

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Oliver Muensterer

Rapamycin als neue Therapieoption in der Behandlung von Hochrisiko- Hepatoblastompatienten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bente Jochner
aus Flensburg
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Roland Kappler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander L. Gerbes
Prof. Dr. Tobias Feuchtinger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Ferdinand Wagner

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2023

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatoblastom	1
1.2	Relevante Signalwege für die Entstehung des Hepatoblastoms	3
1.2.1	Hedgehog-Signalweg.....	3
1.2.2	Wnt/ β -catenin-Signalweg	4
1.2.3	PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.....	5
1.3	mTOR-Inhibitoren	7
2	Aufgabenstellung	9
3	Material.....	10
3.1	Zelllinien	10
3.2	Kulturmedien.....	10
3.3	Mausmodell.....	10
3.4	Primer	10
3.5	Antikörper.....	11
3.6	Größenstandard	12
3.7	Enzyme.....	12
3.8	Chemikalien und Reagenzien	13
3.9	Puffer.....	14
3.10	Kits.....	15
3.11	Verbrauchsmaterial	15
3.12	Geräte	16
4	Methoden	19
4.1	Zellkultur	19
4.1.1	Auftauen von Zellen	19
4.1.2	Splitten von adhärennten Zellen.....	19
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	19
4.1.4	Kryokonservierung von Zellen	19
4.2	Proliferationsassay	20
4.3	Immunfluoreszenz.....	20
4.4	Hepatoblastom-Xenograft-Mausmodell.....	21
4.5	Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67-Antigen und CD31	22
4.5.1	Färbung	22
4.5.2	Bestimmung der Proliferationsrate am Lichtmikroskop.....	23
4.5.3	Bestimmung der Vaskularisierungsrate am Lichtmikroskop.....	23
4.6	Proteinisolierung aus Zellen	23
4.7	Proteinisolierung aus Gewebe	23

4.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
4.9	Western blot.....	24
4.10	RNA-Isolierung aus Gewebe.....	25
4.11	cDNA-Synthese	26
4.12	Quantitative Real Time PCR	26
4.13	Statistik.....	27
5	Ergebnisse.....	28
5.1	Wirkung von Rapamycin auf Hepatoblastomzelllinien <i>in vitro</i>	28
5.1.1	Reduktion der Zellvitalität.....	28
5.1.2	Induktion von Apoptose	29
5.1.3	Inhibierung des AKT-Signalwegs.....	30
5.2	Wirkung von Rapamycin auf HUH6-Zellen <i>in vivo</i>	30
5.2.1	Wachstum von subkutanen Tumoren vermindert.....	30
5.2.2	Abnahme der Proliferation	32
5.2.3	Keine Induktion von Apoptose.....	33
5.2.4	Kein Effekt auf Angiogenese	35
5.2.5	Beeinflussung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs.....	37
6	Diskussion.....	40
6.1	Rapamycin: Medikament der Wahl für zukünftige Studien?	40
6.2	Rapamycin als Monotherapie	41
6.3	Biomarker zur Überwachung des Therapieerfolgs mit Rapamycin	42
6.4	Zelltod unter Rapamycin-Therapie.....	43
6.5	Feedback-Aktivierung von AKT durch Rapamycin.....	44
6.6	Anti-angiogenetischer Effekt auf Leberzellen.....	45
7	Zusammenfassung.....	47
8	Literaturverzeichnis	49
9	Abkürzungsverzeichnis.....	57
10	Danksagung	60
11	Eidesstattliche Versicherung	61
12	Publikation	62

1 Einleitung

1.1 Das Hepatoblastom

Lebertumore sind nach Neuroblastomen und Nephroblastomen die dritthäufigsten intraabdominalen bösartigen Neoplasien im Kindesalter (Clatworthy et al., 1974). Das Hepatoblastom ist ein maligner, embryonaler Tumor der Leber, der vor allem im Alter von 6 bis 36 Monaten auftritt (Weinberg and Finegold, 1983). Mit einer Inzidenz von 0,7 pro einer Million Kinder ist das Hepatoblastom der häufigste pädiatrische Lebertumor (von Schweinitz, 2006). Mit einem Anteil von ungefähr 0,3% bis 2,0% der soliden Tumoren im Kindesalter gehört es allerdings zu den selteneren Tumoren (Mann et al., 1990). Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Hepatoblastoms ist bei einigen genetischen Syndromen, wie zum Beispiel dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (DeBaun and Tucker, 1998) und der familiären adenomatösen Polyposis (Kingston et al., 1983), erhöht.

Klinisch präsentiert sich das Hepatoblastom meist als schmerzlose abdominale Raumforderung. Gewichtsverlust, Anorexie, Erbrechen und abdominelle Schmerzen sind Zeichen für eine fortgeschrittene Erkrankung (Perilongo and Shafford, 1999). Bei laborchemischen Untersuchungen finden sich meist erhöhte Werte für Alphafetoprotein (AFP) und humanes Choriongonadotropin (β HCG) (Nakagawara et al., 1985). Außerdem zeigt sich zum Zeitpunkt der Diagnose häufig eine Thrombozytose, die möglicherweise durch erhöhte Produktion von Thrombopoetin im Tumor entsteht (Komura et al., 1998).

Das Hepatoblastom kann in vier histologische Subtypen unterteilt werden: fetal, embryonal, makrotrabekular und undifferenziert (Perilongo and Shafford, 1999). Viele Hepatoblastome enthalten außerdem mesenchymale Strukturen, wie Osteoid und Spindelzellen und können eine extramedulläre Hämatopoese aufweisen (Finegold et al., 2008).

Mit bildgebenden Verfahren, wie Computertomographie, kann das Ausmaß des Tumors mit Hilfe des PRETEXT (Pretreatment extent of disease) Staging-Systems beurteilt werden. Dabei erfolgt, je nachdem wie viele Lebersegmente mit Tumor befallen sind, eine Zuordnung zu den PRETEXT-Gruppen I-IV. Zudem wird mit den Buchstaben M, E, V, P gekennzeichnet, ob Metastasen (M), extrahepatischer Befall (E), oder Beteiligung der Lebervene (V) oder Pfortader (P) vorhanden sind (Roebuck et al., 2007).

Einleitung

Vor Therapiebeginn werden die Patienten entweder der Standardrisiko-Gruppe (SR) oder der Hochrisiko-Gruppe (HR) zugeteilt, wobei die SR-Gruppe die PRETEXT-Gruppen I-III und die HR-Gruppe die PRETEXT-Gruppen I-III mit M, E, V oder P und die PRETEXT-Gruppe IV umfasst (Haberle et al., 2003) (Zsiros et al., 2010). Die Therapiestrategien, die aus einer Kombination von neoadjuvanter Chemotherapie (zum Beispiel Cisplatin, Carboplatin, Ifosfamid), chirurgischer Resektion und Lebertransplantation bestehen, ermöglichen aktuell in der SR-Gruppe eine Heilung von über 90% und in der HR-Gruppe von ungefähr 60% der Patienten (Haberle et al., 2003) (Perilongo et al., 2009) (Zsiros et al., 2010). Trotz verbesserter Chemotherapie ist die chirurgische Resektion des Tumors immer noch ein unentbehrlicher Bestandteil der Therapie des Hepatoblastoms, da es nach mehreren Kursen Chemotherapie häufig zu einer *multi drug resistance* kommt (von Schweinitz et al., 1995) (Warmann et al., 2002). Somit ist es von großer Bedeutung, neue Medikamente für zukünftige Therapiekonzepte zu finden.

Zytogenetische Analysen haben häufig chromosomale Veränderungen in Hepatoblastom-Fällen aufgedeckt, wobei vor allem Trisomien der Chromosomen 2, 8 und 20 häufig gefunden werden (Tomlinson et al., 2005). Häufig finden sich Mutationen im *beta-Catenin*-Gen, die zu einer Aktivierung des Wingless (Wnt)-Signalwegs führen (Koch et al., 1999) (Wei et al., 2000) (Zatkova et al., 2004). Zudem konnte auch eine Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs durch Überexpression von *GLI1* (glioma-associated oncogene homolog 1) und *PTCH1* (Patched) und durch Methylierung der Promotorregion von *HHIP* (hedgehog interacting protein) im Hepatoblastom nachgewiesen werden (Eichenmüller et al., 2009). Des Weiteren findet sich ein Verlust der Heterozygotie und Prägung am *IGF2/H19*-Lokus auf Chromosom 11 (Albrecht et al., 1994) (Rainier et al., 1995) und eine Überexpression von *IGF2* (Hartmann et al., 2000) und dem IGF2-Regulator *PLAG1* (Zatkova, Rouillard 2004). Der IGF-Rezeptor (insulin-like growth factor) wiederum vermittelt, als Rezeptortyrosinkinase, die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, dessen Rolle in der Entstehung des Hepatoblastoms nachgewiesen werden konnte (Hartmann et al., 2009). Durch Inhibierung von definierten Signalwegen bestehen somit vielfältige Möglichkeiten der Wachstumshemmung des Hepatoblastoms, die therapeutisch genutzt werden könnten. Eine dieser Möglichkeiten, die Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs

durch mTOR-Inhibitoren, wie Rapamycin, soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.2 Relevante Signalwege für die Entstehung des Hepatoblastoms

In der Entwicklung neuer Medikamente für die Therapie von malignen Erkrankungen spielt die zielgerichtete Krebstherapie (sog. „targeted therapy“) aktuell eine große Rolle (Zhu and Hezel, 2011). Angriffspunkte dieser Therapie sind Krebs-spezifische Signalwege, die eine Behandlung mit wenigen Nebenwirkungen ermöglichen können (Li and Hall, 2010). Im Folgenden soll auf einige Signalwege, die für die Entstehung des Hepatoblastoms eine bedeutende Rolle spielen, eingegangen werden.

1.2.1 Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog-Signalweg (Abb. 1) spielt in der Embryonalentwicklung von vielen mehrzelligen Organismen eine wichtige Rolle und ist an der Ausbildung einer Vielzahl von Geweben beteiligt (McMahon et al., 2003). Er wurde erstmals in der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) entdeckt (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Dass der Hedgehog-Signalweg für die Entwicklung von Tumoren verantwortlich sein könnte, wurde erstmals vermutet als bei Patienten mit Gorlin-Syndrom, die durch diese Erkrankung häufig unter Basalzellkarzinomen leiden, eine Mutation im *PTCH1*-Gen entdeckt wurde (Hahn et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg auch in der Entstehung des Hepatoblastoms eine Rolle spielt (Eichenmuller et al., 2009).

Namensgebend für diesen Signalweg sind die drei Liganden Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog und Indian Hedgehog. In deren Abwesenheit hemmt der Transmembranrezeptor Patched die Aktivität von Smoothened. Durch Bindung der Liganden wird die Hemmung aufgehoben und Smoothened aktiviert Gli-Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Expression von Genen, die Proliferation, Zellüberleben und Angiogenese betreffen, beeinflussen (Merchant and Matsui, 2010).

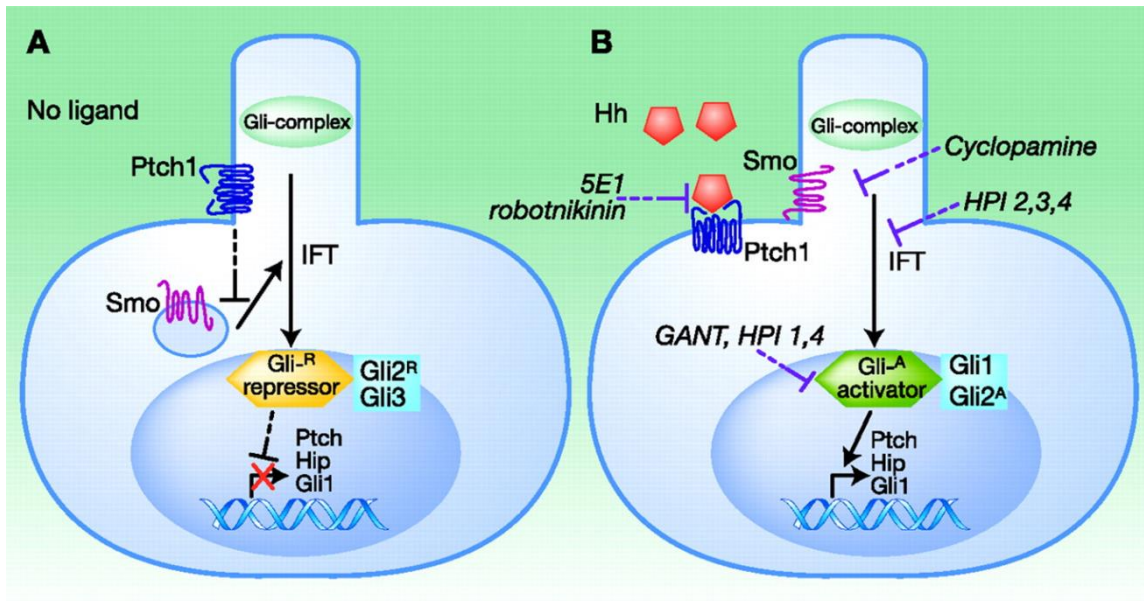


Abb. 1: Schematische Darstellung des Hedgehog-Signalwegs nach (Merchant and Matsui, 2010)

(A) In Abwesenheit von Hedgehog-Liganden hemmt Patched (Ptch1) Smoothed (Smo). (B) Nach Bindung von Hedgehog (Hh)-Liganden an Ptch1 aktiviert Smo Gli-Transkriptionsfaktoren.

1.2.2 Wnt/ β -catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -catenin Signalweg (Abb. 2) spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung, indem er Zellproliferation und Zellüberleben steuert (Logan and Nusse, 2004). Mutationen in diesem Signalweg führen häufig zu Krebs und anderen Erkrankungen (Clevers, 2006). Der Wnt/ β -catenin Signalweg ist auch an der Genese des Hepatoblastoms beteiligt (Koch et al., 1999) (Wei et al., 2000). Ohne Wnt-Signal liegt β -catenin in einem Komplex mit Axin (axis inhibition protein) und *adenomatous polyposis coli* (APC) vor und wird durch die Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) hyperphosphoryliert, wodurch es für den proteasomalen Abbau markiert wird. Durch Bindung von Wnt-Proteinen an den Transmembranrezeptor Frizzled wird das Protein Dishevelled rekrutiert und verhindert durch Bindung von Axin die Phosphorylierung von β -catenin durch GSK3 β . Dadurch entkommt β -catenin dem Abbau durch Proteasomen und kann im Zellkern mit den Proteinen TCF und LEF interagieren und Transkription aktivieren (Polakis, 2000).

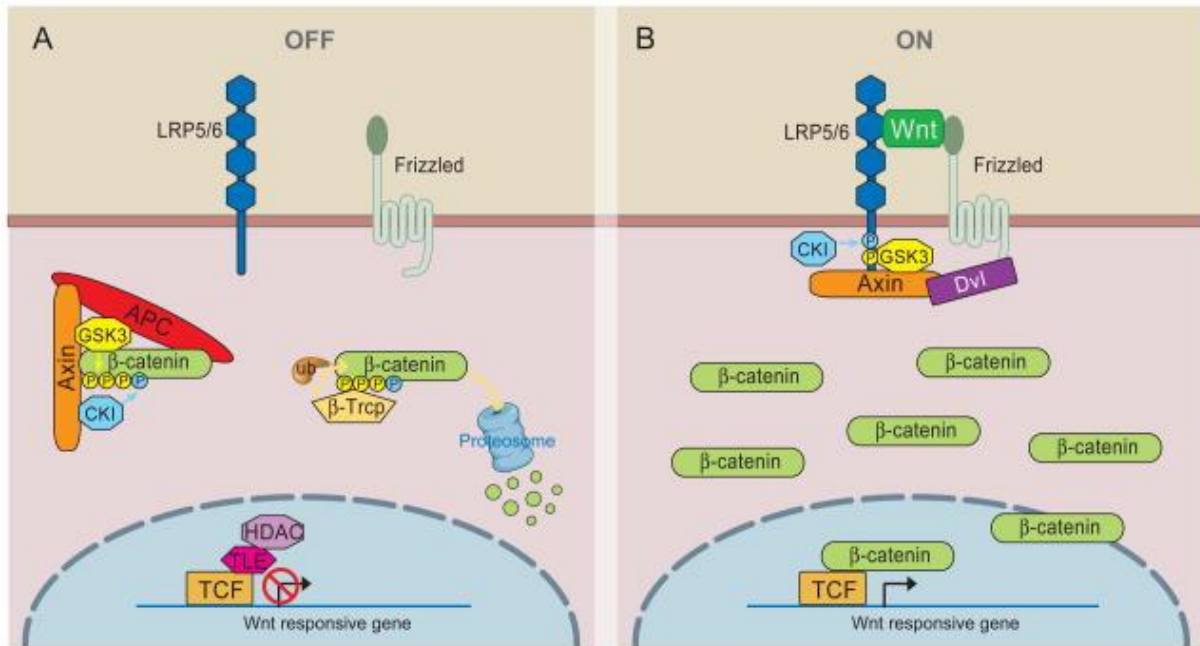


Abb. 2: Schematische Darstellung des Wnt/β-catenin-Signalwegs nach (MacDonald et al., 2009)

(A) Inaktiver Signalweg. β-catenin ist hyperphosphoryliert und im Komplex mit Axin und APC für den proteasomalen Abbau markiert. (B) Aktiver Signalweg. Durch Bindung von Wnt-Proteinen an Frizzled erfolgt die Rekrutierung von Dishevelled (Dvl), das Axin inaktiviert und die Phosphorylierung von β-catenin verhindert. β-catenin kann im Zellkern die Transkription von Zielgenen aktivieren.

1.2.3 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (Abb. 3) ist in einer Reihe von Tumorerkrankungen überaktiviert und spielt auch in der Genese des Hepatoblastoms eine wesentliche Rolle (Vivanco and Sawyers, 2002) (Hartmann et al., 2009).

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) phosphoryliert Phosphatidylinositollipide der Plasmamembran an der D-3-Ring-Position, wodurch Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) gebildet wird (Whitman et al., 1988). Die PI3K besteht aus zwei Untereinheiten, wobei die p85-Untereinheit als Adapter für Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie zum Beispiel Wachstumshormonrezeptoren dient, die p110-Untereinheit hingegen katalytische Aktivität besitzt (Hiles et al., 1992).

Durch Bindung von Liganden, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, an RTK erfolgt die Rekrutierung von PI3K an die Plasmamembran. Die PI3K konvertiert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) zu PIP3. PIP3 ermöglicht nun die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB), durch phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) an Thr308 und Ser473 (Nicholson and Anderson, 2002).

Einleitung

AKT wirkt antiapoptotisch und fördert die Proliferation von Zellen (Franke et al., 1997) (Diehl et al., 1998). Durch Deregulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs durch, z.B. Amplifikation von *AKT* oder p110 oder durch Mutationen im *PTEN* Gen, entstehen eine Vielzahl von Tumoren, zum Beispiel Brustkrebs, Nierenzellkarzinome oder Glioblastome (Vivanco and Sawyers, 2002).

Über den Tuberose-Sklerosekomplex (TSC), der durch Hamartin (TSC1) und Tuberin (TSC2) gebildet wird, aktiviert AKT mTOR, eine Serin/Threonin-Kinase, die vor allem Zellwachstum und Proliferation fördert (Schmelzle and Hall, 2000). Das Protein wurde zuerst als Zielobjekt der Substanz Rapamycin in Hefen entdeckt und erhielt die Bezeichnung TOR (target of rapamycin) (Heitman et al., 1991). Daraufhin wurde mTOR auch in Zellen von Säugetieren (engl. mammals) gefunden (Sabers et al., 1995). Der Komplex TSC1/TSC2 hemmt mTOR. Durch Phosphorylierung von TSC2 durch AKT löst sich der Komplex und die inhibierende Wirkung auf mTOR entfällt (Inoki et al., 2002) (Manning et al., 2002). Dadurch können eine Reihe von zellulären Prozessen, wie Translation, Transkription, Ribosomenbiogenese und Zellmetabolismus in Gang gesetzt werden (Wullschleger et al., 2006). mTOR bildet Komplexe mit zwei verschiedenen Proteinen. Im Komplex mit Rictor (*mTORC2*) beeinflusst mTOR vor allem das Zytoskelett (Sarbasov et al., 2004). mTORC2 spielt aber durch Phosphorylierung von AKT an Ser473 auch eine Rolle in der Regulation von Wachstum, Proliferation, und Tumorangio-genese, da diese Phosphorylierung die maximale Wirkung von AKT bedingt (Sarbasov et al., 2005). Im Komplex mit Raptor (*mTORC1*) reguliert mTOR die p70S6-Kinase und den Translationsinhibitor 4E-BP1 (Hara et al., 2002). Die p70S6-Kinase steigert vor allem die Translation von Teilen des Translationsapparates, wie ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren (Jefferies et al., 1997) (Terada et al., 1994). Hypophosphoryliertes 4E-BP1 bindet und hemmt den Translationsinitiationsfaktor eIF4E. mTOR fördert die Phosphorylierung von 4E-BP1, wodurch die inhibierende Wirkung auf den Translationsinitiationsfaktor wegfällt (Gingras et al., 1998).

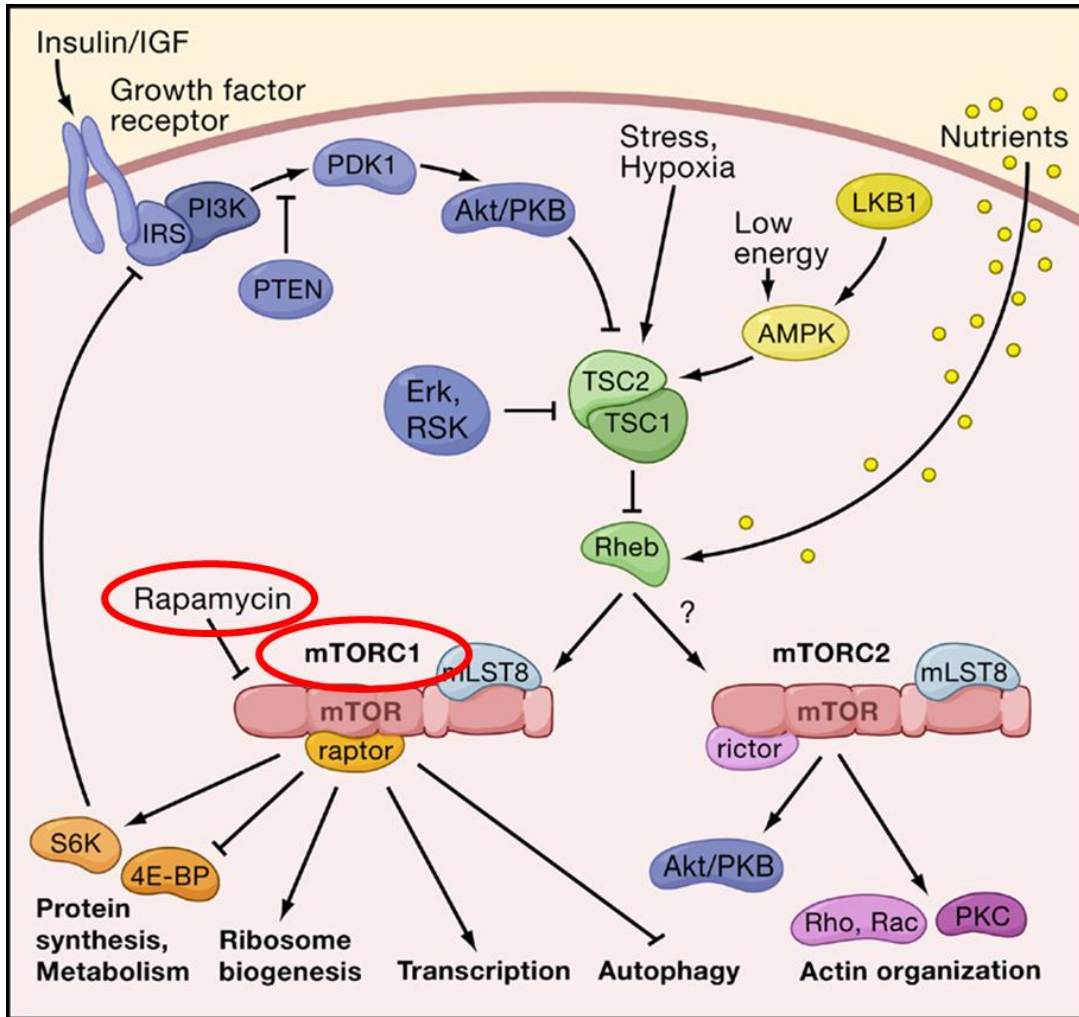


Abb. 3: Schematische Darstellung des mTOR-Signalwegs modifiziert nach (Wullschleger et al., 2006)

Durch Bindung von Liganden an Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität wird PI3K aktiviert. PI3K vermittelt über die Bildung von PIP3 die Phosphorylierung von AKT durch PDK1. AKT beeinflusst eine Reihe von zellulären Prozessen, wie Wachstum, Apoptose und Proliferation und aktiviert über die Phosphorylierung von TSC2 mTOR. mTOR fördert über die Phosphorylierung von p70S6-Kinase (S6K) und den Translationsinhibitor 4E-BP1 ebenfalls Zellwachstum und Proliferation.

1.3 mTOR-Inhibitoren

Der erste bekannte mTOR-Inhibitor war Rapamycin, auch bekannt unter dem Namen Sirolimus, eine Substanz, die 1975 als Produkt von *Streptomyces hygroscopicus* in Bodenproben der Osterinsel (Rapa nui) entdeckt wurde und der zunächst nur antimykotische Eigenschaften zugeschrieben wurden (Sehgal et al., 1975, Vezina et al., 1975). Weitere Untersuchungen zeigten eine immunsuppressive Wirkung (Martel et al., 1977) und einen hemmenden Effekt auf Tumorwachstum (Eng et al., 1984). Zur Klasse der mTOR-Inhibitoren zählen ebenfalls die Derivate von Rapamycin, Temsirolimus und Everolimus, die sich vor allem durch ihre unterschiedliche

Löslichkeit in Wasser unterscheiden (Le Tourneau et al., 2008).

Seine immunsuppressive Wirkung entfaltet Rapamycin durch Hemmung der Aktivität von B- und T-Zellen und der Wirkung von Interleukin-2 (Hardinger et al., 2004) (Sehgal, 2003) (Vasquez, 2000). Es wurde schon Ende der 1990er Jahre erfolgreich in Kombination mit anderen immunsuppressiven Medikamenten, wie Cyclosporin A, nach Nierentransplantationen verabreicht (Kahan et al., 1999).

Eine Komplikation der immunsuppressiven Therapie nach Transplantationen ist das Auftreten bösartiger Erkrankungen (Buell et al., 2005) (Kapoor, 2008). Nach Einführung von Rapamycin in das immunsuppressive Therapieschema zeigte sich eine niedrigere Inzidenz von Malignitäten, sowie eine Remission von Kaposi-Sarkomen (Mathew et al., 2004) (Kahan et al., 2005) (Stallone et al., 2005). Rapamycin hemmt den Komplex mTOR/Raptor (mTORC1) und damit die Aktivierung der p70S6-Kinase und Inaktivierung des Translationsinhibitors 4E-BP1 (Hara et al., 2002). In vielen Tumorentitäten ist dieser Signalweg vermehrt aktiviert. Guba, von Breitenbuch et al. konnten erstmals nachweisen, dass Rapamycin das Tumorwachstum hemmen kann. Dies wurde insbesondere auf eine Hemmung der Tumorangiogenese zurückgeführt (Guba et al., 2002). Rapamycin bietet sich somit, zusätzlich zu seiner immunsuppressiven Wirkung, auch als Medikament in der Therapie von malignen Erkrankungen an (Rao et al., 2004) (Wullschlegler et al., 2006). Derzeit werden Rapamycin und seine Derivate (sog. „Rapaloga“) in Studien in ihrer Wirkung auf maligne Erkrankungen wie z.B. Glioblastom, Mammakarzinom und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) untersucht (Chan et al., 2005) (Galanis et al., 2005) (Rizell et al., 2008) (Schnitzbauer et al., 2010). Für die Therapie des Nierenzellkarzinoms besteht bereits eine Zulassung (Motzer et al., 2008).

2 Aufgabenstellung

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist im Hepatoblastom vermehrt aktiviert und trägt dadurch zur Tumorentstehung bei. Rapamycin ist ein Vertreter der Klasse der mTOR-Inhibitoren und blockiert durch seine Wirkung diesen Signalweg. In dieser Arbeit soll in einem präklinischen Rahmen untersucht werden, ob Rapamycin einen hemmenden Effekt auf das Wachstum des Hepatoblastoms zeigt, um so eine neue Therapiestrategie in der Behandlung von Hochrisiko-Hepatoblastom zu finden.

Hier sollen zunächst Hepatoblastom-Zelllinien *in vitro* mit Rapamycin behandelt werden und der Effekt auf die Vitalität und Apoptoserate der Zellen beurteilt werden. Zudem soll untersucht werden, ob der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg in den Tumorzellen deaktiviert werden kann.

Im Anschluss sollen immundefiziente Mäuse, die mittels subkutaner Injektion einen Tumor aus Hepatoblastomzellen tragen, ebenfalls mit Rapamycin behandelt werden. In diesem *in vivo* Experiment soll der Effekt von Rapamycin auf Tumorwachstum, Zellproliferation, Apoptoserate und Inhibierung des Signalwegs in den Tumorzellen untersucht werden. Zudem soll untersucht werden, ob Rapamycin einen anti-angiogenetischen Effekt zeigt.

3 Material

3.1 Zelllinien

Es wurden drei humane Hepatoblastomzelllinien verwendet.

HUH6	Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan
HepT1	Pietsch et al. 1996 (Pietsch et al., 1996)
HepG2	ATCC, Manassas, VA, USA

3.2 Kulturmedien

RPMI 1640 Medium (1x), liquid with GlutaMAX™ Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Das RPMI Medium wurde für die Kultivierung der drei Hepatoblastomzelllinien verwendet und mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) (Invitrogen, Karlsruhe) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

Einfriermedium, bestehend aus	50 ml FBS
	40 ml DMEM
	12,5 ml DMSO

Das Einfriermedium wurde zur Kryokonservierung der Zelllinien verwendet.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1x), liquid (High Glucose) – with GlutaMAX™ I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.3 Mausmodell

Nu/nu Balb/c Mäuse	Charles River, Sulzfeld
Nacktmausfutter, steril	SSNIFF, Soest
Rapamune oral solution (1mg/ml)	Wyeth Europe Ltd., Berkshire, UK

3.4 Primer

Material

Die Primer wurden mit Hilfe von *PRIMER-EXPRESS 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) designt und von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Tabelle 1 Primer

Name	Sequenz forward 5`-3`	Sequenz reverse 5`-3`	Lok
AFP	GAAACATTACCTTCCATGCAG	GCAGCATTCTGTTATTTTGTGGAC	Ex 7/8
ALB	CCTAGGAAAAGTGGGCAGCA	CTGGTTCAGGACCACGGATAG	Ex 12/13
BAX	CGGGTTGTCGCCCTTTT	AGCCCATGATGGTTCTGATCA	Ex 3/4
BCL2	CGCCCTGTGGATGACTGAGTAC	CAAACAGAGGCCGCATGCT	Ex 2/3
FGF2	GACCTCACATAAGCTACAACCTTC	AGACACAACCTCTCTCTCTCTGCT	Ex 1/2
HIF1 α	CTTTAACTTTGCTGGCCCCA	TCAAGTTGCTGGTCATCAGTTTCT	Ex 9/10
IGF2	CCTCCGACCGTGCTTCC	GGTGGACTGCTTCCAGGTGT	Ex 3/4
KRT19	AAGGAAGAGCTGGCCTACCTG	CCACCTCCACACTGACCTGG	Ex 3/4
VEGF	TGACGAGGGCCTGGAGTG	TCCTATGTGCTGGCCTTGGT	Ex 3/4

Die Primer wurden nach Herstellerangaben mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Schmelztemperaturen liegen zwischen 55°C-64°C. Die Ampliconlänge liegt bei mindestens 90 Basenpaaren.

3.5 Antikörper

Die monoklonalen Primärantikörper für den Western blot wurden von Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) bezogen, außer HIF1- α von Novus Biologicals (Littleton, CO, USA). Es handelt sich bei allen, um aus Hasen gewonnene Antikörper.

Tabelle 2 Monoklonale Antikörper für Western blot

Name	Größe in kDa	Verdünnung	Verdünnungsmedium
β -Actin	45	1:2000	5% BSA
PARP	89	1:1000	5% Milchpulver
p-p70S6-Kinase (Ser371)	70	1:1000	5% BSA
p70S6-Kinase	70	1:1000	5% BSA
p-p4EBP-1 (Ser65)	15-20	1:1000	5% BSA
4EBP-1	15-20	1:1000	5% BSA
p-AKT (Ser473)	60	1:500	5% BSA
AKT	60	1:1000	5% BSA
HIF1-alpha	92	1:1000	5% Milchpulver

Material

SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Biorad, München
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

3.8 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	SAV LP, Flintsbach
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Natriumsalz	Merk, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
ChemMate™ Antibody Diluent	DakoCytomation, Hamburg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x), without CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetracyanat (EDTA), 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Eosin Y-Lösung, alkalisch, 0,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Isofluran (99,9 % (w/w))	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS SDS Laufpuffer	Novex, Carlsbad, CA, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
O ₂ Oxeane Supra Light	Linde AG, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Peroxidase Block	DakoCytomation, Hamburg
Random-Hexamere	Roche Diagnostics, Mannheim

Material

Rapamycin	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sodiumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
TRI Reagent® RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
UltraPure™ DNase/RNase- Free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium with DAPI	VectorLaboratories, Burlingame, CA, USA
X-Ray Entwicklerlösung Roentoroll 25	Tetental AG, Schützenwall
X-Ray Fixierungslösung Superfix 25	Tetental AG, Schützenwall
Xylol	Roth, Karlsruhe

3.9 Puffer

Blockierungspuffer	0,10% Tween 20 in PBS 5% Magermilchpulver
Lysepuffer für Zellen	0,50% Triton X-100 1 mM Sodiumorthovanadat in PBS
Lysepuffer für Gewebe	0,2 M KCl 0,03 M TRIS pH 7,25 1 x Proteaseinhibitortablette pro 10 ml dH ₂ O (complete mini, Roche Diagnostics, Mannheim)
5xSDS-Probenpuffer	2% SDS 5% β-Mercaptoethanol 10% Glycerin

Material

Stripping Buffer	1 mM EDTA 0,01% Bromphenolblau pH 6,8 0,2 M Glycin 1% SDS pH 2,0
Transferpuffer	48 mM TRIS 39 mM Glycin
TRIS-Waschpuffer	7,5 mM TRIS 44 mM TRIS-Hydrochlorid 0,15 mM Natriumchlorid
Waschpuffer WB (PBST)	0,1 % Tween in PBST

3.10 Kits

BIO-RAD Protein Assay	Biorad, München
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako REAL TM EnVision TM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Buckinghamshire, UK
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

3.11 Verbrauchsmaterial

BD Falcon TM Round-Bottom Tubes	BD, Heidelberg
Biosphere [®] Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Costar [®] Stripette [®] Serological Pipets	Corning GmbH, Wiesbaden
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
EasyFlasks TM Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG,

Material

Histowax	Langenselbold
Hybond-C extra Nitrocellulosemembran	Leica, Nussloch
Hyperfilm™ MP	Amersham, Buckinghamshire, UK
Kanülen (20 G, 24 G, 26 G, 30 G)	Amersham, Buckinghamshire, UK
Lab-Tek II Chamber Slide	BD, Heidelberg
Multidishes Nunclon™	NUNC, Langenselbold
Nalgene® Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel	Schubert & Weiss GmbH, München
Objektträger	Invitrogen, Karlsruhe
Quarzküvette QS 10 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
PP-Schraubverschluss Röhrchen	Hellma, Mühlheim
Safe-Lock Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzen (1 ml, 10 ml, 50 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Standard 96 Well PCR Plates	BD, Heidelberg
Zellschaber	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.12 Geräte

Absaugsystem EcoVac	Schütt Labortechnik, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Centrifuge LMC-3000	Kisker-Biotech, Steinfurt

Material

CO2-Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Entwicklermaschine CP1000	AGFA, Köln
Feinwaage Te1245	Sartorius AG, Göttingen
GENios Microplatereader	Tecan Crailsheim
Homogenisator Miccra	ART Labortechnik, Mühlheim
Isofluranvapor vet. med.	Drägerwerk AG, Lübeck
Kamera PowerShot G6	Canon, Krefeld
Kryotom	Leica, Solms
Luftstromschrank UNI Protect IP20	Ehret, Emmerdingen
Magnetrührer MR 3001	Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop IX50	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Mikrotom Leica SM 2000R	Leica, Solms
Paraffinmaschine Leica EG 1120	Leica, Solms
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Accu-Jet	Brand, Wertheim
pH-Meter inoLab pH720	WTW-Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
PowerPac Basic™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schieblehre	Black&Decker, Towson, MD, USA
Schüttler Rock-N-Roller G.	Kisker, Steinfurt
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Stickstofftank ARPEGE 140 / 170	Air Liquide, Kirchen
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments Inc., Neu- Isenburg

Material

Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage Vic-1501	Acculab, Edgewood, NY, USA
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Invitrogen, Karlsruhe

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen der Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 wurden aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium, das auf 37°C vorgewärmt war, überführt. Das Kulturmedium wurde mit 10% FCS und 1% Antibiotika versetzt. In der Zentrifuge wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1200 rpm pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das in 5 ml Zellmedium resuspendierte Zellpellet in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht kultiviert. Um abgestorbenen Zellen zu entfernen, wurde das Medium am darauffolgenden Tag gewechselt.

4.1.2 Splitten von adhärennten Zellen

Die Zellen wurden ab einer Konfluenz von 90 bis 100% in neue Zellkulturgefäße überführt. Nach Entfernen des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 500 µl Trypsin hinzugefügt und es folgte eine Inkubation bei 37°C für 3 bis 5 Minuten. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml Kulturmedium gestoppt. In der Zentrifuge wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1200 rpm pelletiert und anschließend in neuem Medium resuspendiert. Je nach Bedarf wurde die Zellsuspension nun auf Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium aufgeteilt.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Gesamtzellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden die Zellen, wie beim Passagieren (siehe 3.1.2), vereinzelt und 10 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Glaspipette in eine Zählkammer gegeben. In der Zählkammer wurden 2 Quadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Durch Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ erhielt man die Zellzahl pro Milliliter. Dadurch ließ sich die Gesamtzellzahl mit dem Volumen der Zellsuspension errechnen.

4.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zunächst wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe von Trypsin gelöst (siehe 4.1.2) und anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei -80

°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2 Proliferationsassay

Mit dem Proliferationsassay wurde analysiert, wie viele Zellen nach einer Behandlung mit Rapamycin vital sind. Die Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (gelb) zu Formazan (violett) wurde mit Hilfe des Cell Proliferation Kit untersucht, wobei eine starke Umsetzung zu Formazan für eine hohe Viabilität der Zellen spricht. Zunächst erfolgte die Aussaat der Zellen der drei Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/well in eine 96-well-Platte. Zur Anhaftung am Boden der Platte wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Es folgte eine Behandlung der Zellen mit 0 nM (als Kontrollgruppe), 0,1 nM, 1 nM, 10 nM oder 100 nM Rapamycin für 48 Stunden. Im Anschluss wurden die Zellen nach Zugabe von 10 µl MTT Labeling Reagent bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 4 Stunden wurde die Reaktion mit 100 µl Solubilization Solution gestoppt. Die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm erfolgte 24 Stunden später mit dem GENios Microplatereader. Der Versuchsaufbau wurde in 3 unabhängigen Versuchsreihen wiederholt.

4.3 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz wurde in den Hepatoblastomzelllinien cleaved Caspase 3 nachgewiesen. Nach Aussaat der Zellen auf Lab-Tek II Chamber Slides mit einer Dichte von $1,5 \times 10^7$ wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um eine Anhaftung der Zellen zu ermöglichen. Die Hepatoblastomzelllinien wurden anschließend 48 Stunden mit 100 nM Rapamycin behandelt. Zur Kontrolle wurden zudem unbehandelte Zellen auf Chamber Slides kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 100 µl 4%-igem Paraformaldehyd auf den Objektträgern fixiert. Die Zellen wurden nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 0,1%-igem Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Nach Waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1% FCS und 0,05 % Tween 20 in PBS blockiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit dem polyklonalen cleaved Caspase 3 Antikörper in PBS mit 0,1%

Tween 20 bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal gewaschen und es folgte die 30-minütige Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS und 0,1% Tween 20 im Dunkeln bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach abermaligem Waschen wurden die Zellen mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI eingedeckelt. Cleaved Caspase 3 positive Zellen wurden mit 200-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 in 3 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern mit mindestens 250 Zellen ausgezählt. Der Versuchsaufbau wurde in 3 unabhängigen Versuchsreihen wiederholt.

4.4 Hepatoblastom-Xenograft-Mausmodell

Für den tierexperimentellen Teil wurden immunkompromittierte, weibliche, 5 bis 6 Wochen alte nu/nu Balb/c Mäuse bei 24°C unter sterilen Bedingungen in einem HEPA-gefilterten UNI Protect Luftstromschrank und unter Einhaltung der Tierschutzverordnungen gehalten. Eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung der Regierung Oberbayern lag vor (Az. 55.2-1-54-2531-68-10). Vor Beginn der Studie wurden die Tiere eine Woche zur Akklimatisation gehalten. Die Mäuse erhielten im Verlauf des Experiments Wasser und Futter ad libitum.

Die Mäuse wurden für das Hepatoblastom-Xenograft-Modell mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisches (0,8 - 2 %) narkotisiert und 2×10^7 HUH6-Zellen in 200 μ l PBS wurden subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die Mäuse wurden täglich gewogen, der Vitalstatus beurteilt und das Wachstum des Tumors kontrolliert. Die Tumorgroße wurde mit der Formel $mm^3 = a \times b \times c \times \frac{2}{3} \times \pi$ berechnet. Sobald die Tumore ein Volumen von 100 mm^3 erreicht hatten, wurden die Mäuse randomisiert und auf zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe wurde täglich über eine Sonde mit *Rapamune oral solution 1mg/ml, Wyeth* (5mg/kg Körpergewicht) und die andere, als Kontrollgruppe, mit 100 μ l sterilem Wasser behandelt. Das Tumolvolumen wurde jeden Tag mit einer Schieblehre ausgemessen und berechnet. Nach 21 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und Blut entnommen. Anschließend wurde der Tumor präpariert, ausgemessen und gewogen. Für weitere Untersuchungen wurde die Hälfte des Tumors in 4% Formalin fixiert und die andere Hälfte in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Das Blut wurde zur Bestimmung des Serum-AFP an das Institut für Laboratoriumsmedizin der LMU München versendet.

4.5 Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67-Antigen und CD31

Ki-67-Antigen ist ein nukleäres Protein, das während allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G₁-, G₂-, S- und M-Phase) exprimiert wird, nicht jedoch in der G₀-Phase oder in ruhenden Zellen. Der Nachweis von Ki-67-Antigen gibt somit einen Hinweis auf die Höhe der Proliferationsraten im Tumorgewebe.

CD31, auch bekannt als PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), ist ein Membranprotein, das auf der Oberfläche von Endothelzellen vorkommt. Mit Hilfe von CD31 soll die Vaskularisierungsrate im Tumor nachgewiesen werden.

4.5.1 Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen mit monoklonalen Ki-67- und CD31-Antikörpern erfolgten nach der indirekten Methode mit einem Primärantikörper und einem Sekundärantikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Die Immunhistochemie wurde an Gefrierschnitten durchgeführt. Dafür wurden mit einem Kryotom 5 bis 6 µm dünne Schnitte der Tumore hergestellt und mit Objektträgern aufgefangen. Die Gewebeschnitte wurden bei -80°C gelagert.

Für die Färbung wurden die Schnitte 5 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton fixiert. Die Objektträger wurden so lange bei Raumtemperatur getrocknet bis das Aceton verflogen war. Die Schnitte wurden nun 10 Minuten mit dualen endogenen Enzymblock inkubiert, um die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer für jeweils 5 Minuten, wurde zur Blockierung von unspezifischen Proteinbindungen eine Inkubation mit 5% Ziegen-Serum für 30 Minuten durchgeführt. Inzwischen wurde der Primärantikörper in Antikörper-Diluent verdünnt. Nach erneutem Waschen mit Tris-Puffer wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gesetzt und über Nacht bei 4°C mit 100 µl Antikörperlösung pro Schnitt inkubiert.

Die Objektträger wurden nun 3 Mal für 5 Minuten mit Tris-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Für die Detektion wurde auf die Schnitte, nach erneutem Waschen, je 100 µl einer Verdünnung aus DAB und Chromogen (1:100) pipettiert. Das DAB dient der Meerrettichperoxidase als Substrat. Dadurch freiwerdende Protonen oxidieren das Chromogen zu einem braunen Endprodukt. Die Zellkerne wurden anschließend mit Hämalaun gefärbt und die Objektträger mit Glycergel

Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckt.

4.5.2 Bestimmung der Proliferationsrate am Lichtmikroskop

Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurden für jeden Ki-67-Antigen-gefärbten Schnitt zehn Gesichtsfelder im Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung zufällig ausgewählt und die Ki-67 positiven Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl gezählt. Daraus wurde der Prozentsatz der positiven Zellen errechnet.

4.5.3 Bestimmung der Vaskularisierungsrate am Lichtmikroskop

Um die Vaskularisierungsrate im Tumorgewebe zu ermitteln, wurde zum einen die mikrovaskuläre Dichte (MVD), zum anderen der Prozentsatz des vaskularisierten Areals (PVA) der CD31-gefärbten Schnitte bestimmt. Die digitalisierten Bilder wurden anonymisiert und verblindet ausgewertet.

Für die MVD wurde in mindestens 3 zufällig ausgewählten Gesichtsfelder, mit einer 100- und 200-fachen Vergrößerung, mit Hilfe von Image J 1.42 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) die Länge der CD31-positiven Gefäße gemessen und die mittlere MVD berechnet. Dabei wurden nekrotische Anteile nicht vermessen und deren Fläche anteilig abgezogen.

Die PVA wurde durch das Messen der Fläche, die durch Gefäße eingenommen wird, in Bezug auf die Gesamtfläche des Tumorgewebeschnitts bestimmt.

4.6 Proteinisolierung aus Zellen

Um Protein aus Zellen zu isolieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen nach Waschen mit PBS mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden wieder für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 40-100 µl Lysepuffer für Zellen resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz bei 13000 rpm und 4°C für 10 Minuten in der Zentrifuge pelletiert. Das Pellet aus Zellresten wurde nun verworfen und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Gefäß überführt.

4.7 Proteinisolierung aus Gewebe

Die Proteinisolierung wurde an kryokonserviertem Tumorgewebe durchgeführt. Kleine Stücke der Gewebe (ca. 5 mm³) wurden mit 1 ml Lysepuffer für Gewebe mit dem Homogenisator Micra homogenisiert. Nach einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis wurden die Lysate für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäße pipettiert und das Pellet aus Zellresten verworfen.

4.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 1 µl Lysat und 9 µl PBS in eine Vertiefung einer klaren 96-well-Platte pipettiert. Im Anschluss wurden je 200 µl steril filtriertes BIO-RAD Protein Assay Konzentrat, das mit Aqua dest. 1:5 verdünnt worden war, zugegeben und die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem GENios Microplatereader erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm. Auf dieselbe Weise wurde die Absorption einer BSA-Eichreihe, für die die Proteinkonzentration bekannt ist, gemessen. Daraus wurde eine Standardkurve $y = mx + t$ errechnet. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mit der Formel $\frac{\text{Mittelwert OD595}-t}{m} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ errechnet.

4.9 Western blot

Die Größenauftrennung der Proteine für den Western blot erfolgte mittels SDS-PAGE. Dafür wurde 25 µg Protein mit 5x Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 99°C inkubiert und für 10 Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert. Die Proben und ein Größenstandard wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden in MOPS-Puffer bei einer konstanten Spannung von 200 V und 110 mA für 50-60 Minuten aufgetrennt.

Die Proteine wurden in einem Wet-Blot-System mit 1x Transferpuffer bei einer konstanten Spannung von 25 V und 100 mA für 90 Minuten von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

Die Protein-besetzte Membran wurde für mindestens 2 Stunden in einer Lösung aus 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran in PBS mit 0,1% Tween 20 (PBST) gewaschen. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C unter konstantem, leichtem Schütteln in einer Antikörperlösung (aus PARP, p-p70S6-

Kinase, p70S6-Kinase, p-4EBP-1, 4EBP-1, p-AKT, AKT oder HIF1- α) inkubiert. Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurde zusätzlich β -Aktin bestimmt.

Nachdem die Membran 3 Mal für 10 Minuten in PBST gewaschen wurde, um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde sie für 1 Stunde unter leichtem Schütteln mit Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Membran abermals 3 Mal für 10 Minuten gewaschen.

Als Detektionslösung wurde ECL Plus Western Blotting Detection Reagent verwendet. Es wurde 1 ml Solution A mit 25 μ l Solution B gemischt und auf die Membran pipettiert. Anschließend folgte eine zweiminütige Inkubation der Membran bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte über HRP-vermittelte Chemolumineszenz mit Hilfe einer Entwicklermaschine.

Für die Auswertung wurde die optische Dichte der Banden mit dem Programm PCBAS Version 2.09g bestimmt und der relative Proteingehalt im Vergleich zu β -Aktin berechnet.

4.10 RNA-Isolierung aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA aus Gewebe wurde kryokonserviertes Tumorgewebe verwendet. Kleine Gewebestücke (ca. 5 mm³) wurden zunächst mit Tri Reagent homogenisiert. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 400 μ l Chloroform pro Ansatz zugegeben. Der Ansatz wurde nun 15 Sekunden mit dem Vortexmischer gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Lysate 15 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere klare Phase mit der RNA wurde in ein neues Tube pipettiert. Um die RNA auszufällen, wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben und durch vorsichtiges hin- und her Kippen gemischt. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12000 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde dem Pellet aus RNA 1 ml gekühltes 70%iges Ethanol hinzugefügt. Mit Hilfe des Vortexmischers wurde der Ansatz erneut kurz gemischt. Der Überstand wurde nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 7500 rpm und 4°C erneut verworfen und das RNA-Pellet für 10 bis 15 Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde nun bei 55°C in 100 μ l Aqua dest. für 15 Minuten gelöst.

Die RNA wurde mit RNeasy Mini Kit von Zellen und Gewebe gereinigt und verbliebene DNA-Verunreinigungen mit RNase-Free DNase Set entfernt. Die in Aqua dest. gelöste RNA wurde hierfür zunächst mit 350 µl RLT-Puffer, der im Verhältnis 1:10 mit β-Mercaptoethanol versetzt war, gemischt. Anschließend wurde 250 µl 100%-igem Ethanol zugegeben. Zur Bindung der RNA an eine Silicagel-Membran wurde dieser Ansatz in eine RNeasy Mini Spin Column pipettiert und bei 8000 rpm für 15 Sekunden in die Zentrifuge gegeben. Nach Hinzufügen von 350 µl RW1-Puffer wurde abermals für 15 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert. Für den DNase Verdau wurde eine Mischung aus 10 µl DNase I Stocklösung und 70 µl RDD Puffer direkt auf die Silicagel-Membran pipettiert. Nach Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde 350 µl RW1-Puffer hinzugefügt und es folgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 rpm. Dem Ansatz wurden 500 µl RPE-Puffer zugegeben und es wurde erneut für 15 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach nochmaligem Hinzufügen von 500 µl RPE-Puffer wurde der Ansatz zunächst für 2 Minuten bei 8000 rpm, dann für 1 Minute bei 12000 rpm zentrifugiert. Um die RNA wieder von der Silicagel-Membran zu lösen wurde zweimal 30 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben. Nach jeweils 1 Minute, in der sich die RNA lösen sollte, wurde der Ansatz für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Bio-Photometer. Die DNase-freie RNA wurde im Anschluss bei -80°C gelagert.

4.11 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden jeweils 2 µg DNase-verdaute und gereinigte RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 7 µl aufgefüllt und nach Hinzufügen von 5 µl Random Hexamere (20 ng/µl) erfolgte für 10 Minuten eine Inkubation bei 70°C. Dem Ansatz wurden daraufhin 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach einer Inkubation für 2 Minuten bei 42°C wurde dem Ansatz 1 µl SuperScriptII hinzugefügt und es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 42°C. Der Ansatz wurde nun 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl RNase H für den RNase-Verdau erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten bei 37°C. Die entstandene cDNA wurde auf 100 µl mit RNase/DNase-freien Wasser aufgefüllt.

4.12 Quantitative Real Time PCR

Methoden

Für Expressionsanalysen wurde eine quantitative real time PCR (qPCR) durchgeführt. Dafür wurden 2 µl cDNA (20 ng/µl) in einer Vertiefung einer 96-well Platte vorgelegt und 10 µl 2x iTaq SYBR Green Supermix with ROX, 1 µl Primer forward (10 mM), 1 µl Primer reverse (10 mM) und 6 µl Aqua dest. hinzugefügt. Für jede Probe wurden zwei Ansätze und das Haushaltsgen TATA-Box-Binding Protein (*TBP*) für die anschließende Normierung bestimmt. Die qPCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

qPCR-Programm:	Initiale Denaturierung	2 Min. bei 95 °C
	40 Zyklen:	
	Denaturierung	15 Sek. bei 95 °C
	Hybridisierung	15 Sek. bei 55 °C
	Elongation	20 Sek. bei 68 °C
	Schmelzkurve	15 Sek. bei 60 °C
		20 Min. bei 55 °C – 95 °C
		15 Sek. bei 95 °C
	Hold	4° C

Mit Hilfe der Schmelzkurve wurde die Spezifität der Primerbindung analysiert. Die relative Expression bezogen auf *TBP* wurde nach Pfaffl *et al.* 2001 (Pfaffl, 2001) mit der Formel $relative\ Expression = 2^{-(Ct\ zu\ untersuchendes\ Gen - Ct\ TBP)}$ berechnet.

4.13 Statistik

In vitro Versuche wurden (soweit nicht anders bezeichnet) in 3 unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe von SPSS Statistics (IBM Corporation, Somers, NY, USA) mit dem Standard t-test und Mann-Whitney-U-Test berechnet. Die Daten wurden als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ blieb.

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung von Rapamycin auf Hepatoblastomzelllinien *in vitro*

Die Auswirkung von Rapamycin auf Hepatoblastomzellen wurde an den Zelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 getestet.

5.1.1 Reduktion der Zellvitalität

Zunächst wurde untersucht, ob Rapamycin einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat. Dafür wurden die HUH6-, HepT1- und HepG2-Zellen für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rapamycin, von 0 nM bis 100 nM, behandelt. Anschließend wurde ein MTT-Proliferationsassay durchgeführt. In den 3 Zelllinien zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellvitalität, wobei die stärkste Wirkung in HUH6-Zellen bei einer Konzentration von 100 nM erreicht wurde (Abb. 4). Die Zellvitalität konnte in HUH6-Zellen auf $47\% \pm 16,7$, in HepT1-Zellen auf $64\% \pm 4,0$ und in HepG2-Zellen auf $62,1\% \pm 7,7$ gegenüber unbehandelten Zellen gesenkt werden.

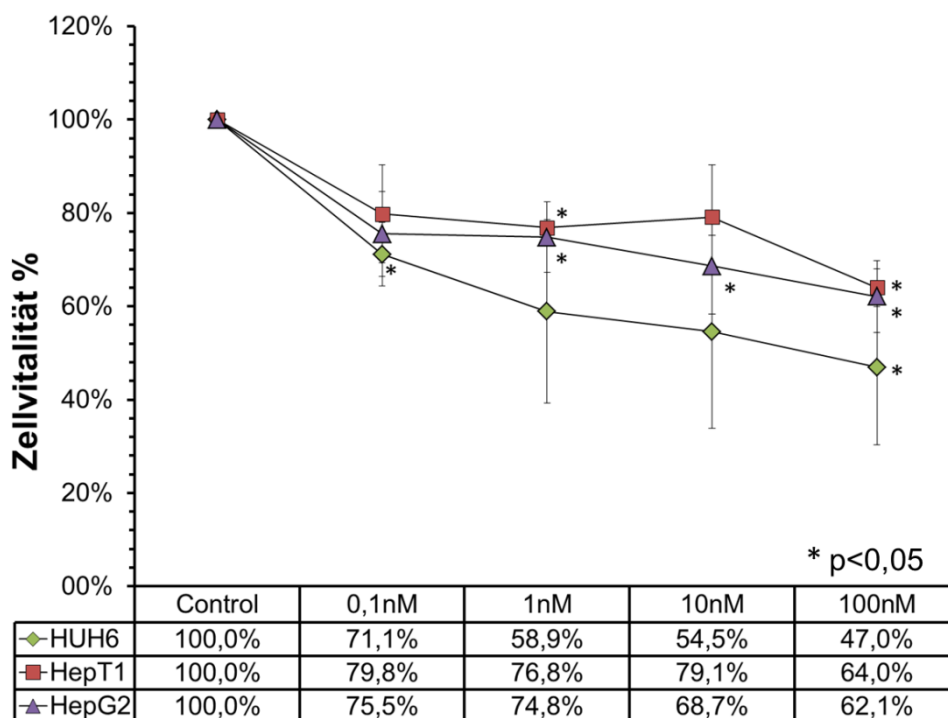


Abb. 4: Reduktion der Zellvitalität in Hepatoblastomzellen durch Rapamycin

HUH6-, HepT1-, und HepG2-Zellen wurden für 48 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von Rapamycin, von 0 nM bis 100 nM, inkubiert. Anschließend wurde ein MTT-Assay durchgeführt, um die Zellvitalität zu bestimmen. Die Untersuchung wurde in drei unabhängigen Versuchen wiederholt und ist als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. * stellt einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe dar ($p < 0,05$).

5.1.2 Induktion von Apoptose

Da Rapamycin einen Einfluss auf die Vitalität der Hepatoblastomzelllinien hat, wollte in einem nächsten Schritt herausgefunden werden, ob diese Wirkung durch die Induktion von Apoptose hervorgerufen wird. Hierzu wurden die Zellen mit einem cleaved Caspase 3-Antikörper mit Hilfe von Immunfluoreszenz angefärbt. Caspase 3 ist eine Protease, die im Rahmen des programmierten Zelltodes durch Spaltung aktiviert wird, weshalb die gespaltene (engl. cleaved) Form ein Marker für die Apoptoserate von Zellen ist. Die Färbung der Zellen erfolgte nach einer Inkubation von 48 Stunden mit 100 nM Rapamycin. In den Kontrollpräparaten mit Zellen, die keine Rapamycin-Behandlung erhielten, zeigte sich generell eine niedrige Apoptoserate in allen 3 Zelllinien, mit 1,63 % \pm 0,42 apoptotische Zellen in HUH6, 1,55% \pm 0,54 in HepG1 und 0,99 % \pm 0,49 in HepG2. Die Behandlung mit Rapamycin führte zu einer Induktion der Apoptose, vor allem in HUH6 (4,76% \pm 1,27)- und HepT1-Zellen (6,09 % \pm 2,18) (Abb. 5), die allerdings nicht signifikant ist. Die Zelllinie HepG2 zeigte hingegen nur 2,51 % \pm 1,95 apoptotische Zellen.

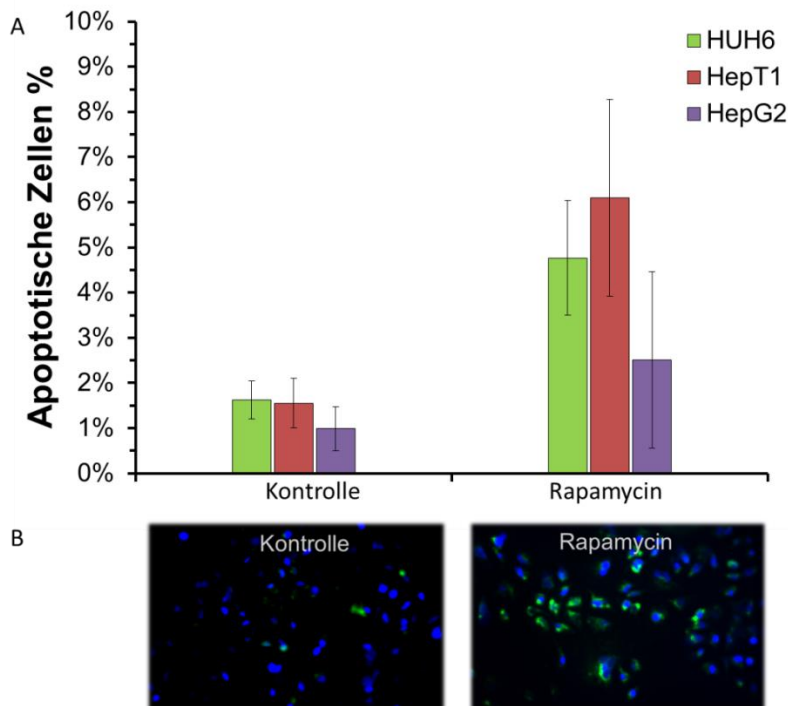


Abb. 5: Induktion von Apoptose in Hepatoblastomzellen durch Rapamycin

(A) HUH6-, HepT1-, und HepG2-Zellen wurden für 48 Stunden mit 100 nM Rapamycin inkubiert und anschließend mittels Immunfluoreszenz mit einem cleaved Caspase 3 Antikörper angefärbt. Cleaved Caspase 3 positive Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und der Prozentsatz der apoptotischen Zellen wurde berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen \pm Standardfehler. (B) Repräsentative Bilder von cleaved Caspase 3 gefärbten Präparaten. Lebende Zellen sind blau angefärbt, cleaved Caspase 3 positive Zellen sind grün gefärbt.

5.1.3 Inhibierung des AKT-Signalwegs

Rapamycin hemmt den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg durch Komplexbildung mit der Kinase mTOR und die dadurch fehlende Phosphorylierung von Faktoren innerhalb der Signalkaskade. Um herauszufinden, ob Rapamycin auch in den Hepatoblastomzelllinien diese hemmende Wirkung hat, wurden das Vorkommen von p70S6-Kinase und 4E-BP-1 und deren phosphorylierte (= aktive) Formen bestimmt. Dafür wurden die Zellen für 24 Stunden mit 100 nM Rapamycin behandelt und die Proteine mit Hilfe von Western blot analysiert. In allen 3 Zelllinien führte die Behandlung zu einer Dephosphorylierung und Deaktivierung der p70S6-Kinase. Auf 4E-BP1 hatte die Behandlung keinen Einfluss.

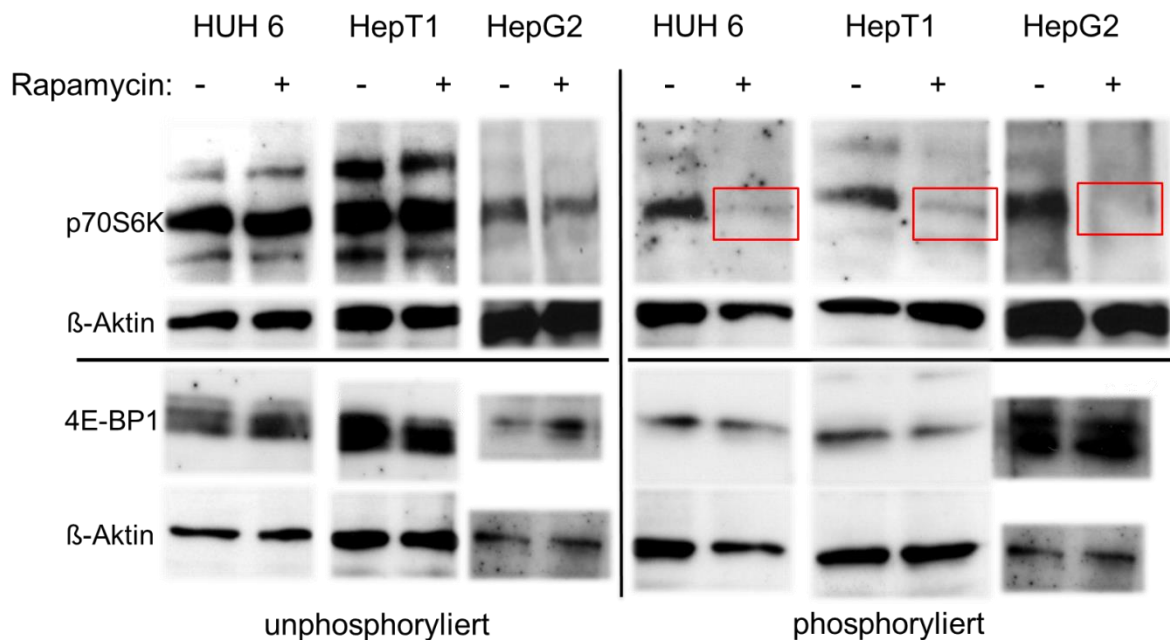


Abb. 6: Deaktivierung von p70S6-Kinase

HUH6-, HepT1-, und HepG2-Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 nM Rapamycin inkubiert. Western blot Analyse von phosphorylierter und unphosphorylierter p70S6-Kinase und 4E-BP1 wurde mit behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. Die fehlende Phosphorylierung der p70S6-Kinase unter Rapamycin Behandlung ist rot markiert. Der Nachweis von β -Aktin diente als Ladekontrolle. Alle Versuche wurden zweifach durchgeführt.

5.2 Wirkung von Rapamycin auf HUH6-Zellen *in vivo*

5.2.1 Wachstum von subkutanen Tumoren vermindert

Um die Wirkung von Rapamycin auf Hepatoblastomzellen *in vivo* zu testen, wurde

Ergebnisse

eine Gruppe von sieben Mäusen mit einem subkutanen HUH6- Tumor täglich für 21 Tage mittels Sonde mit 5 mg/kg Körpergewicht Rapamycin oral behandelt und mit einer Kontrollgruppe (n=7) verglichen, die steriles Wasser erhielt. Im Verlauf der Behandlung stieg das Tumolvolumen in der unbehandelten Kontrollgruppe stetig an, von $163,8 \text{ mm}^3 \pm 8,25$ an Tag 5, über $253,09 \text{ mm}^3 \pm 28,62$ an Tag 10, auf $412,8 \text{ mm}^3 \pm 27,61$ an Tag 21. Das Tumolvolumen der mit Rapamycin behandelten Mäuse zeigte dagegen ein reduziertes Wachstum mit Werten von $130,7 \text{ mm}^3 \pm 6,70$ an Tag 5, über $171,86 \text{ mm}^3 \pm 13,26$ an Tag 10 und $225,9 \text{ mm}^3 \pm 23,96$ an Tag 21 (Abb. 7A). Dieser Unterschied im Verlauf des Tumolvolumens ist ab dem 5. Tag statistisch signifikant. Auch das Tumorgewicht am Ende der Therapie ist in der behandelten Gruppe signifikant reduziert, wobei das Tumorgewicht in der Rapamycingruppe $172,0 \text{ mg} \pm 16,69$ und in der Kontrollgruppe $274,91 \text{ mg} \pm 42,80$ beträgt (Abb. 7C). Mit dem gewonnenen Blut der Mäuse wurde der AFP-Serumspiegel nach 21 Tagen Behandlung bestimmt. Der AFP-Serumspiegel dient in der Klinik als Mittel zur Risikogruppenabschätzung und Überwachung der Therapie eines Hepatoblastoms (Zsiros et al., 2010). Der Serumspiegel ist in der Rapamycin-Gruppe ($1722 \text{ ng/ml} \pm 365,61$) geringer als in der Kontrollgruppe ($2342,67 \text{ ng/ml} \pm 452,53$), der Unterschied ist allerdings nicht signifikant (Abb. 7B).

In Bezug auf Körpergewicht und Vitalstatus der Mäuse bestand zwischen den Gruppen im Verlauf der Behandlung kein Unterschied.

Ergebnisse

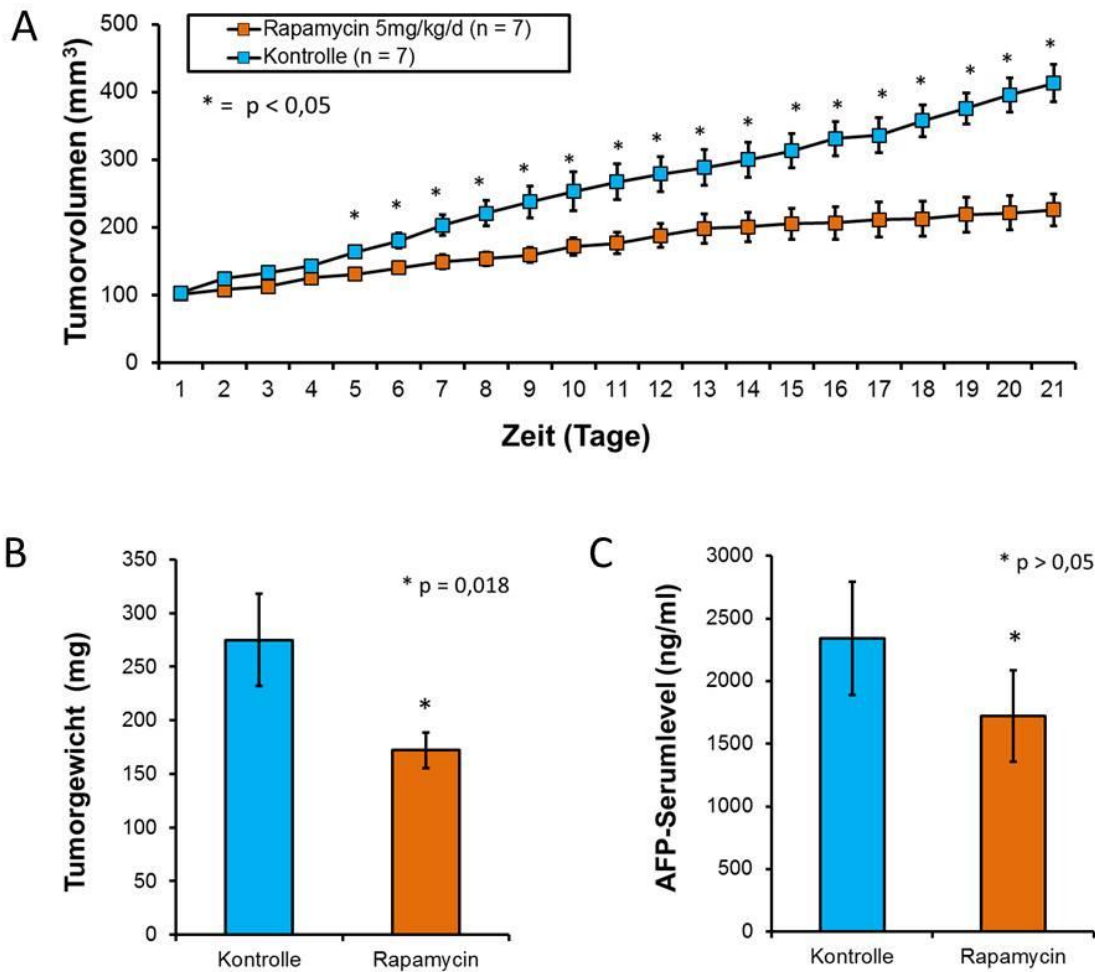


Abb. 7: Hemmung des Tumorwachstums

(A) Balb/c Nacktmäuse mit einem subkutanen HUH6-Tumor wurden je nach Gruppenzuordnung (n = 7 für beide Gruppen) entweder täglich für 21 Tage mit Rapamycin (5mg/kg Körpergewicht) oder als Kontrolle mit sterilem Wasser oral behandelt. Die Größe der Tumore wurde jeden Tag gemessen und das Tumolvolumen berechnet. Ab dem fünften Tag zeigte sich eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums in der Rapamycin-behandelten Gruppe. Das Tumolvolumen ist als Mittelwert \pm Standardfehler für jede Gruppe dargestellt. (B) Das Tumorgewicht wurde nach Entnahme des Tumors nach 21 Behandlungstagen ermittelt, mit einer statistisch signifikanten Reduktion des Tumorgewichts in der Rapamycin-Gruppe. Das Tumorgewicht ist als Mittelwert \pm Standardfehler für jede Gruppe dargestellt. (C) AFP-Serumspiegel wurden am Tag 21 der Behandlung bestimmt. Es besteht hier kein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler für jede Gruppe (n=6) dargestellt.

5.2.2 Abnahme der Proliferation

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen wurde untersucht, ob Rapamycin einen Effekt auf die Proliferationsrate von Tumorzellen *in vivo* hat. Dazu wurden von den subkutanen HUH6-Tumoren Schnittpräparate angefertigt, die mit einem Ki-67 Antikörper angefärbt wurden. Dabei zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion

Ergebnisse

der Proliferationsrate in der Rapamycin-Gruppe (29,31 % \pm 2,23) im Vergleich zur Kontrollgruppe (43,75 % \pm 3,83) (Abb.8).

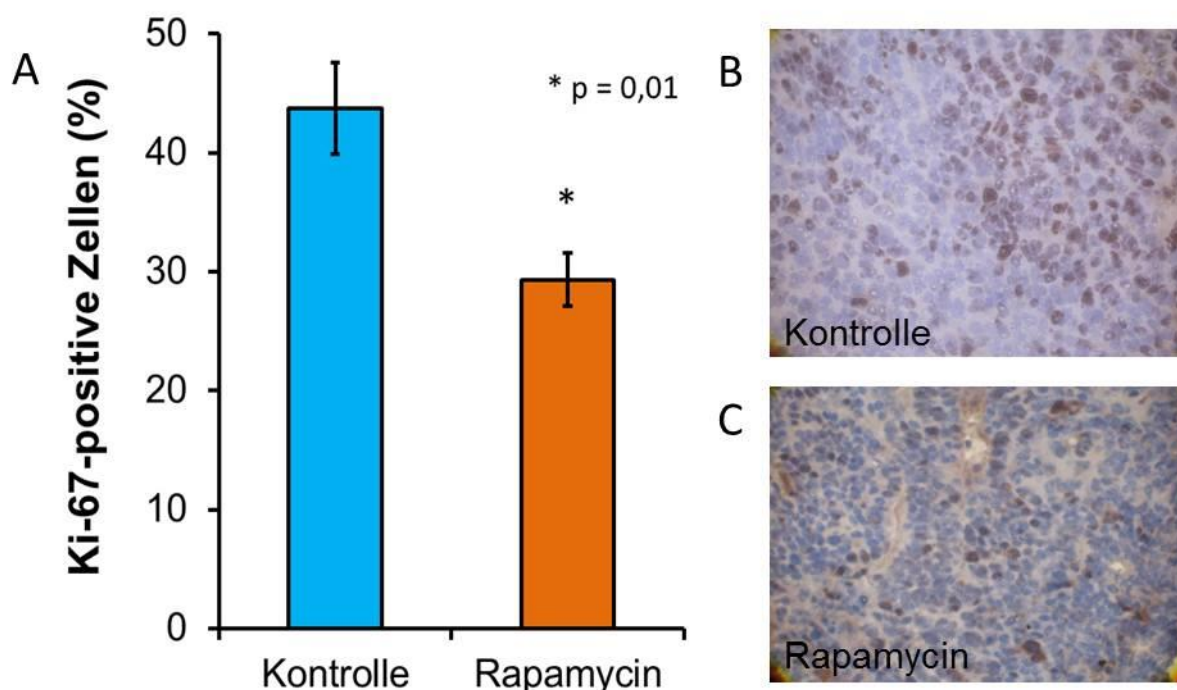


Abb. 8: Reduktion der Proliferationsrate

(A) Die Proliferationsrate wurde durch Auszählung von Ki-67-positiven Zellen in HUH6-Zelltumor-Schnittpräparaten der Rapamycin- und Kontrollgruppe, die immunhistochemisch gefärbt wurden, bestimmt. Der Prozentsatz der Ki-67-positiven Zellen wurde für jede Maus (Rapamycin-Gruppe=7, Kontrollgruppe=6) berechnet und der Mittelwert \pm Standardfehler für jede Gruppe dargestellt. (B)+(C) Repräsentative Bilder für die Ki-67-gefärbten Schnittpräparate.

5.2.3 Keine Induktion von Apoptose

Um herauszufinden, ob Rapamycin auch einen Effekt auf die Apoptoserate der Tumorzellen hat, wurde mittels Western blot cleaved PARP nachgewiesen. PARP ist eine Polymerase, die im Rahmen der Apoptose durch Caspase 3 geschnitten wird und ist somit ein Marker für apoptotische Zellen. Die Western blot-Analyse wurde mit 3 zufällig ausgewählten Tumoren aus jeder Gruppe durchgeführt. Zur Quantifizierung des Signals wurde die optische Dichte der Banden bestimmt und der relative Proteingehalt im Vergleich zu β -Aktin dargestellt. Diese Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Rapamycin- (7,64 \pm 2.63) und Kontrollgruppe (4,47 \pm 1,98) (Abb.9).

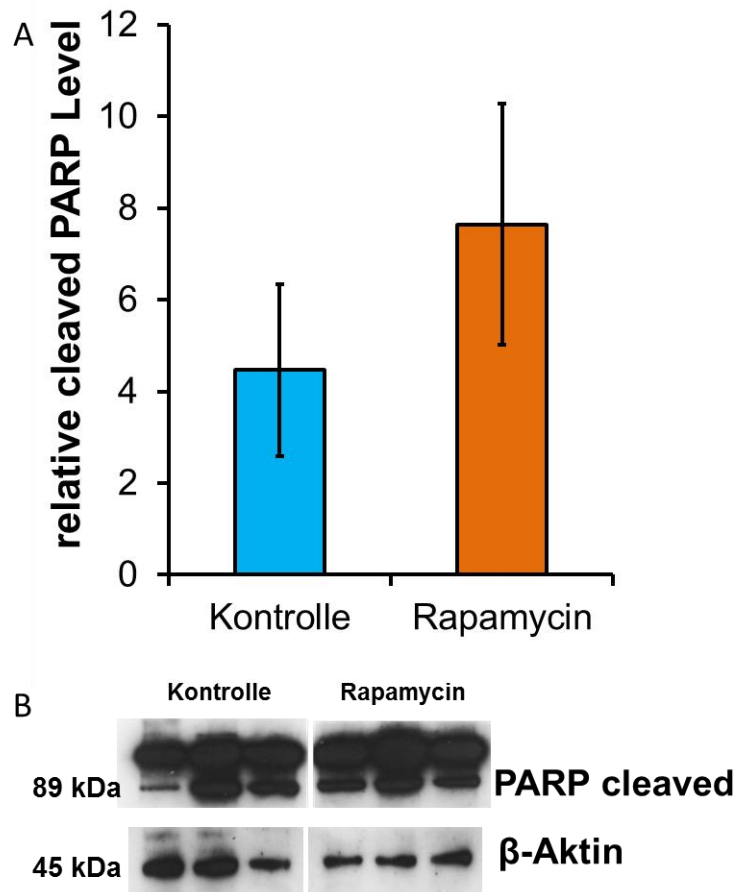


Abb. 9: Relative cleaved PARP Level

(A) Cleaved PARP (89 kDa) wurde mittels Western blot aus drei zufällig ausgewählten Tumoren je Gruppe bestimmt und der relative Proteingehalt im Vergleich zu β -Aktin mit Hilfe der optischen Dichte der Banden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=3$) \pm Standardfehler. (B) Dazugehöriger Western blot.

Auch die Untersuchung der relativen Genexpression mittels qPCR von B-cell lymphoma 2 (*BCL2*) und Bcl-2-associated X protein (*BAX*), Proteine, die ebenfalls eine Rolle im programmierten Zelltod spielen, ergab keinen signifikanten Unterschied. Die relative Genexpression von *BCL2* lag in der Kontrollgruppe bei $0,17 \pm 0,43$ in der Rapamycingruppe bei $0,11 \pm 0,02$, die relative Genexpression von *BAX* lag in der Kontrollgruppe bei $2,45 \pm 0,17$, in der Rapamycingruppe bei $2,74 \pm 0,28$ (Abb.10).

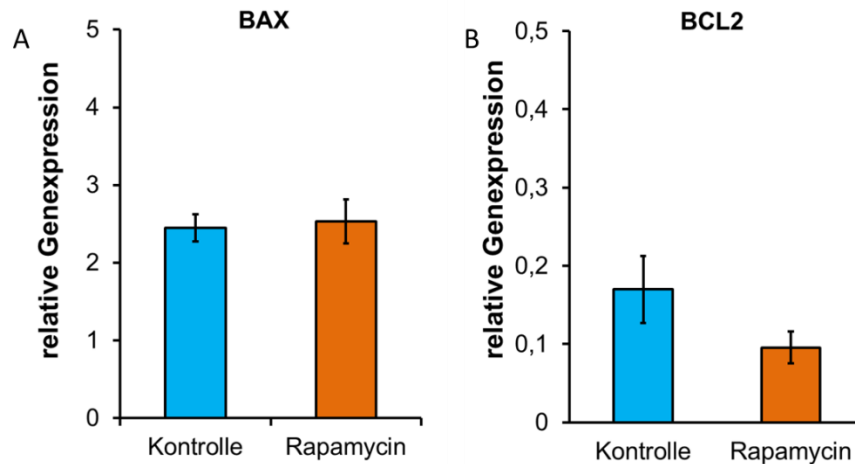


Abb.10: Relative Genexpression von *BAX* und *BCL2*

(A)+(B) Die relative Genexpression von *BAX* und *BCL2* im Verhältnis zu *TBP* wurde mit quantitativer real time PCR bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ($n=7$) \pm Standardfehler.

5.2.4 Kein Effekt auf Angiogenese

In der Literatur ist eine Hemmung der Angiogenese durch Rapamycin beschrieben (Guba et al., 2002). Um zu klären, ob dies auch auf das Hepatoblastom zutrifft, wurde die Angiogenese in den HUH6-Tumoren sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch untersucht.

Mittels eines CD31-Antikörpers wurden Endothelzellen in den Tumorschnittpräparaten angefärbt und die mikrovaskuläre Dichte (MVD) und der Prozentsatz des vaskularisierten Areals (PVA) bestimmt. Sowohl MVD, als auch PVA ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen der Rapamycin-behandelten Gruppe (MVD: $36,46/\text{cm} \pm 3,95$; PVA: $2,79\% \pm 0,42$) und der Kontrollgruppe (MVD: $36,45/\text{cm} \pm 5,02$; PVA: $2,75\% \pm 0,50$) (Abb.11).

Ergebnisse

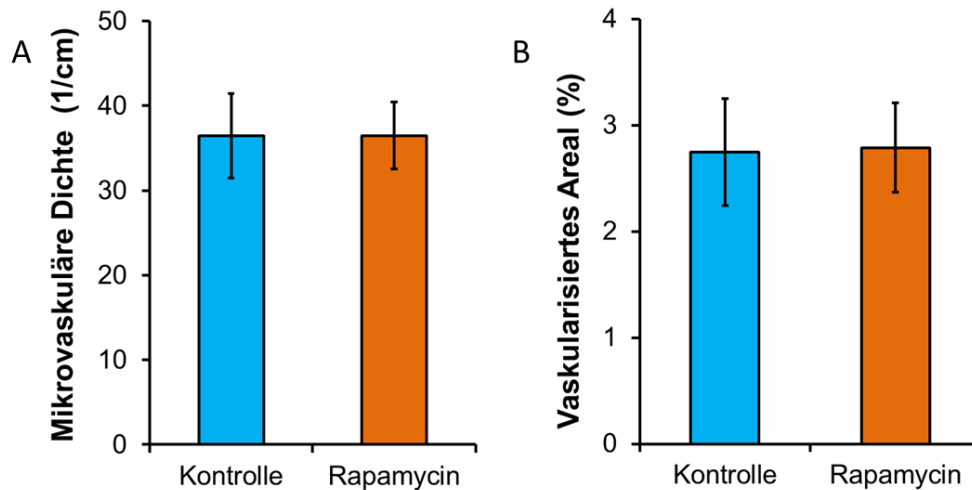


Abb.11: Immunhistochemischer Nachweis von CD31

(A)+(B) In mit CD31 gefärbten Tumorschnittpräparaten (Rapamycin-Gruppe n=7, Kontrollgruppe n=6) wurde sowohl die MVD, als auch die PVA bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Auch die Analysen der Genexpression mittels qPCR von Faktoren, die die Angiogenese induzieren, wie vascular endothelial growth factor (*VEGF*) (Kontrollgruppe: $7,45 \pm 1,19$; Rapamycingruppe: $8,94 \pm 0,85$), fibroblast growth factor 2 (*FGF2*) (Kontrollgruppe: $0,41 \pm 0,32$; Rapamycingruppe: $0,36 \pm 0,18$) und hypoxia inducible factor 1 α (*HIF1 α*) (Kontrollgruppe: $9,36 \pm 1,29$; Rapamycingruppe: $9,94 \pm 0,74$), zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Auch die Bestimmung des relativen Proteingehalts von HIF1- α mittels Western blot, die für jede Gruppe an drei zufällig ausgewählten Tumoren durchgeführt wurde, konnte keinen Unterschied nachweisen (Abb.12).

Ergebnisse

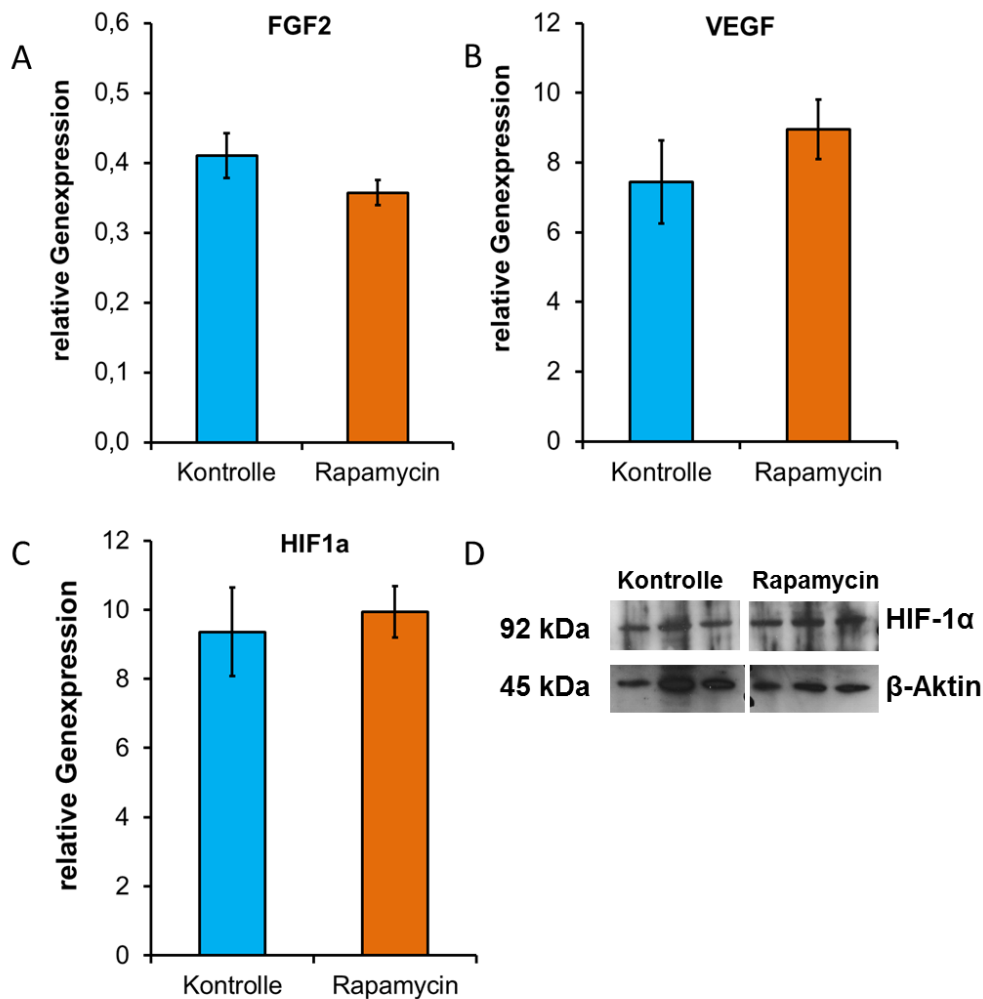


Abb.12: qPCR-Analyse von Angiogenese induzierenden Faktoren und Western blot Analyse von *HIF1-α*

(A)+(B)+(C) Die relative Genexpression von *FGF2*, *VEGF* und *HIF1α* im Verhältnis zu *TBP* wurden mit quantitativer real time PCR bestimmt (Rapamycin-Gruppe n=7, Kontrollgruppe n=7). Dargestellt sind für jede Gruppe die Mittelwerte \pm Standardfehler. (D) Western blot Analyse von *HIF1-α*, für jede Gruppe n=3.

5.2.5 Beeinflussung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs

5.2.5.1 Deaktivierung von p70S6-Kinase

Um sicher zu stellen, dass Rapamycin auch *in vivo* den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg inhibiert, wurde in jeweils drei zufällig ausgewählten subkutanen HUH6-Tumoren jeder Gruppe der relative Gehalt der aktivierten und deaktivierten Form der p70S6-Kinase mit Western blot-Analyse bestimmt. Die deaktivierte, unphosphorylierte p70S6-Kinase ist sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Rapamycin-Gruppe vorhanden. Der relative Proteingehalt der aktivierten, phosphorylierten Form (p-p70S6-Kinase) ist allerdings in der Rapamycingruppe ($0,33 \pm 0,77$) signifikant

Ergebnisse

geringer als in der Kontrollgruppe ($0,85 \pm 0,27$) und zeigt damit, dass der AKT-Signalweg auch *in vivo* von Rapamycin inhibiert wird (Abb.13).

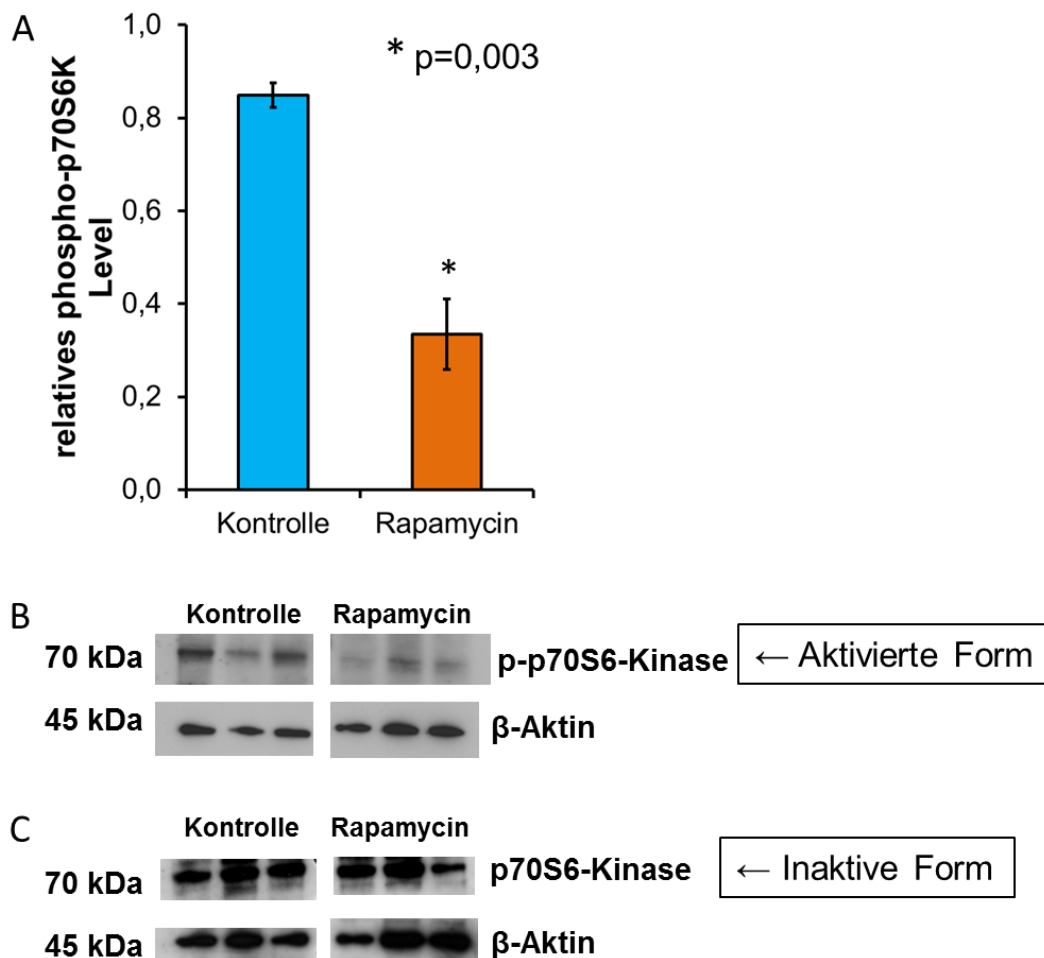


Abb.13: Inhibierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs

(A) Phospho-p70S6-Kinase (70kDa) wurde mittels Western blot in drei zufällig ausgewählten Tumoren jeder Gruppe bestimmt und der relative Proteingehalt im Verhältnis zu β -Aktin über die optische Dichte der Banden errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. (B) Dazugehöriger Western blot. (C) p70S6-Kinase wurde ebenfalls mittels Western blot bestimmt.

5.2.5.2 Keine vermehrte Aktivierung von AKT

In einigen Veröffentlichungen finden sich Hinweise darauf, dass *AKT* durch die Therapie mit Rapamycin über einen Feedback-Mechanismus aktiviert wird (Sun et al., 2005) (Wan et al., 2007). Um herauszufinden, ob dieser ungünstige Nebeneffekt auch für die HUH6-Tumore Bedeutung hat, wurde mittels Western blot der relative Proteingehalt von AKT von drei zufällig ausgewählten Tumoren jeder Gruppe nachgewiesen. Die Menge an phosphoryliertem, aktivierten AKT (p-AKT) blieb jedoch in der Rapamycin-Gruppe ($0,56 \pm 0,08$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,51$

Ergebnisse

$\pm 0,03$) nahezu unverändert (Abb.14).

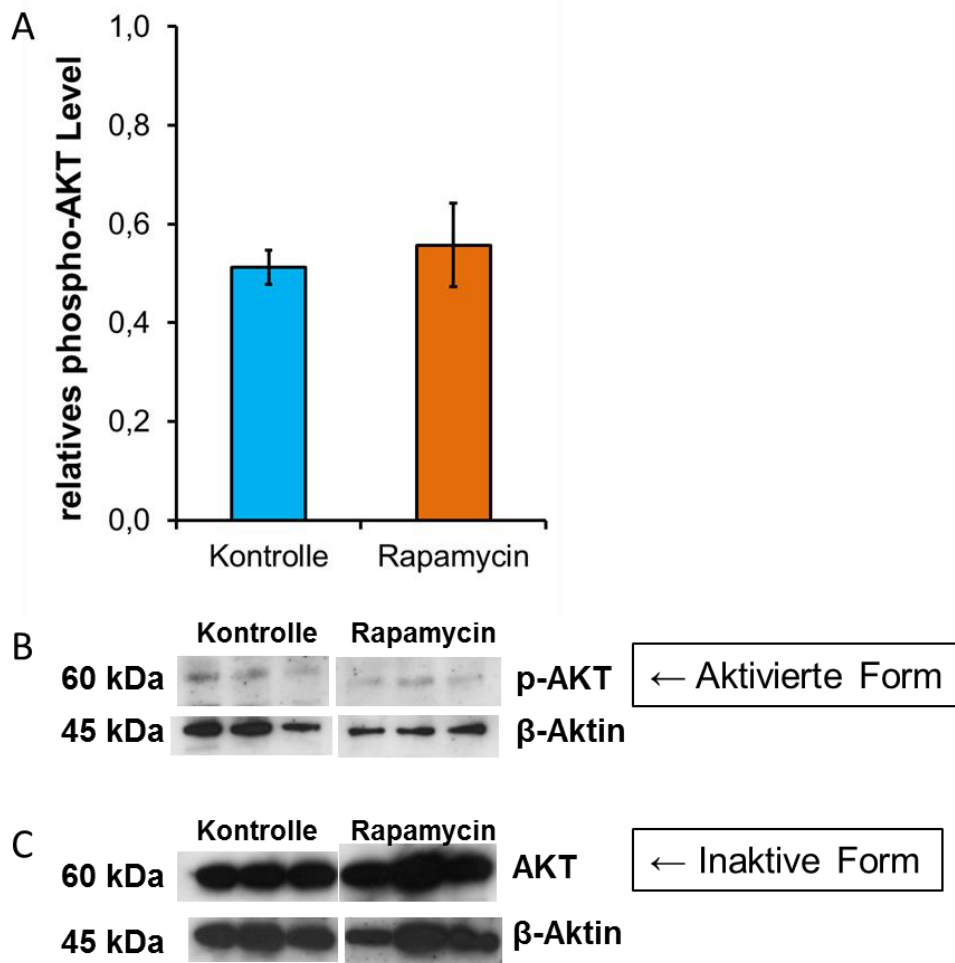


Abb.14: Kein positiver Feedback-Mechanismus zu AKT

(A) Phospho-AKT (60kDa) wurde mittels Western blot in drei zufällig ausgewählten Tumoren jeder Gruppe bestimmt und der relative Proteingehalt im Verhältnis zu β -Aktin über die optische Dichte der Banden errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. (B) Dazugehöriger Western blot. (C) AKT wurde ebenfalls mittels Western blot bestimmt.

6 Diskussion

Die Behandlung des Hepatoblastoms hat sich in den letzten Jahren gerade in der Standardrisikogruppe durch Kombination von Chemotherapie und chirurgischer Resektion des Tumors deutlich verbessert. Um auch in der Hochrisikogruppe entsprechende Ergebnisse zu erzielen, ist es weiterhin wichtig, nach neuen Therapieoptionen zu suchen und neue Medikamente zur Behandlung zu etablieren. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Rapamycin das Wachstum von Hepatoblastomen hemmen kann und sich somit als möglicher neuer Ansatz für zukünftige Studien anbietet.

6.1 Rapamycin: Medikament der Wahl für zukünftige Studien?

Vor allem die Hochrisikogruppe der Hepatoblastompatienten, die mit dem bisherigen Therapiekonzept aus Kombination von Chemotherapie und chirurgischer Resektion nur eine Heilungsrate von 60 % erwartet, ist die Patientengruppe, die einen neuen Ansatz in der Therapie benötigt (Haberle, Bode et al. 2003) (Perilongo, Maibach et al. 2009) (Zsiros, Maibach et al. 2010). Zudem wird die Therapie häufig in fortgeschrittenen Stadien des Hepatoblastoms nach mehreren Chemotherapiezyklen durch Entwicklung einer *multi drug resistance* (MDR) problematisch (Warmann et al., 2002). Studien haben gezeigt, dass bei bis zu 80 % der Hepatoblastompatienten nach 4 bis 5 Zyklen Chemotherapie eine MDR auftritt (von Schweinitz et al., 1997). Ein möglicher Mechanismus der MDR ist eine vermehrte Expression des *MDR1*-Gens, das den Membrantransporter P-glycoprotein (P-gp) kodiert (Warmann et al., 2002). P-gp ist ein Membrantransporter der normalerweise an der Ausscheidung von Giftstoffen aus der Zelle beteiligt ist (Leonard et al., 2003). Um das Auftreten einer MDR zu verhindern, hat es sich als günstig erwiesen, eine Kombination aus verschiedenen Chemotherapeutika mit unterschiedlichen Angriffspunkten in der Behandlung von malignen Erkrankungen zu verwenden (Chabner and Roberts, 2005). Rapamycin würde sich dazu eignen, in die bestehenden Kombinationstherapie aufgenommen zu werden, da es einen zusätzlichen Angriffspunkt bietet und darüber hinaus weitere Vorteile aufweist:

a) Rapamycin kann oral verabreicht werden und dadurch täglich, auch zu Hause, gegeben werden. Dies bewirkt, im Gegensatz zu anderen Substanzen, die derzeit in der Therapie des Hepatoblastoms verwendet werden, die eine intravenöse Gabe und

häufige Klinikaufenthalte erfordern, kontinuierlich effektive Serumspiegel des Medikaments (Tejani et al., 2004).

b) Es besteht bereits klinische Erfahrung in der Dosierung dieses Medikaments in der Pädiatrie, denn Rapamycin wird in der Behandlung von Kindern im Rahmen der Transplantationsmedizin, sowie in der Therapie von gutartigen Tumorerkrankungen wie tuberöse Sklerose und Lymphangiome angewendet (Krueger et al., 2010) (Hammill et al., 2011).

c) Rapamycin ist sowohl in Europa, als auch in den USA bereits für die immunsuppressive Therapie zugelassen und hat sich in einigen Tumorentitäten als wirksam erwiesen (Chan et al., 2005) (Galanis et al., 2005) (Motzer et al., 2008).

d) Derivate von Rapamycin zeigten sich in Studien in der Behandlung von Tumorerkrankungen im Endstadium bereits als effektiv (Chan et al., 2005) (Galanis et al., 2005) (Motzer et al., 2008). Auch in der Behandlung des HCC konnten schon erste Erfolge gesehen werden (Rizell et al., 2008) (Schnitzbauer et al., 2010). In der Kombination von Temsirolimus, einem Derivat von Rapamycin, mit Doxorubicin konnte bei der Therapie des HCC ein additiver Effekt nachgewiesen werden (Piguet et al., 2008). Doxorubicin ist ein Chemotherapeutikum, das in der Behandlung des Hepatoblastoms standardmäßig verwendet wird (Haberle et al., 2003). In einer Studie von 2011 wurde bei pädiatrischen Patienten nach Lebertransplantation die Wirkung von Everolimus, einem weiteren Derivat von Rapamycin, untersucht. Es wurden zwei Hepatoblastom-Patienten in die Studie eingeschlossen, wobei beide Patienten frei von Metastasen blieben (Nielsen et al., 2011).

Insgesamt dokumentieren diese Arbeiten eindrucksvoll, dass in weiteren klinischen Studien untersucht werden sollte, ob Rapamycin in der Therapie des Hepatoblastom einen zusätzlichen Nutzen erzielen kann.

6.2 Rapamycin als Monotherapie

In dieser Arbeit wurde Rapamycin als Monotherapie verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass Rapamycin in der Behandlung des Hepatoblastoms im Mausmodell zu einem verminderten Wachstum der subkutanen Tumore und zu einer Abnahme der Proliferationsrate der Zellen führt. Es kam jedoch nicht zu einer Tumorregression. Auch in anderen präklinischen und klinischen Studien konnte bisher nur ein moderater Effekt in der Monotherapie mit Rapamycin entdeckt werden, da

Rapamycin vor allem zytostatisch und nicht zytotoxisch wirkt (Li et al., 2014). Dies führte in einer klinischen Studie zu Angiomyolipomen zwar zu einer Tumorregression unter Rapamycintherapie, nach Beenden der Therapie neigten die Tumore jedoch dazu wieder an Volumen zuzunehmen (Bissler et al., 2008). mTOR besteht aus einem Komplex aus mTORC1 und mTORC2, Rapamycin entfaltet seine Wirkung durch einen inhibierenden Effekt auf mTORC1 und hat keine Wirkung auf mTORC2 (Willems et al., 2012). Dies wird von Liao et al. vor allem als Ursache für den nur moderaten Effekt von Rapamycin gesehen. Im Vergleich von Rapamycin mit *AZD2014*, einem mTORC1 - und mTORC2 – Inhibitor, konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Blockade von mTORC2 in der Therapie von HCC-Zellen *in vitro* eine stärkere Inhibierung der Proliferation, Apoptoseinduktion, Zellzyklusarrest und Autophagie bedingte (Liao et al., 2015).

Wie bereits erwähnt besteht in der Therapie des Hepatoblastoms ist die Gefahr der Entwicklung einer MDR (von Schweinitz et al., 1995). Auch deswegen sollte in zukünftigen Therapiekonzepten vor allem auf Kombinationstherapien und nicht auf Monotherapie gesetzt werden.

6.3 Biomarker zur Überwachung des Therapieerfolgs mit Rapamycin

Die Identifikation von molekularen Biomarkern ist ein wichtiges Thema in der modernen Medizin. Sie ermöglichen es, optimale Behandlungskonzepte zu erstellen und Therapieerfolge zu überprüfen (Lohmann et al., 2012). Ein bekanntes Beispiel für die erfolgreiche Nutzung eines solchen Biomarkers ist *HER2* in der Therapie des Brustkrebs (Vogel et al., 2002). Der Tumormarker AFP ist bereits ein etablierter Marker für die Diagnose und Behandlungsüberwachung des Hepatoblastoms (von Schweinitz, 2006) (Koh et al., 2011). In dieser Arbeit konnten in den mit Rapamycin behandelten Subkutantumoren *in vivo* verminderte Werte für AFP gezeigt werden, obgleich dieses Ergebnis allerdings ohne statistische Signifikanz blieb. Für die Therapie mit Rapamycin und seinen Derivaten wurden in den meisten Studien p70S6-Kinase, 4E-BP1 und Caspase 3 als passende Marker für die erfolgreiche Behandlung angesehen (Seeliger et al., 2007) (Wan et al., 2006). Die Resultate dieser Arbeit werfen jedoch die Frage auf, ob die p70S6-Kinase möglicherweise als einziger Parameter in der Behandlung von Hepatoblastom-Patienten geeignet ist. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Rapamycin den AKT/mTOR-Signalweg

hemmt, indem es die p70S6-Kinase dephosphoryliert, und damit deaktiviert. Dieser Mechanismus konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die Behandlung von Hepatoblastom-Zelllinien mit Rapamycin zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von 4E-BP1. Es wurde schon an anderer Stelle in der Literatur berichtet, dass durch die Behandlung mit Rapamycin das Zellwachstum von Zelllinien des HCC entweder Dephosphorylierung der p70S6-Kinase oder von 4E-BP1 gehemmt wird (Jasinghe et al., 2008). Dass der Effekt von Rapamycin auf 4E-BP1 sich in verschiedenen Zelllinien unterscheidet, mag möglicherweise auch daran liegen, dass 4E-BP1 an drei unterschiedlichen Stellen phosphoryliert werden kann (Ser-65, Thr-70 und Thr-37/46) und in den Studien Antikörper gegen unterschiedliche Epitope verwendet wurden (Boulay et al., 2004) (Lang et al., 2007). Die p70S6-Kinase wird dagegen sowohl in dieser Arbeit, als auch in anderen Studien konstant dephosphoryliert (Hartmann et al., 2009) (Hartmann et al., 2005).

Der dritte empfohlene Biomarker ist Caspase 3, ein Marker der Apoptose (Seeliger et al., 2007) (Wan et al., 2006). Wir konnten in unserer Arbeit keine signifikante Erhöhung von Apoptoseparametern nachweisen. Der Nachweis von Caspase 3 mit Hilfe von Immunfluoreszenz *in vitro* erbrachte keinen Hinweis für eine Induktion der Apoptose durch Rapamycin. Auch *in vivo* zeigte sich keine erhöhte Expression der Gene *BCL2* oder *BAX* oder eine vermehrte Bildung von cleaved PARP als Zeichen für eine verstärkte Apoptoserate in den mit Rapamycin behandelten Xenografts. Möglicherweise führt die ohnehin erhöhte Expression von *BCL2* in Hepatoblastomen und anderen embryonalen Tumoren zu einem geringeren Effekt auf die Kaskade des programmierten Zelltod (Eichenmuller et al., 2009) (Eichenmuller et al., 2010) (Lieber et al., 2010). Auch in einer Studie über das HCC zeigte sich nach der Gabe von Temsirolimus, einem Derivat von Rapamycin, keine vermehrte Expression von Caspase 3 oder eine vermehrte Bildung von cleaved PARP (Piguet et al., 2008).

Unsere Daten zeigen somit, dass die Messung von phosphoryliertem p70S6-Kinase in Tumorbiopsie und Patientenserum, zusammen mit dem bereits etablierten Tumormarker AFP, der einzig verlässliche Parameter in der Überwachung des Therapieerfolgs zu sein scheint.

6.4 Zelltod unter Rapamycin-Therapie

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Rapamycin zu einem

vermindertem Tumorwachstum im Hepatoblastom-Xenograft-Modell führt. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass Rapamycin über eine Aktivierung der Caspase-3, sowie über eine verminderte Expression des anti-apoptischen Proteins BCL2, bzw. vermehrte Expression des pro-apoptischen Proteins BAX eine Induktion der Apoptose in HCC-Zellen auslöst (Zhang et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine verminderte Proliferationsrate der Hepatoblastomzellen unter Rapamycin, vermehrter Zelltod durch Apoptose konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchung der relativen Genexpression von *BCL2* und *BAX* ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der mit Rapamycin behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Auch in einem *in vitro* Modell zum HCC von Wang et al. konnte eine Apoptoseinduktion durch Rapamycin nicht nachgewiesen werden (Wang et al., 2009). Arcella et al. konnten in einem *in vitro* und *in vivo* Modell für das Glioblastom in den Analysen korrespondierend zu den Ergebnissen dieser Arbeit auch eine verminderte Proliferationsrate nach Behandlung mit Rapamycin zeigen, hier gelang allerdings auch der Nachweis von vermehrtem Zelltod. Es handelte sich aber vor allem um Autophagozytose und nicht um gesteigerte Apoptose (Arcella et al., 2013). Auch in einer Studie mit Zelllinien des HCC konnte nach Behandlung mit Rapamycin eine vermehrte Autophagozytose nachgewiesen werden (Liao et al., 2015). In diesen beiden Studien gelang der Nachweis von Zelltod über die Bestimmung von autophagischen Vakuolen. Zelltod unter Rapamycin scheint somit zu einem großen Teil vor allem durch Autophagozytose zu erfolgen, sodass zum Nachweis eines vermehrten Zelltodes unter Rapamycintherapie andere Bestimmungsmethoden herangezogen werden müssen, als in die die in dieser Arbeit verwendet wurden.

6.5 Feedback-Aktivierung von AKT durch Rapamycin

Die physiologische Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges führt über eine Phosphorylierung von Insulinrezeptorsubstrat (IRS), das eine Adapterfunktion am Wachstumshormonrezeptoren hat, durch die p70S6-Kinase zu einer Inhibierung von PI3K und damit negativem Feedback im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (Um et al., 2004). Ein gefürchteter Nebeneffekt in der Behandlung mit Rapamycin ist eine Feedback-Aktivierung von AKT durch den Wegfall dieser Inhibierung. Einige Studien berichten von der gewünschten verminderten Aktivierung der p70S6-Kinase durch

die Behandlung mit Rapamycin, konnten dadurch aber auch eine vermehrte Phosphorylierung von AKT feststellen (Sun et al., 2005) (Wan et al., 2007). Dies könnte zu einer Enthemmung des Tumorwachstums führen. In einer klinischen Studie in der Behandlung des Glioblastoms wurde postoperativ Rapamycin als adjuvante Chemotherapie verabreicht. In der Patientengruppe, in der eine vermehrte AKT-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte fand sich eine statistisch signifikant kürzere Zeit bis zur Progression der Erkrankung (Cloughesy et al., 2008). In dieser Arbeit konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Menge an phosphoryliertem AKT, und somit aktiviertem AKT, in der mit Rapamycin behandelten und der unbehandelten Gruppe gleich ist. Rapamycin scheint somit in der Therapie des Hepatoblastoms keine zusätzliche Phosphorylierung von AKT über eine Feedback-Schleife zu bedingen. Ein Risiko für ein enthemmtes Wachstum des Lebertumors scheint somit unter der Therapie mit Rapamycin nicht zu bestehen.

6.6 Anti-angiogenetischer Effekt auf Leberzellen

Für einige Tumorentitäten wird ein anti-angiogenetischer Effekt von Rapamycin und seinen Derivaten beschrieben (Guba et al., 2002) (Seeliger et al., 2007). Dies konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Sowohl in immunhistochemischen Färbungen mit dem Endothelmarker CD31, als auch in der Expression von Markern der Angiogenese wie *HIF1 α* , *VEGF* und *FGF2* ergab sich *in vivo* kein Hinweis auf eine verminderte Angiogenese in der mit Rapamycin behandelten Gruppe. Auch Jashinge et al. konnten im *in vivo* HCC-Modell bei den mit Rapamycin behandelten Tieren keinen anti-angiogenetischen Effekt beobachten (Jashinge et al., 2008). Leberzellen scheinen sich möglicherweise durch einen bisher unbekanntem Mechanismus dem anti-angiogenetischen Effekt von Rapamycin zu entziehen. Eine andere Ursache für den mangelhaften anti-angiogenetischen Effekt von Rapamycin könnte in der Dosierung von Rapamycin liegen. Guba et al. kamen 2005 zu dem Schluss, dass Rapamycin vor allem in einer Dosierung, die zu einem kontinuierlich niedrigen Plasmaspiegel des Medikaments führt, den größten anti-angiogenetischen Effekt zeigt. Diese Plasmaspiegel konnten über die kontinuierliche intraperitoneale Infusion von 1,5 mg/kg Körpergewicht Rapamycin erreicht werden (Guba et al., 2005). Die Mäuse in dieser Arbeit erhielten 5 mg/kg Körpergewicht Rapamycin einmal täglich, sowie auch die Mäuse in der Arbeit von Jashinge et al. Wang et al. konnten 2009 in

Diskussion

einem Xenograft-Modell zum HCC einen anti-angiogenetischen Effekt mittels immunhistochemischen Färbungen mit dem Endothelmarker CD31 nachweisen. Diesen Mäusen wurden 2 mg/kg Körpergewicht Rapamycin einmal täglich über eine Sonde oral verabreicht (Wang et al., 2009). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Dosierung von Rapamycin eine entscheidende Rolle für den anti-angiogenetischen Effekt spielt und dass eher niedrigere Plasmaspiegel von Rapamycin den gewünschten Effekt hervorrufen.

7 Zusammenfassung

Das hochmaligne Hepatoblastom ist der häufigste Lebertumor beim Kind. Die Prognose von Kindern mit einem Hepatoblastom ist in der Standardrisiko-Gruppe mit einer Heilungschance von über 90% relativ gut. Jedoch erzielt die derzeitige Therapiestrategie, eine Kombination aus neoadjuvanter Chemotherapie und chirurgischer Resektion, vor allem bei Hochrisikopatienten nur eine Heilungsrate von 60%. Die Entstehung einer *multi-drug resistance* führt zudem häufig zu therapierefraktären Tumoren. Um die Überlebensraten dieser Patienten zu verbessern, ist die Entwicklung neuer Therapiekonzepte von großer Bedeutung. Das bisher vor allem wegen seiner immunsuppressiven Wirkung zum Einsatz kommende Rapamycin, ein mTOR-Inhibitor, könnte ein möglicher Kandidat für zukünftige Therapiestrategien sein. Zum einen konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass diese Substanz das Tumorwachstum hemmen kann. Zum anderen ist der PI3/AKT/mTOR-Signalweg, der von Rapamycin durch Komplexbildung mit mTOR gehemmt wird, wesentlich an der Tumorgenese des Hepatoblastoms beteiligt.

In der vorgelegten Arbeit sollte nun in einem präklinischen Rahmen untersucht werden, ob sich Rapamycin als neue Therapieoption in der Behandlung des Hepatoblastoms eignen könnte. Hierfür wurden zunächst Hepatoblastomzelllinien in der Zellkultur mit Rapamycin behandelt. Die Gabe von Rapamycin führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität und zu einer Induktion von Apoptose. Es wurde zudem gezeigt, dass über die Deaktivierung von p70S6, einer Proteinkinase in der Signalkaskade von mTOR, der PI3/AKT/mTOR-Signalweg in den Tumorzellen durch Rapamycin tatsächlich inhibiert wird.

Im Anschluss an die Untersuchungen in der Zellkultur wurden immundefiziente Mäuse, die mittels subkutaner Injektion einen Tumor aus Hepatoblastomzellen trugen, mit Rapamycin therapiert. Es konnte demonstriert werden, dass Rapamycin *in vivo* eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums hervorruft und zu einer geringeren Proliferationsrate der Tumorzellen führt. Die Apoptoserate blieb im Gegensatz zur Zellkultur unbeeinflusst. Auch ein für andere Tumorentitäten vorbeschriebener hemmender Effekt von Rapamycin auf die Angiogenese konnte in dieser Arbeit für das Hepatoblastom nicht belegt werden. Der Proteingehalt der

Zusammenfassung

aktivierten Form der p70S6-Kinase war aber nach Behandlung mit Rapamycin in den subkutanen Tumoren der Mäuse signifikant geringer. Dadurch konnte bestätigt werden, dass auch im Maus-Xenograftmodell der PI3/AKT/mTOR-Signalweg inhibiert wurde. Der AFP-Serumspiegel, der in der Klinik bisher als Biomarker für Risikoabschätzung und Therapieüberwachung bei einem Hepatoblastom dient, zeigte im Mausmodell jedoch nach Behandlung mit Rapamycin keinen signifikanten Unterschied. Eine Feedback-Aktivierung von AKT durch Behandlung mit Rapamycin, die zu einem enthemmten Tumorwachstum führen kann, scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit im Hepatoblastom ebenfalls keine Rolle zu spielen, da der Proteingehalt der aktivierten Form von AKT in der mit Rapamycin behandelten und der unbehandelten Gruppe gleich war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Rapamycin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Blockade des PI3/AKT/mTOR-Signalwegs führt und eine Hemmung des Hepatoblastomwachstums erzielt wird. Rapamycin könnte somit eine sinnvolle Ergänzung der Kombinationstherapie des Hepatoblastoms sein. Die p70S6-Kinase ist dabei möglicherweise als Biomarker für die Auswahl geeigneter Patienten und Therapieüberwachung hilfreich.

8 Literaturverzeichnis

- ALBRECHT, S., VON SCHWEINITZ, D., WAHA, A., KRAUS, J. A., VON DEIMLING, A. & PIETSCH, T. 1994. Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. *Cancer Res*, 54, 5041-4.
- ARCELLA, A., BIAGIONI, F., ANTONIETTA OLIVA, M., BUCCI, D., FRATI, A., ESPOSITO, V., CANTORE, G., GIANGASPERO, F. & FORNAI, F. 2013. Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma. *Brain Res*, 1495, 37-51.
- BISSLER, J. J., MCCORMACK, F. X., YOUNG, L. R., ELWING, J. M., CHUCK, G., LEONARD, J. M., SCHMITHORST, V. J., LAOR, T., BRODY, A. S., BEAN, J., SALISBURY, S. & FRANZ, D. N. 2008. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med*, 358, 140-51.
- BOULAY, A., ZUMSTEIN-MECKER, S., STEPHAN, C., BEUVINK, I., ZILBERMANN, F., HALLER, R., TOBLER, S., HEUSSER, C., O'REILLY, T., STOLZ, B., MARTI, A., THOMAS, G. & LANE, H. A. 2004. Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res*, 64, 252-61.
- BUELL, J. F., GROSS, T. G. & WOODLE, E. S. 2005. Malignancy after transplantation. *Transplantation*, 80, S254-64.
- CHABNER, B. A. & ROBERTS, T. G., JR. 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 65-72.
- CHAN, S., SCHEULEN, M. E., JOHNSTON, S., MROSS, K., CARDOSO, F., DITTRICH, C., EIERMANN, W., HESS, D., MORANT, R., SEMIGLAZOV, V., BORNER, M., SALZBERG, M., OSTAPENKO, V., ILLIGER, H. J., BEHRINGER, D., BARDY-BOUXIN, N., BONI, J., KONG, S., CINCOTTA, M. & MOORE, L. 2005. Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 23, 5314-22.
- CLATWORTHY, H. W., JR., SCHILLER, M. & GROSFELD, J. L. 1974. Primary liver tumors in infancy and childhood. 41 cases variously treated. *Arch Surg*, 109, 143-7.
- CLEVERS, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127, 469-80.
- CLOUGHESY, T. F., YOSHIMOTO, K., NGHIEMPHU, P., BROWN, K., DANG, J., ZHU, S., HSUEH, T., CHEN, Y., WANG, W., YOUNGKIN, D., LIAU, L., MARTIN, N., BECKER, D., BERGSNEIDER, M., LAI, A., GREEN, R., OGLESBY, T., KOLETO, M., TRENT, J., HORVATH, S., MISCHEL, P. S., MELLINGHOFF, I. K. & SAWYERS, C. L. 2008. Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med*, 5, e8.
- DEBAUN, M. R. & TUCKER, M. A. 1998. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr*, 132, 398-400.
- DIEHL, J. A., CHENG, M., ROUSSEL, M. F. & SHERR, C. J. 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, 12, 3499-511.
- EICHENMULLER, M., GRUNER, I., HAGL, B., HABERLE, B., MULLER-HOCKER, J., VON SCHWEINITZ, D. & KAPPLER, R. 2009. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology*, 49, 482-90.
- EICHENMULLER, M., HEMMERLEIN, B., VON SCHWEINITZ, D. & KAPPLER, R. 2010. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma. *Br J Cancer*, 103, 43-51.
- ENG, C. P., SEHGAL, S. N. & VEZINA, C. 1984. Activity of rapamycin (AY-22,989)

- against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*, 37, 1231-7.
- FINEGOLD, M. J., EGLER, R. A., GOSS, J. A., GUILLERMAN, R. P., KARPEN, S. J., KRISHNAMURTHY, R. & O'MAHONY, C. A. 2008. Liver tumors: pediatric population. *Liver Transpl*, 14, 1545-56.
- FRANKE, T. F., KAPLAN, D. R. & CANTLEY, L. C. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88, 435-7.
- GALANIS, E., BUCKNER, J. C., MAURER, M. J., KREISBERG, J. I., BALLMAN, K., BONI, J., PERALBA, J. M., JENKINS, R. B., DAKHIL, S. R., MORTON, R. F., JAECKLE, K. A., SCHEITHAUER, B. W., DANCEY, J., HIDALGO, M. & WALSH, D. J. 2005. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol*, 23, 5294-304.
- GINGRAS, A. C., KENNEDY, S. G., O'LEARY, M. A., SONENBERG, N. & HAY, N. 1998. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*, 12, 502-13.
- GUBA, M., KOEHL, G. E., NEPLL, E., DOENECKE, A., STEINBAUER, M., SCHLITT, H. J., JAUCH, K. W. & GEISLER, E. K. 2005. Dosing of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer. *Transpl Int*, 18, 89-94.
- 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. & GEISLER, E. K. 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*, 8, 128-35.
- HABERLE, B., BODE, U. & VON SCHWEINITZ, D. 2003. [Differentiated treatment protocols for high- and standard-risk hepatoblastoma--an interim report of the German Liver Tumor Study HB99]. *Klin Padiatr*, 215, 159-65.
- HAHN, H., WICKING, C., ZAPHIROPOULOUS, P. G., GAILANI, M. R., SHANLEY, S., CHIDAMBARAM, A., VORECHOVSKY, I., HOLMBERG, E., UNDEN, A. B., GILLIES, S., NEGUS, K., SMYTH, I., PRESSMAN, C., LEFFELL, D. J., GERRARD, B., GOLDSTEIN, A. M., DEAN, M., TOFTGARD, R., CHENEVIX-TRENCH, G., WAINWRIGHT, B. & BALE, A. E. 1996. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85, 841-51.
- HAMMILL, A. M., WENTZEL, M., GUPTA, A., NELSON, S., LUCKY, A., ELLURU, R., DASGUPTA, R., AZIZKHAN, R. G. & ADAMS, D. M. 2011. Sirolimus for the treatment of complicated vascular anomalies in children. *Pediatr Blood Cancer*, 57, 1018-24.
- HARA, K., MARUKI, Y., LONG, X., YOSHINO, K., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., TOKUNAGA, C., AVRUCH, J. & YONEZAWA, K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110, 177-89.
- HARDINGER, K. L., KOCH, M. J. & BRENNAN, D. C. 2004. Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation. *Pharmacotherapy*, 24, 1159-76.
- HARTMANN, B., SCHMID, G., GRAEB, C., BRUNS, C. J., FISCHEREDER, M., JAUCH, K. W., HEESCHEN, C. & GUBA, M. 2005. Biochemical monitoring of mTOR inhibitor-based immunosuppression following kidney transplantation: a novel approach for tailored immunosuppressive therapy. *Kidney Int*, 68, 2593-8.
- HARTMANN, W., KUCHLER, J., KOCH, A., FRIEDRICH, N., WAHA, A., ENDL, E., CZERWITZKI, J., METZGER, D., STEINER, S., WURST, P., LEUSCHNER, I., VON SCHWEINITZ, D., BUETTNER, R. & PIETSCH, T. 2009. Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival.

- Clin Cancer Res*, 15, 4538-45.
- HARTMANN, W., WAHA, A., KOCH, A., GOODYER, C. G., ALBRECHT, S., VON SCHWEINITZ, D. & PIETSCH, T. 2000. p57(KIP2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(KIP2), IGF2, and H19. *Am J Pathol*, 157, 1393-403.
- HEITMAN, J., MOVVA, N. R. & HALL, M. N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253, 905-9.
- HILES, I. D., OTSU, M., VOLINIA, S., FRY, M. J., GOUT, I., DHAND, R., PANAYOTOU, G., RUIZ-LARREA, F., THOMPSON, A., TOTTY, N. F. & ET AL. 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*, 70, 419-29.
- INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J. & GUAN, K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4, 648-57.
- JASINGHE, V. J., XIE, Z., ZHOU, J., KHNG, J., POON, L. F., SENTHILNATHAN, P., GLASER, K. B., ALBERT, D. H., DAVIDSEN, S. K. & CHEN, C. S. 2008. ABT-869, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, in combination with rapamycin is effective for subcutaneous hepatocellular carcinoma xenograft. *J Hepatol*, 49, 985-97.
- JEFFERIES, H. B., FUMAGALLI, S., DENNIS, P. B., REINHARD, C., PEARSON, R. B. & THOMAS, G. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J*, 16, 3693-704.
- KAHAN, B. D., JULIAN, B. A., PESCOVITZ, M. D., VANRENTERGHEM, Y. & NEYLAN, J. 1999. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. Rapamune Study Group. *Transplantation*, 68, 1526-32.
- KAHAN, B. D., YAKUPOGLU, Y. K., SCHOENBERG, L., KNIGHT, R. J., KATZ, S. M., LAI, D. & VAN BUREN, C. T. 2005. Low incidence of malignancy among sirolimus/cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation*, 80, 749-58.
- KAPOOR, A. 2008. Malignancy in kidney transplant recipients. *Drugs*, 68 Suppl 1, 11-9.
- KINGSTON, J. E., HERBERT, A., DRAPER, G. J. & MANN, J. R. 1983. Association between hepatoblastoma and polyposis coli. *Arch Dis Child*, 58, 959-62.
- KOCH, A., DENKHAUS, D., ALBRECHT, S., LEUSCHNER, I., VON SCHWEINITZ, D. & PIETSCH, T. 1999. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*, 59, 269-73.
- KOH, K. N., PARK, M., KIM, B. E., BAE, K. W., KIM, K. M., IM, H. J. & SEO, J. J. 2011. Prognostic implications of serum alpha-fetoprotein response during treatment of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 57, 554-60.
- KOMURA, E., MATSUMURA, T., KATO, T., TAHARA, T., TSUNODA, Y. & SAWADA, T. 1998. Thrombopoietin in patients with hepatoblastoma. *Stem Cells*, 16, 329-33.
- KRUEGER, D. A., CARE, M. M., HOLLAND, K., AGRICOLA, K., TUDOR, C., MANGESHKAR, P., WILSON, K. A., BYARS, A., SAHMOUD, T. & FRANZ, D. N. 2010. Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *N Engl J Med*, 363, 1801-11.
- LANG, S. A., GAUMANN, A., KOEHL, G. E., SEIDEL, U., BATAILLE, F., KLEIN, D., ELLIS, L. M., BOLDER, U., HOFSTAEDTER, F., SCHLITT, H. J., GEISLER, E. K. & STOELTZING, O. 2007. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer*, 120, 1803-10.
- LE TOURNEAU, C., FAIVRE, S., SEROVA, M. & RAYMOND, E. 2008. mTORC1 inhibitors: is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work? *Br J Cancer*, 99, 1197-203.

- LEONARD, G. D., FOJO, T. & BATES, S. E. 2003. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, 8, 411-24.
- LI, J., KIM, S. G. & BLENIS, J. 2014. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 19, 373-9.
- LI, Y. M. & HALL, W. A. 2010. Targeted toxins in brain tumor therapy. *Toxins (Basel)*, 2, 2645-62.
- LIAO, H., HUANG, Y., GUO, B., LIANG, B., LIU, X., OU, H., JIANG, C., LI, X. & YANG, D. 2015. Dramatic antitumor effects of the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD2014 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res*, 5, 125-39.
- LIEBER, J., KIRCHNER, B., EICHER, C., WARMANN, S. W., SEITZ, G., FUCHS, J. & ARMEANU-EBINGER, S. 2010. Inhibition of Bcl-2 and Bcl-X enhances chemotherapy sensitivity in hepatoblastoma cells. *Pediatr Blood Cancer*, 55, 1089-95.
- LOGAN, C. Y. & NUSSE, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- LOHMANN, S., HEROLD, A., BERGAUER, T., BELOUSOV, A., BETZL, G., DEMARIO, M., DIETRICH, M., LUISTRO, L., POIGNEE-HEGER, M., SCHOSTACK, K., SIMCOX, M., WALCH, H., YIN, X., ZHONG, H. & WEISSER, M. 2012. Gene expression analysis in biomarker research and early drug development using function tested reverse transcription quantitative real-time PCR assays. *Methods*.
- MACDONALD, B. T., TAMAI, K. & HE, X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17, 9-26.
- MANN, J. R., KASTHURI, N., RAAFAT, F., PINCOTT, J. R., PARKES, S. E., MUIR, K. R., INGRAM, L. C. & CAMERON, A. H. 1990. Malignant hepatic tumours in children: incidence, clinical features and aetiology. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 4, 276-89.
- MANNING, B. D., TEE, A. R., LOGSDON, M. N., BLENIS, J. & CANTLEY, L. C. 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, 10, 151-62.
- MARTEL, R. R., KLICIUS, J. & GALET, S. 1977. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*, 55, 48-51.
- MATHEW, T., KREIS, H. & FRIEND, P. 2004. Two-year incidence of malignancy in sirolimus-treated renal transplant recipients: results from five multicenter studies. *Clin Transplant*, 18, 446-9.
- MCCMAHON, A. P., INGHAM, P. W. & TABIN, C. J. 2003. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*, 53, 1-114.
- MERCHANT, A. A. & MATSUI, W. 2010. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res*, 16, 3130-40.
- 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. 2008. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, 372, 449-56.
- NAKAGAWARA, A., IKEDA, K., TSUNEYOSHI, M., DAIMARU, Y., ENJOJI, M., WATANABE, I., IWAFUCHI, M. & SAWADA, T. 1985. Hepatoblastoma producing both alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin. Clinicopathologic analysis of four cases and a review of the literature. *Cancer*, 56, 1636-42.
- NICHOLSON, K. M. & ANDERSON, N. G. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, 14, 381-95.
- NIELSEN, D., BRIEM-RICHTER, A., SORNSAKRIN, M., FISCHER, L., NASHAN, B. & GANSCHOW, R. 2011. The use of everolimus in pediatric liver transplant recipients:

- first experience in a single center. *Pediatr Transplant*, 15, 510-4.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C. & WIESCHAUS, E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287, 795-801.
- PERILONGO, G., MAIBACH, R., SHAFFORD, E., BRUGIERES, L., BROCK, P., MORLAND, B., DE CAMARGO, B., ZSIROS, J., ROEBUCK, D., ZIMMERMANN, A., ARONSON, D., CHILDS, M., WIDING, E., LAITHIER, V., PLASCHKES, J., PRITCHARD, J., SCOPINARO, M., MACKINLAY, G. & CZAUDERNA, P. 2009. Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma. *N Engl J Med*, 361, 1662-70.
- PERILONGO, G. & SHAFFORD, E. A. 1999. Liver tumours. *Eur J Cancer*, 35, 953-8; discussion 958-9.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PIETSCH, T., FONATSCH, C., ALBRECHT, S., MASCHKE, H., WOLF, H. K. & VON SCHWEINITZ, D. 1996. Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest*, 74, 809-18.
- PIGUET, A. C., SEMELA, D., KEOGH, A., WILKENS, L., STROKA, D., STOUPIIS, C., ST-PIERRE, M. V. & DUFOUR, J. F. 2008. Inhibition of mTOR in combination with doxorubicin in an experimental model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 49, 78-87.
- POLAKIS, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14, 1837-51.
- RAINIER, S., DOBRY, C. J. & FEINBERG, A. P. 1995. Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res*, 55, 1836-8.
- RAO, R. D., BUCKNER, J. C. & SARKARIA, J. N. 2004. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors as anti-cancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*, 4, 621-35.
- RIZELL, M., ANDERSSON, M., CAHLIN, C., HAFSTROM, L., OLAUSSON, M. & LINDNER, P. 2008. Effects of the mTOR inhibitor sirolimus in patients with hepatocellular and cholangiocellular cancer. *Int J Clin Oncol*, 13, 66-70.
- ROEBUCK, D. J., ARONSON, D., CLAPUYT, P., CZAUDERNA, P., DE VILLE DE GOYET, J., GAUTHIER, F., MACKINLAY, G., MAIBACH, R., MCHUGH, K., OLSEN, O. E., OTTE, J. B., PARIENTE, D., PLASCHKES, J., CHILDS, M. & PERILONGO, G. 2007. 2005 PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group. *Pediatr Radiol*, 37, 123-32; quiz 249-50.
- SABERS, C. J., MARTIN, M. M., BRUNN, G. J., WILLIAMS, J. M., DUMONT, F. J., WIEDERRECHT, G. & ABRAHAM, R. T. 1995. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*, 270, 815-22.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SCHMELZLE, T. & HALL, M. N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103, 253-62.
- SCHNITZBAUER, A. A., ZUELKE, C., GRAEB, C., ROCHON, J., BILBAO, I., BURRA, P., DE JONG, K. P., DUVOUX, C., KNETEMAN, N. M., ADAM, R., BECHSTEIN, W. O., BECKER, T., BECKEBAUM, S., CHAZOILLERES, O., CILLO, U., COLLEDAN, M., FANDRICH, F., GUGENHEIM, J., HAUSS, J. P., HEISE, M.,

- HIDALGO, E., JAMIESON, N., KONIGSRAINER, A., LAMBY, P. E., LERUT, J. P., MAKISALO, H., MARGREITER, R., MAZZAFERRO, V., MUTZBAUER, I., OTTO, G., PAGEAUX, G. P., PINNA, A. D., PIRENNE, J., RIZELL, M., ROSSI, G., ROSTAING, L., ROY, A., TURRION, V. S., SCHMIDT, J., TROISI, R. I., VAN HOEK, B., VALENTE, U., WOLF, P., WOLTERS, H., MIRZA, D. F., SCHOLZ, T., STEININGER, R., SODERDAHL, G., STRASSER, S. I., JAUCH, K. W., NEUHAUS, P., SCHLITT, H. J. & GEISSLER, E. K. 2010. A prospective randomised, open-labeled, trial comparing sirolimus-containing versus mTOR-inhibitor-free immunosuppression in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 10, 190.
- SEELIGER, H., GUBA, M., KLEESPIES, A., JAUCH, K. W. & BRUNS, C. J. 2007. Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 26, 611-21.
- SEHGAL, S. N. 2003. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*, 35, 7S-14S.
- SEHGAL, S. N., BAKER, H. & VEZINA, C. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 28, 727-32.
- STALLONE, G., SCHENA, A., INFANTE, B., DI PAOLO, S., LOVERRE, A., MAGGIO, G., RANIERI, E., GESUALDO, L., SCHENA, F. P. & GRANDALIANO, G. 2005. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*, 352, 1317-23.
- SUN, S. Y., ROSENBERG, L. M., WANG, X., ZHOU, Z., YUE, P., FU, H. & KHURI, F. R. 2005. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res*, 65, 7052-8.
- TEJANI, A., ALEXANDER, S., ETTENGER, R., LERNER, G., ZIMMERMAN, J., KOHAUT, E. & BRISCOE, D. M. 2004. Safety and pharmacokinetics of ascending single doses of sirolimus (Rapamune, rapamycin) in pediatric patients with stable chronic renal failure undergoing dialysis. *Pediatr Transplant*, 8, 151-60.
- TERADA, N., PATEL, H. R., TAKASE, K., KOHNO, K., NAIRN, A. C. & GELFAND, E. W. 1994. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11477-81.
- TOMLINSON, G. E., DOUGLASS, E. C., POLLOCK, B. H., FINEGOLD, M. J. & SCHNEIDER, N. R. 2005. Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. *Genes Chromosomes Cancer*, 44, 177-84.
- UM, S. H., FRIGERIO, F., WATANABE, M., PICARD, F., JOAQUIN, M., STICKER, M., FUMAGALLI, S., ALLEGRINI, P. R., KOZMA, S. C., AUWERX, J. & THOMAS, G. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431, 200-5.
- VASQUEZ, E. M. 2000. Sirolimus: a new agent for prevention of renal allograft rejection. *Am J Health Syst Pharm*, 57, 437-48; quiz 449-51.
- VEZINA, C., KUDELSKI, A. & 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, 721-6.
- VIVANCO, I. & SAWYERS, C. L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, 489-501.
- VOGEL, C. L., COBLEIGH, M. A., TRIPATHY, D., GUTHEIL, J. C., HARRIS, L. N., FEHRENBACHER, L., SLAMON, D. J., MURPHY, M., NOVOTNY, W. F., BURCHMORE, M., SHAK, S., STEWART, S. J. & PRESS, M. 2002. Efficacy and

- safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20, 719-26.
- VON SCHWEINITZ, D. 2006. Management of liver tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg*, 15, 17-24.
- VON SCHWEINITZ, D., BYRD, D. J., HECKER, H., WEINEL, P., BODE, U., BURGER, D., ERTTMANN, R., HARMS, D. & MILDENBERGER, H. 1997. Efficiency and toxicity of ifosfamide, cisplatin and doxorubicin in the treatment of childhood hepatoblastoma. Study Committee of the Cooperative Paediatric Liver Tumour Study HB89 of the German Society for Paediatric Oncology and Haematology. *Eur J Cancer*, 33, 1243-9.
- VON SCHWEINITZ, D., HECKER, H., HARMS, D., BODE, U., WEINEL, P., BURGER, D., ERTTMANN, R. & MILDENBERGER, H. 1995. Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. *J Pediatr Surg*, 30, 845-52.
- WAN, X., HARKAVY, B., SHEN, N., GROHAR, P. & HELMAN, L. J. 2007. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*, 26, 1932-40.
- WAN, X., SHEN, N., MENDOZA, A., KHANNA, C. & HELMAN, L. J. 2006. CCI-779 inhibits rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1alpha/VEGF signaling. *Neoplasia*, 8, 394-401.
- WANG, Z., ZHOU, J., FAN, J., TAN, C. J., QIU, S. J., YU, Y., HUANG, X. W. & TANG, Z. Y. 2009. Sirolimus inhibits the growth and metastatic progression of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135, 715-22.
- WARMANN, S., HUNGER, M., TEICHMANN, B., FLEMMING, P., GRATZ, K. F. & FUCHS, J. 2002. The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma: clinical course and in vivo model. *Cancer*, 95, 1795-801.
- WEI, Y., FABRE, M., BRANCHEREAU, S., GAUTHIER, F., PERILONGO, G. & BUENDIA, M. A. 2000. Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene*, 19, 498-504.
- WEINBERG, A. G. & FINEGOLD, M. J. 1983. Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol*, 14, 512-37.
- WHITMAN, M., DOWNES, C. P., KEELER, M., KELLER, T. & CANTLEY, L. 1988. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*, 332, 644-6.
- WILLEMS, L., TAMBURINI, J., CHAPUIS, N., LACOMBE, C., MAYEUX, P. & BOUSCARY, D. 2012. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep*, 14, 129-38.
- WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R. & HALL, M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124, 471-84.
- ZATKOVA, A., ROUILLARD, J. M., HARTMANN, W., LAMB, B. J., KUICK, R., ECKART, M., VON SCHWEINITZ, D., KOCH, A., FONATSCH, C., PIETSCH, T., HANASH, S. M. & WIMMER, K. 2004. Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 39, 126-37.
- ZHANG, J. F., LIU, J. J., LU, M. Q., CAI, C. J., YANG, Y., LI, H., XU, C. & CHEN, G. H. 2007. Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transpl Immunol*, 17, 162-8.
- ZHU, A. X. & HEZEL, A. F. 2011. Development of molecularly targeted therapies in biliary tract cancers: reassessing the challenges and opportunities. *Hepatology*, 53, 695-704.

Literaturverzeichnis

ZSIROS, J., MAIBACH, R., SHAFFORD, E., BRUGIERES, L., BROCK, P., CZAUDERNA, P., ROEBUCK, D., CHILDS, M., ZIMMERMANN, A., LAITHIER, V., OTTE, J. B., DE CAMARGO, B., MACKINLAY, G., SCOPINARO, M., ARONSON, D., PLASCHKES, J. & PERILONGO, G. 2010. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study. *J Clin Oncol*, 28, 2584-90.

9 Abkürzungsverzeichnis

4-EBP-1	eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1
α	alpha
AFP	Alphafetoprotein
ALB	Albumin
AKT	Proteinkinase B (Serin/Threonin-Kinase)
Aqua dest.	lat.: aqua destillata, destilliertes Wasser
β	beta
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	engl. B-cell lymphoma 2
BSA	engl.: Bovine Serum Albumine
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	engl.: complementary DNA, komplementäre DNS
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	engl.: day, Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid, Desoxyribunukleinsäure
DMEM	engl.: Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetracyanat
et al.	und andere
FGF	engl.: fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisocyanat
FBS	engl.: fetale bovine serum, fetales Rinderserum
FCS	engl.: fetal calf serum, fetales Kälberserum
h	engl.: hour, Stunde
HIF1- α	Hypoxie-induzierter Faktor-1-alpha
HCC	engl.: hepatocellular carcinoma, hepatozelluläres Karzinom
HCL	Salzsäure
H ₂ O	Wasser

Abkürzungsverzeichnis

HRP	(engl.: hourse radish peroxidase) Meerrettichperoxidase
HR	Hochrisiko
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilo-Basenpaar
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KRT 19	Keratin 19
M	Mol
MDR	engl.: multi drug resistance, multiple Medikamentenresistenz
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mTOR	engl.: mammalian target of Rapamycin
MVD	Mikrovaskuläre Dichte
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
n	Nano
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NTPs (ATP, CTP, GTP, UTP)	Nukletid-TriPhosphat (Adenin-, Cytosin-, Guanin-, Uracil-)
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PARP	poly(adenosin diphosphate-ribose)polymerase
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1

Abkürzungsverzeichnis

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PVA	Prozentsatz des vaskularisierten Areal
PVP	Polyvinylpyrolidon
RNA	engl.: ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	engl.: rounds per minute
RPMI	engl.: Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS-PAGE	engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SR	Standard Risiko
sec	Sekunde
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	engl.: unit, Einheit
V	Volt
VEGF	engl.: Vascular Endothelial Growth Factor
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

10 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich meine Doktorarbeit erfolgreich durchführen konnte.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, dem ehemaligen Direktor der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München, der mir die Möglichkeit gab meine Doktorarbeit in den kinderchirurgischen Forschungslaboratorien durchführen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Kappler für die ausgezeichnete Betreuung und fachliche Unterstützung.

Speziell danken möchte ich auch meinem Betreuer PD Dr. med. Ferdinand Wagner, der mir jederzeit mit hilfreichem Rat zur Seite stand.

Desweiteren möchte ich den technischen Assistentinnen Shiva Promoli, Anett Domokos und Nicole Stadler für ihre Hilfe danken, sowie Johanna Helmbrecht und Saskia Joppien, die mir durch ihre Erfahrung und ihr Wissen eine große Hilfe bei der Durchführung verschiedener Experimente waren.

Mein Dank gilt auch Herrn Rudolf Lehner, der sich liebevoll als Tierpfleger um die Mäuse kümmerte.

Meinen Eltern und meinem Ehemann Thomas danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie immer für mich da waren, immer an mich geglaubt haben und mich in jeglicher Situation unterstützt haben.

11 Eidesstattliche Versicherung

Jochner, Bente

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Rapamycin als neue Therapieoption in der Behandlung von Hochrisiko-
Hepatoblastompatienten

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, 14.03.23

Bente Jochner

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

12 Publikation

Wagner F, Henningsen B, Lederer C, Eichenmüller M, Gödeke J, Müller-Höcker J, von Schweinitz D, Kappler R. „Rapamycin blocks hepatoblastoma growth in vitro and in vivo implicating new treatment options in high-risk patients.“ Eur J Cancer. 2012 Oct;48(15):2442-50. doi: 10.1016/j.ejca.2011.12.032. Epub 2012 Jan 28