransduktionsweg ist ein von AKT unabhängiger promitogener Signatransduktionsweg (Pearson et al. 2001) und könnte unter Einfluss einer mTOR-Inhibition nicht nur eine Resistenz gegenüber der Kombinationsbehandlung vermitteln, sondern bei einer Hyperaktivierung auch zu einer Verbesserung des Zellüberlebens beitragen. Da die APC's auch als Inhibitoren des MAPK-Signalweges wirken (van Blitterswijk and Verheij 2008, Yao et al. 2013), erscheint eine Kombinationstherapie bestehend aus mTOR-Inhibitoren und APC's recht sinnvoll. Mit Hilfe der MAPK-Signalweginhibition könnte der durch mTOR-Inhibitoren induzierte Resistenzmechanismus unterbunden werden. Die Überprüfung dieser Theorie bedarf jedoch eigenständiger Experimente.

Bei der kombinierten Anwendung von Perifosin und einem mTOR-Inhibitor kam es sowohl bei SW-872 als auch bei SW-982 Zellen zu einer Zunahme der Zytotoxizität. Der dosisabhängige Effekt der zusätzlichen mTOR-Inhibition zeigte sich insbesondere bei der geringeren Konzentration von Perifosin (8 µmol/l).

Bei Skut-1, MRC-5 und BN-175 Zellen zeigte sich im Gegensatz zu den Beobachtungen bei SW-872 und SW-982 bei beiden APC's nach Hinzunahme eines mTOR-Inhibitors ein zusätzlicher zytotoxischer Effekt. Diese Beobachtungen wurden zur Veranschaulichung als

Reaktionsmuster zwei (Skut- 1 und MRC-5) und drei (BN-175) bezeichnet (Kapitel 8.1.4.). Auch bei diesen Zelllinien erwies sich die zusätzliche Zytotoxizität durch den mTOR-Inhibitor in den jeweils niedrigeren Konzentrationen des jeweiligen APC (8 $\mu\text{mol/l}$ Perifosin beziehungsweise 17,5 $\mu\text{mol/l}$ Erufosin) als stärker ausgeprägt. Dies war der Grund für die Anwendung der jeweils niedrigeren APC-Dosis im Rahmen der folgenden Experimente mittels klonogenen Assays. Insgesamt vergleichbare Ergebnisse wurden 2014 von Djukom *et al.* für humane Pankreaskarzinomzelllinien publiziert. Es zeigte sich bei der alleinigen Anwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 eine stärker ausgeprägte Inhibition des Zellwachstums als durch die alleinige Einwirkung von Everolimus. Erst die Kombination beider Substanzen zeigte hier eine ausgeprägte Einschränkung des Zellwachstums (Djukom *et al.* 2014). Diese Ergebnisse decken sich mit denen, welche im Rahmen dieser Arbeit bei den Zelllinien Skut-1, MRC-5 und BN-175 beobachtet wurden. Pitter *et al.* zeigten unter Annahme derselben Rationale, nämlich einer Inhibition der kompensatorischen AKT-Aktivierung, durch die Kombination von Temsirolimus und Perifosin bei humanen Glioblastomzelllinien ähnliche Ergebnisse (Pitter *et al.* 2011). Außer bei SW-872 und SW-982 unter der Verwendung von Erufosin als AKT-Inhibitor lässt sich also die Annahme eines sich zumindest ergänzenden Effektes einer kombinierten AKT und mTOR-Inhibition durch die gezeigten Ergebnisse und die vorliegende Literatur bestätigen.

9.1.2. Klonogene Assays ohne Hyperthermie

Im WST-1-Assay werden methodenbedingt alle stoffwechselaktiven Zellen mit intakten mitochondrialen Atmungskettenenzymen berücksichtigt (Mosmann 1983), also auch solche die zwar noch vital und in minimalem Maße stoffwechselaktiv, aber nicht mehr proliferationsfähig sind. Der Koloniebildungstest hat bezüglich der Differenzierung zwischen teilungsfähigen und nicht mehr teilungsfähigen Zellen eine höhere Trennschärfe. Dies liegt daran, dass nur diejenigen Zellen Berücksichtigung finden, welche auch nach der getesteten Behandlung die Fähigkeit behalten haben zu proliferieren und somit Kolonien zu bilden (Franken *et al.* 2006). Daher fallen die Auswirkungen von Substanzen oder Bedingungen, welche die Proliferationsfähigkeit beeinträchtigen, im Koloniebildungstest stärker aus als im WST1-Assay.

Im Rahmen der klonogenen Assays wirkte sich die mTOR-Inhibition durch Everolimus bei allen untersuchten Zellen stärker zytotoxisch aus als im WST1-Assay. Ursächlich hierfür dürfte die oben beschriebene höhere Empfindlichkeit des klonogenen Assays sein. Durch die Wirkung von Everolimus, vermittelt durch eine irreversible Bindung an FKBP12 (Wander *et al.* 2011), wird ein Proliferationsstopp durch Zellzyklusarrest induziert. Im klonogenen Assay

werden solche nicht mehr proliferationsfähige Zellen im Gegensatz zum WST1-Assay nicht mehr gewertet, da sie zwar vital, jedoch nicht koloniebildend sind. Der durch Everolimus induzierte Zellzyklusarrest (Imura et al. 2014, Yu et al. 2014) fällt daher bei klonogenen Assays mehr ins Gewicht als beim WST1-Assay. Die höhere Sensitivität aller drei im Koloniebildungstest untersuchten Zelllinien gegenüber Everolimus lässt sich methodenbedingt also gut erklären. Die Ergebnisse im klonogenen Assay fügen sich gut in das Bild ein, welches andere Autoren für mitunter Osteosarkomzelllinien (Moriceau et al. 2010) und Zelllinien von epitheloiden Sarkomen (Imura et al. 2014) beschrieben haben. Die alleinige mTOR-Inhibition zeigte bei allen Zelllinien im Koloniebildungstest eine hohe Einschränkung der Koloniebildung passend zum bereits bekannten Effekt von Everolimus, einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Zwar erfolgten im Rahmen der hier dargestellten Arbeit keine Zellzyklusanalysen, aber indirekt lässt sich aus den voneinander abweichenden Ergebnissen der beiden Testverfahren der mögliche Schluss ziehen, dass eine Hauptauswirkung des mTOR-Inhibitors Everolimus auf die untersuchten Sarkomzelllinien in einem Zellzyklusarrest besteht. Um dies jedoch zu beweisen sind definitiv weitere eigene Experimente im Sinne von Zellzyklusanalysen notwendig.

Auch die beiden angewandten Konzentrationen der APC's (Perifosin: 8 $\mu\text{mol/l}$ und Erufosin: 17,5 $\mu\text{mol/l}$) erwiesen sich im Koloniebildungstest als tendenziell toxischer als im WST-1 Assay. Auch hier ist angesichts einer irreversiblen Bindung an AKT durch die APC's (Hennessy et al. 2007) von einem methodisch bedingten Unterschied auszugehen.

Der im Rahmen der WST1-Assays beobachtete protektive Effekt der Kombination Erufosin und Everolimus ließ sich bei SW-872 Zellen im Rahmen der Koloniebildungstests nicht beobachten. Es zeigte sich im Gegenteil eine zusätzliche Zytotoxizität bei der Hinzugabe eines APC's zum mTOR-Inhibitor. Angesichts der höheren Empfindlichkeit des klonogenen Assays muss davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse des klonogenen Assays und der WST1-Assays methodenbedingt voneinander abweichen. Auch in Anbetracht der insgesamt sehr hohen Standardabweichungen bei den entsprechenden WST1-Assays (Abbildung 8) wird von einer methodenbedingten Ungenauigkeit in den besagten Experimenten ausgegangen. Im klonogenen Assay zeigte sich die erwartete Verstärkung der Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung bei beiden APC's durch die Hinzunahme von Everolimus in steigenden Dosierungen. Auch bei Skut-1 und BN-175 Zellen zeigte sich, wie durch andere Autoren bei verschiedenen Zelllinien bereits gezeigt, eine Kombinationswirkung der gemeinsamen Anwendung von AKT- und mTOR-Inhibitoren im Sinne einer zusätzlichen Zytotoxizität (Djukom et al. 2014, Liu et al. 2014, Pitter et al. 2011) durch die aufsteigende Dosierung eines mTOR-Inhibitors.

Insgesamt ließen sich die Ergebnisse der Kombinationsversuche des WST1-Assays im Rahmen der Koloniebildungstests, mit Ausnahme von SW-872 Zellen, bestätigen. Bei SW-872 Zellen, welche im Rahmen der WST1-Assays das Reaktionsmuster eins gezeigt hatten, muss jedoch aufgrund der genannten Argumente zugunsten des klonogenen Assays von der Richtigkeit der Ergebnisse, welche im Rahmen dieser Methode erhoben wurden, ausgegangen werden.

9.1.3. Klonogene Assays mit Hyperthermie

Die regionale Tiefenhyperthermie und die Oberflächenhyperthermie haben in der Therapie des Hochrisikoweichteilsarkomes in den aktuellen internationalen Leitlinien verankerten Stellenwert (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Im Rahmen von Studien wird derzeit auch der Einsatz in Kombination mit neuen Substanzen beim Weichteilsarkom, oder der Einsatz bei anderen Entitäten wie dem Rektumkarzinom oder dem Pankreaskarzinom untersucht.

Im Rahmen der hier gezeigten Experimente zeigte sich eine nur geringe *in vitro* Sensitivität aller drei getesteten Zelllinien (SW-872, Skut-1, BN-175) gegenüber den beiden 90-minütigen Hitzeschockbehandlungen bei 41,8° C und 43° C (Abbildung 16). BN-175 Zellen zeigten sich am stärksten hitzesensitiv, jedoch ergaben sich bei allen Experimenten mit Anwendung von Hyperthermie hohe Standardabweichungen. Die Hyperthermie führt auf zellulärer Ebene zu verschiedenen Reaktionen. Bereits Temperaturen von 41° C führen unter anderem zu Denaturierungen von verschiedenen Proteinen und somit zu deren Funktionsverlust (Zaarur et al. 2006). Auch die Inhibition von DNS-Reparaturmechanismen (Iliakis et al. 2008), wie zum Beispiel der homologen Rekombination (Krawczyk et al. 2011), scheinen einen wichtigen Beitrag zur toxischen Wirkung der Hyperthermie zu leisten. Bei verschiedenen Malignomzelllinien zeigten Krawczyk *et al.* ähnliche Zytotoxizitäten durch eine alleinige Hyperthermie von 41° C (Krawczyk et al. 2011) wie im Rahmen der oben dargestellten Experimente gezeigt (siehe Abbildung 16). Die oben genannten Mechanismen, mit Ausnahme der hitze-induzierten Proteindenaturierung, bedürfen jedoch alle weiterer toxischer Einflüsse im Sinne von Strahlentherapie oder Chemotherapie um einen tatsächlich letalen Schaden zu bewirken. Die Hyperthermie wird daher derzeit auch nur in Kombination mit diesen Verfahren empfohlen (ESMO and Sarcoma Network Working Group 2014, von Mehren et al. 2014). Die Hyperthermie alleine, so zeigten die oben beschriebenen Experimente, führte lediglich zu geringen Zytotoxizitäten (siehe Abbildung 16). Die nur mäßige Wirkung der Hyperthermie *in vitro* könnte hierbei auf dem Fehlen von Faktoren beruhen, welche nur *in vivo* auftreten können. Diese Faktoren umfassen die vielfach

beschriebene durch Hitzeschock induzierte Aktivierung des Immunsystems, im speziellen von natürlichen Killerzellen. Durch die vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen nach einem Hitzeschock (Melcher et al. 1998) wie HSP70 und HSP90 (Milani et al. 2002, Noessner et al. 2002), welche anschließend auch in den extrazellulären Raum gelangen, kommt es über bislang noch nicht völlig aufgeklärte Mechanismen zu einer Aktivierung des Immunsystems mit einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort (Jolesch et al. 2012). Der Effekt einer vermehrten Tumorperfusion durch die Hyperthermie mit gesteigerter Anflutung von Zytostatika (Bettaieb et al. 2013, Issels 2008) kann *in vitro* ebenso wenig auftreten. Die zytotoxische Wirkung der Hyperthermie, so zeigen die Ergebnisse anderer Autoren bezüglich deren Wirkmechanismen, ist daher auf die Anwendung anderer Verfahren, oder die durch sie selbst induzierten immunmodulatorischen Effekte angewiesen. Dies erklärt die insgesamt nur geringe *in vitro* Wirksamkeit einer alleinigen Hitzeschockbehandlung (Hildebrandt and Wust 2007).

Die Kombinationsversuche reproduzierten gut die im Rahmen der zuvor durchgeführten klonogenen Assays gezeigten Sensitivitäten der Zelllinien (SW-872 Skut-1, BN-175 gegenüber den Inhibitor kombinationen. Bekannt ist eine kompensatorische AKT-Aktivierung durch Hyperthermie (Gao et al. 2013, Sun et al. 2005). Die Erwartung einer vermehrten Zytotoxizität der Hyperthermie durch eine Hemmung dieser AKT-Aktivierung mittels APC's bestätigte sich nicht. Es zeigte sich weder bei der Kombination der Einzelsubstanzen mit Hyperthermie, noch bei der Kombination der Doppelinhibition mit einer Hitzeexposition ein zusätzlicher zytotoxischer Effekt. Es wurde zwar eine tendenzielle Abnahme des klonogenen Überlebens bei BN-175 und Skut-1 Zellen mit Perifosin und einem Hitzeschock beobachtet, jedoch lagen bei den Experimenten die Standardabweichungen zu hoch um einen temperaturabhängigen Effekt eindeutig postulieren zu können.

Trotz der bereits beschriebenen pleiotropen Effekte der Hyperthermie auf zellulärer Ebene zeigte sich in den Kombinationsexperimenten keine relevante Zunahme der Toxizitäten unter Hyperthermie. Das Fehlen eines zumindest zusätzlichen Effektes der Hyperthermie auf das klonogene Überleben könnte in den oben geschilderten Mechanismen der Zytotoxizität der Hyperthermie begründet sein. Diese Mechanismen umfassen, wie oben geschildert, Aktivierungen des Immunsystems, gesteigerte Tumorperfusion sowie die Inhibitionen von DNS-Reparaturmechanismen (Bettaieb et al. 2013). Die Aktivierung des Immunsystems und eine gesteigerte Tumorperfusion können in einem *in vitro* Modell, wie im Rahmen dieser Arbeit vorliegend, keine Rolle spielen. Die Hemmung diverser DNS-Reparaturmechanismen, wie der homologen Rekombination durch die Hyperthermie (Iliakis et al. 2008, Krawczyk et al. 2011), kann in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ebenfalls keinen Beitrag zur Zytotoxizität geleistet haben. Die Inhibition solcher Mechanismen kann

nur bei Kombination mit einer Strahlentherapie oder mit DNS-schädigenden Chemotherapeutika zu einem zusätzlichen Effekt auf das Zellüberleben führen (Hurwitz and Stauffer 2014, Issels 2008). Bei der Anwendung von mTOR-Inhibitoren und APC's sind die Zielstrukturen der Medikamente jedoch nicht die DNS-Stränge im Zellkern, sondern diverse, oben näher beschriebene Proteine im Zytosol sowie die zellulären Membranen (van Blitterswijk and Verheij 2008). Eine direkte Einwirkung auf die DNS ist weder für die APC's noch für die mTOR-Inhibitoren beschrieben, folglich kann auch eine Inhibition von Reparaturmechanismen, wie durch die Hyperthermie induziert, bei Kombination mit mTOR-Inhibitoren und APC's keine zusätzliche Zytotoxizität bedingen.

Ein weiterer Grund für eine fehlende zumindest additive Wirkung von Hyperthermie zur AKT-mTOR-Inhibition könnte die von Powel *et al.* sowie van der Waal *et al.* beschriebene Eigenschaft der Hyperthermie sein, besonders in der S-Phase eine zytotoxische Wirkung zu entfalten (Powell and Kachnic 2011, van der Waal *et al.* 2001). Die Behandlung mit einem mTOR-Inhibitor, wie in den oben gezeigten Experimenten mittels Everolimus, resultiert jedoch wie oben geschildert eher in einem Zellzyklusarrest in der G0/1-Phase (Imura *et al.* 2014, Yu *et al.* 2014). Hierdurch befinden sich die Zellen also hauptsächlich in der gegenüber einer Hyperthermiebehandlung weniger sensiblen G0/1-Phase.

Insgesamt zeigte sich im Rahmen der klonogenen Assays trotz Hinzunahme von Hitzeschocks von 41,8°C und 43 ° C über 90 Minuten kein temperaturabhängiger Effekt. Dies zeigt, dass zumindest *in vitro* kein zusätzlicher, additiver oder gar synergistischer Effekt einer mTOR-, AKT- oder AKT- und mTOR-Inhibition mit einer zusätzlichen Hyperthermiebehandlung zu erreichen ist. Die Mechanismen der Toxizität der Hyperthermie ergänzen sich *in vitro* wie oben beschrieben wohl nur ungenügend mit den Wirkmechanismen der mTOR-Inhibitoren oder der APC's. Die Erwartung, durch die Reduktion einer AKT-Aktivierung mittels APC's eine Reduktion des Zellüberlebens unter Hyperthermie zu erreichen bestätigte sich nicht. Ob sich das Konzept dieses Dreifachansatzes *in vivo* sinnvoll ergänzen könnte, müsste mit Hilfe eigener Experimente geklärt werden. Im speziellen würden in einem Tiermodell die Effekte der Hyperthermie auf das Immunsystem und die Tumorperfusion zum Tragen kommen können. Dies ist in den vorliegenden *in vitro* Experimenten nicht der Fall.

9.1.4. Western blots

Im Rahmen der Western blot Analysen wurden an der Leiomyosarkomzelllinie Skut-1, die Proteine phospho-AKT(Ser473), das phosphorylierte ribosomale Protein S6 und die phospho-GSK3 α (Ser21) untersucht.

Die Einwirkung sowohl von Erufosin als auch von Perifosin führte wie erwartet und im Rahmen diverser Publikationen beschrieben, zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion von phospho-AKT(Ser473). Bei Zelllinien von humanen Leukämien (Chiarini et al. 2008), Endometriuskarzinomen (Engel et al. 2008), Ovarialkarzinomen (Engel et al. 2011), Mammakarzinomen (Hennessy et al. 2007), Prostatakarzinomen (Kondapaka et al. 2003) sowie vielen anderen mehr, zeigten sich bereits diese dosisabhängigen Effekte von Perifosin auf die Expression von phospho-AKT(Ser473).

Dieselben Auswirkungen auf die Phosphorylierung von phospho-AKT(Ser473) hatte die Anwendung von Erufosin. Auch diese Effekte sind von bereits mehreren Autoren zum Beispiel für Zelllinien von Prostatakarzinomen (Rudner et al. 2010) und Plattenepithelkarzinomen (Kapoor et al. 2012) beschrieben.

Die bereits von mehreren Autoren beschriebene kompensatorische Phosphorylierung von AKT nach einer mTOR-Inhibition (Carracedo et al. 2008, O'Reilly et al. 2006, Sun et al. 2005), ließ sich bei insgesamt hohen Standardabweichungen in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western blots jedoch nicht rekonstruieren.

Es zeigte sich jedoch eine Zunahme der Expression des phosphorylierten AKT-Zielproteines phospho-GSK3 α (Ser21) (Cross et al. 1995, Rayasam et al. 2009), nach der Einwirkung von 100 nmol/l Everolimus im Vergleich zur Kontrolle. Hieraus lässt sich zumindest indirekt auf eine Everolimus-induzierte verstärkte Aktivität von AKT als die der GSK3 α übergeordneten Kinase schließen. Es ergibt sich, in Form der gesteigerten Expression von phospho-GSK3 α , ein Hinweis auf eine gesteigerte AKT-Aktivität nach einer Einwirkung einer mTORC1-Inhibition. Die Vermutung bestätigt sich umso mehr, da eine Einwirkung der APC's Erufosin und Perifosin zu einer dosisabhängigen Depletion des Signales für phospho-GSK3 α (Ser21) führte. Dies wiederum zeigt, dass eine Reduktion der AKT-aktivierenden Phosphorylierung zu einer Reduktion der AKT-abhängigen Phosphorylierung von GSK3 α führt. Die gesteigerte Phosphorylierung von GSK3 α nach mTOR-Inhibition kann im Umkehrschluss als Hinweis auf eine gesteigerte AKT-Aktivität interpretiert werden. Zusammenfassend kann zumindest indirekt auf eine gesteigerte AKT-Aktivität nach Einwirkung eines mTOR-Inhibitors geschlossen werden.

Wie in bereits veröffentlichten Arbeiten gezeigt (Carracedo et al. 2008, Pitter et al. 2011), kam es durch die Einwirkung des mTOR-Inhibitors zu einer kompletten Depletion des Signales für phospho-S6. Phosphoryliertes Protein S6 wird als Marker für die Aktivität für die mTORC1-vermittelte Signaltransduktionskaskade angesehen (Nave et al. 1999, Pitter et al. 2011). Die vorliegenden Ergebnisse implizieren, dass Everolimus den mTOR-Signalweg komplett und die APC's Erufosin und Perifosin diesen Signalweg nur unvollständig blockieren. Nach einer Inkubation mit den APC's zeigte sich das Signal für phospho-S6 im Vergleich zur Kontrolle vermindert, jedoch nicht komplett aufgehoben. Bei kombinierter Verwendung beider Inhibitoren zeigte sich eine dosisabhängige Depletion der Signale vor allem für phospho-S6 aber auch für phospho-AKT(Ser473) und zuletzt auch für phospho-GSK3 α (Ser21). Die APC's blockierten suffizient die AKT-Phosphorylierung und die Phosphorylierung von GSK3 α , eine komplette Blockade des mTOR-Signalweges ab mTORC1 ließ sich durch die APC's alleine nicht erreichen.

Zusammengefasst zeigte sich wie erwartet die bereits beschriebene komplette Blockade des mTOR-Signalweges ab mTORC1 durch Everolimus und eine dosisabhängige Reduktion der Signale für phospho-AKT(Ser473) und phospho-GSK3 α (Ser21) durch APC's (Djukom et al. 2014). Eine komplette Blockade des mTOR-Signalweges durch APC's ließ sich nicht erreichen, dies gelang nur durch den Einsatz von kombinierter mTOR- und AKT-Inhibition. Die Kombination der Medikamente führte zu einer dosisabhängigen Depletion der Signale aller drei Proteine. Es ergab sich des Weiteren zumindest ein indirekter Hinweis auf eine vermehrte AKT-Aktivität nach Einwirkung einer alleinigen mTOR-Inhibition im Sinne einer vermehrten Phosphorylierung von GSK3 α im Vergleich zur Kontrolle. Somit fügen sich die Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen der verwendeten Inhibitoren auch bei den hier verwendeten Leiomyosarkomzellen Skut-1 in das bisher bekannte Bild ein. Warum die im klonogenen Assay beobachteten Zytotoxizitäten trotz der nachgewiesenen vertikalen Blockade des mTOR-AKT-Signalweges nicht stärker ausgeprägt waren, kann anhand der durchgeführten Experimente jedoch nicht beantwortet werden. Hierzu müssten weitere Untersuchungen alternativer Signalwege wie zum Beispiel des MAPK-Signalweges (Carracedo et al. 2008) sowie Zellzyklusanalysen und Untersuchungen zur Apoptoseinduktion und Seneszenz erfolgen.

10. Zusammenfassung und Ausblick

APC's wie Perifosin oder Erufosin sind Wirkstoffe, welche aufgrund von vielfältigen Wirkmechanismen ohne eine Interaktion mit der DNS antineoplastisch wirken. Ein Hauptmechanismus hierbei ist die Inhibition der Serin-Threoninkinase AKT, einem Schlüsselprotein des in humanen Sarkomen häufig dysreguliertem AKT-mTOR-Signaltransduktionsweges. Derzeit erfolgt ihre Evaluation in der antineoplastischen Therapie im Rahmen von Studien. Perifosin wurde in verschiedenen Phase II Studien getestet, Erufosin im Rahmen einer bisher unveröffentlichten Phase I Studie. Die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus, spezifische Inhibitoren von mTORC1, einem weiteren Bestandteil des AKT-mTOR-Signalweges, werden derzeit in der klinischen Routine bereits bei der Behandlung einiger ausgewählter Malignome eingesetzt. Beim Weichteilsarkom hat sich zuletzt sowohl die alleinige mTOR-Inhibition im Rahmen einer Phase III Studie (Demetri et al. 2013) als auch der alleinige Einsatz von APC's in diversen Phase II Studien (Bailey et al. 2006, Knowling et al. 2006) als unzureichend erwiesen. Die Hyperthermie hingegen ist in der Therapie des Hochrisikoweichteilsarkomes ein etabliertes Verfahren zur Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie. In zahlreichen Publikationen wurde beschrieben, dass sowohl durch eine alleinige mTOR-Inhibition, als auch durch die Hyperthermie eine reaktive AKT-Hyperphosphorylierung und somit -Aktivierung induziert wird. Die Theorie, diese kompensatorische AKT-Aktivierung, welche einen potenziellen Resistenzmechanismus gegen eine alleinige mTOR-Inhibition und eine alleinigen Hyperthermiebehandlung darstellen könnte, mit Hilfe einer AKT-Inhibition mittels APC's zu durchbrechen, gab den Anstoß zur Durchführung dieser Arbeit.

In zellkultur-basierten Experimenten erfolgten Viabilitätsassays nach Einzel- und Kombinationsbehandlung mit den oben genannten Inhibitoren Everolimus, Temsirolimus, Erufosin und Perifosin. Als Testverfahren wurden der WST1-Viabilitätsassay und der klonogene Assay verwendet. Als Behandlungszeitraum wurden 48 Stunden für die verschiedenen Inhibitoren und für die Hyperthermie Temperaturen von 41,8° oder 43° C festgelegt. Es erfolgten des Weiteren Western Blots zur Charakterisierung der Inhibitor-induzierten Auswirkungen auf den AKT-mTOR-Signalweg.

Die Untersuchungen wurden an den drei humanen Sarkomzelllinien SW-872 (Liposarkom), Skut-1 (Leiomyosarkom) und SW-982 (Synovialsarkom), sowie an BN-175 Zellen (Fibrosarkom der Ratte) und MRC-5 Zellen (humanen Fibroblasten) durchgeführt. Alle untersuchten Zelllinien zeigten im WST1-Assay und im Koloniebildungstest mit jeweils unterschiedlichen Sensitivitäten ein dosisabhängiges Ansprechen auf eine mTOR- oder AKT-Inhibition. Insgesamt zeigten sich im WST1-Assay drei unterschiedliche

Reaktionsmuster der Zelllinien. Bei SW-872 und angedeutet bei SW982 zeigte sich im WST-1-Assay, aber nicht im klonogenen Assay bei der Anwendung von Erufosin und mTOR-Inhibitoren im niedrigen Konzentrationsbereich von Erufosin ein protektiver Effekt (Reaktionsmuster 1). Bei Skut-1 und MRC-5 zeigte sich eine leichte zusätzliche Zytotoxizität der Kombinationsbehandlungen (Reaktionsmuster 2) und bei BN-175 eine ausgeprägte Zytotoxizität der Kombinationsbehandlungen (Reaktionsmuster 3). Je ein Vertreter eines Reaktionsmusters wurde in Folgeexperimenten im klonogenen Assay untersucht. Die Kombination aus AKT- und mTOR-Inhibition zeigte sich in diesem empfindlicheren Testverfahren bei allen untersuchten Zelllinien als toxischer als die jeweilige Einzelbehandlung. Damit ergab sich keine Bestätigung der drei Reaktionsmuster im WST1-Assay, es zeigte sich viel mehr eine gleichsinnige Reaktion aller untersuchten Zelllinien. Gegenüber einer Hyperthermiebehandlung zeigten sich die Zellen nur geringfügig sensitiv. Die Anwendung einer Hyperthermieapplikation zusätzlich zur AKT-, mTOR- oder AKT-mTOR-Doppelinhibition führte zu keinerlei zusätzlicher temperaturabhängiger Zytotoxizität. Die Western blot Experimente an Skut-1 belegten jedoch die erwarteten Auswirkungen der Inhibitoren auf den AKT-mTOR-Signalweg. Die Expression von phospho-AKT und in geringerem Maße von phospho-Protein S6 wurde durch die APC's, die Expression von phospho-Protein S6 durch Everolimus vermindert. Bei der Kombination der Inhibitoren zeigten sich die Expressionen sowohl von phospho-Protein S6 als auch von phospho-AKT stark vermindert. Die Inhibition von AKT mittels APC's ging mit einer Verminderung der Expression von phospho-GSK3 α einher. Zwar zeigte sich keine Vermehrung der AKT-Phosphorylierung durch die Einwirkung des mTOR-Inhibitors, jedoch zeigte sich unter dessen Einfluss zumindest das AKT-Zielprotein phospho-GSK3 α vermehrt phosphoryliert. Die molekularen Mechanismen hinter dem Fehlen eines Synergismus der oben beschriebenen Behandlungsstrategie konnten im Rahmen der Experimente für diese Arbeit nicht beantwortet werden. Diese Fragestellung bedarf weiterer gründlicher Untersuchungen von alternativen Signaltransduktionsmechanismen und Zellzyklusanalysen. Anhand der hier gewonnenen Daten kann der bisher fehlende Stellenwert einer alleinigen mTOR- und AKT-Inhibition bei der Therapie des Weichteilsarkomes jedoch bestätigt werden. Auch die Hyperthermie scheint kein geeigneter Kombinationspartner für die vertikale Blockade des AKT-mTOR-Signalweges beim Weichteilsarkom zu sein. Isoliert, so bestätigen die Daten die Ergebnisse von klinischen Studien, sind die Einzelsubstanzen zur Therapie des Weichteilsarkomes wohl nicht geeignet. Eine Kombination von mTOR- und AKT-Inhibition, so zeigen die Daten der klonogenen Assays und der Western blots, könnte jedoch einen neuen Therapieansatz für das Weichteilsarkom darstellen. Dieser Therapieansatz müsste jedoch im Rahmen von weiteren zellkulturbasierten Experimenten und im Rahmen eines Tiermodells genauer untersucht werden.

11. Literaturverzeichnis

- Alektiar, K. M., Velasco, J., Zelefsky, M. J., Woodruff, J. M., Lewis, J. J. and Brennan, M. F. (2000) Adjuvant radiotherapy for margin-positive high-grade soft tissue sarcoma of the extremity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48(4), pp. 1051-8.
- Andre, F., O'Regan, R., Ozguroglu, M., Toi, M., Xu, B., Jerusalem, G., Masuda, N., Wilks, S., Arena, F., Isaacs, C., Yap, Y. S., Papai, Z., Lang, I., Armstrong, A., Lerzo, G., White, M., Shen, K., Litton, J., Chen, D., Zhang, Y., Ali, S., Taran, T. and Gianni, L. (2014) Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 15(6), pp. 580-91.
- Argiris, A., Cohen, E., Karrison, T., Esparaz, B., Mauer, A., Ansari, R., Wong, S., Lu, Y., Pins, M., Dancey, J. and Vokes, E. (2006) A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol Ther*, 5(7), pp. 766-70.
- Bagley, R. G., Kurtzberg, L., Rouleau, C., Yao, M. and Teicher, B. A. (2011) Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68(6), pp. 1537-46.
- Bailey, H. H., Mahoney, M. R., Ettinger, D. S., Maples, W. J., Fracasso, P. M., Traynor, A. M., Erlichman, C. and Okuno, S. H. (2006) Phase II study of daily oral perifosine in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Cancer*, 107(10), pp. 2462-7.
- Baird, K., Davis, S., Antonescu, C. R., Harper, U. L., Walker, R. L., Chen, Y., Glatfelter, A. A., Duray, P. H. and Meltzer, P. S. (2005) Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res*, 65(20), pp. 9226-35.
- Banaszynski, L. A., Liu, C. W. and Wandless, T. J. (2005) Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *J Am Chem Soc*, 127(13), pp. 4715-21.
- Bendell, J. C., Nemunaitis, J., Vukelja, S. J., Hagenstad, C., Campos, L. T., Hermann, R. C., Sportelli, P., Gardner, L. and Richards, D. A. (2011) Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 29(33), pp. 4394-400.
- Berger, M. R., Sobottka, S., Konstantinov, S. M. and Eibl, H. (1998) Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines. *Drugs Today*, 34, pp. 73-81.
- Bettaieb, A., Wrzal, P. K. and Averill-Bates, D. A. (2013) Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. *INTECH*. <http://dx.doi.org/10.5772/55795>.
- Blay, J. Y. (2011) Updating progress in sarcoma therapy with mTOR inhibitors. *Ann Oncol*, 22(2), pp. 280-7.

- Blay, J. Y., Leahy, M. G., Nguyen, B. B., Patel, S. R., Hohenberger, P., Santoro, A., Staddon, A. P., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Hendifar, A., Lardelli, P., Nieto, A., Alfaro, V. and Chawla, S. P. (2014) Randomised phase III trial of trabectedin versus doxorubicin-based chemotherapy as first-line therapy in translocation-related sarcomas. *Eur J Cancer*, 50(6), pp. 1137-47.
- Boggs, K., Rock, C. O. and Jackowski, S. (1998) The antiproliferative effect of hexadecylphosphocholine toward HL60 cells is prevented by exogenous lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*, 1389(1), pp. 1-12.
- Brady, M. S., Gaynor, J. J. and Brennan, M. F. (1992) Radiation-associated sarcoma of bone and soft tissue. *Arch Surg*, 127(12), pp. 1379-85.
- Bucan, V., Choi, C. Y., Lazaridis, A., Vogt, P. M. and Reimers, K. (2011) Silencing of anti-apoptotic transmembrane protein lifeguard sensitizes solid tumor cell lines MCF-7 and SW872 to perifosine-induced cell death activation. *Oncol Lett*, 2(3), pp. 419-422.
- Calera, M. R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A. K., Birnbaum, M. J. and Pilch, P. F. (1998) Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem*, 273(13), pp. 7201-4.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res*, 47(4), pp. 943-6.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L. C., Baselga, J. and Pandolfi, P. P. (2008) Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*, 118(9), pp. 3065-74.
- Chawla, S. P., Staddon, A. P., Baker, L. H., Schuetze, S. M., Tolcher, A. W., D'Amato, G. Z., Blay, J. Y., Mita, M. M., Sankhala, K. K., Berk, L., Rivera, V. M., Clackson, T., Loewy, J. W., Haluska, F. G. and Demetri, G. D. (2012) Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*, 30(1), pp. 78-84.
- Chen, X. G., Liu, F., Song, X. F., Wang, Z. H., Dong, Z. Q., Hu, Z. Q., Lan, R. Z., Guan, W., Zhou, T. G., Xu, X. M., Lei, H., Ye, Z. Q., Peng, E. J., Du, L. H. and Zhuang, Q. Y. (2010) Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. *Mol Carcinog*, 49(6), pp. 603-10.
- Chiarini, F., Del Sole, M., Mongiorgi, S., Gaboardi, G. C., Cappellini, A., Mantovani, I., Follo, M. Y., McCubrey, J. A. and Martelli, A. M. (2008) The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia*, 22(6), pp. 1106-16.

- Cho, D. C., Hutson, T. E., Samlowski, W., Sportelli, P., Somer, B., Richards, P., Sosman, J. A., Puzanov, I., Michaelson, M. D., Flaherty, K. T., Figlin, R. A. and Vogelzang, N. J. (2012) Two phase 2 trials of the novel Akt inhibitor perifosine in patients with advanced renal cell carcinoma after progression on vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Cancer*, *118*(24), pp. 6055-62.
- Clark, M. A., Fisher, C., Judson, I. and Thomas, J. M. (2005) Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med*, *353*(7), pp. 701-11.
- Coindre, J. M. (2006) Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch Pathol Lab Med*, *130*(10), pp. 1448-53.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, *378*(6559), pp. 785-9.
- Crul, M., Rosing, H., de Klerk, G. J., Dubbelman, R., Traiser, M., Reichert, S., Knebel, N. G., Schellens, J. H., Beijnen, J. H. and ten Bokkel Huinink, W. W. (2002) Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer*, *38*(12), pp. 1615-21.
- Demetri, G. D., Chawla, S. P., Ray-Coquard, I., Le Cesne, A., Staddon, A. P., Milhem, M. M., Penel, N., Riedel, R. F., Bui-Nguyen, B., Cranmer, L. D., Reichardt, P., Bompas, E., Alcindor, T., Rushing, D., Song, Y., Lee, R. M., Ebbinghaus, S., Eid, J. E., Loewy, J. W., Haluska, F. G., Dodion, P. F. and Blay, J. Y. (2013) Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *J Clin Oncol*, *31*(19), pp. 2485-92.
- Demetri, G. D., Chawla, S. P., von Mehren, M., Ritch, P., Baker, L. H., Blay, J. Y., Hande, K. R., Keohan, M. L., Samuels, B. L., Schuetze, S., Lebedinsky, C., Elsayed, Y. A., Izquierdo, M. A., Gomez, J., Park, Y. C. and Le Cesne, A. (2009) Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized phase II study of two different schedules. *J Clin Oncol*, *27*(25), pp. 4188-96.
- Dineva, I. K., Zaharieva, M. M., Konstantinov, S. M., Eibl, H. and Berger, M. R. (2012) Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins. *J Cancer Res Clin Oncol*, *138*(11), pp. 1909-17.
- Djukom, C., Porro, L. J., Mrazek, A., Townsend, C. M., Jr., Hellmich, M. R. and Chao, C. (2014) Dual inhibition of PI3K and mTOR signaling pathways decreases human pancreatic neuroendocrine tumor metastatic progression. *Pancreas*, *43*(1), pp. 88-92.

- Duan, L., Ying, G., Danzer, B., Perez, R. E., Shariat-Madar, Z., Levenson, V. V. and Maki, C. G. (2014) The prolyl peptidases PRCP/PREP regulate IRS-1 stability critical for rapamycin-induced feedback activation of PI3K and AKT. *J Biol Chem*, 289(31), pp. 21694-705.
- Ducimetiere, F., Lurkin, A., Ranchere-Vince, D., Decouvellaere, A. V., Peoc'h, M., Istier, L., Chalabreysse, P., Muller, C., Alberti, L., Bringuier, P. P., Scoazec, J. Y., Schott, A. M., Bergeron, C., Cellier, D., Blay, J. Y. and Ray-Coquard, I. (2011) Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS One*, 6(8), pp. e20294.
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M. and Thompson, C. B. (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, 64(11), pp. 3892-9.
- Engel, J. B., Honig, A., Schonhals, T., Weidler, C., Hausler, S., Krockenberger, M., Grunewald, T. G., Dombrowski, Y., Rieger, L., Dietl, J. and Wischhusen, J. (2008) Perifosine inhibits growth of human experimental endometrial cancers by blockade of AKT phosphorylation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 141(1), pp. 64-9.
- Engel, J. B., Schonhals, T., Hausler, S., Krockenberger, M., Schmidt, M., Horn, E., Koster, F., Dietl, J., Wischhusen, J. and Honig, A. (2011) Induction of programmed cell death by inhibition of AKT with the alkylphosphocholine perifosine in in vitro models of platinum sensitive and resistant ovarian cancers. *Arch Gynecol Obstet*, 283(3), pp. 603-10.
- Erdlenbruch, B., Jendrossek, V., Gerriets, A., Vetterlein, F., Eibl, H. and Lakomek, M. (1999) Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration. *Cancer Chemother Pharmacol*, 44(6), pp. 484-90.
- Ernst, D. S., Eisenhauer, E., Wainman, N., Davis, M., Lohmann, R., Baetz, T., Belanger, K. and Smylie, M. (2005) Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs*, 23(6), pp. 569-75.
- Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Algaba, F., Patard, J. J., Khoo, V., Eisen, T., Horwich, A. and Group, E. G. W. (2014) Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 25 Suppl 3, pp. iii49-56.
- ESMO, N. G. and Sarcoma Network Working Group, E. (2014) Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 25 Suppl 3, pp. iii102-12.
- Fayette, J., Penel, N., Chevreau, C., Blay, J. Y., Cupissol, D., Thyss, A., Guillemet, C., Rios, M., Rolland, F., Fargeot, P., Bay, J. O., Mathoulin-Pelissier, S., Coindre, J. M. and Bui-Nguyen, B. (2009) Phase III trial of standard versus dose-intensified doxorubicin, ifosfamide and dacarbazine (MAID) in the first-line treatment of metastatic and locally advanced soft tissue sarcoma. *Invest New Drugs*, 27(5), pp. 482-9.

- Ferner, R. E. and Gutmann, D. H. (2002) International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res*, 62(5), pp. 1573-7.
- Fiegl, M., Lindner, L. H., Juergens, M., Eibl, H., Hiddemann, W. and Braess, J. (2008) Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: single activity and combination with other antileukemic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62(2), pp. 321-9.
- Fletcher, C. D. (2014) The evolving classification of soft tissue tumours - an update based on the new 2013 WHO classification. *Histopathology*, 64(1), pp. 2-11.
- Fletcher, C. D. M., World Health Organization. and International Agency for Research on Cancer. (2013) *WHO classification of tumours of soft tissue and bone, World Health Organization classification of tumours*, 4th ed., Lyon: IARC Press.
- Frank, S. A. (2004) Inheritance of cancer. *Discov Med*, 4(24), pp. 396-400.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5), pp. 2315-9.
- Friedman, D. R., Lanasa, M. C., Davis, P. H., Allgood, S. D., Matta, K. M., Brander, D. M., Chen, Y., Davis, E. D., Volkheimer, A. D., Moore, J. O., Gockerman, J. P., Sportelli, P. and Weinberg, J. B. (2014) Perifosine treatment in chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II clinical trial and in vitro studies. *Leuk Lymphoma*, 55(5), pp. 1067-75.
- Friedrichs, N., Kuchler, J., Endl, E., Koch, A., Czerwitzki, J., Wurst, P., Metzger, D., Schulte, J. H., Holst, M. I., Heukamp, L. C., Larsson, O., Tanaka, S., Kawai, A., Wardelmann, E., Buettner, R., Pietsch, T. and Hartmann, W. (2008) Insulin-like growth factor-1 receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma. *J Pathol*, 216(4), pp. 428-39.
- Gallicchio, M. A., van Sinderen, M. and Bach, L. A. (2003) Insulin-like growth factor binding protein-6 and CCI-779, an ester analogue of rapamycin, additively inhibit rhabdomyosarcoma growth. *Horm Metab Res*, 35(11-12), pp. 822-7.
- Ganesan, P., Piha-Paul, S., Naing, A., Falchook, G., Wheler, J., Fu, S., Hong, D. S., Kurzrock, R., Janku, F., Laday, S., Bedikian, A. Y., Kies, M., Wolff, R. A. and Tsimberidou, A. M. (2014) Phase I clinical trial of lenalidomide in combination with sorafenib in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs*, 32(2), pp. 279-86.
- Gao, Z., Liu, F., Yin, P., Wan, C., He, S., Liu, X., Zhao, H., Liu, T., Xu, J. and Guo, S. (2013) Inhibition of heat-induced apoptosis in rat small intestine and IEC-6 cells through the AKT signaling pathway. *BMC Vet Res*, 9, pp. 241.

- Georgieva, M. C., Konstantinov, S. M., Topashka-Ancheva, M. and Berger, M. R. (2002) Combination effects of alkylphosphocholines and gemcitabine in malignant and normal hematopoietic cells. *Cancer Lett*, 182(2), pp. 163-74.
- Ghobrial, I. M., Roccaro, A., Hong, F., Weller, E., Rubin, N., Leduc, R., Rourke, M., Chuma, S., Sacco, A., Jia, X., Azab, F., Azab, A. K., Rodig, S., Warren, D., Harris, B., Varticovski, L., Sportelli, P., Leleu, X., Anderson, K. C. and Richardson, P. G. (2010) Clinical and translational studies of a phase II trial of the novel oral Akt inhibitor perifosine in relapsed or relapsed/refractory Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Cancer Res*, 16(3), pp. 1033-41.
- Gortzak, E., Azzarelli, A., Buesa, J., Bramwell, V. H., van Coevorden, F., van Geel, A. N., Ezzat, A., Santoro, A., Oosterhuis, J. W., van Glabbeke, M., Kirkpatrick, A., Verweij, J., Group, E. O. R. T. C. S. T. B. S. and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group/Canadian Sarcoma, G. (2001) A randomised phase II study on neo-adjuvant chemotherapy for 'high-risk' adult soft-tissue sarcoma. *Eur J Cancer*, 37(9), pp. 1096-103.
- Grignani, G., Palmerini, E., Ferraresi, V., D'Ambrosio, L., Bertulli, R., Asaftei, S. D., Tamburini, A., Pignochino, Y., Sangiolo, D., Marchesi, E., Capozzi, F., Biagini, R., Gambarotti, M., Fagioli, F., Casali, P. G., Picci, P., Ferrari, S., Aglietta, M. and Italian Sarcoma, G. (2015) Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncol*, 16(1), pp. 98-107.
- Gronchi, A., Lo Vullo, S., Colombo, C., Collini, P., Stacchiotti, S., Mariani, L., Fiore, M. and Casali, P. G. (2010) Extremity soft tissue sarcoma in a series of patients treated at a single institution: local control directly impacts survival. *Ann Surg*, 251(3), pp. 506-11.
- Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K. W. and Geissler, E. K. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*, 8(2), pp. 128-35.
- Guidetti, A., Carlo-Stella, C., Locatelli, S. L., Malorni, W., Mortarini, R., Viviani, S., Russo, D., Marchiano, A., Sorasio, R., Dodero, A., Farina, L., Giordano, L., Di Nicola, M., Anichini, A., Corradini, P. and Gianni, A. M. (2014) Phase II study of perifosine and sorafenib dual-targeted therapy in patients with relapsed or refractory lymphoproliferative diseases. *Clin Cancer Res*, 20(22), pp. 5641-51.
- Heijkoop, S. T., Franckena, M., Thomeer, M. G., Boere, I. A., Van Montfort, C. and Van Doorn, H. C. (2012) Neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy and concurrent hyperthermia in patients with advanced-stage cervical cancer: a retrospective study. *Int J Hyperthermia*, 28(6), pp. 554-61.
- Hennessy, B. T., Lu, Y., Poradosu, E., Yu, Q., Yu, S., Hall, H., Carey, M. S., Ravoori, M., Gonzalez-Angulo, A. M., Birch, R., Henderson, I. C., Kundra, V. and Mills, G. B. (2007) Pharmacodynamic markers of perifosine efficacy. *Clin Cancer Res*, 13(24), pp. 7421-31.

- Hernando, E., Charytonowicz, E., Dudas, M. E., Menendez, S., Matushansky, I., Mills, J., Socci, N. D., Behrendt, N., Ma, L., Maki, R. G., Pandolfi, P. P. and Cordon-Cardo, C. (2007) The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat Med*, 13(6), pp. 748-53.
- Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L. and Coiffier, B. (2009) Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 27(23), pp. 3822-9.
- Hideshima, T., Catley, L., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Mitsiades, C., Podar, K., Munshi, N. C., Chauhan, D., Richardson, P. G. and Anderson, K. C. (2006) Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood*, 107(10), pp. 4053-62.
- Hildebrandt, B. and Wust, P. (2007) Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Res*, 134, pp. 185-93.
- Hurwitz, M. and Stauffer, P. (2014) Hyperthermia, radiation and chemotherapy: the role of heat in multidisciplinary cancer care. *Semin Oncol*, 41(6), pp. 714-29.
- Iliakis, G., Wu, W. and Wang, M. (2008) DNA double strand break repair inhibition as a cause of heat radiosensitization: re-evaluation considering backup pathways of NHEJ. *Int J Hyperthermia*, 24(1), pp. 17-29.
- Imura, Y., Yasui, H., Outani, H., Wakamatsu, T., Hamada, K., Nakai, T., Yamada, S., Myoui, A., Araki, N., Ueda, T., Itoh, K., Yoshikawa, H. and Naka, N. (2014) Combined targeting of mTOR and c-MET signaling pathways for effective management of epithelioid sarcoma. *Mol Cancer*, 13, pp. 185.
- Issels, R. D. (2008) Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer*, 44(17), pp. 2546-54.
- Issels, R. D., Abdel-Rahman, S., Wendtner, C., Falk, M. H., Kurze, V., Sauer, H., Aydemir, U. and Hiddemann, W. (2001) Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. *Eur J Cancer*, 37(13), pp. 1599-608.
- Issels, R. D., Lindner, L. H., Ghadjar, P., Reichardt, P., Hohenberger, P., Verweij, J., Abdel-Rahman, S., Daugaard, S., Salat, C., Vujaskovic, Z., Wessalowski, R., Duerr, H. R., Ploner, F., Mella, O., Schmidt, M., Mansmann, U., Jauch, K. W., Belka, C., Hiddemann, W. and Gronchi, A. (2015) LATE BREAKING ABSTRACT: Improved overall survival by adding regional hyperthermia to neo-adjuvant chemotherapy in patients with localized high-risk soft tissue sarcoma (HR-STs): Long-term outcomes of the EORTC 62961/ESHO randomized phase III study. <http://www.europecancercongress.org/Scientific-Programme/Abstract-search?abstractid=23007>.

- Issels, R. D., Lindner, L. H., Verweij, J., Wust, P., Reichardt, P., Schem, B. C., Abdel-Rahman, S., Daugaard, S., Salat, C., Wendtner, C. M., Vujaskovic, Z., Wessalowski, R., Jauch, K. W., Durr, H. R., Ploner, F., Baur-Melnyk, A., Mansmann, U., Hiddemann, W., Blay, J. Y., Hohenberger, P., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Soft, T., Bone Sarcoma, G. and European Society for Hyperthermic, O. (2010) Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol*, 11(6), pp. 561-70.
- Italiano, A., Delva, F., Mathoulin-Pelissier, S., Le Cesne, A., Bonvalot, S., Terrier, P., Trassard, M., Michels, J. J., Blay, J. Y., Coindre, J. M. and Bui, B. (2010) Effect of adjuvant chemotherapy on survival in FNCLCC grade 3 soft tissue sarcomas: a multivariate analysis of the French Sarcoma Group Database. *Ann Oncol*, 21(12), pp. 2436-41.
- Jakubowiak, A. J., Richardson, P. G., Zimmerman, T., Alsina, M., Kaufman, J. L., Kandarpa, M., Kraftson, S., Ross, C. W., Harvey, C., Hideshima, T., Sportelli, P., Poradosu, E., Gardner, L., Giusti, K. and Anderson, K. C. (2012) Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium study. *Br J Haematol*, 158(4), pp. 472-80.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. and Ward, E. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60(5), pp. 277-300.
- Jendrossek, V., Hammersen, K., Erdlenbruch, B., Kugler, W., Krugener, R., Eibl, H. and Lakomek, M. (2002) Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, 50(1), pp. 71-9.
- Jolesch, A., Elmer, K., Bendz, H., Issels, R. D. and Noessner, E. (2012) Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur J Cell Biol*, 91(1), pp. 48-52.
- Jones, E. L., Oleson, J. R., Prosnitz, L. R., Samulski, T. V., Vujaskovic, Z., Yu, D., Sanders, L. L. and Dewhirst, M. W. (2005) Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors. *J Clin Oncol*, 23(13), pp. 3079-85.
- Judson, I., Verweij, J., Gelderblom, H., Hartmann, J. T., Schoffski, P., Blay, J. Y., Kerst, J. M., Sufliarsky, J., Whelan, J., Hohenberger, P., Krarup-Hansen, A., Alcindor, T., Marreaud, S., Litiere, S., Hermans, C., Fisher, C., Hogendoorn, P. C., dei Tos, A. P., van der Graaf, W. T., European, O., Treatment of Cancer Soft, T. and Bone Sarcoma, G. (2014) Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 15(4), pp. 415-23.
- Juengel, E., Engler, J., Natsheh, I., Jones, J., Mickuckyte, A., Hudak, L., Jonas, D. and Blaheta, R. A. (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, pp. 161.

- Kaleagasioglu, F. and Berger, M. R. (2014) Differential effects of erufosine on proliferation, wound healing and apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Oncol Rep*, 31(3), pp. 1407-16.
- Kampinga, H. H. (2006) Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field. *Int J Hyperthermia*, 22(3), pp. 191-6.
- Kapoor, V., Zaharieva, M. M., Das, S. N. and Berger, M. R. (2012) Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt-mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, 319(1), pp. 39-48.
- Kattan, M. W., Leung, D. H. and Brennan, M. F. (2002) Postoperative nomogram for 12-year sarcoma-specific death. *J Clin Oncol*, 20(3), pp. 791-6.
- Kelleher, F. C. and Thomas, D. M. (2012) Molecular pathogenesis and targeted therapeutics in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumours. *Clin Sarcoma Res*, 2(1), pp. 6.
- Knowling, M., Blackstein, M., Tozer, R., Bramwell, V., Dancey, J., Dore, N., Matthews, S. and Eisenhauer, E. (2006) A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Invest New Drugs*, 24(5), pp. 435-9.
- Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J. and Roth, R. A. (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*, 271(49), pp. 31372-8.
- Kollmannsberger, C., Brugger, W., Hartmann, J. T., Maurer, F., Bohm, P., Kanz, L. and Bokemeyer, C. (1999) Phase II study of oral trofosamide as palliative therapy in pretreated patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Anticancer Drugs*, 10(5), pp. 453-6.
- Kondapaka, S. B., Singh, S. S., Dasmahapatra, G. P., Sausville, E. A. and Roy, K. K. (2003) Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther*, 2(11), pp. 1093-103.
- Konstantinov, S. M., Georgieva, M. C., Topashka-Ancheva, M., Eibl, H. and Berger, M. R. (2002) Combination with an antisense oligonucleotide synergistically improves the antileukemic efficacy of erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium in chronic myeloid leukemia cell lines. *Mol Cancer Ther*, 1(10), pp. 877-84.
- Konstantinov, S. M., Topashka-Ancheva, M., Benner, A. and Berger, M. R. (1998) Alkylphosphocholines: Effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells. *Int J Cancer*, 77(5), pp. 778-86.
- Kouloulis, V., Triantopoulou, S., Uzunoglou, N., Pistevou-Gompaki, K., Barich, A., Zygogianni, A., Kyrgias, G., Kardamakis, D., Pectasidis, D., Kouvaris, J. and Greek Society of Hyperthermic, O.

(2015) Hyperthermia Is Now Included in the NCCN Clinical Practice Guidelines for Breast Cancer Recurrences: An Analysis of Existing Data. *Breast Care (Basel)*, 10(2), pp. 109-16.

Krawczyk, P. M., Eppink, B., Essers, J., Stap, J., Rodermond, H., Odijk, H., Zelensky, A., van Bree, C., Stalpers, L. J., Buist, M. R., Soullie, T., Rens, J., Verhagen, H. J., O'Connor, M. J., Franken, N. A., Ten Hagen, T. L., Kanaar, R. and Aten, J. A. (2011) Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(24), pp. 9851-6.

Kraybill, W. G., Harris, J., Spiro, I. J., Ettinger, D. S., DeLaney, T. F., Blum, R. H., Lucas, D. R., Harmon, D. C., Letson, G. D. and Eisenberg, B. (2010) Long-term results of a phase 2 study of neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation Therapy Oncology Group Trial 9514. *Cancer*, 116(19), pp. 4613-21.

Kraybill, W. G., Harris, J., Spiro, I. J., Ettinger, D. S., DeLaney, T. F., Blum, R. H., Lucas, D. R., Harmon, D. C., Letson, G. D., Eisenberg, B. and Radiation Therapy Oncology Group, T. (2006) Phase II study of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation Therapy Oncology Group Trial 9514. *J Clin Oncol*, 24(4), pp. 619-25.

Krenzien, F., ElKhal, A., Quante, M., Rodriguez Cetina Bieffer, H., Hirofumi, U., Gabardi, S. and Tullius, S. G. (2015) A Rationale for Age-Adapted Immunosuppression in Organ Transplantation. *Transplantation*, 99(11), pp. 2258-68.

Kwitkowski, V. E., Prowell, T. M., Ibrahim, A., Farrell, A. T., Justice, R., Mitchell, S. S., Sridhara, R. and Pazdur, R. (2010) FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist*, 15(4), pp. 428-35.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.

Lawrence, W., Jr., Donegan, W. L., Natarajan, N., Mettlin, C., Beart, R. and Winchester, D. (1987) Adult soft tissue sarcomas. A pattern of care survey of the American College of Surgeons. *Ann Surg*, 205(4), pp. 349-59.

Le Cesne, A., Antoine, E., Spielmann, M., Le Chevalier, T., Brain, E., Toussaint, C., Janin, N., Kayitalire, L., Fontaine, F., Genin, J. and et al. (1995) High-dose ifosfamide: circumvention of resistance to standard-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*, 13(7), pp. 1600-8.

Leighl, N. B., Dent, S., Clemons, M., Vandenberg, T. A., Tozer, R., Warr, D. G., Crump, R. M., Hedley, D., Pond, G. R., Dancy, J. E. and Moore, M. J. (2008) A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 108(1), pp. 87-92.

- Lepock, J. R. (2005) How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia*, 21(8), pp. 681-7.
- Lindl, T. (2000) *Langzeitlagerung- und Kryokonservierung von Zellen., Zell- und Gewebekultur*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 110-3.
- Lindner, L. H., Eibl, H., Hossann, M. and Vogeser, M. (2008) Quantification of erufosine, the first intravenously applicable alkylphosphocholine, in human plasma by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a deuterated internal standard. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 869(1-2), pp. 16-9.
- Liu, T., Sun, Q., Li, Q., Yang, H., Zhang, Y., Wang, R., Lin, X., Xiao, D., Yuan, Y., Chen, L. and Wang, W. (2014) Dual PI3K/mTOR inhibitors, GSK2126458 and PKI-587, suppress tumor progression and increase radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer Ther*.
- Maki, R. G., Wathen, J. K., Patel, S. R., Priebat, D. A., Okuno, S. H., Samuels, B., Fanucchi, M., Harmon, D. C., Schuetze, S. M., Reinke, D., Thall, P. F., Benjamin, R. S., Baker, L. H. and Hensley, M. L. (2007) Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas: results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002 [corrected]. *J Clin Oncol*, 25(19), pp. 2755-63.
- Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), pp. 1261-74.
- Marsh Rde, W., Rocha Lima, C. M., Levy, D. E., Mitchell, E. P., Rowland, K. M., Jr. and Benson, A. B., 3rd (2007) A phase II trial of perifosine in locally advanced, unresectable, or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*, 30(1), pp. 26-31.
- Martin, K. A., Merenick, B. L., Ding, M., Fetalvero, K. M., Rzucidlo, E. M., Kozul, C. D., Brown, D. J., Chiu, H. Y., Shyu, M., Drapeau, B. L., Wagner, R. J. and Powell, R. J. (2007) Rapamycin promotes vascular smooth muscle cell differentiation through insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt2 feedback signaling. *J Biol Chem*, 282(49), pp. 36112-20.
- Martins, A. S., Olmos, D., Missiaglia, E. and Shipley, J. (2011) Targeting the insulin-like growth factor pathway in rhabdomyosarcomas: rationale and future perspectives. *Sarcoma*, 2011, pp. 209736.
- Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M. and Vile, R. G. (1998) Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med*, 4(5), pp. 581-7.
- Milani, V., Noessner, E., Ghose, S., Kuppner, M., Ahrens, B., Scharner, A., Gastpar, R. and Issels, R. D. (2002) Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia*, 18(6), pp. 563-75.

- Millar, B. C., Fielden, E. M. and Steele, J. J. (1980) Effect of oxygen-radiosensitizer mixtures on the radiation response of Chinese hamster cells, line V-79-753B, in vitro. II. Determination of the initial yield of single-strand breaks in the cellular DNA using a rapid lysis technique. *Radiat Res*, 83(1), pp. 57-65.
- Mir, O., Domont, J., Cioffi, A., Bonvalot, S., Boulet, B., Le Pechoux, C., Terrier, P., Spielmann, M. and Le Cesne, A. (2011) Feasibility of metronomic oral cyclophosphamide plus prednisolone in elderly patients with inoperable or metastatic soft tissue sarcoma. *Eur J Cancer*, 47(4), pp. 515-9.
- Moriceau, G., Ory, B., Mitrofan, L., Riganti, C., Blanchard, F., Brion, R., Charrier, C., Battaglia, S., Pilet, P., Denis, M. G., Shultz, L. D., Monkkonen, J., Redini, F. and Heymann, D. (2010) Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer Res*, 70(24), pp. 10329-39.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), pp. 55-63.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Grunwald, V., Thompson, J. A., Figlin, R. A., Hollaender, N., Urbanowitz, G., Berg, W. J., Kay, A., Lebwohl, D., Ravaud, A. and Group, R.-S. (2008) Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, 372(9637), pp. 449-56.
- Nave, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R. and Shepherd, P. R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J*, 344 Pt 2, pp. 427-31.
- Noessner, E., Gastpar, R., Milani, V., Brandl, A., Hutzler, P. J., Kuppner, M. C., Roos, M., Kremmer, E., Asea, A., Calderwood, S. K. and Issels, R. D. (2002) Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol*, 169(10), pp. 5424-32.
- O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D. J., Ludwig, D. L., Baselga, J. and Rosen, N. (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 66(3), pp. 1500-8.
- O'Sullivan, B., Davis, A. M., Turcotte, R., Bell, R., Catton, C., Chabot, P., Wunder, J., Kandel, R., Goddard, K., Sadura, A., Pater, J. and Zee, B. (2002) Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet*, 359(9325), pp. 2235-41.
- Okuno, S., Bailey, H., Mahoney, M. R., Adkins, D., Maples, W., Fitch, T., Ettinger, D., Erlichman, C. and Sarkaria, J. N. (2011) A phase 2 study of temsirolimus (CCI-779) in patients with soft tissue sarcomas: a study of the Mayo phase 2 consortium (P2C). *Cancer*, 117(15), pp. 3468-75.

- Pal, S. K., Reckamp, K., Yu, H. and Figlin, R. A. (2010) Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 19(11), pp. 1355-66.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), pp. 153-83.
- Penel, N., Bui, B. N., Bay, J. O., Cupissol, D., Ray-Coquard, I., Piperno-Neumann, S., Kerbrat, P., Fournier, C., Taieb, S., Jimenez, M., Isambert, N., Peyrade, F., Chevreau, C., Bompas, E., Brain, E. G. and Blay, J. Y. (2008) Phase II trial of weekly paclitaxel for unresectable angiosarcoma: the ANGIOTAX Study. *J Clin Oncol*, 26(32), pp. 5269-74.
- Pervaiz, N., Colterjohn, N., Farrokhyar, F., Tozer, R., Figueredo, A. and Ghert, M. (2008) A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. *Cancer*, 113(3), pp. 573-81.
- Petersen, I. (2013) [The new WHO classification and recent results in soft tissue tumor pathology]. *Pathologie*, 34(5), pp. 436-48.
- Petricoin, E. F., 3rd, Espina, V., Araujo, R. P., Midura, B., Yeung, C., Wan, X., Eichler, G. S., Johann, D. J., Jr., Qualman, S., Tsokos, M., Krishnan, K., Helman, L. J. and Liotta, L. A. (2007) Phosphoprotein pathway mapping: Akt/mammalian target of rapamycin activation is negatively associated with childhood rhabdomyosarcoma survival. *Cancer Res*, 67(7), pp. 3431-40.
- Pisters, P. W., Leung, D. H., Woodruff, J., Shi, W. and Brennan, M. F. (1996) Analysis of prognostic factors in 1,041 patients with localized soft tissue sarcomas of the extremities. *J Clin Oncol*, 14(5), pp. 1679-89.
- Pisters, P. W., Patel, S. R., Varma, D. G., Cheng, S. C., Chen, N. P., Nguyen, H. T., Feig, B. W., Pollack, A., Pollock, R. E. and Benjamin, R. S. (1997) Preoperative chemotherapy for stage IIIB extremity soft tissue sarcoma: long-term results from a single institution. *J Clin Oncol*, 15(12), pp. 3481-7.
- Pitter, K. L., Galban, C. J., Galban, S., Tehrani, O. S., Li, F., Charles, N., Bradbury, M. S., Becher, O. J., Chenevert, T. L., Rehemtulla, A., Ross, B. D., Holland, E. C. and Hambardzumyan, D. (2011) Perifosine and CCI 779 co-operate to induce cell death and decrease proliferation in PTEN-intact and PTEN-deficient PDGF-driven murine glioblastoma. *PLoS One*, 6(1), pp. e14545.
- Populo, H., Lopes, J. M. and Soares, P. (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci*, 13(2), pp. 1886-918.
- Posadas, E. M., Gulley, J., Arlen, P. M., Trout, A., Parnes, H. L., Wright, J., Lee, M. J., Chung, E. J., Trepel, J. B., Sparreboom, A., Chen, C., Jones, E., Steinberg, S. M., Daniels, A., Figg, W. D. and

- Dahut, W. L. (2005) A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther*, 4(10), pp. 1133-7.
- Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B. and Horton, M. R. (2012) Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*, 30, pp. 39-68.
- Powell, S. N. and Kachnic, L. A. (2011) Homologous recombination research is heating up and ready for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(24), pp. 9731-2.
- Prosnitz, L. R., Maguire, P., Anderson, J. M., Scully, S. P., Harrelson, J. M., Jones, E. L., Dewhirst, M., Samulski, T. V., Powers, B. E., Rosner, G. L., Dodge, R. K., Layfield, L., Clough, R. and Brizel, D. M. (1999) The treatment of high-grade soft tissue sarcomas with preoperative thermoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 45(4), pp. 941-9.
- Quek, R., Wang, Q., Morgan, J. A., Shapiro, G. I., Butrynski, J. E., Ramaiya, N., Huftalen, T., Jederlinic, N., Manola, J., Wagner, A. J., Demetri, G. D. and George, S. (2011) Combination mTOR and IGF-1R inhibition: phase I trial of everolimus and figitumumab in patients with advanced sarcomas and other solid tumors. *Clin Cancer Res*, 17(4), pp. 871-9.
- Rayasam, G. V., Tulasi, V. K., Sodhi, R., Davis, J. A. and Ray, A. (2009) Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol*, 156(6), pp. 885-98.
- Richardson, P. G., Wolf, J., Jakubowiak, A., Zonder, J., Lonial, S., Irwin, D., Densmore, J., Krishnan, A., Raje, N., Bar, M., Martin, T., Schlossman, R., Ghobrial, I. M., Munshi, N., Laubach, J., Allerton, J., Hideshima, T., Colson, K., Poradosu, E., Gardner, L., Sportelli, P. and Anderson, K. C. (2011) Perifosine plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma previously treated with bortezomib: results of a multicenter phase I/II trial. *J Clin Oncol*, 29(32), pp. 4243-9.
- Rudner, J., Ruiner, C. E., Handrick, R., Eibl, H. J., Belka, C. and Jendrossek, V. (2010) The Akt-inhibitor Erufosine induces apoptotic cell death in prostate cancer cells and increases the short term effects of ionizing radiation. *Radiat Oncol*, 5, pp. 108.
- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J. and Verheij, M. (2003) Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs*, 14(2), pp. 167-73.
- Saleiro, D. and Plataniias, L. C. (2015) Intersection of mTOR and STAT signaling in immunity. *Trends Immunol*, 36(1), pp. 21-9.
- Samartzis, D., Nishi, N., Cologne, J., Funamoto, S., Hayashi, M., Kodama, K., Miles, E. F., Suyama, A., Soda, M. and Kasagi, F. (2013) Ionizing radiation exposure and the development of soft-tissue sarcomas in atomic-bomb survivors. *J Bone Joint Surg Am*, 95(3), pp. 222-9.

- Samartzis, E. P., Gutsche, K., Dedes, K. J., Fink, D., Stucki, M. and Imesch, P. (2014) Loss of ARID1A expression sensitizes cancer cells to PI3K- and AKT-inhibition. *Oncotarget*, 5(14), pp. 5295-303.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), pp. 1098-101.
- Schöffski, P., Maki, R. G., Italiano, A., Gelderblom, H., Grignani, G., De Camargo, V. P., Bauer, S., Rha, S. Y., Chawla, S. P., Blay, J.-Y., Hohenberger, P., D'Adamo, D. R., Wang, B., Bartosz, C., Le Cesne, A., Demetri, G. and Patel, S. (2015) Randomized, open-label, multicenter, phase III study of eribulin versus dacarbazine in patients (pts) with leiomyosarcoma (LMS) and adipocytic sarcoma (ADI). *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr LBA10502).
- Schöffski, P., Ray-Coquard, I. L., Cioffi, A., Bui, N. B., Bauer, S., Hartmann, J. T., Krarup-Hansen, A., Grunwald, V., Sciot, R., Dumez, H., Blay, J. Y., Le Cesne, A., Wanders, J., Hayward, C., Marreaud, S., Ouali, M., Hohenberger, P., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Soft, T. and Bone Sarcoma, G. (2011) Activity of eribulin mesylate in patients with soft-tissue sarcoma: a phase 2 study in four independent histological subtypes. *Lancet Oncol*, 12(11), pp. 1045-52.
- Schwartz, G. K., Tap, W. D., Qin, L. X., Livingston, M. B., Undevia, S. D., Chmielowski, B., Agulnik, M., Schuetze, S. M., Reed, D. R., Okuno, S. H., Ludwig, J. A., Keedy, V., Rietschel, P., Kraft, A. S., Adkins, D., Van Tine, B. A., Brockstein, B., Yim, V., Bitas, C., Abdullah, A., Antonescu, C. R., Condy, M., Dickson, M. A., Vasudeva, S. D., Ho, A. L., Doyle, L. A., Chen, H. X. and Maki, R. G. (2013) Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 14(4), pp. 371-82.
- She, Q. B., Solit, D. B., Ye, Q., O'Reilly, K. E., Lobo, J. and Rosen, N. (2005) The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*, 8(4), pp. 287-97.
- Shi, Y., Yan, H., Frost, P., Gera, J. and Lichtenstein, A. (2005) Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther*, 4(10), pp. 1533-40.
- Slavotinek, A., McMillan, T. J. and Steel, C. M. (1994) Measurement of radiation survival using the MTT assay. *Eur J Cancer*, 30A(9), pp. 1376-82.
- SMAC (1997) Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data. Sarcoma Meta-analysis Collaboration. *Lancet*, 350(9092), pp. 1647-54.
- Sun, S. Y., Rosenberg, L. M., Wang, X., Zhou, Z., Yue, P., Fu, H. and Khuri, F. R. (2005) Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res*, 65(16), pp. 7052-8.

- Takahashi, Y., Kohashi, K., Yamada, Y., Endo, M., Setsu, N., Ishii, T., Yamamoto, H., Iwamoto, Y. and Oda, Y. (2014) Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway in myxofibrosarcomas. *Hum Pathol*, 45(5), pp. 984-93.
- Tao, Y., Guo, Y., Liu, W., Zhang, J., Li, X., Shen, L., Ru, Y., Xue, Y., Zheng, J., Liu, X., Zhang, J. and Yao, L. (2013) AKT inhibitor suppresses hyperthermia-induced Ndr2 phosphorylation in gastric cancer cells. *Braz J Med Biol Res*, 46(4), pp. 394-404.
- Urano, M., Kuroda, M. and Nishimura, Y. (1999) For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia*, 15(2), pp. 79-107.
- van Blitterswijk, W. J. and Verheij, M. (2008) Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des*, 14(21), pp. 2061-74.
- van der Graaf, W. T., Blay, J. Y., Chawla, S. P., Kim, D. W., Bui-Nguyen, B., Casali, P. G., Schoffski, P., Aglietta, M., Staddon, A. P., Beppu, Y., Le Cesne, A., Gelderblom, H., Judson, I. R., Araki, N., Ouali, M., Marreaud, S., Hodge, R., Dewji, M. R., Coens, C., Demetri, G. D., Fletcher, C. D., Dei Tos, A. P., Hohenberger, P., Tissue, E. S., Bone Sarcoma, G. and group, P. s. (2012) Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, 379(9829), pp. 1879-86.
- van Der Luit, A. H., Budde, M., Verheij, M. and Van Blitterswijk, W. J. (2003) Different modes of internalization of apoptotic alkyl-lysophospholipid and cell-rescuing lysophosphatidylcholine. *Biochem J*, 374(Pt 3), pp. 747-53.
- van der Waal, R. P., Griffith, C. L., Wright, W. D., Borrelli, M. J. and Roti, J. L. (2001) Delaying S-phase progression rescues cells from heat-induced S-phase hypertoxicity. *J Cell Physiol*, 187(2), pp. 236-43.
- van der Zee, J., Gonzalez Gonzalez, D., van Rhoo, G. C., van Dijk, J. D., van Putten, W. L. and Hart, A. A. (2000) Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *Lancet*, 355(9210), pp. 1119-25.
- van Glabbeke, M., van Oosterom, A. T., Oosterhuis, J. W., Mouridsen, H., Crowther, D., Somers, R., Verweij, J., Santoro, A., Buesa, J. and Tursz, T. (1999) Prognostic factors for the outcome of chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma: an analysis of 2,185 patients treated with anthracycline-containing first-line regimens--a European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol*, 17(1), pp. 150-7.
- van Ummersen, L., Binger, K., Volkman, J., Marnocha, R., Tutsch, K., Kolesar, J., Arzoomanian, R., Alberti, D. and Wilding, G. (2004) A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading

- dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 10(22), pp. 7450-6.
- Verma, S., Younus, J., Stys-Norman, D., Haynes, A. E., Blackstein, M. and Members of the Sarcoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-Based, C. (2008) Meta-analysis of ifosfamide-based combination chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma. *Cancer Treat Rev*, 34(4), pp. 339-47.
- Verschraegen, C. F., Movva, S., Ji, Y., Schmit, B., Quinn, R. H., Liem, B., Bocklage, T. and Shaheen, M. (2013) A phase I study of the combination of temsirolimus with irinotecan for metastatic sarcoma. *Cancers (Basel)*, 5(2), pp. 418-29.
- Vezina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S. N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(10), pp. 721-6.
- Vink, S. R., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., Sindermann, H., Engel, J., Dubbelman, R., Moppi, G., Hillebrand, M. J., Bartelink, H. and Verheij, M. (2006) Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours. *Radiother Oncol*, 80(2), pp. 207-13.
- von Mehren, M., Randall, R. L., Benjamin, R. S., Boles, S., Bui, M. M., Casper, E. S., Conrad, E. U. r., Delaney, T. F., Ganjoo, K. N., George, S., Gonzalez, R. J., Heslin, M. J., Kane, J. M. r., Mayerson, J., McGarry, S. V., Meyer, C., O'Donnell, R. J., Pappo, A. S., Paz, I. B., Pfeifer, J. D., Riedel, R. F., Schuetze, S., Schupak, K. D., Schwartz, H. S., Van Tine, B. A., Wayne, J. D., Bergman, M. A. and Sundar, H. (2014) Soft tissue sarcoma, version 2.2014. *J Natl Compr Canc Netw.*, 12(4), pp. 473-83.
- Wagner, L. M., Fouladi, M., Ahmed, A., Krailo, M. D., Weigel, B., DuBois, S. G., Doyle, L. A., Chen, H. and Blaney, S. M. (2015) Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 62(3), pp. 440-4.
- Wan, X. and Helman, L. J. (2007) The biology behind mTOR inhibition in sarcoma. *Oncologist*, 12(8), pp. 1007-18.
- Wander, S. A., Hennessy, B. T. and Slingerland, J. M. (2011) Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest*, 121(4), pp. 1231-41.
- Wasserman, T. H. and Twentyman, P. (1988) Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 15(3), pp. 699-702.

- Welz, S., Hehr, T., Lamprecht, U., Scheithauer, H., Budach, W. and Bamberg, M. (2005) Thermoradiotherapy of the chest wall in locally advanced or recurrent breast cancer with marginal resection. *Int J Hyperthermia*, 21(2), pp. 159-67.
- Woll, P. J., Reichardt, P., Le Cesne, A., Bonvalot, S., Azzarelli, A., Hoekstra, H. J., Leahy, M., Van Coevorden, F., Verweij, J., Hogendoorn, P. C., Ouali, M., Marreaud, S., Bramwell, V. H., Hohenberger, P., Tissue, E. S., Bone Sarcoma, G. and the, N. C. T. G. S. D. S. C. (2012) Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 13(10), pp. 1045-54.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), pp. 471-84.
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. and Schlag, P. M. (2002) Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3(8), pp. 487-97.
- Yao, C., Wei, J. J., Wang, Z. Y., Ding, H. M., Li, D., Yan, S. C., Yang, Y. J. and Gu, Z. P. (2013) Perifosine induces cell apoptosis in human osteosarcoma cells: new implication for osteosarcoma therapy? *Cell Biochem Biophys*, 65(2), pp. 217-27.
- Yoo, C., Lee, J., Rha, S. Y., Park, K. H., Kim, T. M., Kim, Y. J., Lee, H. J., Lee, K. H. and Ahn, J. H. (2013) Multicenter phase II study of everolimus in patients with metastatic or recurrent bone and soft-tissue sarcomas after failure of anthracycline and ifosfamide. *Invest New Drugs*, 31(6), pp. 1602-8.
- Yosifov, D. Y., Konstantinov, S. M. and Berger, M. R. (2009) Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium shows substantial cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1171, pp. 350-8.
- Yu, C. C., Hung, S. K., Liao, H. F., Lee, C. C., Lin, H. Y., Lai, H. C., Li, S. C., Ho, H. C., Huang, H. B. and Su, Y. C. (2014) RAD001 enhances the radiosensitivity of SCC4 oral cancer cells by inducing cell cycle arrest at the G2/M checkpoint. *Anticancer Res*, 34(6), pp. 2927-35.
- Zaarur, N., Gabai, V. L., Porco, J. A., Jr., Calderwood, S. and Sherman, M. Y. (2006) Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Res*, 66(3), pp. 1783-91.
- Zagars, G. K., Ballo, M. T., Pisters, P. W., Pollock, R. E., Patel, S. R. and Benjamin, R. S. (2003) Prognostic factors for disease-specific survival after first relapse of soft-tissue sarcoma: analysis of 402 patients with disease relapse after initial conservative surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57(3), pp. 739-47.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W. and Semenza, G. L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the

epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60(6), pp. 1541-5.

Zhong, H., Hanrahan, C., van der Poel, H. and Simons, J. W. (2001) Hypoxia-inducible factor 1alpha and 1beta proteins share common signaling pathways in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(2), pp. 352-6.

Zimmermann, S. and Moelling, K. (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, 286(5445), pp. 1741-4.

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem promovierten Betreuer Dr. Eric Kampmann für die sowohl fachliche als auch emotionale Unterstützung in allen Phasen während der Anfertigung dieser Arbeit sowie für die von ihm initiierte, interessante Fragestellung, die zum Anstoß wurde für die hier vorgelegte wissenschaftliche Arbeit.

Meinem Doktorvater Privatdozent Dr. Lars Lindner, Oberarzt der Medizinischen Klinik III und Leiter der Abteilung für Hyperthermie, danke ich herzlich für die Möglichkeit, als Doktorand an der Ludwigs-Maximilians-Universität München tätig sein zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen ehemaligen Mitgliedern der Klinischen Kooperationsgruppe für Tumorthherapie durch Hyperthermie Anita Gosch, Katja Kierner, Dominique Harnicek, Valentina Sujeva, Sigrid Barth, Daniel Neumann und zuletzt insbesondere Dr. Elwira Strozyk für ihre Hilfe und ihren Rat bei wissenschaftlichen oder technischen Fragestellungen und ihre Unterstützung während der gesamten Arbeit von ganzem Herzen bedanken.

Herrn Professor Dr. Rolf Dieter Issels möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken, die Experimente für meine Arbeit im Labor der Klinischen Kooperationsgruppe für Tumorthherapie durch Hyperthermie anzufertigen.

Anja Zengerle, Kirsten Wachholz und Dr. Martin Hossan von der Arbeitsgruppe „Thermosensitive Liposomen“ gilt des Weiteren mein Dank für die ausführliche technische Beratung und die Bereitstellung von Erufosin und eines Lichtmikroskopes zur Auszählung der angefertigten Koloniebildungstests.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe „Maligne Lymphome“ der Medizinischen Klinik III des Klinikums der Universität München und hier insbesondere bei Dr. Grit Hutter, unter anderem für die Bereitstellung von Temsirolimus.

Auch Herrn Professor Dr. Hansjörg Eibl vom Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, danke ich für die Synthese und die anschließende Bereitstellung des Alkylphosphocholines Erufosin.

Zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie für ihre stetige Unterstützung während meines Studiums, während der Zeit der Doktorarbeit und die Zeit darüber hinaus bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Ismann, Bernhard

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

In vitro-Untersuchungen zur vertikalen AKT-mTOR-Inhibition in Kombination mit Hyperthermie in humanen Sarkomzelllinien

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25, 11.2015

Ort, Datum

UnterschriftDoktorandin/ Doktorand