

AUS DER ABTEILUNG
FÜR PÄDIATRISCHE HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND
STAMMZELLTRANSPLANTATION
PROF. DR. SELIM CORBACIOGLU
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

TESTUNG VERSCHIEDENER mTOR-INHIBITOREN ZUR VERBESSERUNG DER
RIS-THERAPIE IN EINEM IN-VITRO MODELL DES NEUROBLASTOMS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rebecca Brigitta Wätzig

2021

AUS DER ABTEILUNG
FÜR PÄDIATRISCHE HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND
STAMMZELLTRANSPLANTATION
PROF. DR. SELIM CORBACIOGLU
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

TESTUNG VERSCHIEDENER mTOR-INHIBITOREN ZUR VERBESSERUNG DER
RIS-THERAPIE IN EINEM IN-VITRO MODELL DES NEUROBLASTOMS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rebecca Brigitta Wätzig

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Selim Corbacioglu
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Tobias Pukrop
Betreuerin:	PD Dr. Gunhild Sommer
Tag der mündlichen Prüfung:	01.04.2022

Abstract

Neuroblastoma (NB) is one of the most common malignancies in childhood. The prognosis for patients with high-risk NB or relapsed respectively treatment refractory disease (rNB) remains poor and novel therapeutic options are urgently needed. The RIST therapy, a multimodal therapy approach combining biologicals (Rapamycin and Dasatinib) with conventional chemotherapy (Irinotecan and Temozolomide) in a metronomic way has shown promising results in a compassionate use setting.

Contrary to expectations the anti-tumor effect of the actual used allosteric mTOR inhibitor Rapamycin was only modest in clinical investigation and it is assumed that new ATP competitive mTOR inhibitors – like Torin 1, Torin 2, PP2A and AZD3147 – could improve the efficiency by a more selective and potent inhibition of the mTOR signalling pathway. After testing various ATP competitive mTOR inhibitors in viability assays Torin 2 stood out as significant improvement compared to Rapamycin in inhibiting the viability of three different NB cell lines at significant lower concentrations. Therefore, Rapamycin and Torin 2 were compared alone or in combinations that are used in the RIST therapy approach to potentially contribute to an improvement of the therapy protocol. The study demonstrated that tested neuroblastoma cell lines are more sensitive to Torin 2 leading to a considerably lower treatment dose compared to Rapamycin. The effect of both combinations of the mTOR inhibitors with Dasatinib has shown to be synergistic. Additionally, Torin 2 inhibited mTOR signalling more potent and completely than Rapamycin. A further investigation of the impact on cell cycle progression by combination treatments showed an inhibition of Cyclin D1 and induction of p21 expression. This mechanism might contribute to the induction of G₁ cell cycle arrest in NB cells. The alternative RIST treatment with Torin 2 affected NB cells lines relating to suppression of cell viability and induction of apoptosis as effective as Rapamycin despite a thousandfold reduced concentration applied.

Zusammenfassung

Das Neuroblastom (NB) stellt eine der häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter dar. Patient/innen mit Hoch-Risiko- bzw. rezidivierten oder unter Therapie refraktären Tumoren haben weiterhin eine ungünstige Prognose, weshalb die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dringend notwendig ist. Die RIST-Therapie, ein multimodaler Therapieansatz, in dem Biologika (Dasatinib und Rapamycin) mit einer „milden“ konventionellen Chemotherapie (Irinotecan und Temozolomid) in metronomischer Weise kombiniert werden, konnte in einer Pilotstudie bereits vielversprechende Ergebnisse liefern.

Entgegen der Erwartungen konnte der in der Kombinationstherapie bisher verwendete allosterisch wirkende mTOR-Inhibitor Rapamycin in klinischen Studien verschiedener Krebserkrankungen nur moderate Effekte erzielen. Es wird angenommen, dass die Effektivität der Behandlung durch neue ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren – wie Torin 1, Torin 2, AZD3147 oder PP242 – aufgrund ihrer hochselektiven und potenten Hemmung des mTOR-Signalwegs gesteigert werden kann. Das Ziel dieser Studie war eine vergleichende Untersuchung von Torin 2 und Rapamycin in Einzelbehandlung beziehungsweise in Kombination entsprechend dem RIST-Therapieschema, um möglicherweise zu einer Verbesserung des Therapieprotokolls beizutragen. Es konnte gezeigt werden, dass die IC₅₀-Konzentrationen durch eine höhere Sensitivität der NB-Zelllinien gegenüber Torin 2 im Vergleich zu Rapamycin deutlich reduziert werden. Die Kombinationstherapien der mTOR-Inhibitoren Rapamycin beziehungsweise Torin 2 mit Dasatinib wiesen beide eine synergistische Wirkung auf. Zudem wurde eine stärkere und umfassendere Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Torin 2 nachgewiesen. Die Untersuchung des Einflusses der Kombinationstherapie auf die Zellzyklus-Progression zeigte eine Inhibition der Cyclin-D1- und Induktion der p21-Expression. Dieser Mechanismus trägt möglicherweise zur Induktion des G₁-Zellzyklus-Arrests bei. Die alternative RIST-Therapie mit Torin 2 führte trotz der tausendfach reduzierten Behandlungsdosis zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich einer Hemmung der Zellviabilität und Induktion von Apoptose.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	5
Zusammenfassung	6
Inhaltsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	12
Abbildungsverzeichnis	13
1 Einleitung	15
1.1 Das Neuroblastom	15
1.2 RIST-Therapie	16
1.3 PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade	18
1.3.1 Die mTOR-Signalkaskade	20
1.3.2 Die Rolle der mTOR-Signalkaskade bei Krebserkrankungen	21
1.4 mTOR-Inhibitoren	22
1.4.1 Rapamycin und Rapaloga	22
1.4.2 ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren	24
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Verwendete Geräte, Software, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien und Antikörper	29
2.1.2 Zellkultur	33
2.1.2.1 Medien und Reagenzien für die Zellkultur	34
2.1.3 Puffer und Reagenzien für Westernblot	35
2.1.4 Medikamente	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Zellkultur, Passage und Aussaat	37
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer	38
2.2.3 Ausschluss einer Mycoplasma-Kontamination	38
2.2.4 MTT-Assay zur Bestimmung der IC ₅₀	39
2.2.4.1 IC ₅₀ -Bestimmung bei Einzelbehandlung	40
2.2.4.2 IC ₅₀ -Bestimmung bei Doppelbehandlung	42
2.2.4.3 Untersuchung zum Effekt der Kombinationstherapie (= Doppelbehandlung)	43
2.2.4.4 IC ₅₀ -Bestimmung in der Zelllinie Tet21N	45
2.2.5 Durchführung der <i>in-vitro</i> -RIST-Therapie	46

2.2.6	Untersuchung der Proteinexpression und -phosphorylierung mittels Westernblot-Analysen	48
2.2.7	Untersuchung der Induktion von Seneszenz mittels β -Galactosidase-Färbung	52
2.2.8	Statistische Verfahren	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Aktivierung des Seneszenz-Signalwegs durch die Biologika- Vorbehandlung	55
3.2	Keine erhöhte Sensitivität MycN-exprimierender Tet21N-Zellen gegenüber Rapamycin	57
3.3	IC ₅₀ -Konzentrationen bei Einzel- und Doppelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Torin 2	59
3.4	IC ₅₀ -Konzentrationen bei Einzel- und Doppelbehandlung mit Irinotecan und Temozolomid	63
3.5	Synergistische Wirkung der Kombinationsbehandlungen	64
3.6	Vergleichbare Viabilitätshemmung durch TIST- und RIST-Therapie	66
3.7	Effektive Hemmung der mTOR-Signalkaskade	67
3.8	Hemmung der AKT-Aktivität	71
3.9	Apoptose und Autophagie	72
4	Diskussion	75
4.1	Hinweise auf Seneszenz-Induktion durch die Vorbehandlung mit der Biologika-Kombination	75
4.2	Keine erhöhte Sensitivität gegenüber Rapamycin der induzierbaren MycN-exprimierenden Tet21N-Zellen	76
4.3	Reduktion der IC ₅₀ -Konzentration von mikromolaren auf nanomolare Bereiche durch Torin 2	77
4.4	Synergistische Wirkung der Kombinationstherapie	78
4.5	Verstärkte Hemmung der mTOR-Komplexe durch Torin 2	79
4.6	Einfluss auf MycN	81
4.7	Einfluss auf die Zellzyklus-regulierenden Proteine Cyclin D1 und p21 .	82
4.8	Apoptose und Autophagie	85
4.9	Vergleichbare Wirkung der TIST-Therapie	85
4.10	Ausblick	86
5	Literaturverzeichnis	87
6	Anhang	103
6.1	Untersuchung der Zellkultur auf eine Kontamination mit Mycoplasmen	103
6.2	Induktion von Seneszenz	103
6.3	IC ₅₀ -Bestimmung bei Einzelbehandlung	104
6.4	Publikation	106
7	Danksagung	119

Eidesstattliche Erklärung..... 121

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	Eukaryotic Initiating Factor 4E Binding Protein
AKT (PKB)	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	Proteinkinase ARM
ATM	Proteinkinase ATM
BSA	Bovines Serumalbumin
CI	Combination Index
CdK	Cycline-dependent kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinasen
DRF	Dosis-Reduktions-Faktor
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF4E	eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor 4E
FA	Fraction Affected
FBS	Fetal Bovine Serum
GBM	Glioblastom
IC ₅₀	Mittlere/halbmaximale inhibitorische Konzentration
IGF	Insulin-like Growth Factor
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
LC3B	Microtubule-associated protein light chain 3
MTD	Maximal Tolerierte Dosis
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1 und 2	mTOR-Complex 1 und 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NB	Neuroblastom
NEAA	Non Essential Aminoacids
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDK1	Phosphoinositide-dependent Kinase 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PI3K-Kinasen	Phosphoinositid-3-Kinase-abhängige Kinase
PKC	Proteinkinase C

PP2A	Proteinphosphatase 2A
RIST-Therapie	Kombinationstherapie aus Rapamune [®] (Rapamycin), Irinomedac [®] (Irinotecan), Sprycel [®] (Dasatinib) und Temomedac [®] (Temozolomid)
rNB	rezidiertes oder unter Therapie refraktäres Neuroblastom
rpS6	ribosomales Protein S6
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S6K1/2	ribosomale Proteinkinase S6 1/2
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-LB	SDS-Loading Buffer
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Electrophoresis
Ser	Serin
SGK	Serum- und Glucocorticoid-induzierte Proteinkinase (Serin-Threonin-Kinase)
T75-Flasche	75 cm ² -Zellkultur-Flasche
Thr	Threonin
TIST-Therapie	RIST-Therapie mit Torin 2 anstelle von Rapamycin
TSC	Tuberous sclerosis complex
β-Gal	β-Galactosidase
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
β-ME	β-Mercaptoethanol
WB	Westernblot

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	29
Tabelle 2: Software	29
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	30
Tabelle 5: Antikörper	31
Tabelle 6: Zelllinien	33
Tabelle 7: Medikamente für die Behandlung der Zellen.....	36
Tabelle 8: Bedeutung der CI-Werte	44
Tabelle 9: Ausplattieren in 12-Well-Plates für die Herstellung von Proteinlysaten	48
Tabelle 10: Zusammensetzung der Trenn- bzw. Sammelgele	49
Tabelle 11: IC ₅₀ -Konzentration in der Zelllinie Tet21N	58
Tabelle 12: Vergleich der IC ₅₀ -Konzentrationen der mTOR-Inhibitoren in den Zelllinien Kelly und IMR-32	59
Tabelle 13: IC ₅₀ -Konzentrationen Einzelbehandlung mit Biologika	61
Tabelle 14: IC ₅₀ -Konzentrationen und Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) bei Doppelbehandlung mit Biologika	61
Tabelle 15: IC ₅₀ -Konzentrationen bei Einzelbehandlung mit Chemotherapeutikum	63
Tabelle 16: IC ₅₀ -Konzentrationen und Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) bei Doppelbehandlung mit Chemotherapeutika	63
Tabelle 17: Kombinatorische Indices (CI) bei Doppelbehandlung mit Biologika.....	65
Tabelle 18: Kombinatorische Indices (CI) bei Doppelbehandlung mit Chemotherapeutika	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Angriffspunkte der Medikamente der RIST-Therapie.....	17
Abbildung 2: PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade	19
Abbildung 3: mTOR-Hemmung durch Rapalogs und ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren im Vergleich	25
Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinien	33
Abbildung 5: Metabolische Umwandlung von MTT in lebenden Zellen	40
Abbildung 6: Titrationsschema zur Ermittlung der IC ₅₀ -Werte bei Doppelbehandlung.....	42
Abbildung 7: Schema der <i>in-vitro</i> -RIST-Therapie	47
Abbildung 8: Aufbau Westernblot	50
Abbildung 9: β-Galactosidase-Färbung nach Einzel- und Doppelbehandlung.....	56
Abbildung 10: MycN-Expression während des MTT-Versuchs zur IC ₅₀ -Bestimmung von Rapamycin in der Zelllinie Tet21N	58
Abbildung 11: Zellviabilitätskurve zur IC ₅₀ -Bestimmung für Rapamycin in der Zelllinie Tet21N.....	58
Abbildung 12: Zellviabilitätskurven zur IC ₅₀ -Bestimmung für Dasatinib, Rapamycin und Torin 2 in der Zelllinie Kelly	60
Abbildung 13: Reduktion der Zellviabilität durch Doppelbehandlung mit Biologika....	62
Abbildung 14: Reduktion der Zellviabilität durch Doppelbehandlung mit Chemotherapeutika	64
Abbildung 15: Vergleich der „RIST-Therapie“ mit dem alternativen Schema „TIST-Therapie“	66
Abbildung 16: Hemmung der mTOR-Signalkaskade durch Biologika- Doppelbehandlung	67
Abbildung 17: Auswirkungen auf die Proteine MycN und Cyclin D1	69
Abbildung 18: Steigerung der p21-Expression durch Biologika-Behandlung.....	70
Abbildung 19: Hemmung der Phosphorylierung von AKT durch Biologika- Doppelbehandlung	71
Abbildung 20: Induktion von Apoptose und Autophagie durch Biologika- Doppelbehandlung	72
Abbildung 21: Induktion von Apoptose durch RIST- und TIST-Therapie.....	73
Abbildung 22: Agarose-Gel nach Mycoplasma-PCR	103
Abbildung 23: Vorversuch zur Induktion von Seneszenz.....	103
Abbildung 24: Zellviabilitätskurven der Einzelbehandlungen mit Dasatinib, Torin 2 und Rapamycin	104
Abbildung 25: Zellviabilitätskurven der Einzelbehandlungen mit Irinotecan und Temozolomid	104

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom (NB) ist die häufigste Form extrakranieller, solider Tumoren im Kindesalter (1). Im ersten Lebensjahr ist das NB vor den Leukämien die am häufigsten diagnostizierte maligne Erkrankung (2–4), 90 % der Diagnosen erfolgen in den ersten fünf Lebensjahren (5). Nach dem zehnten Lebensjahr tritt eine Erkrankung äußerst selten auf (4).

Das NB ist ein embryonaler Tumor des sympathischen Nervensystems und entwickelt sich aus primitiven Zellen des Neuralrohrs (6). Es tritt meist paraspinal im Thorax oder Abdomen auf (1), wobei etwa 50 % der NB im Nebennierenmark entstehen (1,4). Der andere Teil der Tumore hat seinen Ursprung in paraspinalen sympathischen Ganglien des Thorax, Abdomens oder Beckens (1).

Das NB ist eine heterogene Erkrankung mit verschiedensten klinischen Ausprägungen. Neben der vor allem bei Säuglingen vorkommenden spontanen Tumorregression und Ausreifung zum benignen Ganglioneurinom beziehungsweise Ganglioneuroblastom treten insbesondere bei Kindern, die bei Diagnose älter als ein Jahr sind, schwere, metastasierende Krankheitsbilder mit ungünstiger Prognose auf (1). Es besteht eine Abhängigkeit der Prognose von Alter, Stadium der Erkrankung, molekularer Biologie und zytogenetischen Eigenschaften des Tumors (4).

Unter allen pädiatrischen Krebserkrankungen bei Patient/innen unter 15 Jahren nimmt das NB etwa 7 % ein und ist für 15 % der onkologischen Todesfällen bei Kindern verantwortlich (7). Die 5-Jahresüberlebensrate lag in den Jahren 1985 – 1994 für Säuglinge < 1 Jahr bei 83 %, dagegen bei Kindern zwischen 5 und 9 Jahren bei 40 % (3). 55 % der Patient/innen > 1 Jahr weisen bereits bei Diagnose Metastasen auf und haben trotz intensiver Therapie nur eine geringe Überlebensrate (1).

Eine häufige genetische Auffälligkeit der NB-Zellen ist die Amplifikation des MycN-Onkogens. Die genetische Veränderung tritt vor allem in höheren Stadien auf und wird mit einer ungünstigen Prognose und rascher Tumorprogression assoziiert (5,8–10). Die Überexpression von Myc-Transkriptionsfaktoren kann Ursache einer Dysregulation von

Wachstum und Proliferation sein (1). Es wird angenommen, dass die MycN-Amplifikation im NB Angiogenese, Überleben und Metastasierung fördert und die Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem, die sogenannte Immunüberwachung, unterdrückt (11).

1.2 RIST-Therapie

Abhängig von Tumorstadium und prognostischen Faktoren werden die chirurgische Entfernung des Tumors mit Chemotherapie und gegebenenfalls Radiotherapie kombiniert (4). Die 5-Jahresüberlebensrate dieser Patient/innen ist aber weiterhin gering (6), weshalb in klinischen Studien neue Therapieansätze, wie beispielsweise die RIST-Therapie, getestet werden.

Die RIST-Therapie, eine multimodale Kombinationstherapie, setzt sich aus **Rapamune®** (Rapamycin), **Irinomedac®** (Irinotecan), **Sprycel®** (Dasatinib) und **Temomedac®** (Temozolomid) zusammen. Die Biologika Rapamycin und Dasatinib werden mit den Chemotherapeutika Temozolomid und Irinotecan in einem metronomischen Therapieschema angewandt (12). Das neuartigen Therapiemodell wird derzeit in einer randomisierten Phase-II-Studie im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie mit Irinotecan + Temozolomid unter Leitung von Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu getestet (RIST-rNB-2011, Clinical Trial.gov Identifier: NCT001467986, (12)). Die Studie soll Aufschluss geben, ob eine Vorbehandlung mit molekular wirksamen Medikamenten (Biologika) und Durchführung der Therapie in metronomischem Design eine Verbesserung der Neuroblastom-Behandlung bringt (12). Die Zielgruppe der Studie sind Patient/innen mit rezidivierendem oder Therapie-refraktärem Neuroblastom (rNB) (12), bei denen die Prognose trotz intensiver Therapien weiter ungünstig ist (9,13) und eine Verbesserung der Therapiemöglichkeiten dringend notwendig ist.

Kombinationstherapien, also die Kombination zweier oder mehrerer Medikamente, stellen häufig einen Vorteil in der Tumorthherapie dar: Durch additive oder synergistische Wirkmechanismen kann die Effektivität im Gegensatz zu Monotherapien gesteigert werden, während toxische Wirkungen durch eine niedrigere Dosierung unter Erhalt oder Steigerung der anti-Tumor-Effekte verringert werden können. Zudem wird die Entstehung von Therapieresistenzen minimiert beziehungsweise verzögert (14,15).

Metronomische Therapiedesigns zeichnen sich durch die in regelmäßigen Abständen durchgeführte Behandlung ohne lange Therapieunterbrechungen und mit geringen, weit unterhalb der maximal tolerierten Dosis (MTD) liegenden Medikamentendosen aus, wodurch

die klinischen Effektivität erhalten beziehungsweise sogar gesteigert und toxische Wirkungen reduziert werden können (16,17).

Bei der RIST-Therapie werden die Biologika im Wechsel mit den Chemotherapeutika verabreicht (18). Neben der Reduktion der Toxizität und Resistenzentwicklung sollen Krebszellen durch die Vorbehandlung mit den Biologika in einer Zellzyklusphase synchronisiert (18) und für die folgende Chemotherapie sensibilisiert werden (18–22). Bereits therapieresistente Tumorerkrankungen konnten mit metronomischen Therapiemodellen in präklinischen Untersuchungen effektiv behandelt werden (23). In verschiedenen Tumorentitäten wurden komplette oder partielle Remissionen durch Behandlung im metronomischen Therapiedesign erreicht (23,24).

Die RIST-Therapie wurde bereits *in vitro* und *in vivo* am Glioblastom (GBM) getestet und lieferte vielversprechende Resultate, wie eine signifikante Reduktion der Zellzahl und Viabilität, sowie eine Verlängerung des Überlebens und Verringerung der Tumorbelastung unter geringen unerwünschten Nebenwirkungen (18).

Im Folgenden werden die einzelnen Medikamente der RIST-Therapie und deren molekulare Ziele und Wirkmechanismen kurz erklärt. Die Angriffspunkte der Substanzen sind in Abbildung 1 dargestellt.

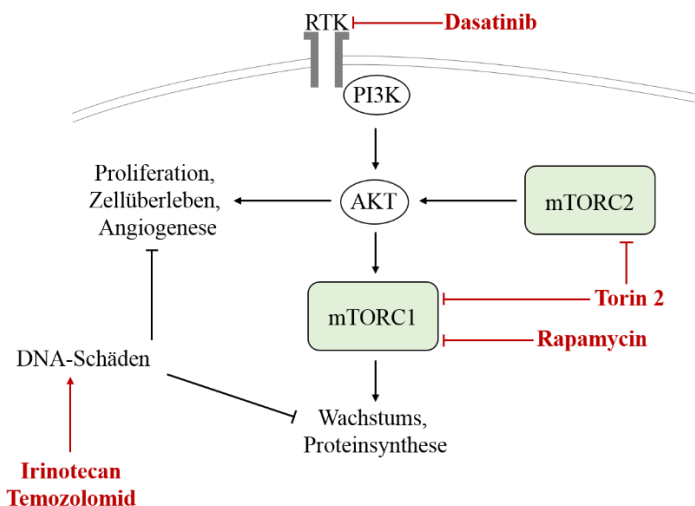


Abbildung 1: Angriffspunkte der Medikamente der RIST-Therapie

Darstellung der molekularen Angriffspunkte der Medikamente der RIST-Therapie. (RTK: Rezeptor-Tyrosin-Kinasen; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; AKT: Proteinkinase B (PKB); mTORC1 bzw. -2: mammalian Target of Rapamycin-Complex 1 bzw. 2)

Dasatinib

Dasatinib weist neben der zunächst charakterisierten Inhibition der Bcr-Abl-Tyrosinkinase eine hemmende Wirkung gegenüber weiteren Kinasen, wie den Src-Family- und Rezeptor-Tyrosinkinasen auf (25–27). In NB-Zelllinien konnte für Dasatinib ein antiproliferativer und antimigratorischer Effekt nachgewiesen werden (28).

Rapamycin und Torin 2

Rapamycin und Torin 2 stellen Vertreter der mTOR-Inhibitoren dar und werden tiefergehend in Kapitel 1.4.1 bzw. 1.4.2 erläutert.

Irinotecan

Irinotecan wird durch eine hepatische Carboxyesterase zum aktiven Metaboliten SN-38 (7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin) prozessiert. Durch die Interaktion mit der DNA-Topoisomerase-I werden DNA-Strangbrüche induziert, die zum Zelltod führen (29).

Temozolomid

Die zytotoxische Aktivität von Temozolomid wird durch den aktiven Metaboliten 5-(3-Methyltriazin-1-yl)-Imidazole-4-Carboxamide (MTIC) vermittelt und beruht auf der Schädigung der DNA durch Alkylierung (Methylierung von Guanin an O6 und N7) (30).

1.3 PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade

Der *Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)/mammalian Target of Rapamycin (mTOR)*-Signalweg beeinflusst maßgeblich die Regulation von Wachstum, Proliferation und Überleben von Zellen (31) und stellt einen der am häufigsten fehlregulierten Signalwege in humanen Tumoren dar (32–34). Im NB nimmt er eine zentrale Rolle für maligne Transformation und Progression ein (35). Eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs fördert das Wachstum und Überleben der Tumorzellen, sowie den zellulären Metabolismus (36). Meist sind eine Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) oder somatische Mutationen verschiedener Komponenten der Signalkaskade ursächlich (36).

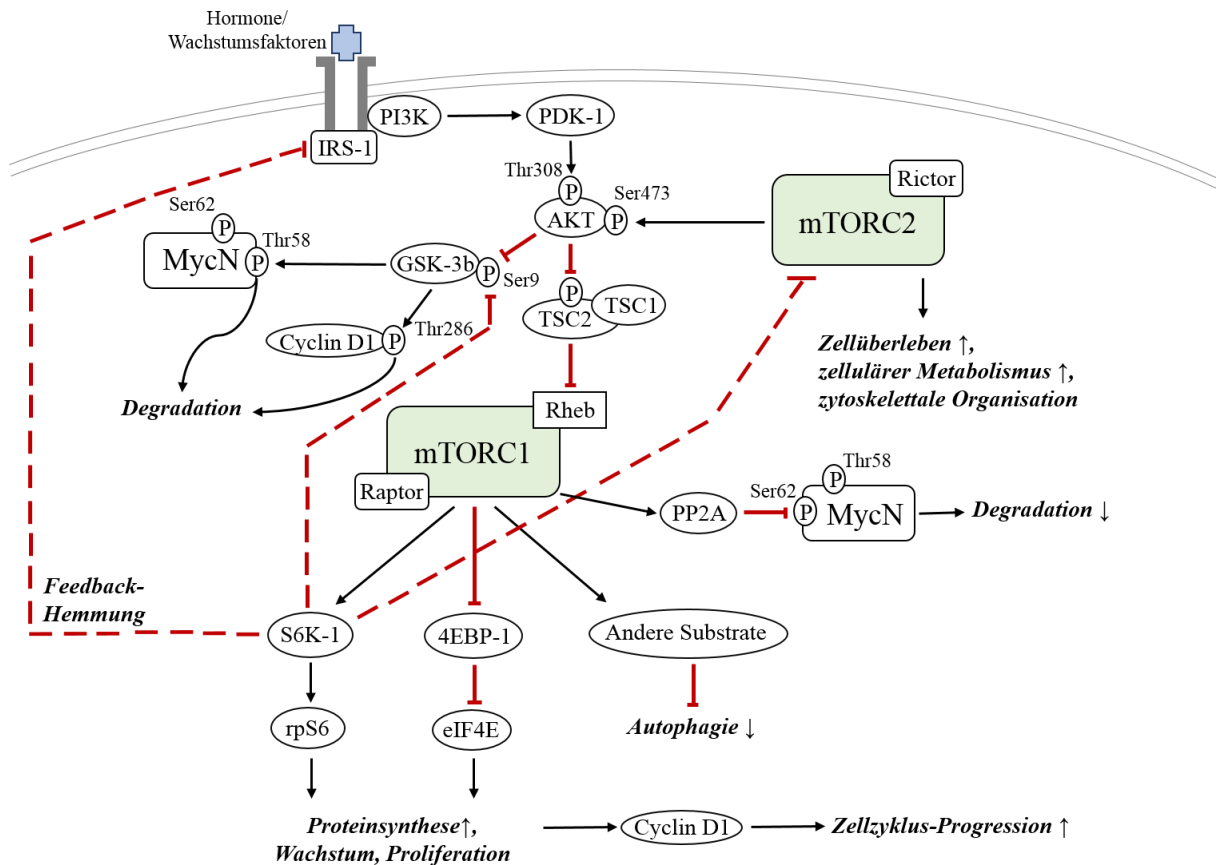


Abbildung 2: PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade

Darstellung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade in Anlehnung an (35,37–42).

Die durch Bindung von Wachstumsfaktoren an RTKs vermittelte Stimulation der PI3-Kinase wirkt sich auf verschiedene Signalkaskaden aus. So wird über Phosphorylierung und Aktivierung von *AKT* (auch PKB: Proteinkinase B) durch PDK-1 unter anderem die mTOR-Signalkaskade reguliert (43). *AKT* gilt in Tumoren als Haupteffektor von PI3K, wobei der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) als das wichtigste Substrat der Signalkette unterhalb von *AKT* angesehen wird (36).

Die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade stellt damit ein interessantes molekulares Ziel der Krebs-beziehungsweise NB-Therapie dar. Dies unterstreichen zahlreiche Untersuchungen, die bereits eine reduzierte Proliferation *in vitro*, sowie ein reduziertes Tumorwachstum *in vivo* durch Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs im NB nachgewiesen haben (44–51). Ein Eingriff in den Signalweg kann dabei auf verschiedenen Ebenen stattfinden. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem Anteil des mTOR-Systems, das im Folgenden tiefergehend erläutert wird.

1.3.1 Die mTOR-Signalkaskade

Das *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) stellt einen zentralen Regulationspunkt für Zellwachstum, Proliferation und zellulären Metabolismus dar (52). Es erfolgt die Integration verschiedener Signale, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Energiestatus, Aminosäuren und Stressbedingungen und die Umwandlung in eine der herrschenden Bedingungen angepassten zellulären Antwort (53,54). Diese Regulationsmechanismen stellen sicher, dass die Induktion von Wachstum, ein energetisch anspruchsvoller Prozess, nur bei ausreichender Versorgung der Zelle mit Energie und Ausgangssubstanzen und in Abwesenheit zellulärer Stresssignale erfolgt (40,42). Unter wachstumsstimulierenden Bedingungen wird die mRNA-Translation, Ribosomen-Biogenese (41) und G₁-Zellzyklus-Progression (52) gefördert und eine Zunahme der Zellgröße und Proliferation erreicht (41). Neben der Förderung der synthetischen Kapazität erfolgt zudem eine Unterdrückung kataboler Stoffwechselprozesse, vorwiegend der Autophagie (53,55). Autophagie stellt einen Stoffwechselweg des Abbaus und Recyclings zellulärer Komponenten wie Proteinen (Mikroautophagie) und Organellen (Makroautophagie) dar und trägt zum Überleben unter Einfluss von zellulärem Stress, sowie Mangelversorgung bei (56,57). Eine Fehlfunktion von Autophagie ist an der Entstehung zahlreicher Erkrankungen, wie beispielsweise Krebserkrankungen, beteiligt (56,57).

mTOR besteht aus derzeit zwei bekannten Komplexen: *mTORC1* und *-2* (mTOR-Komplex 1 und mTOR-Komplex 2) (58), die unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Komponenten, Substraten, zellulären Funktionen und Sensitivität gegenüber dem mTOR-Inhibitor Rapamycin aufweisen (53). Die Aktivierung des mTORC1 erfolgt durch eine AKT-vermittelte Hemmung des *TSC-Komplexes* (Tuberöser Sklerose Komplex), der den mTORC1 in aktivem Zustand unterdrückt (40,53,54). Die Hauptsubstrate des mTORC1 sind die *S6K1/2* (ribosomale Proteinkinasen S6 1/2) und die *4EBP1-3* (eukaryotic initiating factor 4E binding proteins 1-3), worüber die Proteintranslation und die G₁-Zellzyklus-Progression gesteigert und damit Zellwachstum und Proliferation gefördert werden (38,40,53).

Eine wichtige Funktion ist das S6K1-vermittelte negative Feedback, wodurch die PI3K/AKT-Signalkaskade über eine Herunterregulation des IRS-1 (Insulin-Rezeptor-Substrat 1) unterdrückt wird (59). IRS-Proteine vermitteln die Stimulation der PI3K-Signalkaskade durch Wachstumsfaktoren (60).

Über die mTORC2-Substrate *AKT* (auch PKB: Proteinkinase B), *PKC* (Proteinkinase C) und *SGK* (Serum- und Glucocorticoid-induzierte Proteinkinase) greift der mTOR-Signalweg in die Regulation von Zellüberleben, Proliferation und Metabolismus ein (42,53,61). mTOR ist somit

über den mTORC2 an der Regulation von AKT beteiligt und als mTORC1 gleichzeitig selbst Substrat von AKT (38).

Für die vollständige Aktivierung von AKT sind zwei Phosphorylierungen notwendig: zum einen an Thr308 durch die PDK-1 und zum anderen an Ser473 durch den mTORC2 (62).

1.3.2 Die Rolle der mTOR-Signalkaskade bei Krebserkrankungen

Die mTOR-Signalkaskade nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Proliferation und Metabolismus ein (52). Eine Dysregulation und Hyperaktivität der mTOR-Signalkaskade durch Mutationen verschiedener Signalweg-Komponenten beziehungsweise Proteinen, die mTOR regulieren, liegen in verschiedenen Tumorentitäten vor (40,52,63,64). Die Signalkaskade trägt in Krebszellen zu neoplastischem Wachstum und Progression bei und induziert eine metabolische Transformation, Anstieg der Proliferation und des Potentials zu Metastasierung und ist darüber an zahlreichen für die Tumorgenese wichtigen Prozessen beteiligt (37).

Es scheint eine Abhängigkeit von Tumoren mit Hyperaktivität des PI3K/AKT-Signalwegs beziehungsweise des Onkoproteins AKT von einer funktionierenden mTOR-Signalkaskade zu bestehen (43,55). Über die Aktivierung von AKT durch den mTORC2 werden für die Tumorgenese wichtige Prozesse wie Proliferation, Wachstum, Metabolismus, Angiogenese, Glukoseaufnahme und das Zellüberleben gefördert (61). Die Anwendung von mTOR-Inhibitoren greift in dieses System ein und könnte die Tumorgenese beziehungsweise das weitere Tumorwachstum unterdrücken.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits eine Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs im NB zeigen können (35,65,66). In der Studie von *Opel et al.* wurde eine Aktivierung des Signalwegs durch Phosphorylierung von AKT mit einer verkürzten Überlebensdauer und dem Vorhandensein genetischer Marker wie der MycN-Amplifikation, die mit aggressiven Tumoren assoziiert wird, in Verbindung gebracht (66). Laut *Iżycka-Świeszewska et al.* ist die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs bei High-Risk-NB besonders häufig zu finden (65).

Die Amplifikation von MycN tritt im NB vor allem in höhergradigen Tumoren auf und wird mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (5,10). Aufgrund der Förderung von Angiogenese, Überleben und Metastasierung, sowie Inhibition der Immunüberwachung durch die Amplifikation des Onkogens stellt MycN ein erfolgsversprechendes Ziel der Tumorthherapie dar

(11,67). Es wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, um die MycN-Expression zu senken, mit dem Ziel die Entwicklung, Wachstum und Proliferation des NB zu verringern (11). Es konnte gezeigt werden, dass MycN durch eine Hemmung des mTOR-Signalwegs degradiert beziehungsweise herunterreguliert wird (11,50,51). Zudem gibt es Hinweise auf eine höhere Sensitivität MycN-exprimierender Krebszellen gegenüber PI3K/mTOR-Inhibitoren (50,51). Die Verwendung von mTOR-Inhibitoren stellt daher einen vielversprechenden Ansatz der NB-Therapie dar. Gerade für Patient/innen mit Tumoren in höheren Stadien, bei denen eine MycN-Amplifikation besonders häufig vorliegt und deren Prognose weiterhin sehr ungünstig ist, könnte dies zur Verbesserung der Therapieoptionen beitragen.

1.4 mTOR-Inhibitoren

Durch den starken Einfluss des mTOR-Signalwegs auf Tumorentwicklung und -progression erscheinen mTOR-Inhibitoren als potentiell vielversprechende Therapeutika verschiedener Krebserkrankungen (52). In den folgenden Kapiteln soll auf die mTOR-Inhibitoren der ersten (Rapamycin beziehungsweise Rapalogs), sowie der zweiten Generation (ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren) eingegangen werden.

1.4.1 Rapamycin und Rapaloga

Rapamycin wird durch das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiert, welches 1970 aus einer Bodenprobe von den Osterinseln (Rapa Nui) isoliert wurde. Zunächst wurde eine antifungale Wirkung gezeigt (68,69). Durch eine immunsuppressive Wirkung mittels Hemmung der T- und B-Zell-Proliferation und der Antikörpersynthese findet Rapamycin Anwendung in der Prävention der Organabstoßung nach Transplantation (70). Aufgrund eines antiproliferativen Effekts wird Rapamycin zudem als vielversprechendes Medikament in der Krebstherapie angesehen (70). Die Wirkung von Rapamycin umfasst die Hemmung der G₁-Zellzyklus-Progression, Proliferation (70) und Angiogenese (71), sowie die Induktion von Autophagie (72). Es sind nur wenige Nebenwirkungen und keine Endorgan-Toxizitäten bekannt (41).

Mittlerweile wurden zahlreiche Rapamycin-Analoga, sogenannte *Rapalogs*, entwickelt, die sich durch verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften, wie beispielsweise einer höheren Löslichkeit, auszeichnen (38,41). Der Wirkmechanismus wurde nicht verändert und die

therapeutischen Effekte sind mit Rapamycin vergleichbar (41), weshalb im Folgenden *Rapamycin* sowohl für die Ausgangssubstanz, als auch ihre Analoga steht.

Die Hemmung der mTOR-Kinase durch Rapamycin wird über einen allosterischen Mechanismus erreicht (73), wobei zunächst nur der mTORC1 und seine Substrate *S6K1* und *4EBP1* unterdrückt werden (38,41). Der mTORC2 und sein Substrat AKT (Ser473) werden bei kurz andauernder Behandlung von NB-Zelllinien mit Rapamycin nicht gehemmt. Eine länger anhaltende Therapie kann zur Unterdrückung der mTORC2-Aktivität führen (74), wobei dieser Effekt Zelllinien-spezifisch ist (38).

Entgegen der Erwartungen durch vielversprechende Ergebnisse präklinischer Untersuchungen konnte Rapamycin in der klinischen Anwendung nur moderate Anti-Tumor-Effekte erzielen (40). Es gibt verschiedene Ansätze zur Erklärung dieser Wirkungslimitierung:

Erstens wird durch Rapamycin zunächst nur der mTORC1 gehemmt. Der mTORC2 wird, wie oben beschrieben, nur durch länger anhaltende Behandlung (74) und zudem Zelllinien-spezifisch unterdrückt (38). Dies könnte im Hinblick auf die möglicherweise tragende Bedeutung der mTORC2-abhängigen AKT-Aktivierung und damit Förderung von Zellüberleben und Proliferation (61) für die eingeschränkte Wirkung verantwortlich sein.

Zweitens wird der mTORC1 nur unvollständig gehemmt (75–77). In manchen Zelllinien scheint sich Rapamycin unterschiedlich auf die mTORC1-Substrate *S6K1* und *4EBP1* auszuwirken. Nach zunächst erfolgreicher Hemmung von *4EBP1* wird das Substrat unter andauernder Rapamycin-Behandlung resistent und wieder phosphoryliert (77). *4EBP1* spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Proliferation (78). Die fehlende Hemmung durch Rapamycin könnte daher eine Ursache der eingeschränkten antihyperplastischen Wirkung sein (79).

Außerdem wird das in Kapitel 1.3.1 beschriebene mTORC1-vermittelte negative Feedback auf den PI3K/AKT-Signalweg durch die mTORC1-Inhibition unterdrückt (40,80), wodurch es paradoxerweise zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs kommt (80,81). Durch eine Aktivierung von AKT werden, entgegen der erwünschten Anti-Tumor-Effekte, das Zellüberleben, die Proliferation und das Wachstum der Krebszellen gefördert (80).

1.4.2 ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren

Die geringe Effektivität von Rapamycin in der klinischen Anwendung führte zur Entwicklung von ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren (42,79).

Torin 2, ein Vertreter dieser Medikamenten-Gruppe wurde in dieser Arbeit innerhalb des RIST-Therapieschemas im Vergleich zu Rapamycin genauer untersucht. Die theoretischen Hintergründe dieser neuen Inhibitoren werden im Folgenden erläutert.

Die neuen mTOR-Inhibitoren weisen im Gegensatz zur Rapamycin-vermittelten allosterischen mTOR-Hemmung einen ATP-kompetitiven Inhibitionssmechanismus auf, wodurch sowohl der mTORC1, als auch der mTORC2 effektiv unterdrückt werden (37,40,79). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren eine stärkere und vollständige mTORC1-Hemmung induzieren, die eine Steigerung der antiproliferativen Effekte zur Folge hat (76,82).

Ein wichtiger Aspekt der mTOR-Inhibitoren zweiter Generation ist der hemmende Effekt auf AKT. Die lang-anhaltende Therapie mit Rapamycin resultiert in einer Entthemmung des negativen Feedbacks auf die PI3K-Signalkaskade, was zur Hyperphosphorylierung von AKT führt (80,81). *Liu et al.* zeigte dagegen für Torin 2 eine über 72 h anhaltende Hemmung der AKT-Phosphorylierung an Ser473 (83). Verschiedene ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren induzierten neben der Unterdrückung der AKT-Phosphorylierung an Ser473 auch eine Inhibition an der zweiten Phosphorylierungsstelle Thr308 (76,84). *Feldman et al.* nehmen an, dass die Unterdrückung der Phosphorylierung an Thr308 abhängig von der Dephosphorylierung an Ser473 durch eine Hemmung des mTORC2 ist (76).

Die unterschiedlichen Auswirkungen der mTOR-Inhibitoren auf die Substrate beziehungsweise deren Funktionen sind in Abbildung 3 (nach Saxton and Sabatini, 2017 (40)) dargestellt. Demnach unterdrückt Rapamycin über die Hemmung von S6K1 das Wachstum und die Proliferation der Zelle und entthemmt den Stoffwechselweg der Autophagie. 4EBP1 sowie der mTORC2 und sein Substrat AKT werden durch Rapamycin kaum inhibiert. AKT fördert dadurch weiterhin Wachstum und Proliferation und stimuliert den mTORC1. Die ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren hemmen dagegen sowohl den mTORC1 als auch den mTORC2. Die mTORC1-Hemmung umfasst die Unterdrückung beider Substrate S6K1 und 4EBP1, wodurch das Wachstum und die Proliferation der Zelle effektiv unterdrückt werden. Die Autophagie wird, wie auch durch Rapamycin, entthemmt.

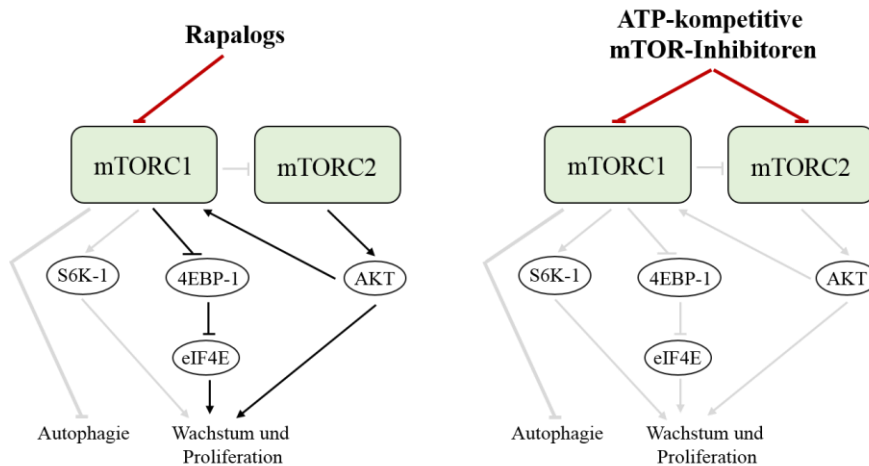


Abbildung 3: mTOR-Hemmung durch Rapalogs und ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren im Vergleich

Darstellung der unterschiedlichen Auswirkungen der mTOR-Hemmung durch Rapalogs und ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren, nach: Saxton and Sabatini, 2017, S. 970. (40).

In Untersuchungen zu verschiedenen Vertretern dieser Inhibitoren-Gruppe konnte im Vergleich zu Rapamycin eine stärkere Hemmung der Proteintranslation (82) und Proliferation festgestellt werden (82,85). Zunächst wurde angenommen, dass die gesteigerte Wirkung durch die zusätzliche Hemmung des mTORC2 begründet ist. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die vollständige mTORC1-Hemmung mit Unterdrückung Rapamycin-resistenter Funktionen, wie der Phosphorylierung von 4EBP1, für die erhöhte Effektivität verantwortlich sind (61,76,82).

Die Inhibitoren weisen eine hochpotente und spezifische Hemmung von mTOR auf (85,86), was dazu führt, dass die Aktivität von mTORC1 und -2 effektiv unterdrückt wird, während PI3-Kinasen, zu denen mTOR stark homolog ist, nicht gehemmt werden (86). Die selektive Hemmung einer Kinase könnte nebenwirkungsärmer sein als eine gleichzeitige Hemmung mehrerer Kinasen.

Im Gegensatz zu dem bei Rapamycin bekannten immunsuppressiven Effekt (70) konnte in einer Untersuchung der Behandlung von T-ALL-Zellen mit Torin-2 trotz des starken zytotoxischen Effekts auf die Tumorzellen keine Beeinträchtigung von ruhenden gesunden CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden (87). Anders als Rapamycin könnte Torin 2 die Immunabwehr während einer Krebstherapie erhalten.

Es besteht die Befürchtung, dass die gleichzeitige Hemmung beider mTOR-Komplexe und damit das Eingreifen in mehrere Signalsysteme zu einer hohen Toxizität führen könnte (41). Dagegen sprechen Zellkultur- und Kurzzeit-Xenograft-Untersuchungen, in denen keine schädigenden Effekte festgestellt wurden beziehungsweise die Behandlung gut toleriert wurde (61,88).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Neuroblastom ist eine der häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter. Patient/innen mit rezidiviertem oder unter Therapie progredientem NB (rNB) haben weiterhin eine ungünstige Prognose. Für diese Patientengruppe ist eine Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten dringlich notwendig. Am Universitätsklinikum Regensburg wurde unter Leitung von Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu für Patient/innen mit rNB ein neues, multimodales Therapiemodell entwickelt, in dem Biologika (Rapamycin und Dasatinib) und eine „milde“ Chemotherapie (Irinotecan und Temozolomid) metronomisch kombiniert werden. In einer Pilotstudie konnten bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt werden: bei 38 % der rNB-PatientInnen konnte eine Langzeitremission erreicht werden. Die Therapie wird derzeit in einer offenen, randomisierten Phase-II-Studie (RIST-rNB-2011) getestet.

In dieser Arbeit soll der neue ATP-kompetitive mTOR-Inhibitor Torin 2 im Vergleich zum derzeit verwendeten Rapamycin getestet werden, um möglicherweise eine Verbesserung des RIST-Therapieschemas zu erzielen. Es wird angenommen, dass die hohe Potenz und Selektivität dieser neuen Inhibitoren-Generation zu einer Reduktion der IC_{50} -Konzentration (mittlere inhibitorische Konzentration) bei Behandlung von NB-Zelllinien führt. Dies könnte in der klinischen Anwendung zu einer Verringerung der Nebenwirkungen der RIST-Therapie beitragen. Daher wurden im ersten Teil dieser Arbeit die IC_{50} -Konzentrationen für die Substanzen in Einzelbehandlung, sowie in Kombination entsprechend dem RIST-Therapieschema ermittelt. Zudem erfolgte die tiefere Charakterisierung des Effekts der Kombinationsbehandlung hinsichtlich einer potenziellen synergistischen, additiven oder antagonistischen Wirkung.

In der Literatur werden eine stärkere Hemmung der mTOR-Signalkaskade und dadurch folgender Steigerung der antiproliferativen Wirkung im Vergleich zu Rapamycin, sowie zytotoxische und zytostatische Effekte und eine starke Induktion von Autophagie durch ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren beschrieben (siehe 1.4.2). Die molekulare Wirkungsweise von Torin 2 wurde daher in Bezug auf die Hemmung des mTOR-Signalwegs, Induktion von Apoptose, Autophagie und Seneszenz, sowie der Vermittlung eines Zellzyklus-Arrests im Vergleich zu Rapamycin analysiert.

Andere Studien sowie laborinterne Voruntersuchungen geben Hinweise auf eine von der Expression des Onkogens MycN abhängige Sensitivität gegenüber mTOR-Inhibitoren

beziehungsweise der RIST-Therapie. Auf einen Zusammenhang zwischen dem Proteinlevel von MycN und dem Therapieansprechen sollte daher mit Hilfe der MycN-induzierbaren Zelllinie Tet21N untersucht werden. Der Nachweis einer Korrelation zwischen dem MycN-Level und Sensitivität gegenüber mTOR-Inhibitoren beziehungsweise der RIST-Therapie könnte helfen, die Behandlung Patienten-spezifischer einzusetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte, Software, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien und Antikörper

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ Inkubator HERA Cell 240	Heraeus
Integra Pipetboy acu 2	Integra
Magnetrührer mit Heizung VMA-C4	VWR
Mikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon
Mikroskopkamera Nikon DS-Vil	Nikon
Mikrozentrifuge gekühlt Mircro Star 17R	VWR
Mini-PROTEAN Tetra cell 4 Gel 1,0mm	Bio-Rad Laboratories
Multipipette research 300 µl	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Brand
Pipetten Eppendorf research plus 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipetten HandyStep®	Brand
Spectrophotometer TECAN	Tecan
Sterilbank HERAsafe	Heraeus
Tischzentrifuge Combi-Spin FVK-2400N	Hartenstein
Vortex GvLab	Gilson
Vortex Mixer; Vortex Genie2	GVLab Gilson; Scientific Industries
Waage	Kern EW
Wasserbad GFL1086	Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf

Tabelle 2: Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe Inc.
CalcuSyn (Version 2)	Biosoft
Citavi	Swiss Academic Software

GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	NIH, Wayne Rasband
Magellan 4	TECAN Austria GmbH
Microsoft Word und Microsoft Excel	Microsoft Corporation
NIS Elements Imaging Software	Laboratory Imaging

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

	Hersteller
Combitips advanced 5,0 mL, 10 mL	Eppendorf/Omnilab
Reaktionsgefäß (Eppendorf Tube) 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäß (Falcons) 15 mL, 50 mL	Sarstedt
Cryotubes 2,0 mL	
Nitrocellulose Blotting Membrane (Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC)	GE Healthcare Life Science
Pasteur Pipetten	VWR
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt
Pipettenspitzen ohne Filter	Gilson, Biosphere
Serologische Pipetten	Sarstedt
Westernblot Filterpapier	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 25 cm ²	Corning/Omnilab
Zellkulturplatten 96 well, 12 well	Omnilab

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Substanz, Katalognummer (#)	Hersteller
2-Propanol	Chemikalienausgabe Universität Regensburg
Agarose (peqGOLD Universal-A.), #35-1020	VWR
Acryl/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bromphenolblau	Merck
Dimethylformamide (#12767)	Cell Signaling
DMSO, HybriMax, steril filtriert	Sigma
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (PBS)	Sigma
Ethanol Rotipuran	Carl Roth
Etoposid, #E1383-25MG	Sigma
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom
G418, Cell Culture Reagent, #E859	VWR

GeldRed, #41003	Biotium
Glycin	Roth
Glycerol BioXtra	Sigma
Salzsäure (HCl) 37 %	Roth
Hygromycin B aus Strep. hygroscopius, #400052	Merck
Isopropanol, 70 %	BRAUN
L-Glutamin (L-Gln), 200 mM	Gibco Life Technologies
MEM NEAA (Non-Essential Amino Acids)	Gibco Life Technologies
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma
Natriumazid (5 %)	Merck
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	PromoCell
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom
Proteinmarker: Blue Prestained Proteinstandard	NewEngland BioLabs
RPMI 1640 mit Phenolrot, ohne Glutamin	Gibco Life Technologies
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Gibco Life Technologies
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate ReagentPlus)	Sigma
Senescence β -Galactosidase Staining Kit (#9860)	Cell Signaling
Sodiumchlorid (NaCl)	Sigma
SuperSignal TM West Dura Trial Kit	Thermo Scientific
SuperSignal TM West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth
Tetrazyklin Hydrochlorid, #SAFST7660	VWR
Tris	Merck
Trypan Blue	BioWhittaker
Trypsin 0,05%/EDTA 0,02%, (w/v) in PBS	Biochrom
Tween20	Sigma
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Roth

Tabelle 5: Antikörper

	Antikörper (AK) mit Katalognummer (#)	Hersteller	Verdünnung	Typ	Molekulargewicht
Primär-AK	Akt (pan) (C67E7) #4691	Cell Signaling	1:1000	rabbit	60 kDa

Phospho-AKT (Ser 473) XP® #4060	Cell Signaling	1:1000	rabbit	60 kDa
Phospho-AKT (Thr308) XP® #13038	Cell Signaling	1:1000	rabbit	60 kDa
Cas-3 (8G10) #9665	Cell Signaling	1:1000	rabbit	35 kDa (full-length), 17 +19 kDa (cleaved)
Cyclin D1	Cell Signaling	1:1000	rabbit	36 kDa
GAPDH (0411) #sc-47724	Santa Cruz	1:2000	mouse	37 kDa
GSK-3 α/β (D75D3) #5676	Cell Signaling	1:1000	rabbit	46+51 kDa
Phospho-GSK-3 β (Ser9) #9336	Cell Signaling	1:1000	rabbit	46 kDa
LC3B #NB100-2220SS	NovusBio	1:2000	rabbit	17 kDa (LC3 II), 19 kDa (LC3 I)
N-Myc #9405	Cell Signaling	1:1000	rabbit	62 kDa
PARP-1 #1072-1	Epitomics	1:1000	rabbit	113 kDa (full-length), 29 kDa (cleaved)
p21 Waf1/Cip (DCS60) #2946	Cell Signaling	1:1000	mouse	21 kDa
p70 S6 Kinase #9202	Cell Signaling	1:1000	rabbit	70+85 kDa
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) #9234	Cell Signaling	1:1000	rabbit	70+85 kDa
Src #2108	Cell Signaling	1:1000	rabbit	60 kDa
Phospho-Src Family (Tyr 416) #2101	Cell Signaling	1:1000	rabbit	60 kDa
4E-BP1 (53H11) # 9644	Cell Signaling	1:1000	rabbit	15-20 kDa
Phospho-4E-BP1 (Ser65) (174A9) #9456	Cell Signaling	1:1000	rabbit	15-20 kDa
Sekundär-AK	Anti-mouse IgG, HRP #7076S	Cell Signaling	1:3000	HRP
	Anti-rabbit IgG, HRP #7074S	Cell Signaling	1:3000	HRP

2.1.2 Zellkultur

Aus Tabelle 6 können die verwendeten Zelllinien, sowie deren Klassifizierung und Eigenschaften entnommen werden. Abbildung 4 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien in Kultur.

Tabelle 6: Zelllinien

Name	Verhalten in Zellkultur	MycN-Expression	Herkunft
Kelly	adhärent; als Mono- und Multilayer wachsend; rund oder spindelförmig, bilden Neuriten	MycN-Amplifikation (89)	DSMZ ACC 355 (09/2017)
IMR-32	adhärent; Fibroblasten-ähnlich, als Monolayer wachsend, aber teilweise auch Haufenbildung und schwimmende Zellen; Ernte der Zellen ohne Trypsin	MycN-Amplifikation (90)	DSMZ ACC 165 (11/2016)
Tet21 N	adhärent	Induzierbar mit Tetrazyklin (91)	DKFZ (03/2018)

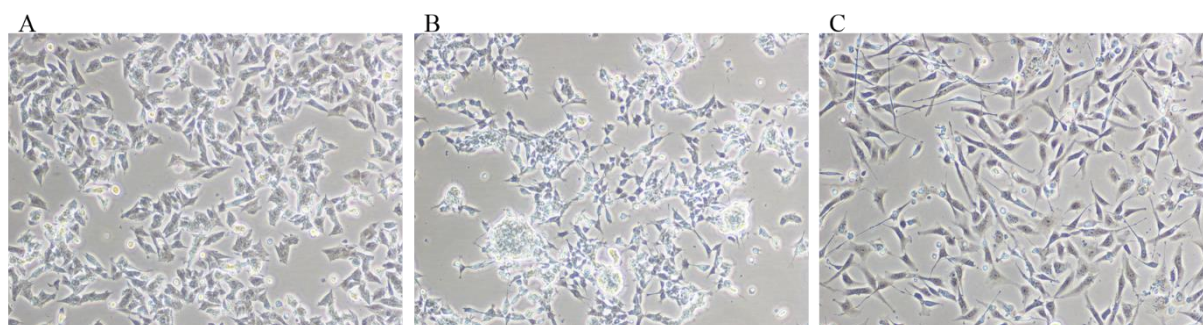


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinien

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien bei 10x-Vergrößerung. **A** Kelly, **B** IMR-32, **C** Tet21N (MycN-Induktion durch Tetrazyklin-Zugabe unterdrückt)

Tet21N

Mit Tet21N wurde von *Lutz et al.* eine MycN-induzierbare Zelllinie entwickelt. Tet21N-Zellen sind transfizierte SH-EP-Zellen, die wiederum einen Subklon der SK-N-SH-Zelllinie darstellen (91).

Durch das Antibiotikum Tetrazyklin wird die Expression des Onkogens MycN transkriptional auf ein minimales Level herunterreguliert („MycN-OFF-Zellen“). Unter Entzug von Tetrazyklin wird die MycN-Expression induziert („MycN-ON-Zellen“). Das Proteinlevel in Tet21N-Zellen unter Induktion ist vergleichbar mit der in LAN-6-Zellen, einer Zelllinie mit MycN-Duplikation (91).

Für die Induktion wurden die Zellen aus den ZK-Flaschen in zwei Falcons überführt. Um das Tetrazyklin zu entfernen wurden die Zellen abzentrifugiert (5 Min., 20 °C, 1.2000 rpm), das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden die für die Induktion bestimmten Zellen in Tetrazyklin-freiem Medium, und die Zellen, die nicht induziert werden sollten in Tetrazyklin-haltigem Medium aufgenommen.

Die Zelllinie stellt ein optimales *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Abhängigkeit der Wirkungsweise von mTOR-Inhibitoren von der MycN-Expression dar. Zelllinien-spezifische Eigenschaften, wie beim Vergleich von MycN-amplifizierten mit nicht-amplifizierten Zelllinien, können somit als einflussgebender Faktor eliminiert werden. Ein möglicher beeinflussender Faktor ist das auf die MycN-OFF-Zellen einwirkende Tetrazyklin.

2.1.2.1 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Herstellung der für die Zellkultur verwendeten Medien:

Kelly-Medium:

1x RPMI 1640 mit Phenolrot, 15 % (v/v) FCS, 1% (v/v) Pen/Strep, 2 mM L-Gln

IMR-32-Medium:

1x RPMI 1640 mit Phenolrot, 20 % (v/v) FCS, 1 % Pen/Strep, 1x NEAA

Tet21 N-Medium

1x RPMI 1640 mit Phenolrot, 10 % (v/v) FCS, 1 % Pen/Strep, 4 mM L-Gln, 1 µg/mL Tetrazyklin (für MycN-OFF; für die Induktion wurde Medium ohne Tetrazyclin angesetzt), 200 µg/mL G418, 90 µg/mL Hygromycin

Die Medien für die Zelllinien Kelly und IMR-32 wurden ein- bis zweimal pro Monat frisch angesetzt und bei 4 °C gelagert.

Das Medium für die Tet21N-Zellen wurde immer frisch angesetzt.

Einfriermedium für die Kryokonservierung:

Das Medium wurde frisch vor dem Einfrieren der Zellen angesetzt

FBS extra, 10 % (v/v) DMSO

2.1.3 Puffer und Reagenzien für Westernblot

APS 10 %

1 g Ammoniumpersulfat (APS), mit Millipore-H₂O auf 10 mL auffüllen

Lagerung der Aliquots (1 mL) bei -20 °C

SDS 10 %

10 g SDS (abwiegen unter dem Abzug), mit Millipore-H₂O auf 80 mL auffüllen, erhitzen, mit Millipore-H₂O auf 100 mL auffüllen

Tris 0,5 M, pH 6,8

15,14 g Tris ($M_{\text{Tris}}=121,14 \text{ g/mol}$), mit Millipore-H₂O auf 200 mL auffüllen, pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen, mit Millipore-H₂O auf 250 mL auffüllen

Tris 1,5 M, pH 8,8

45,43 g Tris ($M_{\text{Tris}}=121,14 \text{ g/mol}$), mit Millipore-H₂O auf 200 mL auffüllen, pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen, mit Millipore-H₂O auf 250 mL auffüllen

SDS-Laufpuffer

10x:

250 mM Tris (30,3 g), 1,92 M Glycin ($M_{\text{Glyc}}=75,07 \text{ g/mol}$, 144,13 g), 1 % SDS (10 g), mit Millipore-H₂O auf 1.000 mL auffüllen

1x:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

100 mL 10x-SDS-Laufpuffers, 900 mL Millipore- H₂O

SDS Loading Buffer (SDS-LB)

5 mL 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 8 mL 10 % SDS; 4 mL Glycerol; 21 mL Millipore- H₂O; Bromphenol-Blau

Transfer-Puffer

10x:

250 mM Tris (30,3 g); 1,92 M Glycin (144,13 g); mit Millipore-H₂O auf 800 mL auffüllen, pH mit HCl (37 %) auf 8,5 einstellen, mit Millipore-H₂O auf 1.000 mL auffüllen

1x:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Ethanol

700 mL Millipore-H₂O; 100 mL 10x-Transferpuffer; 200 mL Ethanol absolut (Reihenfolge wichtig, sonst Salzpräzipitate)

Lagerung des 1x-Transferpuffers bei 4 °C.

TBS-Waschpuffer

10x-TBS:

100 mM Tris (24,2 g); 1,5 M Natriumchlorid (87,8 g); mit Millipore-H₂O auf 800 mL auffüllen, pH mit HCl auf 7,5 einstellen; mit Millipore-H₂O auf 1.000 mL auffüllen

1x-TBS-T:

20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween

100 mL 10x-TBS; 900 mL Millipore-H₂O; 1 mL Tween

2.1.4 Medikamente

Tabelle 7: Medikamente für die Behandlung der Zellen

Medikament und Katalognummer (#)	Hersteller
Dasatinib, #D-3307	LC Laboratories
Rapamycin, #R-5000	LC Laboratories
SN-38 (aktiver Metabolit von Irinotecan), #2684	Tocris
Temozolomid (TMZ), #2226-10	BioVision
Torin 2, #4248	Tocris

Die Medikamente wurden entsprechend der Datenblätter in DMSO gelöst, aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Die gelösten Substanzen wurden maximal zehn Mal aufgetaut und wieder

eingefroren, um einer dadurch bedingten Beeinträchtigung der Wirkung vorzubeugen. Nach dem Auftauen und beim Ansetzen verschiedener Verdünnungsstufen wurde durch sorgfältiges Vortexen der Aliquots sichergestellt, dass eine Lösung mit gleich verteilter Substanzkonzentration vorliegt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur, Passage und Aussaat

Die Neuroblastom-Zellen wurden im entsprechenden Medium der jeweiligen Zelllinie (siehe Kapitel 2.1.2.1) in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei befeuchteter Atmosphäre, 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Die Arbeiten der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank durchgeführt und die Arbeitsflächen, Materialien etc. mit 70 %igem Propanol gereinigt.

Die Zellen wurden etwa zwei Mal pro Woche passagiert. Dafür wurde die Konfluenz der Zellen regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt und bei einer Konfluenz zwischen 70 -100 % passagiert. Bei nicht ausreichender Konfluenz erfolgte nur ein Mediumwechsel.

Zur Passage der Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Dieser Waschschrift dient dem Entfernen der im Medium enthaltenen Magnesium- und Calciumionen, die die Trypsin-Reaktion inhibieren und das Ablösen des Zellrasens vom Flaschenboden verhindern würden. Es folgte eine etwa fünf-minütige Trypsinierung (2 mL Trypsin-EDTA pro T75-Flasche) bei Raumtemperatur. Die Trypsin-Reaktion wurde bei sichtbarer Ablösung der Zellen vom Flaschenboden durch Zugabe von 10 mL frischem Medium gestoppt. Der Flaschenboden wurde sorgfältig mit dem Medium abgespült und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Entsprechend der Ratio der Passagierung wurde eine bestimmte Menge der Medium-Zell-Suspension wieder ausgesät und mit frischem Medium auf 12 mL Gesamt-Medium-Menge aufgefüllt. Die Zellkultur-Flaschen wurden für jede Passage durch eine neue Flasche ersetzt.

Das Waschen mit PBS und Ablösen der Zellen mit Trypsin entfällt bei der semi-adhärenenten Zelllinie IMR-32, die nur durch Abspülen vom Flaschenboden in das frische Medium aufgenommen wurde.

Für die Aussaat in 96- oder 12-Well-Plates wurden die Zellen wie beim Passagieren vom Flaschenboden abgelöst, in 10 mL frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden ausgezählt (siehe Kapitel 2.2.2) und ein Ansatz mit der für den Versuch notwendigen Zellzahl in einem entsprechenden Volumen Medium vorbereitet. Vor dem Ausplattieren wurde diese Zellsuspension sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Aussaat erfolgte mit Hilfe einer Multipipette (HandySteps®).

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die sogenannte Neubauer-Zählkammer verwendet. Für das Auszählen wurden die Zellen zunächst, wie unter 2.2.1 beschrieben, von der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und 1:5 bis 1:10 mit *Trypan Blue-Lösung* verdünnt. Trypan Blue dient der Abgrenzung lebender von toten Zellen, wobei tote Zellen intensiv blau angefärbt sind, während Lebende hell erscheinen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der verdünnten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier Kleinquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl/ml} &= \text{Durchschnitt der Zellzahl pro Kleinquadrat} \\ &x \text{ Verdünnungsfaktor} \\ &x 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \end{aligned}$$

Der Kammerfaktor ergibt sich aus dem Volumen von $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$ zwischen Neubauer-Zählkammer und Deckglas. Um eine Zellzahl pro Milliliter zu erhalten, ist somit eine Multiplikation mit 10^4 notwendig ($10^4 \text{ µl} = 1 \text{ mL}$).

2.2.3 Ausschluss einer Mycoplasma-Kontamination

Zum Ausschluss einer Mycoplasma-Kontamination in den verschiedenen Zelllinien wurde ein PCR-Nachweis (Polymerase-Ketten-Reaktion) mit Hilfe des *PCR Mycoplasma Test Kits I/C* (PromoKine) durchgeführt, der auf Amplifikation und Detektion von Mycoplasma-DNA im Zellkultur-Überstand beruht. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Test-Kits. Die PCR-Produkte wurden nach Durchführung der PCR auf ein mit *GelRed* versetzten 1,5%-igem Agarose-Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 100 V durchgeführt und die DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

Untersucht wurden die Zelllinien, die derzeit in der Arbeitsgruppe kultiviert wurden: Kelly, IMR-32, SK-N-BE(2), SK-N-MC, SK-N-AS (Tomato) und Tet21N. Die Zelllinien Kelly, P9 und P13; IMR-32 P17 und P28, sowie Tet21N wurden für diese Arbeit verwendet.

In keiner der getesteten Zelllinien war eine positive Bande bei 265-278 bp nachweisbar. Für alle Zelllinien, außer IMR-32, ist eine Negativbande bei 479 bp zu erkennen (siehe Abbildung 22). Für die Zelllinie IMR-32 konnte auch in früheren Kontrollen auf Mycoplasma-Kontaminationen keine Negativbande nachgewiesen werden [Daten hier nicht gezeigt]. Das Fehlen der Negativbande könnte möglicherweise durch Zelllinien-spezifische Eigenschaften verursacht werden. Durch das Ausbleiben der Positivbande in allen Zelllinien kann von einer Mycoplasma-freien Zellkultur ausgegangen werden.

2.2.4 MTT-Assay zur Bestimmung der IC_{50}

Zunächst wurden die Substanz-spezifischen mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) der Medikamente in Einzelbehandlung und anschließend in Doppelkombination in den verschiedenen Zelllinien ermittelt. Zudem wurde auf eine synergistische Wirkung bei Kombination zweier Medikamente untersucht. Zum Teil lagen bereits Ergebnisse aus Untersuchungen von Marie Matthes vor. Diese Experimente wurden wiederholt und die Ergebnisse bestätigt.

Die Ermittlung der IC_{50} -Konzentrationen mittels MTT-Assay, also einer Zellviabilitäts-Untersuchung, beruht auf dem Nachweis der metabolischen Aktivität lebender Zellen. Hierfür werden die Zellen mit dem gelben Tetrazoliumsalz *MTT* (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid*) behandelt. Dieses wird in lebenden Zellen abhängig von der Zeit in das dunkelblau-violette Formazan mit Absorptionsmaximum bei 570 nm metabolisiert (siehe Abbildung 5). In toten Zellen erfolgt keine Reduktion von MTT zu Formazan, weshalb die Quantifizierung des Reaktionsprodukts durch die photometrische Messung der Absorptionsänderung zur Untersuchung des Anteils lebender Zellen in einer Probe genutzt werden kann (92).

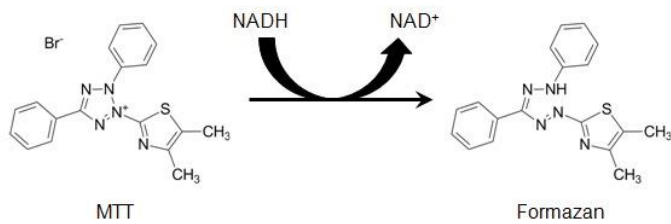


Abbildung 5: Metabolische Umwandlung von MTT in lebenden Zellen

Darstellung der chemischen Umwandlung des gelben MTTs zu dunkelblauen Formazan-Kristallen in lebenden Zellen, aus: Riss et al. Cell Viability Assays. S. 357 (92).

2.2.4.1 IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung

Für die Aktivitätsbestimmung mittels MTT-Assay wurden an „Tag 0“ 30.000 (Kelly) bzw. 40.000 (IMR-32) Zellen pro Well in 100 µl Medium in 96-Well-Platten mit flachem Boden ausgesät. Die äußere Reihe und freie Wells wurden zum Verdunstungsschutz mit jeweils 200 µl PBS beschickt. Die Platten wurden 24 h im Brutschrank inkubiert.

An „Tag 1“ wurden die Zellen in Triplikaten mit je 100 µL Medikamenten-Verdünnung in verschiedenen Konzentrationsstufen behandelt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen vor Behandlung eine Konfluenz von 50-70 % hatten. Die Medikamente lagen wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben in DMSO gelöst vor und wurden vor Beginn des Versuchs bei Raumtemperatur aufgetaut. Für die Behandlung wurden Verdünnungen mit dem entsprechenden Medium der Zelllinie hergestellt. Bei Bestimmung der IC₅₀-Konzentrationen für Einzelsubstanzen wurde jeweils eine Titrationsreihe mit 6 bis 12 Verdünnungsstufen gewählt.

Für eine Negativ-Kontrolle wurde in ein Triplikat jeweils 100 µl frisches Medium pro Well pipettiert. Als „Lebendkontrolle“ diente ein Triplikat mit einer Behandlung mit DMSO (Lösungsmittel der Medikamente). Hierbei wurde eine Verdünnung verwendet, die der maximalen DMSO-Endkonzentration in den mit Medikamenten behandelten Wells entsprach. Bei der Auswertung wurde diese Kontrolle mit „100 % Viabilität“ gleichgesetzt und die gemessenen Viabilitäten um diese Lebendkontrolle normalisiert, um den Einfluss des Lösungsmittels aus der Berechnung auszuschließen.

Die Zellen wurden nach Behandlung 72 h im Brutschrank inkubiert und regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt.

Die *MTT-Stocklösung* wurde mit einer Konzentration von 5 mg/ml angesetzt. Dies erfolgte im abgedunkelten Raum unter sterilen Bedingungen. Dabei wurden 100 mg *MTT* (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) in 20 ml PBS gelöst. Durch mehrmaliges Invertieren und Auf- und Abpipettieren konnte die schwer lösliche Substanz in PBS-Puffer aufgenommen werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C mit Alufolie vor Licht geschützt. Die angesetzte Stocklösung wurde für maximal zwei Wochen verwendet.

An „Tag 4“, also 72 h nach Behandlung der Zellen, wurde die *MTT-Reaktion* und photometrische Messung der Viabilität durchgeführt. Dafür wurden zunächst eine 1:5-Verdünnung der *MTT-Stocklösung* mit farblosem *RPMI 1640* (RPMI ohne Phenolrot) als *MTT-Working-Solution* (1 mg/ml) hergestellt. Diese wurde immer frisch angesetzt und, wie auch die *MTT-Stocklösung*, mit Alufolie vor Licht geschützt.

Für die *MTT-Reaktion* wurde das Medium vorsichtig mit einer Vakuumpipette von den Zellen, sowie der PBS-Puffer aus einem als Leerkontrolle dienenden Triplikate abgesaugt. Pro Well wurden 100 µl *MTT-Working-Solution* pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 2 h im Brutschrank. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Isopropanol pro Well abgestoppt und die entstandenen dunkelblauen Formazan-Kristalle durch Auf- und Abpipettieren vollständig in Lösung gebracht. Die photometrische Messung der Viabilität bei $\lambda=560$ nm im *Plate Reader TECAN* erfolgte nach einer weiteren Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur unter Schutz vor Licht durch Alufolie. Vor dem Einlegen in das Gerät wurden die Wells auf Luftblasen geprüft und diese gegebenenfalls mit einer Kanüle entfernt. Gemessen wurde mit der Software *Magellan 4*.

Für die Auswertung wurden die Werte um die der Leerkontrollen korrigiert und anschließend der prozentuale Anteil lebender Zellen, normalisiert um die DMSO-behandelte Lebendkontrolle in *Microsoft Excel*, berechnet. Die weitere Auswertung und Generierung der Viabilitätskurven erfolgte mit Hilfe der Software *GraphPad Prism*.

Alle Versuche wurden wie beschrieben in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.2.4.2 IC₅₀-Bestimmung bei Doppelbehandlung

Für die Ermittlung der IC₅₀-Konzentration bei Doppelbehandlung wurden ebenfalls MTT-Assays durchgeführt. Das Ausplattieren an „Tag 0“ erfolgte, wie oben für Einzelbehandlungen beschrieben.

Die Behandlung an „Tag 1“ erfolgte ebenfalls in Triplikaten. Dabei wurden pro Well je 50 µL beider Medikamenten-Verdünnungen pipettiert, sodass insgesamt mit 100 µL pro Well und einem Endvolumen von 200 µL pro Well behandelt wurde. Die Kontrollen entsprachen denen der MTT-Assays bei Einzelbehandlung. Der Versuch wurde ebenfalls in Triplikaten durchgeführt.

In Vorversuchen wurde eine Titrationsreihe mit fünf Verdünnungsstufen pro Substanz gewählt, sodass sich wie in Abbildung 6 dargestellt 5 x 5 Kombinationen ergeben. Dieser Versuchsaufbau erfolgte in Anlehnung an die Ermittlung von IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlungen durch Johannes Leister im Rahmen seiner Dissertation (93).

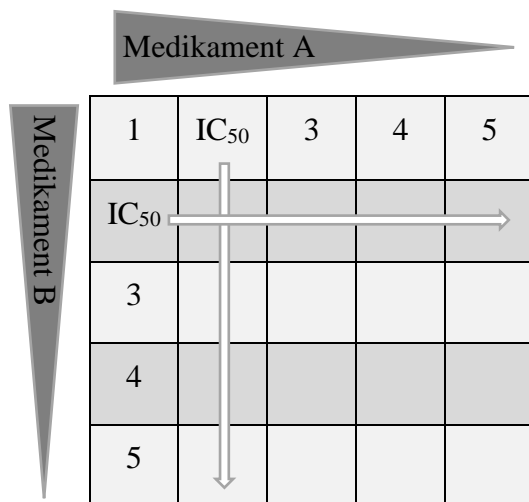


Abbildung 6: Titrationschema zur Ermittlung der IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung

Darstellung des Titrationschemas zur Ermittlung der IC₅₀-Werte bei Behandlung mit zwei Medikamenten, in Anlehnung an MTT-Assays für Doppelbehandlungen durch Johannes Leister (93). Die Konzentrationen fallen von 1 nach 5 ab. Die Verdünnungsstufe 2 entspricht bei der ersten Durchführung dem IC₅₀ der Substanz bei Einzelbehandlung. Bei Folge-Assays wurden die Konzentrationen entsprechend der bisher erhaltenen Ergebnisse angepasst.

Für die Festlegung dieser Titrationsstufen wurden die Ergebnisse der MTT-Assays bei Einzelbehandlung hinzugezogen. Dabei wurde der für eine Substanz ermittelte IC₅₀-Wert, unter der Annahme einer Reduktion der mittleren inhibitorischen Konzentration durch die potenzielle synergistische Wirkung, als zweiter Wert des Titrationschemas angesiedelt. Die Konzentrationen wurden dann von Behandlung 1 nach Behandlung 5 fallend angesetzt. Die Titrationschritte wurden entsprechend der Verläufe der Viabilitätskurven gewählt. Bei starker

Steigung dieser Kurve, also einer deutlichen Änderung der Viabilität durch geringe Konzentrationsänderungen, wurden enge Titrationsschritte verwendet. Bei flach verlaufenden Viabilitätskurven, die zeigen, dass erst eine stärkere Änderung der Konzentration zu einer relevanten Zu- oder Abnahme der Viabilität führt, wurden größere Titrationsschritte gewählt. Diese Vorversuche dienten der Einschränkung der Konzentrationsbereiche für eine IC₅₀-Behandlung bei Doppelbehandlung. Die endgültige Festlegung der IC₅₀-Konzentrationen in Doppelbehandlung erfolgte mit Hilfe der Ergebnisse der mindestens dreimal wiederholten Untersuchungen zum Effekt der Doppelbehandlung, die im folgenden Kapitel beschrieben wird.

Für die Doppelbehandlung wurde außerdem wie folgt ein Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) berechnet:

$$DRF = \frac{\text{Dosis bei Einzelbehandlung}}{\text{Dosis bei Doppelbehandlung}}$$

Der DRF gibt an, um welchen Faktor die Dosis bei Kombination der Medikamente (= Doppelbehandlung) im Vergleich zur Einzelbehandlung unter Erhalt des gleichen Effekts (IC₅₀, also 50 %-ige Hemmung der Viabilität) reduziert werden kann.

2.2.4.3 Untersuchung zum Effekt der Kombinationstherapie (= Doppelbehandlung)

Bei Kombination mehrerer Medikamente können verschiedene Medikamenteninteraktionen auftreten: additive, synergistische oder antagonistische Wirkung (94,95). Ein Antagonismus liegt vor, wenn die Wirkung der Kombinationstherapie schwächer ist als der additive Substanzeffekt. Ein synergistischer Effekt dagegen ist stärker, als die additive Substanzwirkung (95–97).

Die Berechnung eines *Combination Index* (CI) nach der *Chou-Talalay-Methode* ermöglicht eine quantitative und mathematisch fundierte Aussage über den durch die Kombinationstherapie erreichten Effekt. Der CI kann für Medikamente, die unterschiedliche Wirkungsmechanismen haben oder unabhängig voneinander wirken, wie folgt berechnet werden:

$$CI = \frac{D_A}{(D_X)_A} + \frac{D_B}{(D_X)_B} + \frac{D_A \times D_B}{(D_X)_A \times (D_X)_B} \quad (94).$$

Dabei steht D für die Dosis der kombinierten Medikamente 1 und 2 und D_x für den durch die entsprechende Substanz entstehenden Effekt bei Dosierung D.

Für diese Arbeit wurde der CI-Wert für den Effekt bei IC_{50} -Konzentration berechnet, was durch die folgende Gleichung dargestellt wird:

$$CI_{IC50} = \frac{IC50_{(A+B)}}{IC50_A} + \frac{IC50_{(A+B)}}{IC50_B} \quad (94).$$

Die Bedeutung der jeweiligen CI-Werte ist in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Bedeutung der CI-Werte

Bedeutung der CI-Werte nach Reynolds C.P. und Maurer B.J. (2005), S.176 (98).

CI-Wert	Bedeutung
< 0,1	sehr starker Synergismus
0,1-0,3	starker Synergismus
0,3-0,7	Synergismus
0,7-0,9	leichter Synergismus
0,9-1,1	additiver Effekt
1,1-1,45	leichter Antagonismus
1,45-3,3	Antagonismus
> 3,3	starker Antagonismus

Die CI-Berechnungen wurden mit der Software *CalcuSyn*, die auf der Chou-Talalay-Methode beruht, durchgeführt.

Zur Berechnung des CIs werden neben den Viabilitäten der Doppelbehandlung auch die Viabilitäten der entsprechenden Einzelbehandlung benötigt und es erfolgte folgender Versuchsaufbau:

Die Zellen wurden an „Tag 1“ mit fünf Konzentrationsstufen der Medikamente A und B in der Kombination A_1+B_1 , A_1+B_2 , ..., A_5+B_5 behandelt. Zudem wurden Kontrollen mit Einzelbehandlung in den entsprechenden Konzentrationen (Beispiel: Dasatinib₁ - Dasatinib₅ und Rapamycin₁ - Rapamycin₅) gemessen. Der Verdünnungsfaktor war für beide Medikamente gleich und über alle Konzentrationsstufen hinweg konstant, wurde aber in den verschiedenen

Wiederholungen verändert, um den Effekt in verschiedenen Konzentrationsbereichen zu untersuchen. So wurden in den verschiedenen Experimenten die Faktoren 1,5; 2 und 2,5 verwendet.

Die Negativ- und Lebendkontrolle entsprachen den oben beschriebenen MTT-Assays.

Für die Berechnung des Synergismus in der Software *CalcuSyn* wurden die um die Lebendkontrolle normalisierten Viabilitätswerte der verschiedenen Titrationsstufen in Doppel- und Einzelbehandlung zunächst entsprechend der folgenden Formel umgerechnet:

$$FA (Fraction Affected) = 1 - \left(\frac{Viabilität [\%]}{100} \right) \quad (97).$$

Für die Untersuchung des Therapieeffekts und Berechnung des Combination Indexes (CI) wurden pro Zelllinie drei Versuche in Triplikaten mit unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren der Titrationsreihe (1,5; 2 und 2,5) unabhängig voneinander durchgeführt. Für die Berechnung des CIs wurden mindestens zwei unabhängige Experimente hinzugezogen.

Für die Kombination Dasatinib + Rapamycin in der Zelllinie Kelly wurde bereits durch Johannes Leister eine synergistische Wirkung nachgewiesen (93). Die Untersuchung wurden einmal wiederholt, um die Ergebnisse zu bestätigen.

2.2.4.4 IC₅₀-Bestimmung in der Zelllinie Tet21N

In der Zelllinie Tet21N wurde der Einfluss des Onkogens *MycN* auf die IC₅₀-Konzentration untersucht. Dafür erfolgte vor Durchführung des Assays die Induktion von *MycN* durch Kultivierung der Zellen in Tetrazyklin-freiem Medium.

Die Durchführung des MTT-Assays erfolgte wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, in diesem Kapitel soll deshalb nur speziell auf die *MycN*-Induktion eingegangen werden.

In Vorversuchen wurde die Induktion zunächst beim Ausplattieren („Tag 0“), also 24 h vor Behandlung durchgeführt. Es konnte allerdings nicht wie erwartet eine erhöhte Sensitivität der *MycN*-ON-Zellen gegenüber Rapamycin gemessen werden, weshalb der Zeitpunkt der Induktion verändert wurde, um einen noch zu niedrigen *MycN*-Level als Ursache dieses Ergebnisses auszuschließen.

Die Induktion erfolgte nun 72 h vor dem Ausplattieren, also 96 h vor dem Behandlungstag. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da in laborinternen Voruntersuchungen gezeigt wurde, dass 72 h nach Induktion eine starke *MycN*-Expression vorliegt. (Daten hier nicht gezeigt).

Für die *MycN*-Induktion wurden die Zellen von der Zellkultur-Flasche in zwei Reaktionsgefäße überführt. Beide Reaktionsgefäße wurden zentrifugiert (5 Min., 20 °C, 1.2000 rpm) und anschließend der Überstand abgesaugt. Es folgte ein Waschschrift mit PBS, um noch

enthaltenes Tetrazyklin zu entfernen. Dazu wurden die Zellen in 5 mL PBS aufgenommen, erneut bei 1.2000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Zellen, die nicht induziert werden sollten („MycN-OFF-Zellen“) wurden nun wieder in Tetrazyklin-haltigem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben. Die für die Induktion vorgesehenen Zellen („MycN-ON-Zellen“) wurden in Tetrazyklin-freiem Medium aufgenommen und ebenfalls in eine Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden anschließend bis zum Ausplattieren im Brutschrank inkubiert. Das Ausplattieren, die Behandlung, die MTT-Reaktion, die Messung der Viabilität und die Auswertung erfolgten, wie oben für die anderen Zelllinien beschrieben.

Für die Kontrolle der MycN-Induktion wurden gleichzeitig Zellen in eine 12-Well-Platte ausgesät. Für die Proben zur MycN-Kontrolle am Anfang des Experiments („MTT-0-Proben“) wurden bei Induktion jeweils $1,0 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät und zum Zeitpunkt des Ausplattierens für das MTT-Experiment, also 72 h später, mit SDS-Loading-Buffer geerntet. Für die Proben zur Kontrolle des MycN-Levels am Ende des MTT-Experiments wurden parallel zum Ausplattieren des MTT-Versuchs $1,0 \times 10^5$ MycN-ON-Zellen (induziert) und $0,8 \times 10^5$ Zellen der MycN-OFF-Zellen (nicht-induziert) pro Well ausgesät und analog zum MTT-Experiment 24 h später mit $30 \mu\text{M}$ Rapamycin bzw. einer DMSO-Verdünnung behandelt. Die Ernte erfolgte 72 h nach Behandlung zum Zeitpunkt der MTT-Messung.

Die MycN-Expression wurde anschließend mittels Westernblot, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, analysiert. Dadurch wurde kontrolliert, ob die MycN-Induktion erfolgreich war und über das gesamte MTT-Experiment angehalten hat. Die Kontrolle der MycN-Expression erfolgte parallel zu einem MTT-Versuch.

2.2.5 Durchführung der *in-vitro*-RIST-Therapie

Die vier Medikamente Dasatinib, Rapamycin bzw. Torin 2, Irinotecan und Temozolomid wurden nach Ermittlung der IC_{50} -Konzentrationen in der RIST-Therapie kombiniert. Die verwendeten Konzentrationen der Biologika können aus Tabelle 14 und der Chemotherapeutika aus Tabelle 16 entnommen werden. Für die Messung der Viabilität am Ende des RIST-Therapieschemas („Tag 8“) wurde wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben ein MTT-Assay angewandt. Für die Untersuchung auf Induktion von Apoptose und Autophagie wurden an „Tag 8“ der RIST-Therapie anstelle der MTT-Reaktion Zelllysate für den Westernblot hergestellt (siehe Kapitel 2.2.6).

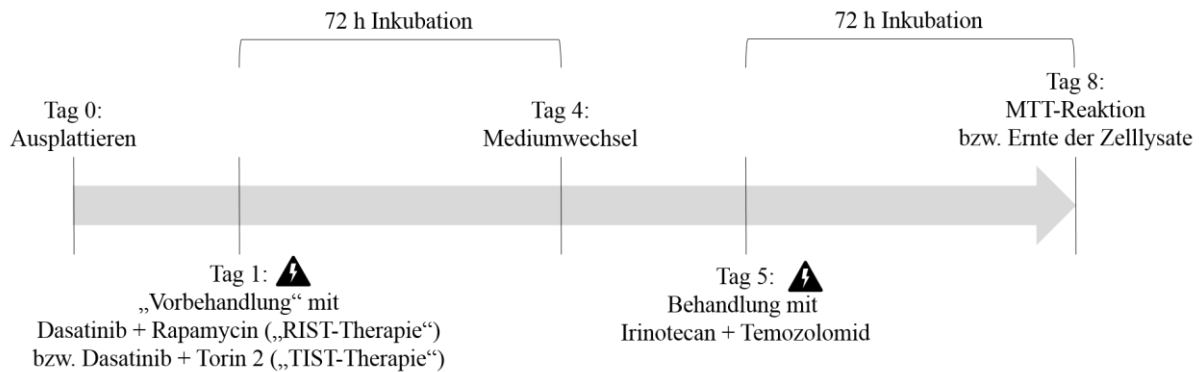


Abbildung 7: Schema der *in-vitro*-RIST-Therapie

Für die *in-vitro*-Durchführung der RIST-Therapie wurden wie in Abbildung 7 dargestellt zunächst die Zellen ausplattiert. Für den MTT-Assay wurden 30.000 Kelly-Zellen pro Well in 100 μ L Medium in eine 96-Well-Platte ausgesät. Zusätzlich wurden für eine DMSO-Kontrolle zur Normalisierung der Viabilitäten 5.000 Zellen pro Well ausplattiert (Lebendkontrolle). Für die RIST-Therapie-Zellysate wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well und für die Kontrollzellen $1,5 \times 10^5$ Zellen in 1 mL Medium in eine 12-Well-Platte ausgesät.

Nach 24 h (Tag 1) erfolgte die Behandlung mit Dasatinib + Rapamycin („RIST-Therapie“) bzw. Dasatinib + Torin 2 („TIST-Therapie“), die in der Folge auch als „Vorbehandlung“ bezeichnet wird. Für den MTT-Assay wurden die Kontrollzellen mit der maximal verwendeten DMSO-Konzentration (Lebendkontrolle zur Normalisierung der Viabilitäten) bzw. Medium (Negativkontrolle) behandelt. Für die Westenblot-Zellysate wurden die Zellen für die DMSO-Kontrolle mit einer DMSO-Verdünnung behandelt.

Nach 72 h, also an „Tag 4“, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, es folgten 24 h Pause vor der Behandlung mit den Chemotherapeutika Irinotecan und Temozolomid. Die DMSO-Kontrollzellen wurden an „Tag 4“ (72 h nach Behandlung) mit SDS-Loading Buffer entsprechend der Konfluenz geerntet.

An „Tag 5“ wurden die Zellen der RIST-Therapie mit Irinotecan und Temozolomid, sowie die Kontrollzellen des MTT-Assays mit DMSO behandelt.

An „Tag 8“ (72 h nach der Chemotherapie) erfolgte die MTT-Reaktion und Messung der Viabilitäten bzw. die Ernte der Zellysate.

Zur Kontrolle der Aktivität der Medikamente wurden für den MTT-Assay zusätzlich Kontrollen für die Einzel- und Doppelbehandlungen (Dasatinib, Rapamycin, Torin 2, Dasatinib + Rapamycin, Dasatinib + Torin 2) wie in den obenstehenden Kapiteln beschrieben, untersucht („Tag 0“: Ausplattieren; „Tag 1“: Behandlung mit einzelner Substanz oder

Doppelkombination; „Tag 4“: MTT-Reaktion und Messung der Viabilität). Die Irinotecan- und Temozolomid-Kontrollen wurden parallel zur DMSO-Kontrolle geführt („Tag 0“: Ausplattieren; „Tag 1“: DMSO-Behandlung; „Tag 4“: Mediumwechsel; „Tag 5“: Behandlung mit Irinotecan, Temozolomid oder Irinotecan + Temozolomid; „Tag 8“: MTT-Reaktion und Messung der Viabilität).

Die Behandlungen erfolgten mit IC₅₀-Konzentrationen bei Einzel- bzw. Doppelbehandlung, die aus Kapitel 3 zu entnehmen sind.

2.2.6 Untersuchung der Proteinexpression und -phosphorylierung mittels Westernblot-Analysen

Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden Zellen in 12-Well-Platten ausgesät (siehe Tabelle 9) und 24 h später bei einer Konfluenz von 50-70 % bzw. entsprechend dem RIST-Therapieschema behandelt.

Tabelle 9: Ausplattieren in 12-Well-Plates für die Herstellung von Proteinlysaten

Zelllinie	Behandlung	Kontrollzellen
Kelly	2,5 x 10 ⁵ Zellen/Well	1,5 x 10 ⁵ Zellen/Well
IMR-32	3,0 x 10 ⁵ Zellen/Well	2,0-2,5 x 10 ⁵ Zellen/Well
Tet21N	1 x 10 ⁵ Zellen/Well	0,8 x 10 ⁵ Zellen/Well

Die Ernte der Zellen erfolgte 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung mit Einzel- oder Doppelbehandlung bzw. 72 h nach der Chemotherapie des RIST-Therapieschemas, also am „8. Tag“ der Kombinationstherapie aus Biologika und Chemotherapeutika.

Für die Ernte wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in *SDS-Loading Buffer* (SDS-LB) aufgenommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Tube) überführt. Waren viele Zellen durch die Therapie abgeschwommen, wurde das Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt, zentrifugiert (20 °C, 1200 rpm, 5 min), der Überstand abgenommen und die toten Zellen ebenfalls mit dem Lysat-enthaltenden SDS-LB aufgenommen. Die Menge des SDS-LB (Beladungspuffers = Natriumdodecylsulfat (SDS) Loading Buffer (LB), wurde entsprechend der Konfluenz der Zellen vorher festgelegt und variierte zwischen 200-600 µL/Well. Die Zugabe des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) dient der Denaturierung der Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung, die notwendig ist, um die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel von der Anode zur Kathode zu bewegen und aufzutrennen.

Die Proben wurden anschließend gevortext und abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Zum vollständigen Aufschluss der Zellen und Zerkleinerung der genomischen DNA wurden die Proben jeweils zweimal für drei Sekunden lang sonifiziert, erneut gevortext und abzentrifugiert. Nach Zugabe von 5 % β -Mercaptoethanol (β -ME) wurden die Proben für 10 min bei 95 °C und 600 rpm gekocht, wodurch eine Spaltung der Disulfidbrücken erreicht wird.

Die Lagerung der Proteinlysate erfolgt bei -20 °C.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der denaturierten Proteine wurde zunächst ein SDS-PAGE durchgeführt. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Westernblot und dient dem Transfer der Proteinbanden vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran. Die Banden wurden schließlich durch eine immunologische Färbung mit Antikörpern gegen das entsprechende Zielprotein sichtbar gemacht.

Für das SDS-PAGE wurde das *Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell*-System (Biorad) verwendet. Es wurde zunächst das Trenngel, in dem die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden, und anschließend das Sammelgel, in dem die Proben in die Taschen geladen und vor Eintritt in das Trenngel konzentriert werden, gegossen. Die Zusammensetzung der Gele kann aus Tabelle 10 entnommen werden. Für diese Arbeit wurden 12,5 %-ige Gele verwendet. Die Bestandteile Acryl/Bisacrylamid, TEMED und APS wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die Ansätze wurden vorbereitet und nach Zugabe von TEMED, welches eine radikale Polymerisierung und damit das Aushärten des Gels induziert, zügig in die Kammern pipettiert. Die Trenngele wurden mit je 500 μ L Isopropanol überschichtet und so zum Aushärten für 45 min belassen. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel vorbereitet und in die Kammern pipettiert und zügig die Kämme für die Bildung der Taschen eingeschoben. Es wurden Kämme zur Bildung von 15 Taschen verwendet. Die Gele wurden für mindestens 45 min zum Aushärten stehen gelassen und anschließend entweder direkt beladen oder über Nacht in einer Schale mit 1x-SDS-Laufpuffer bei 4 °C gelagert.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Trenn- bzw. Sammelgele

Angaben für die Herstellung von jeweils 2 Gelen.

Für 2 Gele:	Trenngel 12,5 %	Sammelgel (2 Gele)	
Millipore-Wasser	3,2 mL	Millipore-Wasser	2,27 mL
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 mL	0,5 M Tris pH 6,8	1,00 mL

Acryl/Bisacrylamid	4,2 mL	Acryl/Bisacrylamid	0,65 mL
10 % SDS	100 μ L	10 % SDS	40 μ L
TEMED	30 μ L	TEMED	2 μ L
10 % APS	40 μ L	10 % APS	30 μ L
	→ 4,5 mL/Gel		→ 2,0 mL/Gel

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und 1x SDS-Laufpuffer (loading buffer: LB, SDS-LB) in die Elektrophorese-Kammer gegeben. In jede Tasche wurden maximal 18 μ L der Proteinproben in SDS-LB + 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (β -ME) bzw. 5 μ L Marker (*Blue Prestained Protein Standard, NewEngland BioLabs*) pipettiert. Die Taschen wurden jeweils vor dem Beladen mit 1x-SDS-Laufpuffer gespült, um potenzielle Verunreinigungen zu entfernen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V und 350 mA (V const.) abhängig von der Größe des Proteins für etwa 50 min.

Protein-Transfer mittels Westernblot

Für diese Arbeit wurde das sogenannte „Wet-Blot“-Verfahren angewandt. Pro Gel wurden zwei Filzmatten, zwei Filterpapiere und die Membran in einer Wanne mit 1x-Transferpuffer befeuchtet und wie in Abbildung 8 dargestellt aufgebaut. Die negativ geladenen Proteine werden während des Blottens von der positiv geladenen Anode angezogen und so vom Gel auf die Membran übertragen.

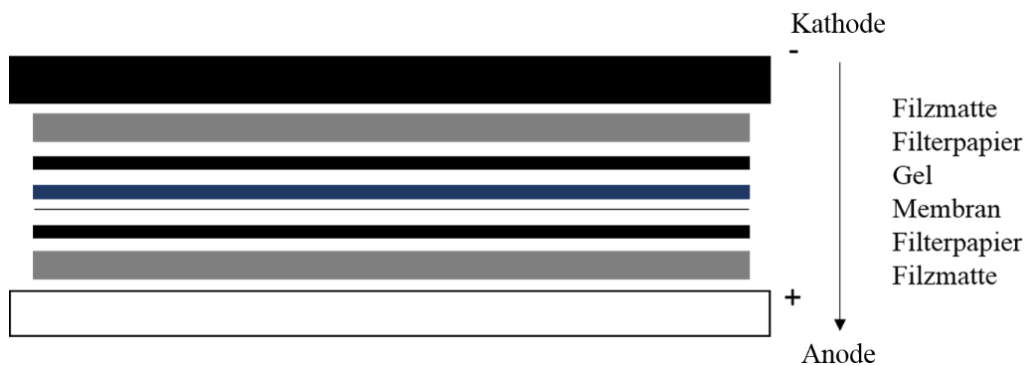


Abbildung 8: Aufbau Westernblot

Für das Blotten wurde ein Magnet-Rührfisch, ein Eisblock und 1x-Transferpuffer in die Transferkammer gegeben. Der Transfer erfolgte bei 100 V, 350 mA für 1,5 h. Der Rührfisch und der Eisblock verhindern ein Erhitzen des Transferpuffers während des Blottens.

Nach dem Transfer wurden die Banden des Proteinmarkers mit Kugelschreiber markiert und freie Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation in 10 mL TBS-T mit 2 % BSA bei Raumtemperatur rotierend in einem 50 mL-Falcon geblockt.

Immunologische Färbung der Nitrocellulose-Membrane

Im Anschluss an das Blocken wurden die Membrane mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C, rotierend in einem 50 mL-Reaktionsgefäß inkubiert. Am Folgetag wurden die Membrane 3 x 5 min mit TBS-T (Waschpuffer) gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Membranen belassen und anschließend erneut für 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Verdünnungen der für diese Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Verdünnung der primären Antikörper erfolgte in TBS-T mit 2 % BSA und 0,05 % Natriumazid (NaN₃). Die Antikörper-Verdünnungen wurden bei 4 °C gelagert. Da die sekundären Antikörper an *Horseradish Peroxidase* (HRP) gekoppelt sind und diese Peroxidase durch Natriumazid inhibiert wird, wurden sekundäre Antikörper immer frisch in TBS-T mit 2 % BSA ohne Natriumazid verdünnt.

Für die Entwicklung wurde *SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* oder *SuperSignal West Dura* verwendet. Die beiden Substanzen *Peroxide Solution* und *Lumino-Enhancer Solution* wurden 1:1 in einem Eppendorf Tube gemischt und auf die Membranen, die auf einer Glasplatte positioniert wurden, gegeben. Die Entwicklungslösung wurde sorgfältig verteilt, sodass die gesamte Membran benetzt war. Pro Membran wurden insgesamt 800 µL Lösung angesetzt.

Zur Anfertigung der Aufnahmen im *ImageQuant LAS 4000* wurde die Membran mit Frischhaltefolie abgedeckt. Nach der Entwicklung und Anfertigung der Aufnahmen wurde die Entwicklungslösung mit Waschpuffer von den Membranen abgewaschen. Es konnten nun weitere immunologische Färbungen mit anderen Antikörpern vorgenommen werden oder die Membrane bei 4 °C in TBS-T mit 0,05 % Natriumazid aufbewahrt werden.

Bei der Untersuchung der p21- und Cyclin D1-Expression wurde zudem eine Quantifizierung mit Hilfe der Software *ImageJ* vorgenommen. Hierbei wurde die Signalintensität der Proteinbanden nach Durchführung einer Westernblot-Analyse gemessen und zur Intensität der GAPDH-Bande normalisiert.

2.2.7 Untersuchung der Induktion von Seneszenz mittels β -Galactosidase-Färbung

Für die Untersuchung auf Seneszenz-Induktion durch Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie Kelly mit den oben aufgeführten Biologika wurde das *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* (Katalognummer #9860) und Dimethylformamide (Katalognummer #12767) von Cell Signaling verwendet. Die β -Galactosidase(β -Gal)-Färbung stellt eine weit verbreitete Methode zur Markierung seneszenten Zellen, in denen die β -Gal-Expression zunimmt, dar (99,100).

Die Aktivierung von Seneszenz mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid wurde in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (101). Bei Behandlung mit niedrigen Etoposid-Konzentrationen wird als zelluläre Antwort auf die DNA-Schäden Seneszenz induziert. Hohe Konzentrationen dagegen führen zur Apoptose der Zelle (101,102). Um eine Positivkontrolle für Seneszenz-Induktion in der verwendeten Neuroblastom-Zelllinie Kelly zu etablieren, wurde in einem Vorversuch die Induktion von Seneszenz durch Etoposid-Konzentrationen von 0,1 – 50 μ M und einer Behandlungsdauer von 72 h untersucht. Der Behandlungszeitraum wurde gewählt, um vergleichbare Bedingungen zwischen der Positivkontrolle und den zu untersuchenden Biologika-Behandlungen, die entsprechend dem RIST-Therapieschema für 72 h durchgeführt werden, zu erhalten.

Der Versuch wurde im 24-Well-Format durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene Zellzahlen pro Well ausplattiert, um nach 24 h Inkubation eine für die Behandlung geeignete Konfluenz von 50-70% zu erreichen. Dafür stellte sich für die Zelllinie Kelly eine Zellzahl von 90.000 Zellen pro Well als geeignet heraus. Die Zellen wurden in 500 μ L Medium ausgesät. Freie Wells wurden zum Schutz vor Verdunstung mit 1 mL PBS beschickt. 24 h nach dem Ausplattieren, also an „Tag 1“ erfolgte die Behandlung mit 5 verschiedenen Etoposid-Konzentrationen. Eine Negativkontrolle wurden mit einer DMSO-Verdünnung, die der maximal verwendeten DMSO-Konzentration entsprach, behandelt.

Nach einer Behandlungsdauer von 72 h wurde an „Tag 4“ ein Mediumwechsel durchgeführt und hoch-konfluente Wells passagiert. Es folgte eine Erholungsphase, um eine Änderung des zellulären Metabolismus und Phänotyps entsprechend des Seneszenz-Signalwegs abzuwarten. Die Zellen wurden dafür regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert und bei hohen Konfluenzen passagiert. An „Tag 8“ wurde die β -Gal-Färbung entsprechend dem Protokoll des Kits durchgeführt. Um weiterhin behandelte Zellen in Kultur zu halten und zu späteren Zeitpunkten erneut Färbungen durchzuführen, wurde ein Teil der Zellen auf eine neue Platte umgesetzt und die restlichen Wells gefärbt. Die Farbe-Ergebnisse nach einer Inkubation von

24 h in einem nicht mit CO₂-begasteten und nicht-befeuchteten Inkubator (37 °C) ergab keinen Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und den mit unterschiedlichen Etoposid-Konzentrationen behandelten Zellen. Auch eine weitere Inkubation im Brutschrank änderte dieses Ergebnis nicht.

Die Untersuchung der Seneszenz-Induktion durch Behandlung der Zelllinie Kelly mit den Biologika Dasatinib, Rapamycin oder Torin 2, sowie der Doppelbehandlung Dasatinib + Rapamycin oder Dasatinib + Torin 2 wurde deshalb folglich im Vergleich zu einer DMSO-Negativkontrolle durchgeführt.

Der Versuchsaufbau entsprach dem Vorversuch mit der Behandlung mit Etoposid. Pro Well wurden 90.000 Zellen (Behandlung) bzw. 50.000 Zellen (DMSO-Kontrolle) ausplattiert. Die Behandlung mit den Biologika erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.1 (Einzelbehandlung) bzw. 2.2.4.2 (Doppelbehandlung) für den MTT-Assay beschrieben.

Nach 72 h wurde die Färbung der Versuchsplatte durchgeführt entsprechend dem Protokoll des Kits durchgeführt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zum Vergleich der Blaufärbung der behandelten mit denen der DMSO-Kontrolle erfolgte wie im Protokoll angegeben 24 h nach der Färbung mit β -Gal. Die β -Gal-Färbung wurde einmal unter Verwendung von zwei Replikaten durchgeführt.

2.2.8 Statistische Verfahren

Für die Bestimmung der IC₅₀-Konzentrationen wurden die um die DMSO-Kontrolle normalisierten Zellviabilitäten [%] in GraphPad Prism in logarithmische Werte transformiert und auf einen Wertebereich von 0 – 100 % normalisiert. Es erfolgte eine nicht-lineare Regressions-Analyse. Die Ergebnisse werden in Mittelwerten \pm Standardabweichung angegeben.

Für die Untersuchung des Effekts auf die Reduktion der Zellviabilität durch Kombination der Medikamente im Vergleich zur Einzelbehandlung und Kontrolle bzw. des Effekts der RIST- und TIST-Therapie im Vergleich zur Kontrolle wurde ein ungepaarter T-Test durchgeführt. Für die P-Wert-Ermittlung wurden keine konstanten Standardabweichungen angenommen. Für die statistische Signifikanz wurde die Holm-Sidak-Methode und eine Signifikanz-Level von $\alpha = 5,00$ % verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung des Seneszenz-Signalwegs durch die Biologika-Vorbehandlung

Seneszenz ist nach Hayflick and Moorhead (1961) ein Zustand, in den die Zellen bei Erreichen des Endes der Replikationsphase eintreten und der mit einem irreversiblen Zellzyklus- und Wachstumsarrest einhergeht (103). Neben der „replikativen Seneszenz“, ausgelöst meist durch intrinsische Signale, kann die Zelle auch „vorzeitig“ durch diverse Stressoren, wie beispielsweise eine Behandlung mit DNA-schädigenden Medikamenten, eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder eine Aktivierung von Onkogenen in diesen Zustand gelangen (reviewed in (104,105)). Es wurde untersucht, ob Seneszenz durch die Biologika-Vorbehandlung der RIST-Therapie induziert wird.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Seneszenz-Markers *p21* mittels Westernblot sind in Kapitel 3.9 dargestellt. Neben der Analyse der Expression von *p21* wurde zudem in der Zelllinie Kelly eine β -Galactosidase(β -Gal)-Färbung (siehe Kapitel 2.2.7), eine weit verbreitete Methode zur Markierung seneszenten Zellen, in denen die β -Gal-Expression zunimmt (99,100), durchgeführt.

Zunächst sollte die Behandlung mit Etoposid als Positiv-Kontrolle etabliert werden. Der Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen und ist als Seneszenz-induzierende Substanz bekannt (101). Es wurde eine Konzentrationsbreite von 0,1 – 50 μ M Etoposid zu Behandlung der Zelllinie Kelly verwendet, um die Dosis zu bestimmen, die für die Induktion von Seneszenz notwendig ist. Allerdings konnte bei keiner der Konzentrationen Seneszenz durch eine positive β -Gal-Färbung im Vergleich zur DMSO-Negativkontrolle nachgewiesen werden. Nach Behandlung in hohen Konzentrationen sind die Zellen tot abgeschwommen, was daraufhin deutet, dass die Zellen in Apoptose gehen. Bei niedrigeren Behandlungskonzentrationen ergab sich nach β -Gal-Färbung kein Unterschied zwischen behandelten Zellen und Kontrollzellen (siehe Abbildung 23: Beispiel einer Färbung nach Behandlung mit 1 μ M Etoposid). Es konnte keine Etoposid-Behandlung als Positivkontrolle für die Induktion von Seneszenz in der Zelllinie Kelly etabliert werden.

Die Untersuchung der Zellen nach Behandlung mit Dasatinib, Rapamycin, Torin 2 und den Doppelkombinationen der mTOR-Inhibitoren mit Dasatinib erfolgte daher im Vergleich zu einer mit DMSO behandelten Negativkontrolle.

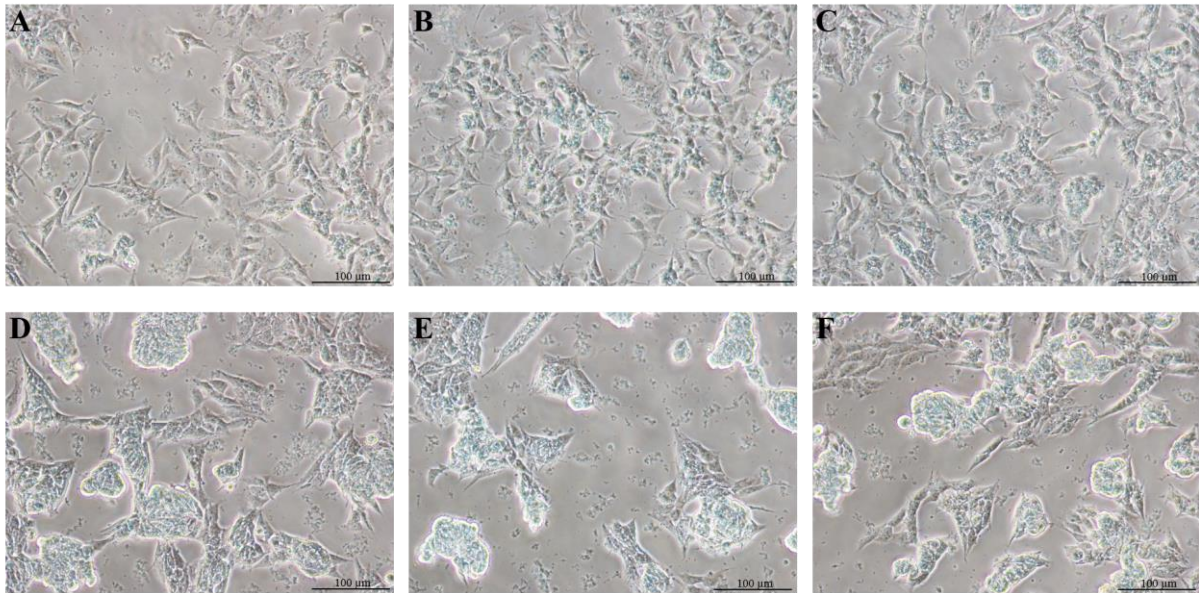


Abbildung 9: β -Galactosidase-Färbung nach Einzel- und Doppelbehandlung

Lichtmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 20x) nach Behandlung der Zelllinie Kelly mit den Einzelmedikamenten Dasatinib, Rapamycin und Torin 2, sowie der Kombination von Dasatinib mit Rapamycin bzw. Torin 2 in entsprechenden IC_{50} -Konzentrationen und Färbung mit β -Galactosidase. A: DMSO-Kontrolle; B: Rapamycin; C: Torin 2; D: Dasatinib; E: Dasatinib + Rapamycin; F: Dasatinib + Torin 2. Das Experiment wurde einmal mit zwei Replikaten durchgeführt.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, nahm die Blaufärbung nach allen Behandlungen (Abbildung 9, B-F) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 9, A) tendenziell zu. Durch die starke morphologische Veränderung der Zellen konnte allerdings keine Quantifizierung blau gefärbter Zellen vorgenommen werden, da die Zellen nicht mehr einzeln abgrenzbar, sondern rundlich aufgebläht in haufenförmiger Anordnung vorlagen. Das Zytosol zeigte sich zudem nicht einheitlich blau, wie es beispielsweise durch Nelli Frank als Nachweis seneszenten Neuroblastom-Zellen gezeigt wurde (104). Die β -Gal-Färbung wurde nur durch vermehrt blaue Granula in den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Das Ergebnis stellt keinen eindeutigen Positivnachweis dar, die tendenzielle Zunahme der Blaufärbung gibt zusammen mit dem Ergebnis der Zunahme der p21-Expression (siehe Abbildung 18) einen Hinweis auf eine Induktion von Seneszenz durch die Behandlung mit den getesteten Biologika.

3.2 Keine erhöhte Sensitivität MycN-exprimierender Tet21N-Zellen gegenüber Rapamycin

In Voruntersuchungen durch Johannes Leister und Gina Penkivech wurde bereits ein stärkeres Ansprechen MycN-amplifizierter NB-Zelllinien auf Rapamycin beziehungsweise die RIST-Therapie gezeigt (93,106). *Johnsen et al.* konnte 2008 in der Zelllinie Tet21N eine Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber Rapamycin und einem weiteren mTOR-Inhibitor CCI-779 von der Expression des Onkogens MycN zeigen. MycN-ON-Zellen wiesen hierbei im MTT-Assay ein signifikant stärkeres Ansprechen auf die Behandlung mit Rapamycin und CCI-779 auf (50).

Für die Untersuchung einer Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber der mTOR-Inhibitoren Rapamycin und Torin 2 von der Expression des Onkogens MycN diente für diese Arbeit ebenfalls das MycN-regulierbare System der Zelllinie Tet21N (siehe Kapitel 2.1.2).

In dieser Arbeit sollte zunächst die IC_{50} -Konzentration für Rapamycin in induzierten im Vergleich zu nicht-induzierten Tet21N-Zellen mittels MTT-Assay wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben, bestimmt werden. Um zu kontrollieren, ob die MycN-Induktion erfolgreich war und über die gesamte Versuchsdauer hinweg angehalten hatte, wurden Zellysate zu den Zeitpunkten des Ausplattierens, also 72 h nach Induktion (genannt „MTT 0“) und der MTT-Messung, also 72 h nach Behandlung und 168 h nach Induktion (genannt „MTT 4“), hergestellt und die MycN-Expression mittels Westernblot analysiert. Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte wie in Kapitel 2.2.6 erläutert.

Zunächst konnte die MycN-Expression in den Tet21N-Zellen nicht reguliert werden. Sowohl bei Kultivierung in Tetrazyklin-freiem Medium als auch in Tetrazyklin-haltigem Medium exprimierten die Zellen das Onkogen. Verschiedene potenzielle Ursachen, wie beispielsweise ein nicht funktionsfähiges Tetrazyklin konnte in weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. Bei Verwendung von Zellen junger Passagen (P_{x+4}) konnte die MycN-Expression allerdings erfolgreich reguliert werden (siehe Abbildung 10).

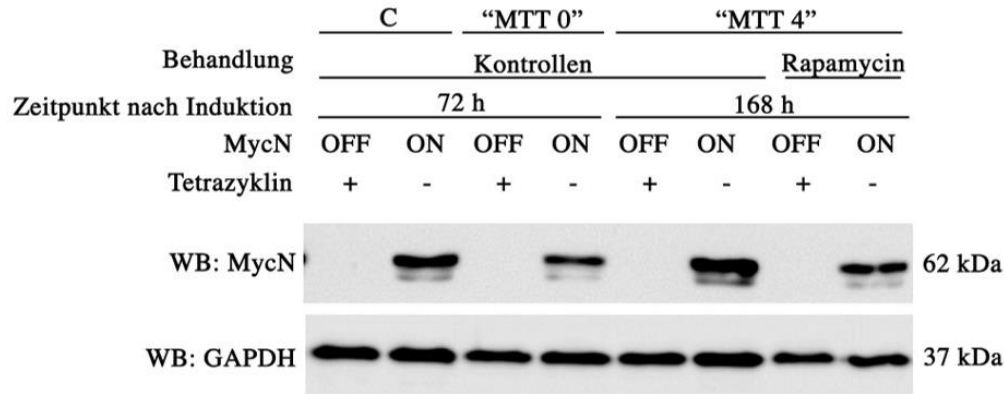


Abbildung 10: MycN-Expression während des MTT-Versuchs zur IC_{50} -Bestimmung von Rapamycin in der Zelllinie Tet21N

Die Zellen zur Herstellung der Lysate wurden analog zum MTT-Versuch induziert, ausplattiert und behandelt. Die „MTT-0“-Probe stellt den Zeitpunkt 72 h nach Induktion, also am Tag des Ausplattierens dar. Die Zellen der „MTT-4“-Probe wurden wie für den MTT-Versuch 24 h nach der Aussaat bei 50-70 % Konfluenz mit 30 μ M Rapamycin bzw. einer DMSO-Verdünnung (Kontrolle) behandelt und 72 h nach Behandlung, also 168 h nach Induktion geerntet. Die Kontrolle „C“ wurde für laborinterne Vorversuche hergestellt und zeigt die MycN-Expression der MycN-ON- und MycN-OFF-Zellen 72 h nach Induktion. Die Westernblot-Analyse der MycN-Expression wurde parallel zu einem MTT-Experiment angefertigt.

In MycN-ON-Zellen wurde unter Kultivierung in Tetrazyklin-freiem Medium eine starke Expression des Onkogens induziert, während die MycN-OFF-Zellen, die in Tetrazyklin-haltigem Medium kultiviert wurden, keine MycN-Expression aufwiesen. Möglicherweise ist die Expressionsregulation durch Tetrazyklin abhängig von der Passage der Zellen und geht im Laufe der Zeit verloren.

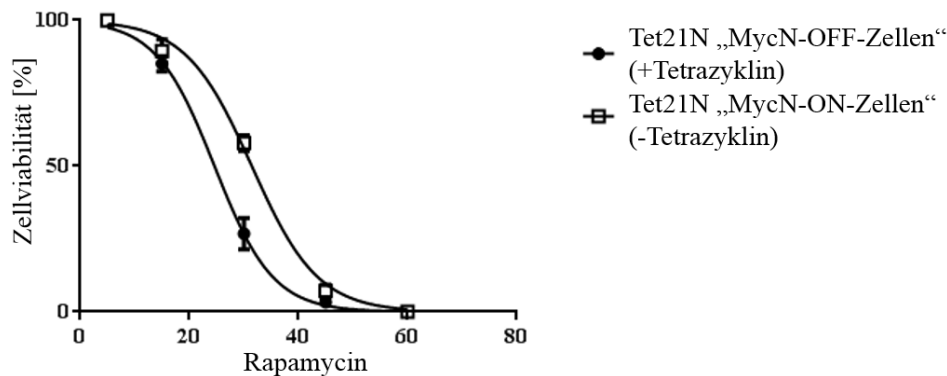


Abbildung 11: Zellviabilitätskurve zur IC_{50} -Bestimmung für Rapamycin in der Zelllinie Tet21N

Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bei einer Konfluenz von 50-70 % behandelt. Die Messung der Viabilität wurde mittels MTT zum Zeitpunkt 72 h nach Behandlung durchgeführt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 11: IC_{50} -Konzentration in der Zelllinie Tet21N

	MycN OFF (+Tetrazyklin)	MycN ON (-Tetrazyklin)
Rapamycin [μ M]	24,61	31,46

Bei Untersuchung der Zellviabilität nach Rapamycin-Behandlung mittels MTT-Assay unter den erläuterten Bedingungen konnte trotz erfolgreicher MycN-Induktion keine erhöhte Sensitivität der MycN-exprimierenden Zellen gegenüber Rapamycin gezeigt werden (siehe Abbildung 11). Die MycN-ON-Zellen sprachen mit einer IC₅₀-Konzentration von 31,46 µM im Vergleich zu den MycN-OFF-Zellen mit 24,61 µM geringfügig schlechter auf den mTOR-Inhibitor an.

3.3 IC₅₀-Konzentrationen bei Einzel- und Doppelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Torin 2

Zunächst erfolgte die Bestimmung der IC₅₀-Konzentrationen bei Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen Dasatinib, Rapamycin oder Torin 2. Anschließend wurden die IC₅₀-Konzentrationen bei Doppelbehandlung (Dasatinib + Torin 2; Dasatinib + Rapamycin) ermittelt und auf synergistische, additive oder antagonistische Effekte untersucht (siehe Kapitel 3.5). Die IC₅₀-Konzentrationen der Doppelbehandlung wurden zudem für die Kombination der Medikamente in der RIST-Therapie verwendet.

In laborinternen Voruntersuchungen wurden die IC₅₀-Konzentrationen für die vier neuen ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren Torin 1, Torin 2, PP242 und AZD3147 in den Zelllinien Kelly und IMR-32 ermittelt. Für die Inhibitoren Torin 1, PP242 und AZD3147 waren hierbei stark unterschiedliche Medikamentenkonzentrationen notwendig, um in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien eine Hemmung der Viabilität um 50 % zu erreichen. Torin 2 wies, im Gegensatz zu den drei anderen Inhibitoren, in den Neuroblastom-Zelllinien Kelly und IMR-32 vergleichbare niedrig nanomolare IC₅₀-Konzentrationen auf (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich der IC₅₀-Konzentrationen der mTOR-Inhibitoren in den Zelllinien Kelly und IMR-32

	Kelly	IMR-32
<i>Rapamycin</i>	27 µM	37 µM
Torin 1	42 nM	397 nM
<i>Torin 2</i>	12 nM	30 nM
PP242	0,9 nM	662 nM
AZD3147	177 nM	390 nM

Aufgrund der stark unterschiedlichen Sensitivität der Zelllinien Kelly und IMR-32 gegenüber der mTOR-Inhibitoren Torin 1, PP242 und AZD3147 und der vergleichbaren Sensitivität der

beiden NB-Zelllinien gegenüber Torin 2 auf der anderen Seite, sowie der im Folgenden dargestellten Eigenschaften der mTOR-Inhibitoren, wurde Torin 2 für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Torin 2 wurde ausgehend von Torin 1 entwickelt, um die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern (107). Torin 2 weist eine höhere Bioverfügbarkeit, metabolische Stabilität und längere Plasmaexpositionszeit sowie eine hoch potente Hemmung der mTOR-Kinase mit einer 800-fach höheren Selektivität im Vergleich zu PI3K auf (107). Die mTOR-Inhibition wird über einen langen Zeitraum aufrechterhalten, was vermutlich auf eine langsame Dissoziation des Inhibitors von der mTOR-Kinase zurückzuführen ist (83). Zudem hemmt die neue Substanz neben der mTOR-Kinase auch PIKK-Kinasen (ATM, ARK, DNA-PK), die eine wichtige Stellung in der DNA-Reparatur einnehmen. Die Inhibition dieser Kinasen hat eine erhöhte Sensibilität gegenüber Bestrahlung zur Folge (84). Durch *Liu et al.* konnten bereits starke anti-Tumor-Effekte gezeigt werden: Torin 2 hemmte die Proliferation verschiedener Krebszelllinien, die Progression des Zellzyklus und induzierte sowohl Apoptose, als auch Autophagie (84).

Die IC_{50} -Konzentrationen wurden für den Zeitpunkt 72 h nach Behandlung, wie in Kapitel 2.2.4.1 und 2.2.4.2 beschrieben, bestimmt. Einige IC_{50} -Konzentrationen waren bereits in laborinternen Vorversuchen durch Marie Matthes ermittelt worden. Die Assays wurden für diese Arbeit in mindestens drei unabhängigen Experimenten wiederholt und die Werte bestätigt. In Abbildung 12 ist ein Beispiel der Zellviabilitätskurven für die IC_{50} -Bestimmung in der Zelllinie Kelly dargestellt. Die Graphen zeigen die abnehmenden Zellviabilität gegen die logarithmische Medikamentenkonzentration.

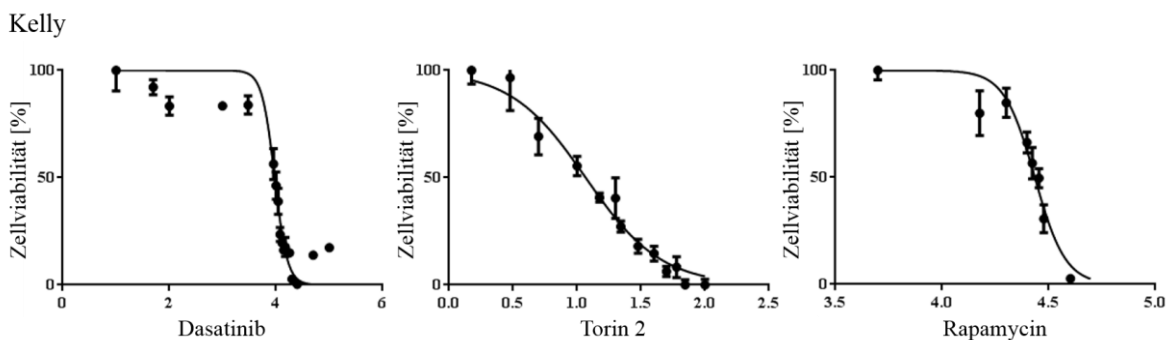


Abbildung 12: Zellviabilitätskurven zur IC_{50} -Bestimmung für Dasatinib, Rapamycin und Torin 2 in der Zelllinie Kelly

Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bei einer Konfluenz von 50-70 % behandelt. Die Messung der Viabilität wurde mittels MTT zum Zeitpunkt 72 h nach Behandlung durchgeführt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Die ermittelten IC₅₀-Werte können aus Tabelle 13 (Einzelbehandlung) bzw. aus Tabelle 14 (Doppelbehandlung) entnommen werden. Tabelle 14 zeigt zudem den jeweiligen Dosis-Reduktions-Faktor (DRF). Der DRF gibt an, um welchen Faktor die Konzentration bei Kombination der Medikamente im Vergleich zu Einzelbehandlung unter Erhalt des gleichen Effekts (50 %-ige Viabilitätshemmung) reduziert werden kann.

Tabelle 13: IC₅₀-Konzentrationen Einzelbehandlung mit Biologika

	Dasatinib [μM]	Rapamycin [μM]	Torin 2 [nM]
Kelly	9,47 ± 0,010	27,21 ± 0,006	11,69 ± 0,019
IMR-32	1,53 ± 0,057	37,47 ± 0,003	29,67 ± 0,013

IC₅₀-Konzentrationen in den Zelllinien Kelly und IMR-32 bei Dasatinib-, Rapamycin- bzw. Torin-2-Behandlung. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

In beiden Zelllinien liegen die IC₅₀-Konzentrationen bei Einzelbehandlung für Dasatinib im niedrig mikromolaren und für Rapamycin im mittleren mikromolaren Bereich.

Für Torin 2 liegen die IC₅₀-Konzentrationen dagegen im niedrig bis mittleren nanomolaren Bereich. Dies entspricht einer etwa 1000-fachen Reduktion der Konzentrationen bei Vergleich von Rapamycin mit Torin 2.

Tabelle 14: IC₅₀-Konzentrationen und Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) bei Doppelbehandlung mit Biologika

	Dasatinib [μM]	Rapamycin [μM]	DRF Dasatinib	DRF Rapamycin
Kelly	5,00	2,00	1,9	13,6
IMR-32	0,05	0,13	30,6	288,2
	Dasatinib [μM]	Torin 2 [nM]	DRF Dasatinib	DRF Torin 2
Kelly	1,50	9,00	6,3	1,3
IMR-32	1,00	6,00	1,5	4,9

IC₅₀-Konzentrationen bei Behandlung der Zelllinien Kelly und IMR-32 mit den Kombinationen Dasatinib + Torin 2 bzw. Dasatinib + Rapamycin und Angabe des Dosis-Reduktions-Faktors (DRF).

Die IC₅₀-Konzentrationen bei Behandlung mit zwei Medikamenten wurde mit Hilfe der Ergebnisse der Untersuchung auf eine synergistische Wirkung (siehe Kapitel 3.5) aus mindestens drei Versuchen festgelegt.

Die IC₅₀-Konzentrationen sind sowohl bei Kombination von Dasatinib mit Rapamycin als auch mit Torin 2 im Vergleich zu denen der Einzelbehandlung leicht bis deutlich reduziert. Bei der Kombination Dasatinib + Rapamycin in der Zelllinie IMR-32 zeigte sich die stärkste Dosis-Reduktion um das fast 31-(Dasatinib) bzw. 300-fache (Rapamycin). Bei den weiteren Kombinationen konnten die Konzentrationen um das 1,3-13,6-fache reduziert werden.

Die hier ermittelten IC₅₀-Konzentrationen der Doppelbehandlung wurden für die Vorbehandlung des RIST-Therapieschemas verwendet.

Abbildung 13 zeigt die deutliche Zunahme der Viabilitätshemmung durch Behandlung der Zelllinien Kelly und IMR-32 mit den Kombinationen Dasatinib + Torin 2 bzw. Dasatinib + Rapamycin im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit den Einzelsubstanzen in den gleichen Konzentrationen. Behandelt wurde mit den in Tabelle 14 angegebenen IC₅₀-Konzentrationen der entsprechenden Doppelbehandlungen.

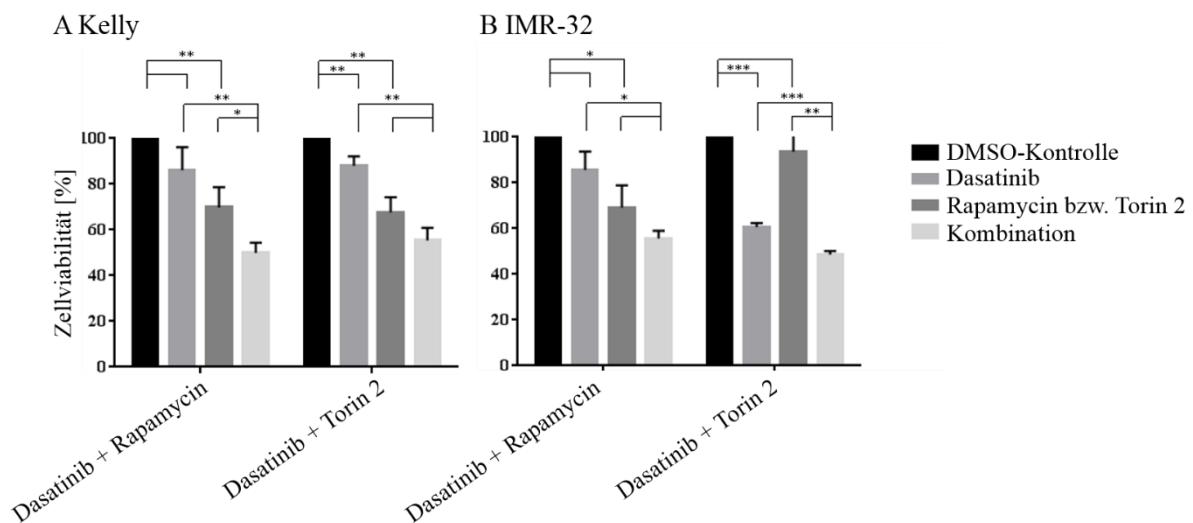


Abbildung 13: Reduktion der Zellviabilität durch Doppelbehandlung mit Biologika

Darstellung der Zellviabilität nach Behandlung der Zelllinien A: Kelly und B: IMR-32 mit den Kombinationen Dasatinib + Rapamycin bzw. Dasatinib + Torin 2 im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit den Einzelsubstanzen. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bei einer Konfluenz von 50-70 % mit den für die jeweilige Doppelbehandlung bestimmten IC₅₀-Konzentrationen (siehe Tabelle 14) behandelt. Die Messung der Viabilität wurde mittels MTT zum Zeitpunkt 72 h nach Behandlung durchgeführt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Untersuchung der Doppelbehandlung mit Dasatinib + Rapamycin in der Zelllinie Kelly wurde bereits durch Johannes Leister durchgeführt (93) und für diese Arbeit einmal bestätigt. Alle weiteren Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Durch die Behandlung der Zelllinie Kelly mit Dasatinib + Rapamycin wurde im Vergleich zur Behandlung mit beiden Einzelsubstanzen eine signifikante Reduktion der Viabilität induziert. Die Doppelbehandlung mit Dasatinib + Torin 2 hat eine signifikant stärkere Hemmung der Viabilität gegenüber der Einzelbehandlung mit Dasatinib zur Folge. In Bezug auf die Behandlung mit Torin 2 wurde keine signifikante, aber trotzdem deutlich stärkere Hemmung mit $p = 0,07$ erreicht.

In der Zelllinie IMR-32 induzierte die Kombination Dasatinib + Rapamycin eine signifikante stärkere Viabilitätshemmung gegenüber der Einzelbehandlung mit Dasatinib. Die Hemmung der Viabilität durch die Doppelbehandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Rapamycin

konnte mit $p = 0,20$ gesteigert werden. Die Doppelbehandlung Dasatinib + Torin 2 führte gegenüber beiden Einzelbehandlungen zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Zellviabilität.

3.4 IC₅₀-Konzentrationen bei Einzel- und Doppelbehandlung mit Irinotecan und Temozolomid

Für die Durchführung der RIST-Therapie wurden neben der Biologika auch die IC₅₀-Konzentrationen der Chemotherapeutika Irinotecan (Verwendung des aktiven Metaboliten SN-38) und Temozolomid, wie in Kapitel 2.2.4.1 und 2.2.4.2 beschrieben, bestimmt.

Die IC₅₀-Werte können aus Tabelle 15 (Einzelbehandlung) bzw. aus Tabelle 16 (Doppelbehandlung) entnommen werden. In Tabelle 16 ist zudem der Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) angegeben.

Tabelle 15: IC₅₀-Konzentrationen bei Einzelbehandlung mit Chemotherapeutikum

	Irinotecan [SN-38, nM]	Temozolomid [μ M]
Kelly	2,74 \pm 0,008	246,0 \pm 0,004
IMR-32	0,67 \pm 0,009	159,9 \pm 0,004

IC₅₀-Konzentrationen in den Zelllinien Kelly und IMR-32 bei Irinotecan- bzw. Temozolomid-Behandlung. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Die IC₅₀-Konzentration für Irinotecan liegt für beide Zelllinien im niedrig nanomolaren Bereich. Für Temozolomid sind für beide Zelllinien hohe mikromolare Konzentrationen notwendig, um eine 50 %ige Hemmung der Viabilität zu erreichen.

Tabelle 16: IC₅₀-Konzentrationen und Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) bei Doppelbehandlung mit Chemotherapeutika

	Irinotecan [nM]	Temozolomid [μ M]	DRF Irinotecan	DRF Temozolomid
Kelly	1,0	225,0	2,7	1,1
IMR-32	0,4	120,0	0,2	1,3

IC₅₀-Konzentrationen bei Doppelbehandlung der Zelllinien Kelly und IMR-32 mit der Kombination Irinotecan + Temozolomid und Angabe des Dosis-Reduktions-Faktors. Die IC₅₀-Konzentrationen für die Doppelbehandlung wurden nach Durchführung von mindestens drei unabhängigen Experimenten festgelegt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

In der Zelllinie Kelly führte die Kombination der beiden Chemotherapeutika gegenüber der jeweiligen Einzelbehandlung zu einer 2,7-fachen Dosis-Reduktion bei Irinotecan und einer 1,1-fachen Reduktion bei Temozolomid.

In der Zelllinie IMR-32 konnte die niedrig-nanomolare IC₅₀-Konzentration für die Irinotecan-Behandlung durch die Kombination mit Temozolomid um das 0,2-fache reduziert werden. Die Temozolomid-Konzentration lag in der Doppelbehandlung um das 1,3-fache niedriger gegenüber der Einzelbehandlung.

Abbildung 14 zeigt die Zunahme der Viabilitätshemmung durch Behandlung der Zelllinien Kelly und IMR-32 mit der Kombination Irinotecan + Temozolomid im Vergleich zur Behandlung mit den Einzelsubstanzen in den gleichen Konzentrationen. Verwendet wurde die in Tabelle 16 angegebene IC₅₀-Konzentrationen der Doppelbehandlung. Die IC₅₀-Konzentration für Irinotecan liegt für beide Zelllinien im niedrig nanomolaren Bereich. Für Temozolomid sind für beide Zelllinien hohe mikromolare Konzentrationen notwendig, um eine 50 %ige Hemmung der Viabilität zu erreichen.

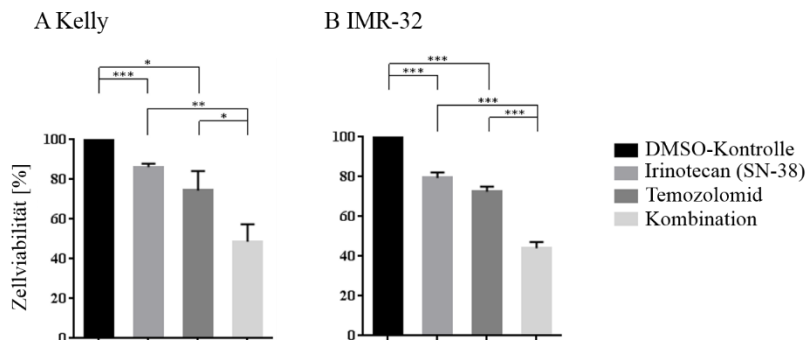


Tabelle 16

Abbildung 14: Reduktion der Zellviabilität durch Doppelbehandlung mit Chemotherapeutika

Darstellung der Zellviabilität nach Behandlung der Zelllinien A: Kelly und B: IMR-32 mit Irinotecan + Temozolomid im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit den Einzelsubstanzen. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bei einer Konfluenz von 50-70 % mit der IC₅₀-Konzentration bei Doppelbehandlung (siehe Tabelle 16) behandelt. Die Messung der Viabilität wurde mittels MTT zum Zeitpunkt 72 h nach Behandlung durchgeführt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

In beiden Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Kombination der Chemotherapeutika eine signifikant stärkere Hemmung der Zellviabilität im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen zur Folge hat.

3.5 Synergistische Wirkung der Kombinationsbehandlungen

Bei Kombinationsbehandlung können additive, synergistische oder antagonistische Effekte auftreten (94,95), wobei eine synergistische Wirkung stärker und eine antagonistische Wirkung schwächer ist, als der additive Substanzeffekt (95–97).

In Brustkrebszellen konnte durch *Park et al.* ein starker Synergismus der Kombination von Dasatinib mit Rapamycin nachgewiesen werden (108). Eine synergistische Wirkung wurde durch *Johannes Leister* im Rahmen seiner Dissertation in verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien, unter anderem auch in der für diese Arbeit verwendeten Zelllinie Kelly, nachgewiesen (93).

Hier wurde nun auf eine synergistische Wirkung der Kombination von Dasatinib mit dem neuen ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor Torin 2 in den Zelllinien Kelly und IMR-32 untersucht und getestet, ob eine Bestätigung des durch *Johannes Leister* gezeigten synergistischen Effekts von Dasatinib + Rapamycin in der Zelllinie Kelly möglich ist. Zudem wurde der Effekt der Kombination von Irinotecan und Temozolomid, also des Chemotherapie-Arms der RIST-Therapie, analysiert.

Für die Untersuchung des Effekts der Doppelbehandlungen wurde die Software *CalcuSyn*, die auf der Chou-Talalay-Methode basiert, verwendet. Dabei wurde quantitativ ermittelt, ob ein Synergismus oder Antagonismus im Hinblick auf den Effekt der 50 %-igen Hemmung der Viabilität vorliegt.

Tabelle 17: Kombinatorische Indices (CI) bei Doppelbehandlung mit Biologika

	Dasatinib + Torin 2	Dasatinib + Rapamycin
Kelly	0,60 ± 0,15	0,23 ± 0,07
IMR-32	0,17 ± 0,11	0,20 ± 0,02

CI-Werte für die Behandlung mit Dasatinib + Torin 2 bzw. Dasatinib + Rapamycin in zuvor ermittelter IC₅₀-Konzentration (siehe Kapitel 3.33) in den Zelllinien Kelly und IMR-32. In der Tabelle werden die Mittelwerte der Ergebnisse aus mindestens zwei Experimenten und deren Standardabweichung angegeben.

Die berechneten CI-Werte (siehe Tabelle 17) liegen in den Zelllinien Kelly und IMR-32 sowohl für die Kombination Dasatinib + Rapamycin, als auch Dasatinib + Torin 2 unter 0,9, was eine synergistische Wirkung für beide Doppelbehandlungen zeigt (Bedeutungen der CI-Werte: siehe Tabelle 8 in Kapitel 2.2.4.3). Der Effekt dieser Kombinationsbehandlung ist also stärker als die additive Wirkung der Einzelmedikamente. In der Zelllinie IMR-32 lagen die CI-Werte im Bereich zwischen 0,1 – 0,3. Dies entspricht einer starken synergistischen Wirkung. In der Zelllinie Kelly konnte mit einem CI = 0,23 für die Kombination Dasatinib + Rapamycin ebenfalls ein starker Synergismus gezeigt und der durch *Johannes Leister* erbrachte Nachweis eines Synergismus bestätigt werden (vgl.: Leister, J.: CI = 0,18 für Dasatinib + Rapamycin in Kelly (93)). Der Effekt der Behandlung Dasatinib + Torin 2 in der Zelllinie Kelly lag mit einem CI = 0,60 im Bereich zwischen leichtem und starkem Synergismus.

Beide Doppelbehandlungen weisen damit in Hinblick auf den Effekt einer 50 %-igen Hemmung der Zellviabilität eine synergistische Wirkung auf.

Tabelle 18: Kombinatorische Indices (CI) bei Doppelbehandlung mit Chemotherapeutika

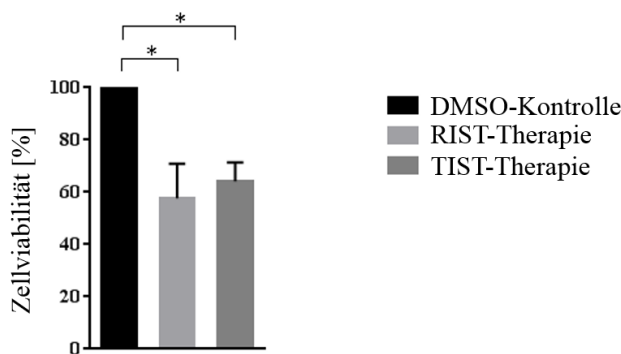
	Irinotecan (SN-38) + Temozolomid
Kelly	1,20 ± 0,09
IMR-32	1,30 ± 0,15

CI-Werte für die Doppelbehandlung mit Irinotecan (SN-38) und Temozolomid in zuvor ermittelter IC₅₀-Konzentration (siehe Kapitel 3.4) in den Zelllinien Kelly und IMR-32. In der Tabelle werden die Mittelwerte der Ergebnisse aus mindestens drei Experimenten und deren Standardabweichung angegeben.

Die CI-Werte der Doppelbehandlung mit den Chemotherapeutika Irinotecan + Temozolomid (siehe Tabelle 18) liegen mit 1,20 in Kelly und 1,30 in IMR-32 zwischen 1,1 und 1,45 und entsprechen damit einem leichten Antagonismus. Der Effekt bei Kombination ist also geringer, als die additive Wirkung beider Einzelmedikamente.

3.6 Vergleichbare Viabilitätshemmung durch TIST- und RIST-Therapie

Für einen Vergleich des bisher verwendeten RIST-Schemas mit der alternativen „TIST-Therapie“, die anstelle von Rapamycin den ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor Torin 2 enthält, wurde mittels MTT-Assay die Viabilitätshemmung im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle bestimmt (Abbildung 15). Die Durchführung ist in den Kapiteln 2.2.4 und 2.2.5 erläutert.

**Abbildung 15: Vergleich der „RIST-Therapie“ mit dem alternativen Schema „TIST-Therapie“**

Vergleich der Zellviabilität nach Behandlung der Zelllinie Kelly mit der RIST-Therapie, sowie dem alternativen Schema mit Torin 2 mit einer DMSO-Kontrolle. Die Zellen wurden entsprechend dem RIST-Therapieschema (siehe Abbildung 7) behandelt. Die Messung der Viabilität wurde mittels MTT an „Tag 8“ durchgeführt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Beide Therapieschemata führen zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Zwischen den beiden Therapieprotokollen zeigte sich kein relevanter

Unterschied. Hervorzuheben ist allerdings, dass der Effekt der TIST-Therapie in 1.000-fach reduzierter Behandlungskonzentrationen erreicht wird.

3.7 Effektive Hemmung der mTOR-Signalkaskade

Zunächst wurde der Effekt von Torin 2 in Kombination mit Dasatinib (D+T) auf die Expression und Phosphorylierung der direkten mTOR-Substrate, sowie weiterer Proteine des mTOR-Signalwegs und der Kinase Src im Vergleich zur Kombination von Rapamycin mit Dasatinib (D+R) und einer DMSO-Kontrolle (C) für die Zeitpunkte 6 und 24 h in Kelly und IMR-32 mittels Westernblot analysiert (Abbildung 16). Hierzu wurde jeweils ein phosphospezifischer Antikörper zum Nachweis des Phosphorylierungsgrades des entsprechenden Proteins (z.B. Zeile 1, P-4E-BP) verwendet, sowie ein Antikörper, der die Gesamtexpression eines Proteins (z.B. Zeile 2: 4E-BP) nachweist.

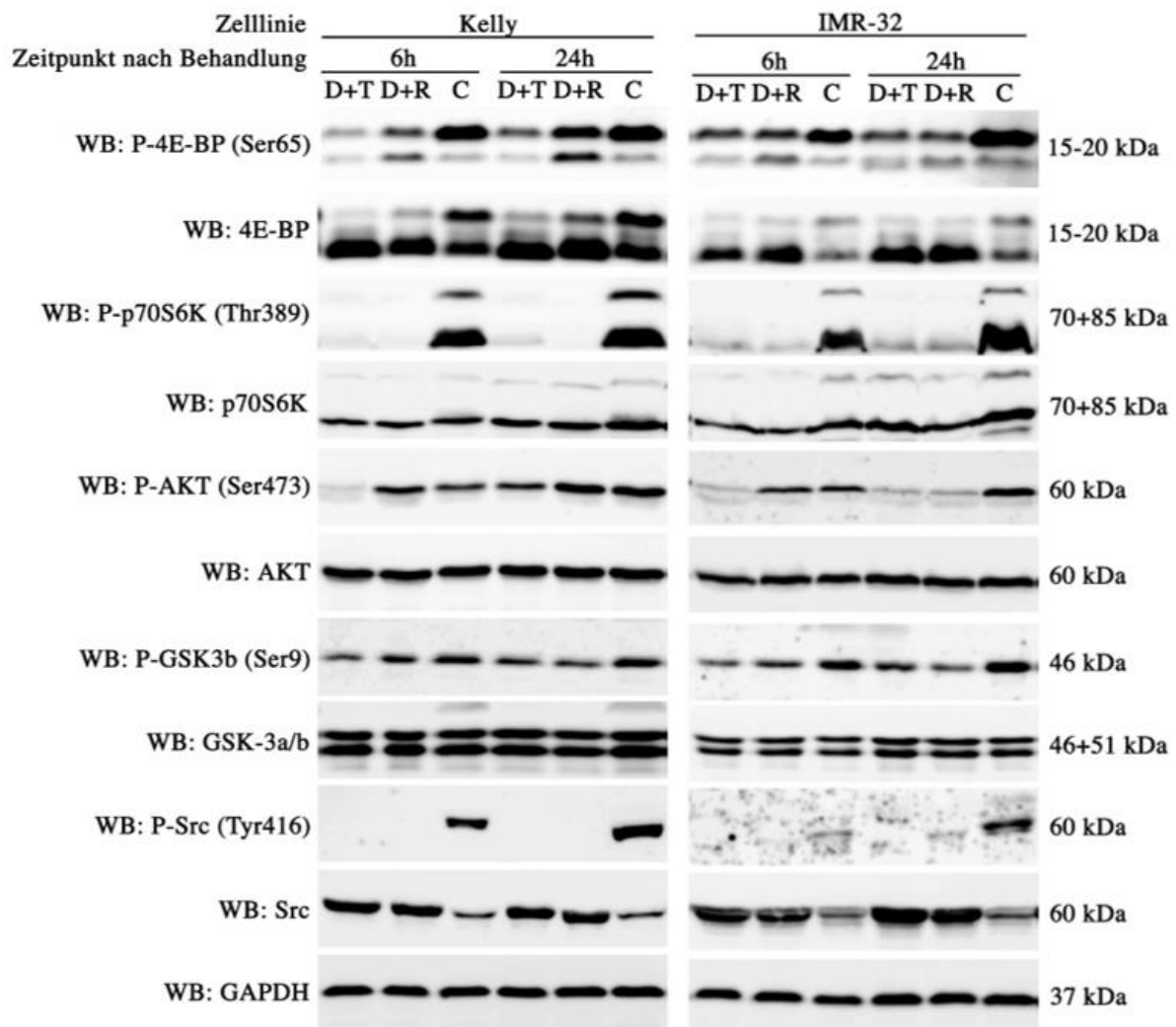


Abbildung 16: Hemmung der mTOR-Signalkaskade durch Biologika-Doppelbehandlung

Effekte der Behandlung Dasatinib + Torin 2 (D+T) im Vergleich zu Dasatinib + Rapamycin (D+R) bzw. einer DMSO-Kontrolle (C) auf die Phosphorylierung (P) der Substrate der mTOR-Komplexe 1 und 2 (mTORC1 und 2), sowie von der Kinase Src in den Zelllinien Kelly und IMR-32. Die Zellen wurden mit IC₅₀-Konzentrationen der entsprechenden Doppelbehandlung behandelt und nach 6 bzw. 24 h geerntet. Mittels Westernblot wurde die Phosphorylierung der Proteine 4E-BP, p70S6K, AKT, GSK-3 β und Src untersucht. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten. WB: Westernblot.

In beiden Zelllinien zeigte sich für beide Medikamenten-Kombinationen eine starke Hemmung des mTORC1 durch die deutliche Reduktion der Phosphorylierungen der mTORC1-Substrate 4E-BP1 (Ser65) (Regulator der mRNA Translation) und p70S6K (Thr389) (S6 Kinase) im Vergleich zur Kontrolle. Bei Vergleich der mTOR-Inhibitoren fällt auf, dass die Phosphorylierung von 4E-BP1 in der Zelllinie Kelly durch die Kombination mit Torin 2 (D+T) im Vergleich zu Rapamycin (D+R) stärker unterdrückt wird (Zeile 1 und 2, Spur 1, 2 und 4, 5).

Durch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Torin 2 (D+T) konnte zudem eine starke mTORC2-Hemmung durch eine deutliche Unterdrückung der Phosphorylierung der AKT-Kinase an Ser473 in beiden getesteten Zelllinien gezeigt werden. Der Effekt auf die AKT-Phosphorylierung (Ser473) war in der Zelllinie Kelly bei 6 h stärker (Zeile 5 und 6, Spur 1, 4, 7 und 10).

Durch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) konnte in Kelly keine Hemmung von AKT (Ser473) erreicht werden, es erfolgte sogar eine Hyperphosphorylierung von AKT (Ser473) im Vergleich zur Kontrolle (Zeile 5 und 6, Spur 2 und 5). In der Zelllinie IMR-32 konnte dagegen zum Zeitpunkt 24 h eine Unterdrückung der AKT-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Zeile 5 und 6, Spur 11). Hemmende Effekte durch Rapamycin auf die AKT-Phosphorylierung (Ser473) traten somit erst nach langanhaltender Behandlung (24 h) und Zelllinien-spezifisch (nur bei IMR-32) auf.

In der Folge wurden weitere, im Signalweg tiefer liegende Zielproteine untersucht. Zunächst wurde die Phosphorylierung der Kinase GSK-3 β mittels Westernblot analysiert. Eine hemmende Phosphorylierung von GSK-3 β (Ser9) kann sowohl durch AKT (109), als auch durch S6K erfolgen (110). Eine geringe Abnahme dieser Phosphorylierung konnte für beide Behandlungskombinationen und Zelllinien gezeigt werden (Zeile 7 und 8, Spur 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11).

Neben der Zielproteine der mTOR-Inhibitoren wurde auch die Aktivität des dualen Abl/Src-Kinase-Inhibitors Dasatinib über die Phosphorylierung von Src (Tyr416) getestet (Abbildung 16). Durch beide Behandlungskombinationen wurde eine starke Hemmung dieser

Phosphorylierung erreicht. Die Gesamtproteinmenge von Src nahm dabei sowohl in Kelly als auch IMR-32 deutlich zu (Zeile 9 und 10, Spur 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11).

Zudem sollte der Einfluss der Behandlungen auf die mTOR-regulierten Proteine MycN und Cyclin D1 untersucht werden. Im dephosphorylierten, also aktiven Zustand, induziert die Kinase GSK-3 β durch Phosphorylierung von MycN an Thr58 und Cyclin D1 an Thr286 die Degradation der beiden Proteine (51,111). Die Phosphatase PP2A wird durch den mTORC1 phosphoryliert und inhibiert, was die Akkumulation von doppelt phosphoryliertem, aktiven MycN ermöglicht (112).

Eine Stimulation von PI3K/AKT induziert eine Steigerung der Expression von Cyclin D1 durch Zunahme der Proteintranslation, während PI3K-Inhibitoren wie Wortmannin oder der mTOR-Inhibitor Rapamycin zur Abnahme der Cyclin D1-Level führen (113). Die Regulation von Cyclin D1 und MycN sind daher sowohl dem mTORC1 als auch dem mTORC2 unterstellt. Die gezeigte Rapamycin- bzw. Torin 2-vermittelte mTORC1- und mTORC2-Hemmung führt daher zur Annahme, dass die Proteine MycN und Cyclin D1 nach Behandlung reduziert werden sollten. Bei Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin wurde in verschiedenen Zelllinien eine Herunterregulation von Cyclin D1 nachgewiesen (114–116). Eine Abnahme von MycN durch mTOR-Inhibitoren wurde bereits in mehreren Neuroblastom-Zelllinien gezeigt (50,51). Um den Einfluss auf die Proteinexpression dieser Proteine zu analysieren wurden die späteren Zeitpunkte 24 und 72 h gewählt (Abbildung 17).

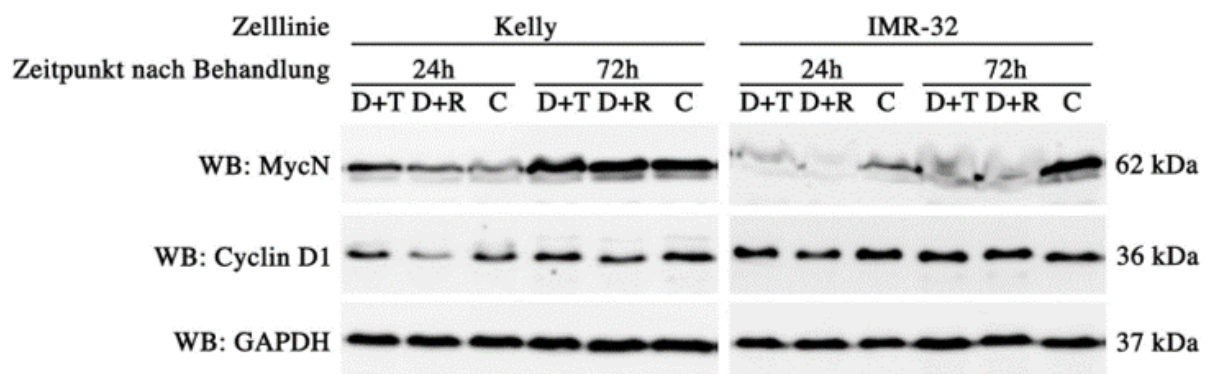


Abbildung 17: Auswirkungen auf die Proteine MycN und Cyclin D1

Effekte der Doppelbehandlung Dasatinib + Torin 2 (D+T) im Vergleich zu Dasatinib + Rapamycin (D+R) bzw. einer DMSO-Kontrolle (C) auf die Proteinlevel von MycN und Cyclin D1 in den Zelllinien Kelly und IMR-32. Die Zellen wurden mit IC₅₀-Konzentrationen der entsprechenden Doppelbehandlung behandelt, nach 24 bzw. 72 h mit geerntet und die Proteine mittels Westernblot untersucht. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten. WB: Westernblot.

In der Zelllinie Kelly konnte nach Behandlung mit Dasatinib + Rapamycin (D+R) bzw. Torin 2 (D+T) keine Abnahme des Onkogens MycN festgestellt werden (Zeile 1, Spur 1-6). Dagegen

wurde das MycN-Level in der Zelllinie IMR-32 durch beide Behandlungskombinationen reduziert (Zeile 1, Spur 7-12).

Durch die Behandlung mit Dasatinib plus Torin 2 (D+T) konnte in beiden Zelllinien keine Reduktion von Cyclin D1 induziert werden (Zeile 2, Spur 1, 4, 7 und 10). Bei der Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) zeigte sich hingegen in der Zelllinie Kelly zu beiden Zeitpunkten eine Abnahme des Proteinlevels im Vergleich zur Kontrolle (Zeile 2, Spur 2 und 5). In der Zelllinie IMR-32 war nach D+R-Behandlung nur bei 24 h eine Reduktion von Cyclin D1 ersichtlich (Zeile 2, Spur 8 und 11).

Als weiterer potenzieller Mechanismus der Therapie-induzierten Wachstumshemmung in Neuroblastom-Zelllinien wurde die p21-Expression nach Biologika-Doppelbehandlung in Kelly und IMR-32 für den Zeitpunkt 72 h nach Behandlung mittels Westernblot untersucht, das Signal quantifiziert und für eine Darstellung der p21-Expression um die Expression der Kontrolle (Haushaltsgen: GAPDH) normalisiert (Abbildung 18).

Eine Überexpression von p21, einem Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (CdK), führt in verschiedenen Karzinomzellen zur Hemmung des Wachstums (117). Die Unterdrückung des Wachstums wird zum einen durch Bindung an PCNA (proliferating cell nuclear antigen) vermittelt, wodurch die DNA-Replikation gehemmt wird. Zum anderen wird durch Inhibition der CdK-Aktivität die Zellzyklus-Progression verhindert (118,119). Die Zunahme von p21 scheint zudem entscheidend für die frühe Phase der zellulären Seneszenz zu sein (120).

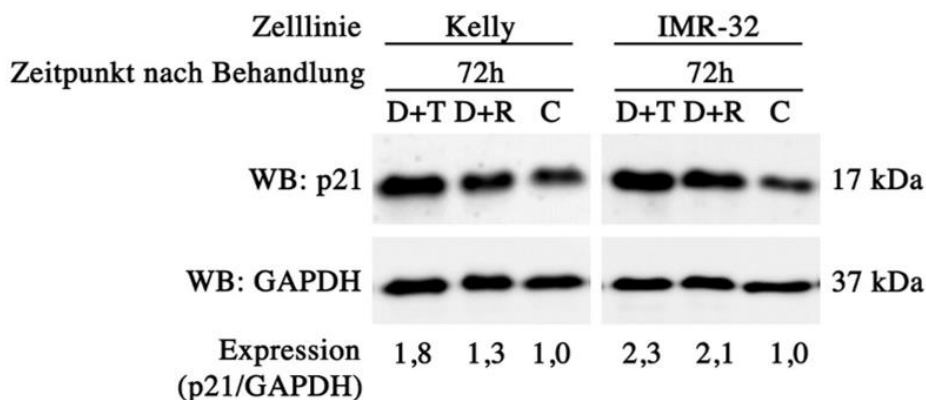


Abbildung 18: Steigerung der p21-Expression durch Biologika-Behandlung

Darstellung des Effekts der Doppelbehandlung mit Dasatinib + Torin 2 (D+T) im Vergleich zu Dasatinib + Rapamycin (D+R) bzw. einer DMSO-Kontrolle (C) auf die Expression von Zellzyklus-Inhibitor p21 in den Zelllinien Kelly und IMR-32. Die Zellen wurden mit IC₅₀-Konzentrationen der entsprechenden Doppelbehandlung behandelt, nach 72 h geerntet und die Proteine mittels Westernblot (WB) untersucht. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Für die Angabe der p21-Expression wurde das p21-Signal quantifiziert und um das von GAPDH normalisiert. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten.

In der Zelllinie Kelly induzierte die Behandlung mit Dasatinib plus Torin 2 (D+T) im Vergleich zur Kontrolle eine 1,8-fache Zunahme der p21-Expression (Zeile 1, Spur 1), während die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) nur zu einer geringen, 1,3-fachen Zunahme von p21 führte (Zeile 1, Spur 2). In der Zelllinie IMR-32 stimulierten beide Behandlungen eine starke, mehr als doppelt so hohe Zunahme der Expression von p21 im Vergleich zur Kontrolle (Zeile 1, Spur 4 und 5). Zwischen den beiden Behandlungen lag in dieser Zelllinie nur ein geringer Unterschied (D+T: 2,3-fache Zunahme; D+R: 2,1-fache Zunahme). Die Bande von p21 lag bei 17 kDa, anstelle der angegebenen 21 kDa. Dies ist wahrscheinlich auf ein aberrantes Laufverhalten zurückzuführen.

3.8 Hemmung der AKT-Aktivität

Es ist bekannt, dass die Behandlung mit Rapamycin durch Enthemmung des negativen Feedbacks S6K/IRS-1/AKT eine Hyperphosphorylierung von AKT – eine Feedback-Aktivierung – induziert (81). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass neue ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren wie Torin 2 durch die gleichzeitige Hemmung beider mTOR-Komplexe die Feedback-Aktivierung von AKT verhindern und dadurch eine höhere Anti-Tumor-Wirkung aufweisen könnten (61). In Kapitel 3.7 wurde bereits der Effekt der Behandlungen auf die AKT-Phosphorylierung an Ser473 als Substrat von mTORC2 besprochen. Zudem wurde die Phosphorylierung von AKT an Thr308 untersucht (Abbildung 19).

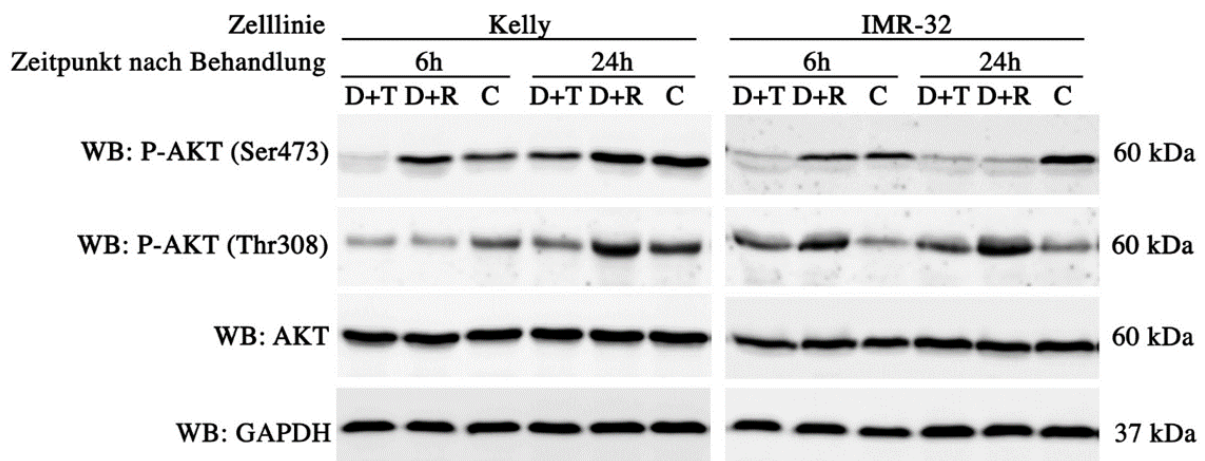


Abbildung 19: Hemmung der Phosphorylierung von AKT durch Biologika-Doppelbehandlung

Effekte der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Torin 2 (D+T) im Vergleich zu Dasatinib plus Rapamycin (D+R) bzw. einer DMSO-Kontrolle (C) auf die Phosphorylierung von AKT (Ser473 und Thr308) in den Zelllinien Kelly und IMR-32. Die Zellen wurden mit den IC_{50} -Konzentrationen der entsprechenden Doppelbehandlung behandelt, nach 6 bzw. 24 h geerntet und mittels Westernblot (WB) analysiert. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten.

In der NB-Zelllinie Kelly konnte die Thr308-Phosphorylierung durch Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Torin 2 (D+T) über 24 h effektiv gehemmt werden (Zeile 2, Spur 4). Im Gegensatz dazu erfolgte nach Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) schon nach 24 h eine Re-Induktion bzw. sogar Hyperaktivierung von AKT (Thr308) (Zeile 2, Spur 5). In der Zelllinie IMR-32 konnte die Thr308-Phosphorylierung durch die Kombinationsbehandlung mit Torin 2 nicht unterdrückt werden, zeigte sich aber deutlich schwächer als nach der Rapamycin-Behandlung, die schon nach 6 h eine Hyperaktivierung von AKT induzierte, welche auch bis zum 24 h-Zeitpunkt andauerte (Zeile 2, Spur 7 und 10).

3.9 Apoptose und Autophagie

Für diese Arbeit wurde zunächst die Biologika-Doppelbehandlung, die als Vorbehandlung in der RIST-Therapie verwendet wird, in den Neuroblastom-Zelllinien Kelly und IMR-32 auf die Induktion von Apoptose mittels Caspase-3- und PARP-1-Spaltung im Westernblot untersucht (Abbildung 20). Eine weitere potenzielle Antwort der Zellen auf die Behandlung stellt die Induktion von Autophagie dar, weshalb auch die Expression der Marker LC3B-I und -II mittels Westernblot analysiert wurden (Abbildung 20).

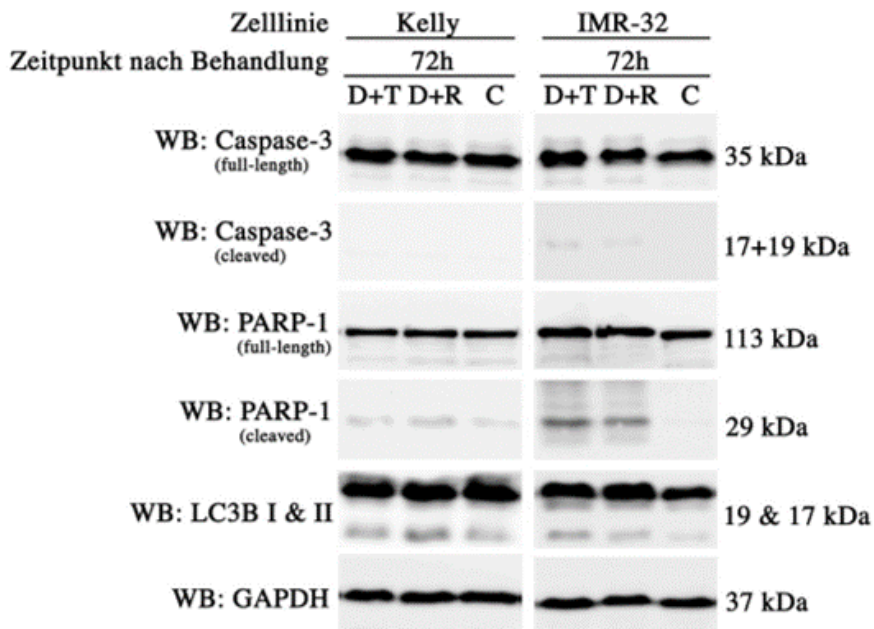


Abbildung 20: Induktion von Apoptose und Autophagie durch Biologika-Doppelbehandlung

Untersuchung auf Induktion von Apoptose durch Caspase-3- und PARP-1-Spaltung (cleaved), sowie von Autophagie mit Hilfe der Expression von LC3B-I und -II mittels Westernblot (WB) in den Zelllinien Kelly und IMR-32. Die Zellen wurden mit IC_{50} -Konzentrationen der entsprechenden Doppelbehandlung behandelt und nach 72 h geerntet. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten. D+T: Dasatinib plus Torin 2, D+R: Dasatinib plus Rapamycin, C: DMSO-Kontrolle.

In der Zelllinie Kelly konnte kein positiver Apoptose-Nachweis nach Biologika-Doppelbehandlung erbracht werden. Nach 72 h waren keine Cas-3-Spaltprodukte nachweisbar (Zeile 2, Spur 1 und 2). Das PARP-1-Spaltprodukt ist nach Behandlung vergleichbar zur Kontrolle und kann als Hintergrund gewertet werden (Zeile 4, Spur 1 und 2). In der Zelllinie IMR-32 führte die Behandlung zu einer geringen Cas-3- und PARP-1-Spaltung (Zeile 2 und 4, Spur 4 und 5). In IMR-32 konnte somit durch die Vorbehandlung mit der Biologika-Kombination Apoptose induziert werden.

Die Menge des Konversionsprodukts LC3B-II, das aus LC3B-I entsteht, ist abhängig von der Anzahl der Autophagosomen und wird zur Detektion von Autophagie verwendet (121). Wie durch *Mizushima et al.* beschrieben wurde, besteht eine höhere Sensitivität der LC3B-Antikörper gegenüber LC3B-II im Vergleich zu LC3B-I (121), weshalb nicht die Ratio von LC3B-I zu -II analysiert wird, sondern die Bandenintensität von LC3B-II zwischen den verschiedenen Behandlungen bzw. der DMSO-Kontrolle verglichen wird. Nach beiden Behandlungskombinationen konnte im Vergleich zur Kontrolle eine geringe Akkumulation von LC3B-II nachgewiesen werden. In der Zelllinie Kelly zeigte sich diese Zunahme stärker nach Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) (Zeile 5, Spur 1 und 2). In der Zelllinie IMR-32 dagegen konnte nach Dasatinib plus Torin 2 (D+T)-Behandlung eine stärkere Zunahme von LC3B-II festgestellt werden als durch Dasatinib plus Dasatinib plus Rapamycin (D+R) (Zeile 5, Spur 4 und 5). Die beiden Vorbehandlungen können also beide in verschiedenen NB-Zelllinien eine leichte Autophagie auslösen.

Im nächsten Schritt wurde die Induktion von Apoptose nach Durchführung des gesamten RIST- bzw. TIST-Therapieprotokolls untersucht (Abbildung 21).

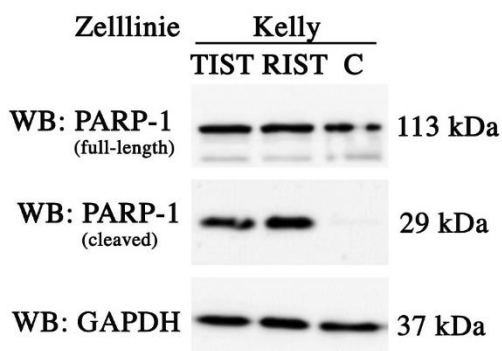


Abbildung 21: Induktion von Apoptose durch RIST- und TIST-Therapie

Untersuchung auf Induktion von Apoptose durch PARP-1-Spaltung mittels Westernblot (WB) in der Zelllinie Kelly. Die Zellen wurden in der RIST-Therapie mit IC₅₀-Konzentrationen der entsprechenden Doppelbehandlung behandelt und an „Tag 8“ des RIST-Therapieschemas geerntet. „TIST“ entspricht der alternativen RIST-Therapie mit Dasatinib plus Torin 2 (D+T)-Vorbehandlung. „RIST“ stellt das Therapieschema mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R)-Vorbehandlung dar. „C“ ist die mit DMSO-behandelte Kontrolle, die an

„Tag 4“ des RIST-Schemas geerntet wurde. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten.

Die deutliche PARP-1-Spaltung nach beiden Behandlungen weist die Induktion von Apoptose durch die RIST- und auch alternative TIST-Therapie nach, während in der mit DMSO behandelten Kontrolle keine Spaltprodukte und damit keine Apoptose-Induktion auftrat (Zeile 2, Spur 1, 2 und 3). Beim Vergleich der beiden Therapieschemata RIST und TIST ergeben sich keine Unterschiede, d.h. die alternative TIST-Therapie induziert vergleichbar gut Apoptose in den getesteten NB-Zelllinien wie die RIST-Therapie (Zeile 2, Spur 1 und 2). Wichtig ist dabei, dass die Behandlung des TIST-Schemas aber deutlich niedrigere Konzentrationen von Torin 2 im Vergleich zu Rapamycin im RIST-Schema beinhaltet.

4 Diskussion

4.1 Hinweise auf Seneszenz-Induktion durch die Vorbehandlung mit der Biologika-Kombination

Seneszenz wirkt sich hemmend auf die Tumorgenese und -progression aus. Die Unterdrückung des Prozesses kann zur Progression prämaligener Läsionen hin zu malignen Tumoren beitragen (100). Durch den Tumor-supprimierenden Effekt erscheint die therapie-induzierte Seneszenz als ein vielversprechender Ansatz zu Behandlung von Krebserkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass in Seneszenz gegangene Tumorzellen durch in den Tumor einwandernde Immunzellen entfernt werden, wodurch eine Tumorregression vermittelt wird (100). Trotz vielversprechender Ergebnisse muss die Therapie-induzierte Seneszenz kritisch gesehen werden: In einen Ruhezustand versetzte Tumorzellen könnten zurückbleiben und ein Potential für einen Rückfall darstellen (100).

Ein weiterer positiver Aspekt der Seneszenz-Aktivierung in der NB-Therapie und speziell für die Behandlung von Tumoren mit MycN-Amplifikation ist die Regulation des Onkogens in Korrelation zu Seneszenz: Es gibt Hinweise auf eine Reduktion von MycN, als Marker für Tumore mit aggressivem Verhalten und rapider Progression, durch Aktivierung von Seneszenz (104). Zudem konnte die Elimination von extrachromosomal amplifiziertem MycN durch Micronuclei-Formation (122) mit Hilfe Hydroxyurea-induzierter Seneszenz gesteigert werden (123). *Taschner-Mandl et al.* konnten außerdem feststellen, dass durch eine metronomische Therapie mit chemotherapeutischen Medikamenten sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, Seneszenz in MycN-amplifizierten NB-Zellen induziert wird und sich diese wachstumshemmend auf nicht-seneszente Zellen auswirken (124).

In dieser Arbeit wurde eine Zunahme des Seneszenz-Markers p21 nach Vorbehandlung entsprechend des RIST- bzw. TIST-Schemas nachgewiesen (siehe Abbildung 18). Die Färbung der Zellen mit β -Galactosidase (β -Gal) in Kelly zeigte neben enormen morphologischen Veränderungen eine tendenzielle Zunahme einer granulären Blaufärbung. Die Zellen wiesen allerdings keine generelle Färbung des Zytosols auf, wie es zum Beispiel beim Seneszenz-Nachweis durch *Nelli Frank* in NB-Zelllinien gezeigt wurde (104). Dies könnte durch die starke morphologische Veränderung der Zellen begründet sein. Die Zellen lagen nicht mehr flach und adhären auf dem Wellboden, sondern bildeten große, rundlich aufgeblähte Zellhaufen, in denen das Zytosol stark granulär erschien (siehe Abbildung 9). Möglicherweise stellt das

metronomische Therapiedesign, das in der Studie von *Taschner-Mandl et al.* angewendet wurde (124) bzw. die durch *Nelli Frank* durchgeführte Therapie über einen Zeitraum von 3-6 Wochen einen wichtigen Faktor für die Induktion von Seneszenz dar.

Die β -Gal-Färbung scheint daher im Rahmen dieses Versuchsaufbaus keine geeignete Methode für den Nachweis der Seneszenz-Induktion zu sein. Für eine weiterführende Untersuchung sollte die *in vitro*-RIST-Therapie über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, um das metronomische Therapiedesign besser darzustellen. Zudem sollten weitere Marker sowie ein Nachweis der Unterdrückung von Proliferation durch beispielsweise BrdU- oder Ki67-Labeling (100,105) miteingeschlossen werden.

Insgesamt gibt die verstärkte Blaufärbung zusammen mit der Akkumulation von p21 einen Hinweis auf eine mögliche Induktion von Seneszenz durch die Biologika-Behandlungen.

4.2 Keine erhöhte Sensitivität gegenüber Rapamycin der induzierbaren MycN-exprimierenden Tet21N-Zellen

Die Amplifikation des Onkogens MycN ist eine, vor allem in höheren Stadien, häufig auftretende genetische Auffälligkeit in NB und wird mit einer ungünstigen Prognose (5,10) und rascher Tumorprogression assoziiert (5). *Johnsen et al.* wies unter Verwendung der MycN-regulierbaren Zelllinie Tet21N eine Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber Rapamycin und einem weiteren mTOR-Inhibitor CCI-779 von der Expression des Onkogens nach (50). *Vaughan et al.* zeigte eine erhöhte Sensitivität MycN-amplifizierter Zelllinien wie beispielsweise Kelly gegenüber dem ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor Torin 1. Es bestand ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Proliferationshemmung und der MycN-Expression (51). In dieser Arbeitsgruppe konnte zudem durch *Johannes Leister* und *Gina Penkivech* ein stärkeres Ansprechen gegenüber Rapamycin bzw. der RIST-Therapie in MycN-amplifizierten Zelllinien gezeigt werden (93,106).

In dem hier untersuchten Versuchsaufbau unter Verwendung der Zelllinie Tet21N konnte die Annahme einer höheren Sensitivität MycN-exprimierender Zellen gegenüber der Behandlung mit Rapamycin nicht bestätigt werden. Die Sensitivität der MycN-ON-Zellen war sogar etwas geringer als die der MycN-OFF-Zellen, was sich in einer höheren Viabilität bei gleicher Behandlungskonzentration zeigte (siehe Abbildung 11). Die MycN-Expression war sowohl zu Beginn des Experiments als auch zum Zeitpunkt der Viabilitätsmessung am Ende des Versuchs deutlich vorhanden (siehe Abbildung 10). Trotz der erfolgreichen Induktion des Onkogens konnte die erwartete höhere Sensitivität der MycN-ON-Zellen gegenüber mTOR-Inhibitoren

nicht nachgewiesen werden. Die Induktion der Tet21N-Zellen zur Expression des Onkogens MycN erfolgte durch Entfernung von Tetrazyklin aus dem Medium in den hier gezeigten Versuchen 24 h beziehungsweise 72 h vor Behandlung der Zellen mit Rapamycin. In der Studie von *Johnsen et al.* dagegen wurden die Zellen dauerhaft in Tetrazyklin-freiem Medium, also als MycN-ON-Zellen kultiviert und die MycN-Expression 24 h vor Durchführung der Versuche durch Zugabe von Tetrazyklin unterdrückt. Möglicherweise ist eine längere beziehungsweise dauerhafte MycN-Induktion notwendig, um eine Adaptation der Zelle an die Expression des Onkogens zu bewirken und ein stabiles, von MycN abhängiges System zu erhalten. Zur weiteren Untersuchung der Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber mTOR-Inhibitoren beziehungsweise der RIST-Therapie von der MycN-Expression sollte daher der Versuchsaufbau geändert werden und die MycN-Expression dauerhaft induziert werden. Der Nachweis einer potenziell vorhanden erhöhten Sensitivität MycN-exprimierender NB-Zellen gegenüber der RIST-Therapie ist von enormer Bedeutung, um eine individualisierte Therapie der Patient/innen mit MycN-amplifizierten Tumoren durchführen und die Krebserkrankung gezielt an dessen „Achillesferse“ angreifen zu können. Damit könnte eine deutliche Verbesserung speziell der Behandlung der Patient/innen mit MycN-amplifizierten Tumoren, also Erkrankungen, die häufig in höheren Stadien vorliegen und mit einer schlechten Prognose und rascher Tumorprogression einhergehen (5), erreicht werden.

4.3 Reduktion der IC₅₀-Konzentration von mikromolaren auf nanomolare Bereiche durch Torin 2

Torin 2 induziert eine hoch potente Hemmung des mTOR-Signalwegs (107). In den NB-Zelllinien Kelly und IMR-32 zeigte sich für Torin 2 im Vergleich zu Rapamycin eine mehr als 1000-fache Reduktion der Konzentration zur halbmaximalen Hemmung der Zellviabilität (IC₅₀-Konzentration) von mikromolaren auf nanomolare Dosen.

Durch eine hohe Selektivität der Torin 2-vermittelten mTOR-Hemmung gegenüber der Unterdrückung anderer Proteinkinasen (107) werden weitere Signalsysteme in diesem Konzentrationsbereich nicht bzw. kaum beeinflusst, wodurch bei Anwendung des ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitors anstelle von Rapamycin in der alternativen TIST-Therapie Nebenwirkungen verringert werden könnten.

4.4 Synergistische Wirkung der Kombinationstherapie

Kombinationstherapien weisen meist große Vorteile in der Behandlung von Krebserkrankungen auf: Durch synergistische Wirkmechanismen kann im Vergleich zur Monotherapie der therapeutische Effekt gesteigert und toxische Wirkungen durch niedrigere Dosen unter Erhalt eines gleichbleibenden oder sogar stärkeren Effekts verringert werden. Zudem wird die Entwicklung von Therapieresistenzen verhindert bzw. verlangsamt (95). Medikamentenkombinationen können additive, synergistische oder antagonistische Wirkungen haben (94,95), wobei eine synergistische Wirkung stärker und eine antagonistische Wirkung schwächer als der additive Substanzeffekt ist (95–97).

Die Kombination von Dasatinib plus Rapamycin (D+R) wurde bereits durch *Johannes Leister* in NB-Zelllinien, sowie durch *Park et al.* in Brustkrebs-Zelllinien untersucht. Beide Studien zeigten eine synergistische Wirkung der Kombinationstherapie und damit Überlegenheit im Vergleich zur Behandlung mit den Einzelsubstanzen (93,108).

Die vergleichende Untersuchung der Kombinationen von Dasatinib plus Rapamycin (D+R) bzw. Torin 2 (D+T) in Kelly und IMR-32 dieser Arbeit hat gezeigt, dass die Konzentrationen beider Inhibitoren unter Erhalt einer 50 %-igen Hemmung der Zellviabilität um das 1,5- bis 300-fache reduziert werden können. Die starke Reduktion der Medikamentenkonzentrationen unter Erhalt des gleichen Effekts weist auf eine synergistische Wirkung der Inhibitoren hin, was durch die Berechnung der CI-Werte und damit Quantifizierung des Effekts der Kombinationsbehandlung bestätigt werden konnte. Die Kombination von Dasatinib mit dem neuen ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor Torin 2 ist der bisher in der RIST-Therapie verwendeten Kombination mit Rapamycin im Hinblick auf die synergistische Verstärkung der Effekte und dadurch ermöglichten Verringerung der Medikamentendosis ebenbürtig. Die im Vergleich zu Rapamycin deutlich niedrigere IC₅₀-Konzentration von Torin 2 im nano- statt mikromolaren Bereich könnte allerdings vor allem unter Berücksichtigung der hohen Selektivität des ATP-kompetitiven Inhibitors (107) eine deutliche Verbesserung des Nebenwirkungsprofils der RIST-Therapie zur Folge haben.

Bei der Kombination von Irinotecan plus Temozolomid (I+T) konnte zwar eine signifikant stärkere Hemmung der Zellviabilität im Vergleich zu den Monotherapie gezeigt werden (siehe Abbildung 14), der Effekt war mit einem CI > 1,1 allerdings antagonistisch, also geringer als der additive Effekt beider Einzelsubstanzen. Ein vergleichbares Ergebnis wurde für die Zelllinie Kelly bereits durch *Johannes Leister* gezeigt (93).

4.5 Verstärkte Hemmung der mTOR-Komplexe durch Torin 2

Die mTOR-Hemmung durch Rapamycin ist weitgehend auf den mTORC1 beschränkt. Eine Hemmung des mTORC2 erfolgt nur in bestimmten Zelllinien und nach lang anhaltender Therapie (38,74). Zudem sind auch einige mTORC1-Funktionen resistent gegenüber Rapamycin (76,77,82). Dagegen werden durch neue ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren wie Torin 2 beide mTOR-Komplexe effektiv gehemmt (84,107,125). Dies konnte in dieser Arbeit auch für die Kombination von Dasatinib plus Torin 2 (D+T) durch Hemmung der Phosphorylierungen von 4E-BP1 (Ser65), S6K (Thr389) und AKT (Ser473) gezeigt werden (siehe Abbildung 16). Die Kombination mit Rapamycin (D+R) induzierte dagegen zwar eine deutliche Hemmung von S6K, aber nur eine schwächere Hemmung des mTORC1-Substrats 4E-BP1. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen verschiedener Studien, die zum einen eine unvollständige Hemmung des mTORC1-Substrats 4E-BP1 durch Rapamycin gezeigt haben und zum anderen eine Unterdrückung Rapamycin-resistenter mTORC1-Funktionen und dadurch induzierten stärkeren Unterdrückung von Wachstum und Proliferation durch ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren nachweisen konnten (76,82). 4E-BP1 wirkt sich über die Regulation der Translation bestimmter mRNAs maßgeblich auf die Proliferation aus (78), weshalb die durch Torin 2-vermittelte vollständige mTORC1-Hemmung eine Steigerung der anti-proliferativen Wirkung der RIST-Therapie bedeuten könnte.

Durch die Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) konnte zudem in der Zelllinie Kelly zu keinem Zeitpunkt eine Hemmung der Ser473-Phosphorylierung von AKT als mTORC2-Substrat festgestellt werden. In der Zelllinie IMR-32 scheint der mTORC2 nach langanhaltender Behandlung sensitiv gegenüber Rapamycin zu sein, was sich in einer Dephosphorylierung an Ser473 zeigt. Eine Zelllinien-abhängige Wirkung auf den mTORC2 und sein Substrat AKT (Ser473) nach Langzeit-Therapie ist aus der Literatur bekannt (38,74) und wird als Ursache der gezeigten Effekte in den NB-Zelllinien angenommen.

In der Zelllinie Kelly wurde nach einer Behandlung von 6 h eine Hyperphosphorylierung von AKT (Ser473) sichtbar. Diese Hyperphosphorylierung kann wahrscheinlich auf eine durch Rapamycin-vermittelte Aktivierung des PI3K-Signalwegs durch Hemmung des negativen S6K/PI3K/AKT-Feedbacks zurückgeführt werden (80,81).

Neben der Phosphorylierung von AKT an Ser473 wurde in der Zelllinie Kelly durch Behandlung mit Dasatinib plus Torin 2 (D+T) auch Thr308 der AKT Kinase dephosphoryliert. In der Zelllinie IMR-32 konnte zwar keine Hemmung der Thr308-Phosphorylierung festgestellt

werden, AKT lag aber weitaus weniger phosphoryliert vor als nach Behandlung mit Rapamycin plus Dasatinib (D+R). Eine transiente Hemmung dieser Phosphorylierungsstelle wurde bereits durch verschiedene ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren gezeigt (76,84,126). *Feldman et al.* stellten in der Untersuchung des mTOR-Inhibitors PP242 eine Abhängigkeit der Dephosphorylierung an Thr308 von der Unterdrückung der mTORC2-vermittelten Phosphorylierung an Ser473 fest (76). *Liu et al.* stellten die Vermutung auf, dass die Dephosphorylierung an Ser473 eine Translokation von AKT an die Plasmamembran, an der die Thr308-Phosphorylierung durch die PDK-1 erfolgt, vermindert (84).

Die Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) induzierte wie oben dargestellt in der Zelllinie Kelly nach 6 h eine Hyperphosphorylierung von AKT an Ser473. Nach 24 h konnte auch eine verstärkte Phosphorylierung der Thr308-Stelle nachgewiesen werden. In der Zelllinie IMR-32 lag AKT zu allen Zeitpunkten hyperphosphoryliert vor. Die Zunahme der Thr308-Phosphorylierung nach Rapamycin-Behandlung könnte wie oben dargestellt durch die verstärkte Phosphorylierung an Ser473 aufgrund der fehlenden mTORC2-Hemmung begründet sein. In IMR-32 führte die langanhaltende Rapamycin-Behandlung wie oben erläutert nach 24 h zur Hemmung der Ser473-Phosphorylierung. Diese könnte sich daher möglicherweise zu einem späteren, in dieser Arbeit nicht untersuchten Zeitpunkt vergleichbar zu den Ergebnissen der Torin 2-Behandlung in Kelly hemmend auf die Thr308-Phosphorylierung auswirken.

Zusammenfassend konnte durch Torin 2 eine stärkere Unterdrückung der Phosphorylierung von AKT sowohl an Ser473 als auch an Thr308 gezeigt werden. Da eine Steigerung der AKT-Aktivität das Überleben, die Proliferation und das Wachstum von Tumorzellen steigert (61,80), könnte die Verwendung von Torin 2 anstelle von Rapamycin eine Verbesserung der Anti-Tumor-Wirkung der RIST-Therapie ermöglichen.

Zudem muss wieder die deutlich niedrigere Konzentration von Torin 2 im Vergleich zu Rapamycin angemerkt werden. Der vergleichbare beziehungsweise zum Teil stärkere Effekt auf die mTOR-Signalkaskade wird unter Verwendung geringerer Konzentrationen erreicht und könnte daher in der Klinik zur Reduktion der Nebenwirkungen aufgrund niedriger Behandlungsdosen unter Erhalt beziehungsweise Steigerung der Therapiewirkung beitragen.

Die Wirkung von Dasatinib wurde durch effektive Hemmung der Src-Phosphorylierung (Tyr416) in beiden Biologika-Kombinationen nachgewiesen (siehe Abbildung 16). Es fällt auf, dass die Gesamtproteinmenge von Src durch beide Behandlungen deutlich zunimmt. Dies ist möglicherweise durch eine Zunahme der Degradation des phosphorylierten Zustands (p-

Tyr416) beziehungsweise der erhöhten Stabilität im nicht-phosphorylierten Zustand (Tyr416) zu erklären. Nach *Harris et al.*, der eine rapide Abnahme der steady-state-Proteinlevel der aktiven Form von Src beobachtete, scheint die an Tyr527 dephosphorylierte und an Tyr416 autophosphorylierte Form von Src in einen aktiven, geöffneten Status überzugehen, welche rasch durch Ubiquitin-vermittelt Proteolyse degradiert wird (127).

4.6 Einfluss auf MycN

Die Amplifikation von MycN im NB wird mit einer ungünstigen Prognose (5,10) und raschen Tumorprogression assoziiert (5). Eine Therapie-induzierte Reduktion der MycN-Proteinlevel könnte daher einen vielversprechenden Ansatz für die effektive Therapie des NB darstellen (67). Eine Abnahme von MycN durch mTOR-Inhibitoren konnte bereits in mehreren NB-Zelllinien gezeigt werden (50,51). *Vaughan et al.* konnte eine von der mTOR-Aktivität abhängige Degradation von MycN nach Torin 1-Behandlung unter anderem in der Zelllinie Kelly nachweisen. Dabei erwies sich im Speziellen die Inhibition des mTORC2 und der damit verbundenen Enthemmung von GSK-3 β als entscheidend für die Stimulation der MycN-Degradation (51). Die durch mTOR-Inhibitoren vermittelte MycN-Degradation ging in der Studie von *Johnsen et al.* mit einer Reduktion der Zellproliferation und VEGF-Sekretion, sowie der Induktion von Apoptose einher (50).

Hier konnte in der Zelllinie Kelly allerdings durch die Kombinationsbehandlungen mit Dasatinib und den mTOR-Inhibitoren Torin 2 bzw. Rapamycin keine Abnahme von MycN gezeigt werden. Dagegen wurde das Onkoprotein in der Zelllinie IMR-32 durch beide Kombinationen deutlich reduziert (siehe Abbildung 17).

Es stellt sich die Frage, warum sich die Behandlungen in den beiden NB-Zelllinien unterschiedlich auf die MycN Proteinlevel auswirkten.

Eine potenzielle Ursache des fehlenden Effekts auf MycN in der Zelllinie Kelly stellt die Kombination mit Dasatinib dar. Möglicherweise treten dabei unbekannte, Zelllinien-abhängige Interaktionsmechanismen auf, die die reduzierende Wirkung auf MycN beeinflussen. Daher wurden die Einzelbehandlungen mit Rapamycin und Torin 2 im Vergleich zu den Doppelkombinationen untersucht. Die Ergebnisse waren allerdings nicht eindeutig bzw. nicht reproduzierbar [Daten hier nicht gezeigt].

Die gezeigte Zelllinien-abhängige Wirkung der mTOR-Hemmung auf MycN könnte möglicherweise auch auf einer unterschiedlichen Expression der Aurora-A-Kinase beruhen. Aurora-A hemmt die MycN-Degradation durch Bindung an das Protein (128). NB-Zellen mit

erhöhter Aurora-A-Expression sind daher weniger abhängig von Wachstumsfaktoren und einer aktiven PI3K/AKT-Signalkaskade, um ein erhöhtes MycN-Level durch Unterdrückung der Degradation aufrecht zu erhalten (39,128). MycN könnte durch eine möglicherweise vorliegenden hohen Aurora-A-Expression in der Zelllinie Kelly vor der durch die mTOR-Hemmung-vermittelten Degradation geschützt sein. Durch eine Kombination mit Aurora-A-Kinase-Inhibitoren, die eine Interaktion mit MycN durch Einfluss auf die Konformation (siehe dazu *Gustafson et al.* (129)) verhindern, sollte in zukünftigen Studien der Einfluss von Aurora-A auf dieses Ergebnis tiefergehend untersucht werden.

Vergleichbar dazu könnte auch eine Mutation der ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), die durch Interaktion mit AKT die Phosphorylierung von MycN an Thr58 reduziert und damit die Proteinstabilität erhöht (39), eine Ursache des verminderten Einflusses auf MycN darstellen. Nach *Harenza et al.* weist die Zelllinie Kelly im Gegensatz zu IMR-32 die aktivierende ALK^{F1174L}-Mutation auf (130). *Berry et al.* konnte zeigen, dass eine Überexpression von ALK^{F1174L} das onkogene Potential von MycN steigert und zu einem frühen Einsetzen und Letalität der Erkrankung führt. Zudem wurde die Proteinstabilität und damit das Proteinlevel von MycN durch die ALK^{F1174L}-vermittelte konstitutive Signalgebung erhöht (131). Durch eine Behandlung MycN-amplifizierter Tumore mit Torin 2 erreichten *Berry et al.* eine Tumorreduktion unter Abnahme von MycN. Dagegen verlor Torin 2 in zusätzlich ALK-mutierten Tumoren jeglichen Effekt auf die Tumorgroße. Durch die Kombination von Torin 2 mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib konnte das Wachstum und die Größe der doppelt mutierten Tumoren deutlich reduziert und teilweise sogar eine Tumorregression erreicht werden (131). Die ALK^{F1174L}-Mutation in der Zelllinie Kelly stellt eine wahrscheinliche Ursache des fehlenden Effekts auf MycN dar. Daher sollte in zukünftigen Studien eine tiefergehende Untersuchung des Effekts von Torin 2 in Kombination mit einem ALK-Inhibitor, wie beispielsweise Crizotinib, auf die MycN Proteinexpression folgen.

4.7 Einfluss auf die Zellzyklus-regulierenden Proteine Cyclin D1 und p21

Rapamycin gilt als Inhibitor des G₁-S-Übergangs und vermittelt damit eine Hemmung der Zellzyklus-Progression und Proliferation (70). In laborinternen Voruntersuchungen konnte durch beide mTOR-Inhibitoren Torin 2 und Rapamycin in den NB-Zelllinien Kelly und IMR-32 ein G₁-Arrest induziert werden [Daten hier nicht gezeigt]. Einen Teil dieser Arbeit stellte die tiefergehende Analyse der potenziell verantwortlichen Mechanismen des Zellzyklus-

Arrests dar. So konnte eine Reduktion von Cyclin D1 und Zunahme des Zellzyklus- Inhibitors p21 nach Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) nachgewiesen werden. Die Kombination von Dasatinib plus Torin 2 (D+T) hatte dagegen keine Auswirkung auf die Expression von Cyclin D1, führte aber zu einer Akkumulation des Zellzyklus-Inhibitors p21 (siehe Abbildung 17 beziehungsweise Abbildung 18).

Cyclin D1 gilt als wichtiger Regulator des G₁-S-Übergangs im Zellzyklus: Als Teil eines Holoenzym mit Cyclin-abhängigen Kinasen (CdKs) ist das Protein an der Phosphorylierung und damit Hemmung des Retinoblastom-Proteins (*Rb-Protein*) beteiligt, wodurch die G₁-S-Transition gefördert wird (132–134).

Nach Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin wurde bereits in verschiedenen Zelllinien eine Herunterregulation von Cyclin D1 nachgewiesen (114–116) und könnte als Mechanismus der Rapamycin-vermittelten Proliferationshemmung und der Induktion des G₁-Arrests fungieren (114,115). Die Kontrolle der Cyclin D1-Expression stellt einen Hauptmechanismus der Regulation der Proliferation durch den mTOR-Signalweg dar (135). Die Ubiquitin-abhängige proteolytische Degradation von Cyclin D1 ist abhängig von der Phosphorylierung des Proteins an T286 (136), welche laut *Diehl et al.* durch die Kinase GSK-3 β vermittelt wird (111). Für die Regulation der Kinase GSK-3 β durch den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg sind verschiedene Mechanismen bekannt: Die hemmende Phosphorylierung von GSK-3 β an Ser9 erfolgt zum einen durch das mTORC2-Substrat AKT (109) und zum anderen durch das mTORC1-Substrat p70S6K (110). Obwohl durch beide Behandlungskombinationen in der vorliegenden Studie eine Reduktion der Phosphorylierung von GSK-3 β (Ser9) induziert wurde, erfolgte nur nach Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) eine Abnahme von Cyclin D1. Die Beteiligung von GSK-3 β an der Phosphorylierung und Degradation von Cyclin D1 konnte durch andere Studien nicht vollständig bestätigt werden (137). Die Regulation der Cyclin D1-Expression könnte also auch durch einen hier nicht untersuchten Signalweg erfolgen, der nur durch Rapamycin, und nicht Torin 2 angesprochen wird.

Dong et al. zeigte in Mammakarzinom-Zelllinien einen Rapamycin-vermittelten G₁-Arrest unter Abnahme von Cyclin D1. Dabei war die Aktivierung von GSK-3 β und Phosphorylierung von Cyclin D1 an Thr286 entscheidend für die Abnahme des Proteinlevels (114). Allerdings erfolgte die Aktivierung von GSK-3 β durch Rapamycin nicht wie oben beschrieben durch eine Dephosphorylierung an Ser9. Rapamycin schien die Kinase durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zu aktivieren (114). Dieser Mechanismus wird durch Torin 2 möglicherweise nicht aktiviert, was erklären könnte, warum auf die Hemmung der Phosphorylierung von GSK-3 β keine Abnahme des Cyclin D1-Levels erfolgte. Für eine tiefergehende Analyse der Wirkung

auf die Regulation von Cyclin D1 sollte neben dem Phosphorylierungsstatus auch die Kinaseaktivität von GSK-3 β , beispielsweise wie durch *Dong et al.* (114) erfolgt, untersucht werden. Neben einer unterschiedlichen Regulation der GSK-3 β -Aktivität durch Rapamycin und Torin 2 könnten auch derzeit unbekannte Interaktionen zwischen Dasatinib und Torin 2 für die ausbleibende Abnahme von Cyclin D1 verantwortlich sein. Daher sollte der Vergleich der Effekte nach Doppelbehandlung mit denen der Einzelbehandlung Bestandteil nachfolgender Experimente sein.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass beide Behandlungskombinationen eine starke Zunahme der Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 induzieren. Dies stellt einen möglichen Mechanismus der Effektivität der Behandlung dar. Durch eine Überexpression von p21, einem CdK-Inhibitor, wird die Proliferation verschiedener Karzinomzellen unterdrückt (117). Neben einem Wachstumsarrest wird p21 auch mit dem Auftreten eines senszenten Phänotyps assoziiert (138). Eine Therapie-induzierte Seneszenz könnte, wie in Kapitel 4.1 erläutert, einen vielversprechenden Ansatz zum Erreichen einer Tumorregression darstellen (118).

CdK-Inhibitor p21 scheint zudem eine wichtige Rolle für das Neuroblastom einzunehmen. *Fontana et al.* beschreiben einen neuen onkogenen Signalweg des NB: MycN soll über eine Transaktivierung des miRNA-17-5p-92-Clusters die Herunterregulation von p21 stimulieren und darüber die Zellzyklus-Progression regulieren. Durch eine Antagomir-17-5p-vermittelte (anti-miRNA-17-5p-Oligonucleotid) Zunahme von p21, sowie BIM (Bcl-2-like protein 11), konnte ein Zellzyklus-Arrest sowie Apoptose induziert und dadurch das Wachstum MycN-amplifizierter und Therapie-resistenter NB-Zellen reduziert werden (139). In der Untersuchung verschiedener NB-Proben wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen einer niedrigen Expression von p21 und Tumoren mit hoher MycN-Expression, ungünstiger Prognose und Therapieresistenz festgestellt. Eine mittelstarke bis hohe p21-Expression wurde dagegen in Tumorproben mit geringerer Aggressivität und besserem Therapieansprechen gefunden. Die Therapieresistenz und ungünstige Prognose MycN-exprimierender Tumore könnte daher in Zusammenhang mit einer Unterdrückung von p21 stehen (139). Eine Therapie-induzierte Akkumulation des Proteins erscheint aus diesem Grund als vielversprechender Ansatz für eine effektive NB-Behandlung.

Die Medikamente Rapamycin und Torin 2 induzieren beide einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Die unterschiedlichen Auswirkungen auf Cyclin D1 und p21 geben einen Hinweis auf eine differenzierte Induktion dieses Zellzyklus-Arrests. Der Mechanismus des Zellzyklus-

Arrests nach Behandlung mit Rapamycin könnte teilweise auf die Abnahme von Cyclin D1 zurückzuführen sein, während der durch Torin 2 induzierte Zellzyklus-Arrest durch die Hochregulation der Expression von p21 vermittelt werden könnte.

4.8 Apoptose und Autophagie

Die Induktion von Apoptose durch Torin 2 und andere ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren wurde bereits in verschiedenen Studien beschrieben (51,84,126,140). Hier konnte durch die Doppelbehandlung mit Torin 2 bzw. Rapamycin und Dasatinib in der Zelllinie Kelly keine bzw. in der Zelllinie IMR-32 nur eine geringe Zunahme der PARP-Spaltprodukte und damit keine bzw. nur schwache Zunahme von Apoptose gezeigt werden (siehe Abbildung 20).

In der Doppelbehandlung wurden die mTOR-Inhibitoren wie beschrieben in sehr geringen Konzentrationen angewendet. In weiteren Experimenten in der Arbeitsgruppe wurde deshalb zudem die Behandlung mit den Einzelsubstanzen in ansteigenden Konzentrationen untersucht. Dabei konnte nach Behandlung mit Rapamycin in hohen Konzentrationen eine deutliche PARP-Spaltung nachgewiesen werden [Daten hier nicht gezeigt]. Die ausbleibende (Kelly) bzw. nur geringe (IMR-32) Induktion von Apoptose nach Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) kann daher wahrscheinlich auf die verwendete niedrige Konzentration des mTOR-Inhibitors innerhalb der Kombinationsbehandlung zurückgeführt werden. Durch alleinige Behandlung mit Torin 2 waren allerdings auch nach hohen Konzentrationen nur minimal PARP-Spaltprodukte entstanden [Daten hier nicht gezeigt]. In dieser Untersuchung konnte somit in den NB-Zelllinien Kelly und IMR-32 keine starke zytotoxische Wirkung von Torin 2 festgestellt werden.

4.9 Vergleichbare Wirkung der TIST-Therapie

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der RIST-Therapie im Vergleich zur alternativen TIST-Therapie mit Torin 2 zunächst in Bezug auf die Hemmung der Zellviabilität in Kelly untersucht. Dabei ergab sich durch beide Therapieschemata eine signifikante Hemmung der Zellviabilität.

Wie oben beschrieben wurden durch die beiden Vorbehandlungen in Kelly kein und in der Zelllinie IMR-32 nur eine minimale PARP-Spaltung und damit nur eine geringe Induktion von Apoptose nachgewiesen. Nach Durchführung des vollständigen RIST-Therapieschema konnte unabhängig von der Vorbehandlung (Rapamycin oder Torin 2) ein positiver Apoptose-

Nachweis erbracht werden. Nach Behandlung mit der TIST-Therapie gingen die NB-Zellen in vergleichbarem Ausmaß in Apoptose, wie es nach der RIST-Therapie erfolgte.

Wichtig ist dabei: Trotz der Verwendung der im Vergleich zu Rapamycin deutlich niedrigeren Torin 2-Konzentration ergaben sich vergleichbare Effekte beider Therapieprotokolle in Bezug auf die Reduktion der Zellviabilität und Induktion von Apoptose. Dieses Ergebnis könnte eine Steigerung der Effektivität der RIST-Therapie in der klinischen Anwendung bedeuten. Die Reduktion der Konzentrationen in der TIST-Therapie könnte zudem zu einer Verbesserung des Nebenwirkungsprofils unter Erhalt eines vergleichbaren Anti-Tumor-Effekts führen.

4.10 Ausblick

Die Ergebnisse dieser *in vitro*-Studie geben erste präklinische Hinweise auf eine mögliche Verbesserung der RIST-Kombinationstherapie durch Austausch von Rapamycin gegen Torin 2. Um weitere Erkenntnisse über die Effektivität der alternativen TIST-Therapie mit Torin 2 zu gewinnen, ist zunächst eine *in vivo*-Testung der TIST-Therapie am Mausmodell notwendig. Gegenstand der weiteren Studie des alternativen Therapieprotokolls sollten zudem das Nebenwirkungsprofil, sowie die Untersuchung auf toxische Effekte sein. Zur Verifizierung der Wirksamkeit sollte außerdem eine Untersuchung der TIST-Therapie im Rahmen einer klinischen Studie durchgeführt werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3(3):203–16. doi: 10.1038/nrc1014. PubMed PMID: 12612655.
2. Gurney JG, Ross JA, Wall DA, Bleyer WA, Severson RK, Robison LL. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1997;19(5):428–32. PubMed PMID: 9329464.
3. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (eds). *Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents - Pediatric Monograph - SEER Publications 1975-1995* [Internet] [cited 2018 Aug 4]. Available from: <https://seer.cancer.gov/archive/publications/childhood/>.
4. Brodeur GM, Hogarty MD, Mosse YP, Maris J.M. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 886–922.
5. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet Oncology* 2003;4(8):472–80. doi: 10.1016/S1470-2045(03)01166-5.
6. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64(2):83–103. doi: 10.3322/caac.21219. PubMed PMID: 24488779.
7. National Cancer Institute. *Surveillance, Epidemiology and End Results Database* [Internet] [cited 2018 Aug 4]. Available from: <https://seer.cancer.gov/>.
8. Swift CC, Eklund MJ, Kraveka JM, Alazraki AL. Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma. *RadioGraphics* 2018;38(2):566–80.
9. Kholodenko IV, Kalinovskiy DV, Doronin II, Deyev SM, Kholodenko RV. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *Journal of Immunology Research* 2018;2018:7394268.
10. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984(224):1121–4.
11. Zafar A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F, et al. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev* 2021;41(2):961–

1021. doi: 10.1002/med.21750. PubMed PMID: 33155698; PubMed Central PMCID: PMC7906923.
12. ClinicalTrials.gov. Multimodal Molecular Targeted Therapy to Treat Relapsed or Refractory High-risk Neuroblastoma: RIST-rNB-2011-Studienprotokoll [Internet]. ClinicalTrials.gov: U.S. National Library of Medicine [cited 2018 Apr 26]. Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01467986?cond=Neuroblastoma&cntry=DE&city=Regensburg&phase=1&rank=1>.
 13. Zage PE. Novel Therapies for Relapsed and Refractory Neuroblastoma. *Children (Basel)* 2018;5(11):148.
 14. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 2017;8(23):38022–43. doi: 10.18632/oncotarget.16723. PubMed PMID: 28410237; PubMed Central PMCID: PMC5514969.
 15. Matsumoto S, Batra S, Saito K, Yasui H, Choudhuri R, Gadisetti C, et al. Antiangiogenic agent sunitinib transiently increases tumor oxygenation and suppresses cycling hypoxia. *Cancer Res* 2011;71(20):6350–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2025. PubMed PMID: 21878530; PubMed Central PMCID: PMC3196374.
 16. La Rosée P, Martiat P, Leitner A, Klag T, Müller MC, Erben P, et al. Improved tolerability by a modified intermittent treatment schedule of dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to imatinib. *Ann Hematol* 2013;92(10):1345–50. doi: 10.1007/s00277-013-1769-2. PubMed PMID: 23625298.
 17. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4(6):423–36. doi: 10.1038/nrc1369. PubMed PMID: 15170445.
 18. Nonnenmacher L, Westhoff M-A, Fulda S, Karpel-Massler G, Halatsch M-E, Engelke J, et al. RIST: A potent new combination therapy for glioblastoma. *International Journal of Cancer [Internet]* 2015 [cited 2018 Apr 18](136):E173-E187. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ijc.29138>.
 19. Saito K, Matsumoto S, Yasui H, Devasahayam N, Subramanian S, Munasinghe JP, et al. Longitudinal imaging studies of tumor microenvironment in mice treated with the mTOR inhibitor rapamycin. *PLoS ONE* 2012;7(11):e49456. doi: 10.1371/journal.pone.0049456. PubMed PMID: 23185335; PubMed Central PMCID: PMC3502528.
 20. Zhou Q, Gallo JM. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *Neuro-oncology* 2009;11(3):301–10.

- doi: 10.1215/15228517-2008-088. PubMed PMID: 18971416; PubMed Central PMCID: PMC2718974.
21. Qayum N, Im J, Stratford MR, Bernhard EJ, McKenna WG, Muschel RJ. Modulation of the tumor microvasculature by phosphoinositide-3 kinase inhibition increases doxorubicin delivery in vivo. *Clin Cancer Res* 2012;18(1):161–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1413. PubMed PMID: 22065081.
 22. Corbacioglu S, Kilic M, Westhoff M-A, Reinhardt D, Fulda S, Debatin K-M. Newly identified c-KIT receptor tyrosine kinase ITD in childhood AML induces ligand-independent growth and is responsive to a synergistic effect of imatinib and rapamycin. *Blood* 2006;108(10):3504–13. doi: 10.1182/blood-2006-05-021691. PubMed PMID: 16840725.
 23. Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy against Experimental Drug-resistant Cancer. *Cancer Res* 2000(60):1878–86.
 24. Kieran MW, Turner CD, Rubin JB, Chi SN, Zimmerman MA, Chordas C, et al. A Feasibility Trial of Antiangiogenic (Metronomic) Chemotherapy in Pediatric Patients With Recurrent or Progressive Cancer. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2005;27(11):573–81. doi: 10.1097/01.mph.0000183863.10792.d4.
 25. Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma* 2008;49(4):615–9. doi: 10.1080/10428190801896103. PubMed PMID: 18398720.
 26. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004;47(27):6658–61. doi: 10.1021/jm049486a. PubMed PMID: 15615512.
 27. Montero JC, Seoane S, Ocaña A, Pandiella A. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res* 2011;17(17):5546–52. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2616. PubMed PMID: 21670084.
 28. Timeus F, Crescenzo N, Fandi A, Doria A, Foglia L, Di Cordero Montezemolo L. In vitro antiproliferative and antimigratory activity of dasatinib in neuroblastoma and Ewing sarcoma cell lines. *Oncol Rep* 2008;19(2):353–9. PubMed PMID: 18202781.

29. Chabot GG. Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet* 1997;33(4):245–59. doi: 10.2165/00003088-199733040-00001. PubMed PMID: 9342501.
30. Thomas A, Tanaka M, Trepel J, Reinhold WC, Rajapakse VN, Pommier Y. Temozolomide in the Era of Precision Medicine. *Cancer Res* 2017;77(4):823–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2983. PubMed PMID: 28159862; PubMed Central PMCID: PMC5313339.
31. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* 2019;18(1):26.
32. Bjornsti M-A, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4(5):335–48. doi: 10.1038/nrc1362. PubMed PMID: 15122205.
33. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(7):489–501. doi: 10.1038/nrc839. PubMed PMID: 12094235.
34. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* 2017;170(4):605–35. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029. PubMed PMID: 28802037; PubMed Central PMCID: PMC5726441.
35. King D, Yeomanson D, Bryant HE. PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2015;37(4):245–51. doi: 10.1097/MPH.0000000000000329. PubMed PMID: 25811750.
36. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9(8):550–62. doi: 10.1038/nrc2664. PubMed PMID: 19629070.
37. Rad E, Murray JT, Tee AR. Oncogenic Signalling through Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR): A Driver of Metabolic Transformation and Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 2018;10(1). doi: 10.3390/cancers10010005. PubMed PMID: 29301334; PubMed Central PMCID: PMC5789355.
38. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006;6(9):729–34. doi: 10.1038/nrc1974. PubMed PMID: 16915295.
39. Otto T. MYCN and Its Posttranslational Regulation in Neuroblastoma. In: Christiansen H, Christiansen NM, editors. *Progressive Neuroblastoma. Pediatric and Adolescent Medicine*: S. Karger AG; 2015. p. 47–58.

40. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017;168(6):960–76. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
41. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XFS. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 2007;12(3-4):112–24. doi: 10.1016/j.drudis.2006.12.008. PubMed PMID: 17275731.
42. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(1):21–35. doi: 10.1038/nrm3025.
43. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6(3):184–92. doi: 10.1038/nrc1819. PubMed PMID: 16453012.
44. Stewart E, Shelat A, Bradley C, Chen X, Federico S, Thiagarajan S, et al. Development and characterization of a human orthotopic neuroblastoma xenograft. *Developmental Biology* 2015;407(2):344–55. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.02.002. PubMed PMID: 25863122; PubMed Central PMCID: PMC4995597.
45. Erdreich-Epstein A, Singh AR, Joshi S, Vega FM, Guo P, Xu J, et al. Association of high microvessel $\alpha\beta 3$ and low PTEN with poor outcome in stage 3 neuroblastoma: rationale for using first in class dual PI3K/BRD4 inhibitor, SF1126. *Oncotarget* 2017;8(32):52193–210. doi: 10.18632/oncotarget.13386. PubMed PMID: 28881723; PubMed Central PMCID: PMC5581022.
46. Cage TA, Chanthery Y, Chesler L, Grimmer M, Knight Z, Shokat K, et al. Downregulation of MYCN through PI3K Inhibition in Mouse Models of Pediatric Neural Cancer. *Front Oncol* 2015;5:111. doi: 10.3389/fonc.2015.00111. PubMed PMID: 26029667; PubMed Central PMCID: PMC4429235.
47. Chanthery YH, Gustafson WC, Itsara M, Persson A, Hackett CS, Grimmer M, et al. Paracrine signaling through MYCN enhances tumor-vascular interactions in neuroblastoma. *Sci Transl Med* 2012;4(115):115ra3. doi: 10.1126/scitranslmed.3002977. PubMed PMID: 22218692; PubMed Central PMCID: PMC3402217.
48. Chesler L, Schlieve C, Goldenberg DD, Kenney A, Kim G, McMillan A, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma. *Cancer Res* 2006;66(16):8139–46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2769. PubMed PMID: 16912192; PubMed Central PMCID: PMC2924674.
49. Segerström L, Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Wickström M, Elfman L, Kogner P, et al. Effects of small molecule inhibitors of PI3K/Akt/mTOR signaling on neuroblastoma

- growth *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Cancer* 2011;129(12):2958–65. doi: 10.1002/ijc.26268. PubMed PMID: 21717457.
50. Johnsen JI, Segerström L, Orrego A, Elfman L, Henriksson M, Kågedal B, et al. Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 2008(27):2910–22. doi: 10.1038/sj.onc.1210938.
51. Vaughan L, Clarke PA, Barker K, Chanthery Y, Gustafson CW, Tucker E, et al. Inhibition of mTOR-kinase destabilizes MYCN and is a potential therapy for MYCN-dependent tumors. *Oncotarget* 2016;7(36):57525–44. doi: 10.18632/oncotarget.10544. PubMed PMID: 27438153; PubMed Central PMCID: PMC5295370.
52. Baldo P, Cecco S, Giacomini E, Lazzarini R, Ros B, Marastoni S. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8(8):647–65. PubMed PMID: 19075588.
53. Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol* 2014;36:79–90. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.011. PubMed PMID: 25242279; PubMed Central PMCID: PMC4253687.
54. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(5):307–18. doi: 10.1038/nrm2672. PubMed PMID: 19339977.
55. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 2007;12(1):9–22. doi: 10.1016/j.ccr.2007.05.008.
56. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009;43:67–93. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910. PubMed PMID: 19653858; PubMed Central PMCID: PMC2831538.
57. Mathiassen SG, Zio D de, Cecconi F. Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Front Oncol* 2017;7:51.
58. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell* 2002;10(3):457–68. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00636-6.
59. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 2004;166(2):213–23. doi: 10.1083/jcb.200403069. PubMed PMID: 15249583; PubMed Central PMCID: PMC2172316.

60. White MF, Yenush L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;228:179–208. PubMed PMID: 9401207.
61. Sparks CA, Guertin DA. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene* 2010;29(26):3733–44. doi: 10.1038/onc.2010.139. PubMed PMID: 20418915; PubMed Central PMCID: PMC3031870.
62. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 1996;15(23):6541–51. PubMed PMID: 8978681; PubMed Central PMCID: PMC452479.
63. Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005;11(8):353–61. doi: 10.1016/j.molmed.2005.06.007. PubMed PMID: 16002336.
64. Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 2006;25(48):6436–46. doi: 10.1038/sj.onc.1209886. PubMed PMID: 17041628.
65. Iżycka-Świeszewska E, Drożyńska E, Rzepko R, Kobierska-Gulida G, Grajkowska W, Perek D, et al. Analysis of PI3K/AKT/mTOR signalling pathway in high risk neuroblastic tumours. *Pol J Pathol* 2010;61(4):192–8. PubMed PMID: 21290341.
66. Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin K-M, Fulda S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res* 2007;67(2):735–45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2201. PubMed PMID: 17234785.
67. Barone G, Anderson J, Pearson ADJ, Petrie K, Chesler L. New strategies in neuroblastoma: Therapeutic targeting of MYCN and ALK. *Clin Cancer Res* 2013;19(21):5814–21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0680. PubMed PMID: 23965898; PubMed Central PMCID: PMC3818140.
68. Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot* 1975;28(10):727–32. PubMed PMID: 1102509.
69. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 1975;28(10):721–6. PubMed PMID: 1102508.
70. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003;35(3 Suppl):7S-14S. PubMed PMID: 12742462.
71. Guba M, Breitenbuch P von, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis:

- involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8(2):128–35.
doi: 10.1038/nm0202-128. PubMed PMID: 11821896.
72. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast. *J Biol Chem* 1998;273(7):3963–6. doi: 10.1074/jbc.273.7.3963.
 73. Abraham RT, Gibbons JJ. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(11):3109–14.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2798. PubMed PMID: 17545512.
 74. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell* 2006;22(2):159–68. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.029.
 75. Thoreen CC, Sabatini DM. Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy* 2009;5(5):725–6. PubMed PMID: 19395872.
 76. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 2009;7(2):e38. doi: 10.1371/journal.pbio.1000038. PubMed PMID: 19209957; PubMed Central PMCID: PMC2637922.
 77. Choo AY, Yoon S-O, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(45):17414–9. doi: 10.1073/pnas.0809136105. PubMed PMID: 18955708; PubMed Central PMCID: PMC2582304.
 78. Dowling RJO, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 2010;328(5982):1172–6. doi: 10.1126/science.1187532. PubMed PMID: 20508131; PubMed Central PMCID: PMC2893390.
 79. Xie J, Wang X, Proud CG. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res* 2016;5:2078. doi: 10.12688/f1000research.9207.1.
 80. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66(3):1500–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2925. PubMed PMID: 16452206; PubMed Central PMCID: PMC3193604.
 81. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* 2007;26(13):1932–40. doi: 10.1038/sj.onc.1209990. PubMed PMID: 17001314.

82. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 2009;284(12):8023–32. doi: 10.1074/jbc.M900301200. PubMed PMID: 19150980; PubMed Central PMCID: PMC2658096.
83. Liu Q, Kirubakaran S, Hur W, Niepel M, Westover K, Thoreen CC, et al. Kinome-wide selectivity profiling of ATP-competitive mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors and characterization of their binding kinetics. *J Biol Chem* 2012;287(13):9742–52. doi: 10.1074/jbc.M111.304485. PubMed PMID: 22223645; PubMed Central PMCID: PMC3322972.
84. Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, Zhang X, Hur W, Liu Y, et al. Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res* 2013;73(8):2574–86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1702. PubMed PMID: 23436801; PubMed Central PMCID: PMC3760004.
85. Liu Q, Kang SA, Thoreen CC, Hur W, Wang J, Chang JW, et al. Development of ATP-competitive mTOR inhibitors. *Methods Mol Biol* 2012;821:447–60. doi: 10.1007/978-1-61779-430-8_29. PubMed PMID: 22125084; PubMed Central PMCID: PMC3964610.
86. Zheng Y, Jiang Y. mTOR Inhibitors at a Glance. *Mol Cell Pharmacol* 2015;7(2):15–20. PubMed PMID: 27134695; PubMed Central PMCID: PMC4849280.
87. Alameen AAM, Simioni C, Martelli AM, Zauli G, Ultimo S, McCubrey JA, et al. Healthy CD4+ T lymphocytes are not affected by targeted therapies against the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 2016;7(34):55690–703. doi: 10.18632/oncotarget.10984. PubMed PMID: 27494886; PubMed Central PMCID: PMC5342446.
88. Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang W-G, Lucas J, Shor B, et al. Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res* 2009;69(15):6232–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0299. PubMed PMID: 19584280.
89. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Kelly, DSMZ ACC-355 [Internet] [cited 2019 Feb 1]. Available from: https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-355.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192.
90. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). IMR-32, DSMZ ACC-165 [Internet] [cited 2019 Feb 1]. Available from: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-165.html>.

91. Lutz W, Stöhr M, Schürmann J, Wenzel A, Löhr A, Schwab M. Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of α -prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 1996;13:803–12.
92. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink, Hélène A, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, editors. *Assay Guidance Manual*.
93. Leister JE. *Multimodale molekulare Therapieansätze in einem in-vitro-Modell des Neuroblastoms*. Regensburg; 2019.
94. Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* 1984;22:27–55. doi: 10.1016/0065-2571(84)90007-4.
95. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):621–81. doi: 10.1124/pr.58.3.10. PubMed PMID: 16968952.
96. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010;70(2):440–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947. PubMed PMID: 20068163.
97. Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol* 2011;731:421–34. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_34. PubMed PMID: 21516426.
98. Reynolds CP, Maurer BJ. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *Methods Mol Med* 2005;110:173–83. doi: 10.1385/1-59259-869-2:173. PubMed PMID: 15901935.
99. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9363–7. PubMed PMID: 7568133; PubMed Central PMCID: PMC40985.
100. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):51–7. doi: 10.1038/nrc2772. PubMed PMID: 20029423; PubMed Central PMCID: PMC3672965.
101. Petrova NV, Velichko AK, Razin SV, Kantidze OL. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* 2016;15(6):999–1017. doi: 10.1111/ace1.12518. PubMed PMID: 27628712.

102. Li Z, Sun B, Clewell RA, Adeleye Y, Andersen ME, Zhang Q. Dose-response modeling of etoposide-induced DNA damage response. *Toxicol Sci* 2014;137(2):371–84. doi: 10.1093/toxsci/kft259. PubMed PMID: 24241721.
103. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 1961;25(3):585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
104. Frank N. Analysis of senescence markers and impact of drug - induced senescent neuroblastoma cells on tumour cell proliferation and immun o modulation [Diplomarbeit]. Wien: Universität Wien; 2012.
105. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010;24(22):2463–79. doi: 10.1101/gad.1971610. PubMed PMID: 21078816; PubMed Central PMCID: PMC2975923.
106. Penkivech G. laborinterne Quelle, Dissertation in Vorbereitung.
107. Liu Q, Wang J, Kang SA, Thoreen CC, Hur W, Ahmed T, et al. Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzoh1,6naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a potent, selective, and orally available mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for treatment of cancer. *J Med Chem* 2011;54(5):1473–80. doi: 10.1021/jm101520v. PubMed PMID: 21322566; PubMed Central PMCID: PMC3090687.
108. Park BJ, Whichard ZL, Corey SJ. Dasatinib synergizes with both cytotoxic and signal transduction inhibitors in heterogeneous breast cancer cell lines--lessons for design of combination targeted therapy. *Cancer Lett* 2012;320(1):104–10. doi: 10.1016/j.canlet.2012.01.039. PubMed PMID: 22306341; PubMed Central PMCID: PMC3470854.
109. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378(6559):785–9. doi: 10.1038/378785a0. PubMed PMID: 8524413.
110. Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 1993;296(Pt 1):15–9. PubMed PMID: 8250835; PubMed Central PMCID: PMC1137648.
111. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998;12(22):3499–511. PubMed PMID: 9832503; PubMed Central PMCID: PMC317244.

112. Gustafson WC, Weiss WA. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene* 2010;29(9):1249–59. doi: 10.1038/onc.2009.512. PubMed PMID: 20101214; PubMed Central PMCID: PMC2904682.
113. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998;273(45):29864–72. PubMed PMID: 9792703.
114. Dong J, Peng J, Zhang H, Mondesire WH, Jian W, Mills GB, et al. Role of glycogen synthase kinase 3beta in rapamycin-mediated cell cycle regulation and chemosensitivity. *Cancer Res* 2005;65(5):1961–72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2501. PubMed PMID: 15753396.
115. Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivières S, Mercep L, Ferrari S. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J Biol Chem* 1998;273(23):14424–9. PubMed PMID: 9603954.
116. Gera JF, Mellinger IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu J-h, et al. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem* 2004;279(4):2737–46. doi: 10.1074/jbc.M309999200. PubMed PMID: 14576155.
117. Gartel AL, Tyner AL. The growth-regulatory role of p21 (WAF1/CIP1). *Prog Mol Subcell Biol* 1998;20:43–71. PubMed PMID: 9928526.
118. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009;9(6):400–14. doi: 10.1038/nrc2657. PubMed PMID: 19440234; PubMed Central PMCID: PMC2722839.
119. Luo Y, Hurwitz J, Massagué J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 1995;375(6527):159–61. doi: 10.1038/375159a0. PubMed PMID: 7753174.
120. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):2109–17. PubMed PMID: 10022898; PubMed Central PMCID: PMC84004.
121. Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* 2007;3(6):542–5. doi: 10.4161/auto.4600.

122. Ambros IM, Rumpler S, Luegmayer A, Hattinger CM, Strehl S, Kovar H, et al. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary MYCN gene copies by micronucleus formation--sign of tumour cell reversion? *Eur J Cancer* 1997;33(12):2043–9. PubMed PMID: 9516850.
123. Narath R, Ambros IM, Kowalska A, Bozsaky E, Boukamp P, Ambros PF. Induction of senescence in MYCN amplified neuroblastoma cell lines by hydroxyurea. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(2):130–42. doi: 10.1002/gcc.20393. PubMed PMID: 17106870.
124. Taschner-Mandl S, Schwarz M, Blaha J, Kauer M, Kromp F, Frank N, et al. Metronomic topotecan impedes tumor growth of MYCN-amplified neuroblastoma cells in vitro and in vivo by therapy induced senescence. *Oncotarget* 2016;7(3):3571–86. doi: 10.18632/oncotarget.6527. PubMed PMID: 26657295; PubMed Central PMCID: PMC4823128.
125. Simioni C, Cani A, Martelli AM, Zauli G, Tabellini G, McCubrey J, et al. Activity of the novel mTOR inhibitor Torin-2 in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential to prevent Akt reactivation. *Oncotarget* 2014;5(20):10034–47. PubMed PMID: 25296981; PubMed Central PMCID: PMC4259403.
126. Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulikakos PI, Scaltriti M, Moskatel E, et al. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov* 2011;1(3):248–59. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0085. PubMed PMID: 22140653; PubMed Central PMCID: PMC3227125.
127. Harris KF, Shoji I, Cooper EM, Kumar S, Oda H, Howley PM. Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(24):13738–43. PubMed PMID: 10570142; PubMed Central PMCID: PMC24134.
128. Otto T, Horn S, Brockmann M, Eilers U, Schüttrumpf L, Popov N, et al. Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2009;15(1):67–78. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.005. PubMed PMID: 19111882.
129. Gustafson WC, Meyerowitz JG, Nekritz EA, Chen J, Benes C, Charron E, et al. Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A. *Cancer Cell* 2014;26(3):414–27. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.015. PubMed PMID: 25175806; PubMed Central PMCID: PMC4160413.
130. Harenza JL, Diamond MA, Adams RN, Song MM, Davidson HL, Hart LS, et al. Transcriptomic profiling of 39 commonly-used neuroblastoma cell lines. *Sci Data*

- 2017;4:170033. doi: 10.1038/sdata.2017.33. PubMed PMID: 28350380; PubMed Central PMCID: PMC5369315.
131. Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, et al. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell* 2012;22(1):117–30. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.001. PubMed PMID: 22789543; PubMed Central PMCID: PMC3417812.
132. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145(12):5439–47. doi: 10.1210/en.2004-0959. PubMed PMID: 15331580.
133. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993;7(5):812–21. doi: 10.1101/gad.7.5.812.
134. Yang K, Hitomi M, Stacey DW. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div* 2006;1:32. doi: 10.1186/1747-1028-1-32. PubMed PMID: 17176475; PubMed Central PMCID: PMC1769361.
135. Advani SH. Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer therapy. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2010;31(4):132–6. doi: 10.4103/0971-5851.76197. PubMed PMID: 21584218; PubMed Central PMCID: PMC3089921.
136. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997;11(8):957–72. PubMed PMID: 9136925.
137. Yang K, Guo Y, Stacey WC, Harwalkar J, Fretthold J, Hitomi M, et al. Glycogen synthase kinase 3 has a limited role in cell cycle regulation of cyclin D1 levels. *BMC Cell Biol* 2006;7:33. doi: 10.1186/1471-2121-7-33. PubMed PMID: 16942622; PubMed Central PMCID: PMC1592484.
138. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, et al. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 1999;18(34):4808–18. doi: 10.1038/sj.onc.1203078. PubMed PMID: 10490814.
139. Fontana L, Fiori ME, Albini S, Cifaldi L, Giovinazzi S, Forloni M, et al. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS ONE* 2008;3(5):e2236. doi: 10.1371/journal.pone.0002236. PubMed PMID: 18493594; PubMed Central PMCID: PMC2375057.

140. Park S, Sim H, Lee K. Rapamycin-resistant and torin-sensitive mTOR signaling promotes the survival and proliferation of leukemic cells. *BMB Rep* 2016;49(1):63–8. PubMed PMID: 26497580; PubMed Central PMCID: PMC4914215.

6 Anhang

6.1 Untersuchung der Zellkultur auf eine Kontamination mit Mycoplasmen

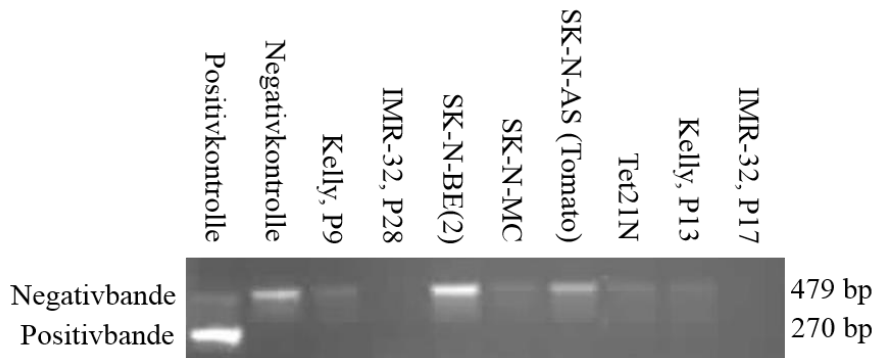


Abbildung 22: Agarose-Gel nach Mycoplasma-PCR

Untersuchung auf Mycoplasma-DNA in den in der Arbeitsgruppe kultivierten Zelllinien. Die potenziell in den Zellkultur-Überständen enthaltene Mycoplasma-DNA wurde zunächst mit Hilfe des *PCR Mycoplasma Test Kits I/C* (PromoKine) amplifiziert und in einem mit dem fluoreszierenden Farbstoff *GelRed* versetzten 1,5 %-igem Agarose-Gel separiert. In keiner der Zelllinien konnte eine Positivbande (265 – 278 bp) nachgewiesen werden. Es kann daher von einer Mycoplasma-freien Zellkultur ausgegangen werden.

6.2 Induktion von Seneszenz

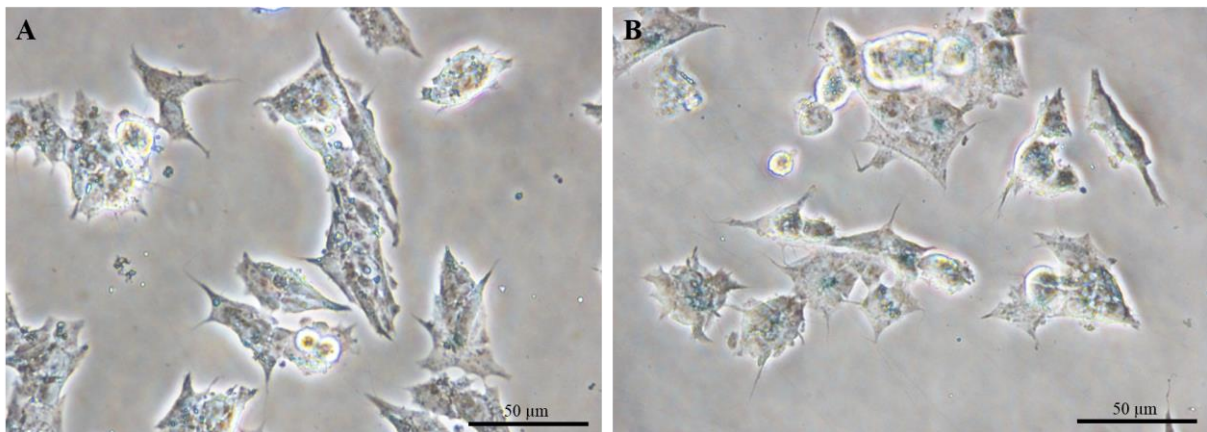
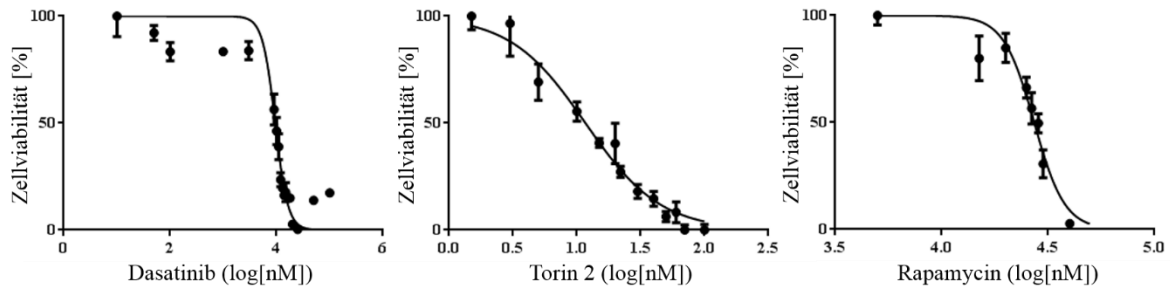


Abbildung 23: Vorversuch zur Induktion von Seneszenz

Versuch der Etablierung einer Etoposid-Behandlung als Positivkontrolle für die Induktion von Seneszenz in der Zelllinie Kelly. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat für eine Dauer von 72 h mit 1 μ M Etoposid behandelt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und nach einer Erholungsphase von 72 h die Färbung mit β -Galactosidase. Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 40 x) der Zellen 24 h nach der Färbung. A: DMSO-Kontrolle; B: Etoposid 1 μ M. Nach Behandlung mit Etoposid ergab sich kein Unterschied zur mit DMSO behandelten Negativ-Kontrolle. Es konnte keine der untersuchten Etoposid-Konzentrationen als Positiv-Kontrolle für die Induktion von Seneszenz etabliert werden.

6.3 IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung

A Kelly



B IMR-32

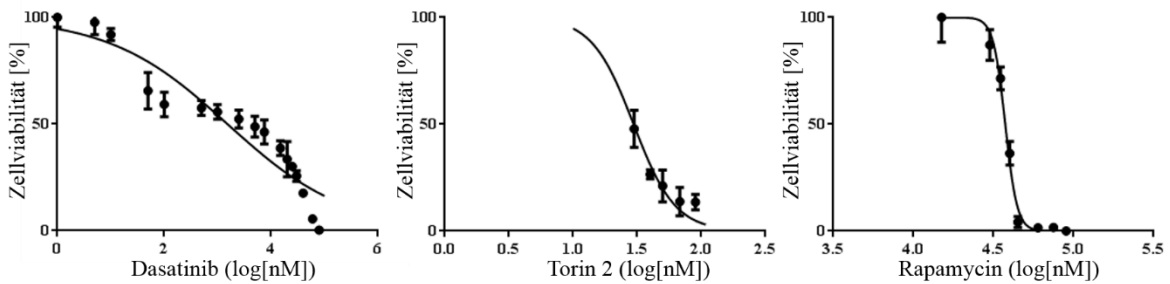
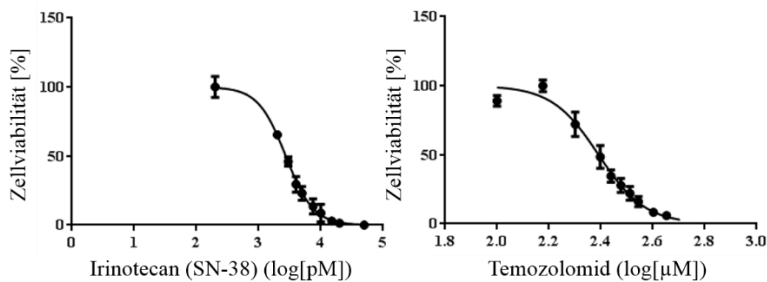


Abbildung 24: Zellviabilitätskurven der Einzelbehandlungen mit Dasatinib, Torin 2 und Rapamycin

Zellviabilitätskurven der IC₅₀-Bestimmung für Dasatinib, Torin 2 bzw. Rapamycin in den Zelllinien A: Kelly und B: IMR-32. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bei einer Konfluenz von 50-70 % behandelt. Die MTT-Reaktion und Messung der Viabilität wurden zum Zeitpunkt 72 h nach Behandlung durchgeführt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

A Kelly



B IMR-32

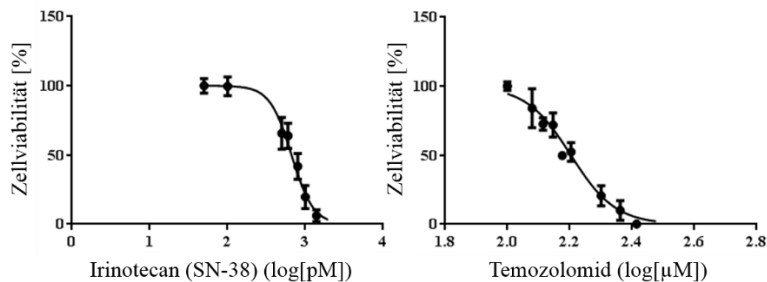


Abbildung 25: Zellviabilitätskurven der Einzelbehandlungen mit Irinotecan und Temozolomid

Zellviabilitätskurven der IC_{50} -Bestimmung für Irinotecan (aktiver Metabolit: SN-38) bzw. Temozolomid in den Zelllinien A: Kelly und B: IMR-32. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bei einer Konfluenz von 50-70 % behandelt. Die MTT-Reaktion und Messung der Viabilität wurden zum Zeitpunkt 72 h nach Behandlung durchgeführt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

6.4 Publikation

Int. J. Med. Sci. 2021, Vol. 18

137



International Journal of Medical Sciences

2021; 18(1): 137-149. doi: 10.7150/ijms.48393

Research Paper

Comparing mTOR inhibitor Rapamycin with Torin-2 within the RIST molecular-targeted regimen in neuroblastoma cells

Rebecca Waetzig, Marie Matthes, Johannes Leister, Gina Penkivech, Tilman Heise, Selim Corbacioglu and Gunhild Sommer✉

Department of Pediatric Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation, University Hospital of Regensburg, Franz-Josef-Strauss Allee 11, 93053, Regensburg, Germany.

✉ Corresponding author: E-mail: gunhild.sommer@klinik.uni-regensburg.de; Pediatric Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation, Children's Hospital Regensburg, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauß Allee 11, 3053 Regensburg, Germany.

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2020.05.19; Accepted: 2020.10.16; Published: 2021.01.01

Abstract

The prognosis for patients with relapsed or refractory high-risk neuroblastoma remains dismal and novel therapeutic options are urgently needed. The RIST treatment protocol has a multimodal metronomic therapy design combining molecular-targeted drugs (Rapamycin and Dasatinib) with chemotherapy backbone (Irinotecan and Temozolomide), which is currently verified in a phase II clinical trial (NCT01467986). With the availability of novel and more potent ATP competitive mTOR inhibitors, we expect to improve the RIST combination therapy. By comparing the IC₅₀ values of Torin-1, Torin-2, AZD3147 and PP242 we established that only Torin-2 inhibited cell viability of all three MycN-amplified neuroblastoma cell lines tested at nanomolar concentration. Single treatment of both mTOR inhibitors induced a significant G₁ cell cycle arrest and combination treatment with Dasatinib reduced the expression of cell cycle regulator cyclin D1 or increased the expression of cell cycle inhibitor p21. The combinatorial index depicted for both mTOR inhibitors a synergistic effect with Dasatinib. Interestingly, compared to Rapamycin, the combination treatment with Torin-2 resulted in a broader mTOR pathway inhibition as indicated by reduced phosphorylation of AKT (Thr308, Ser473), 4E-BP (Ser65), and S6K (Thr389). Furthermore, substituting Rapamycin in the modified multimodal RIST protocol with Torin-2 reduced cell viability and induced apoptosis despite a significant lower Torin-2 drug concentration applied. The efficacy of nanomolar concentrations may significantly reduce unwanted immunosuppression associated with Rapamycin. However, at this point we cannot rule out that Torin-2 has increased toxicity due to its potency in more complex systems. Nonetheless, our results suggest that including Torin-2 as a substitute for Rapamycin in the RIST protocol may represent a valid option to be evaluated in prospective clinical trials for relapsed or treatment-refractory high-risk neuroblastoma.

Key words: mTOR inhibitor, Torin-2, Rapamycin, neuroblastoma, ATP competitive mTOR inhibitors, combination therapy

Introduction

Neuroblastoma, derived from primitive nervous sympathetic cells, is the most common solid tumor of childhood and constitutes 7 % of all pediatric cancers [1,2]. Neuroblastoma is an ambiguous disease with spontaneous remissions in infants with stage 4s while children over 1 year of age with metastatic disease have a persistently poor outcome.³ Amplification of the MycN gene is found predominantly in advanced

stage diseases and is associated with rapid tumor progression and poor prognosis [2,4-6]. Despite intensive therapy the prognosis of patients with high-risk relapsed or refractory neuroblastoma (rNB) comprising up about 60% of cases remains dismal [2,7]. Therefore, development of new treatment protocols is urgently needed.

The RIST protocol for rNB is currently being evaluated in a phase II prospective randomized clinical trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01467986) [8]. This novel metronomic multimodal treatment protocol combines two molecular-targeted drugs, the mTOR-inhibitor Rapamycin and the multi-kinase inhibitor and immunosuppressant Dasatinib with conventional chemotherapy, consisting of the topoisomerase inhibitor irinotecan and the alkylating agent temozolomide. The “pre-treatment” with Rapamycin and Dasatinib is anticipated to have an apoptotic, chemo-sensitizing and cell cycle synchronizing effect [9]. The metronomic therapy is expected to reduce toxicity [10], prevent drug resistance, and to alter the tumor microenvironment in a more anti-tumorigenic manner [9]. With targeting key cancer promoting pathways by synergistically acting drugs, the combination therapy is expected to enhance efficacy compared to the monotherapy. Combination therapy is assumed to reduce drug resistance and dosage, induce anti-tumor effects such as suppressing growth and metastatic potential, arrest mitotically active cells, reduce the cancer stem cell population and induce apoptosis [11]. In a compassionate use setting, the RIST therapy revealed promising results in rNB patients with an overall survival of 55 % and a tolerable adverse event profile [8].

Dysregulation of the PI3K/AKT signaling pathway is common in human malignancies [12-14], promoting neoplastic transformation [13], altering cell growth and survival [12]. Different studies demonstrated that the PI3K/AKT/mTOR pathway plays an important role in neuroblastoma pathogenesis and inhibition of this signaling pathway by mTOR inhibitors were effective in neuroblastoma models [7]. It has been shown that inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling cascade induces down-regulation of MycN expression and reduces the growth of neuroblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. In high-risk neuroblastoma, activation of the PI3K pathway is common [15] and phosphorylation-mediated activation of AKT was shown to be frequently triggered in neuroblastoma [16]. Furthermore activation of AKT by phosphorylation is associated with poor prognosis in primary neuroblastoma and correlates with amplification of the oncogene MycN, a well-known marker of an aggressive phenotype [16]. Hence, agents targeting this pathway are potential treatment options of high-risk and relapsed neuroblastoma [17-19].

Besides the activation of mammalian target of Rapamycin (mTOR) by the PI3K/AKT pathway, the protein kinase mTOR integrates various other cellular signals to control cell proliferation, growth and

metabolism depending on growth factor signaling, as well as nutrient, energy and oxygen supply [14]. In more than 70% of cancer, mTOR is activated and promotes neoplastic growth and progression [20]. Therefore, mTOR is a promising target for cancer therapy. mTOR serves as core component for two distinct protein complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2) [21], which regulate different cellular processes [22]. The mTORC1 is one of the major downstream effectors of the PI3K/AKT signaling cascade [23]. Currently, the allosteric mTOR inhibitor Rapamycin is part of the RIST therapy protocol [8]. It has been shown that Rapamycin inhibits the mTORC1 incompletely [23-25] and that inhibition of mTORC2 is cell-line dependent and occurs after long-term treatment [26,27]. Additionally, Rapamycin-mediated mTORC1 inhibition causes activation of PI3K/AKT by suppression of the negative feedback loop [28,29], promotes survival through AKT, and partly contributes to the known ineffectiveness of Rapamycin treatment [28]. The limited success of the allosteric inhibitor Rapamycin as an anti-cancer drug led to the development of ATP competitive mTOR inhibitors [30,31]. This new drug class potently inhibits both mTOR complexes and consequently may prevent AKT feedback activation [32].

In this study, we hypothesized that inhibition of the mTOR pathway by ATP competitive mTOR inhibitors enhances the efficacy of the conventional RIST therapy. Therefore, we performed a comparative study of Rapamycin with four different ATP competitive mTOR inhibitors, namely Torin-1, Torin-2, AZD3147 and PP242. Our results demonstrate that in the combination drug treatment Torin-2 and protein kinase inhibitor Dasatinib act synergistically. Furthermore, signaling pathway analysis revealed that inhibition of the mTOR pathway by Rapamycin was incomplete and leaky compared to Torin-2. Taken together, the cell-based studies demonstrate that at significant lower Torin-2 drug doses, the alternative ‘T’-IST protocol reduced neuroblastoma cell viability as effective as the conventional RIST protocol.

Materials and Methods

Cell culture and drug treatment

All neuroblastoma cell lines were purchased from Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). The cells were cultivated for not more than 40 passages at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. The cell line Kelly was cultured in RPMI 1640 (Gibco®, Cat. No. 11875093) supplemented with 15 % fetal bovine serum (FBS,

Biochrom), 1% penicillin/streptomycin (Biochrom, Cat. No. A2212) and 2 mM L-glutamine (Gibco®, Cat. No. 25030081). The cell line IMR-32 was cultured in RPMI 1640 with supplemented with 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% non-essential amino acids (MEM NEAA, Gibco®, Cat. No. 11140050). The cell line SK-N-BE(2) was cultured in EMEM (Lonza, Cat. No. 12-125F)/Ham's F12 (Biochrom, Cat. No. F0815) 1:1 supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine. All cell lines were tested periodically for mycoplasma contamination.

AZD3147 (Cat. No. 5615), PP242 (Cat. No. 4257), Torin-1 (Cat. No. 4247), Torin-2 (Cat. No. 4248) and SN-38 (active metabolite of Irinotecan, Cat. No. 2684) were purchased from Tocris Bioscience. Rapamycin (Cat. No. R-5000) and Dasatinib (Cat. No. D-3307) were purchased from LC Laboratories. Temozolomide (TMZ) was purchased from BioVision (Cat. No. 2226-10). All drugs were dissolved in DMSO (Sigma, Cat. No. D2650) following the manufacturer's instructions and stored at -20 °C. Cells were treated with indicated concentrations and for indicated time-periods. As control, cells were treated with appropriate DMSO concentrations. The applied drug concentrations for single or combination treatment are listed in Table 3 and Table 4, respectively. The treatment protocol has been performed as shown in Figure 12.

Determination of the IC₅₀ by applying the MTT cell viability assay

The MTT assay was performed as described in David Morgan's "Polyamine Protocols. Methods in Molecular Biology"³³ with minor changes of the protocol as described: 24 h after plating, 50% confluent cells were treated in concentration series including the expected IC₅₀ concentration of the respective substance. After 72 h of incubation the MTT reaction and photometric analysis was implemented. The cell culture medium was aspirated with a vacuum pipette before applying 100 µL MTT working solution (MTT stock solution: 20 mg/ml MTT (Sigma, Cat. No. M5655) in 1× PBS (D8537, Sigma); MTT working solution: 1:5-dilution of the stock solution with RPMI 1640 medium without phenol red). The reaction was stopped after 2 h at 37 °C with 100 µL isopropanol (70 %, Cat. No. 3889017). The photometric analysis at λ = 560 nm was performed in a TECAN Plate Reader after an additional 30 min incubation at room temperature (RT). The viabilities were normalized to DMSO controls. For the identification of the IC₅₀ values all experiments were performed in three replicates and repeated in at least three independent experiments.

Calculation of the Combination Index (CI)

To describe the effect of the combination treatments with Dasatinib/Rapamycin or Dasatinib/Torin-2 we calculate the Combination Index (CI) applying the Chou-Talalay-Method [34] as followed:

$$CI = \frac{IC50_{(1+2)}}{IC50_1} + \frac{IC50_{(1+2)}}{IC50_2}$$

The calculations were done with the software CalcuSyn. We used normalized viability values determined by MTT assays as described above. For the calculation the viability values were converted to the "Fraction Affected" (FA) [35] as followed:

$$FA = 1 - \left(\frac{\text{viability} [\%]}{100} \right)$$

For the calculation, a constant dilution factor for both drugs is necessary. To test different concentration ranges we used various dilution factors (such as 1.5, 2.0 or 2.5). Three replicates were performed for each experiment. For calculation of the CI we used the results of at least two independent experiments.

The calculation of the Dose Reduction Factor (DRF) was done as followed:

$$DRF = \frac{\text{dose}_{\text{single treatment}}}{\text{dose}_{\text{combination treatment}}}$$

Immunoblot analysis

24 h after plating, 50% confluent cells were treated. The drug concentrations applied are listed in Table 3 (single treatment) respectively Table 4 (combination treatment). After 6 h, 24 h or 72 h for single or combination treatment, respectively at day 8 of the multimodal RIST and TIST treatment, the cells were harvested. The whole cell lysates were separated by gel electrophoresis and the proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham™ Protran™ 0,45 µm, GE Healthcare Life Science, Cat. No. 10600002). After the transfer, the membranes were incubated with primary antibodies (1:1000, respectively 1:2000 for LC3B and GAPDH antibody). The primary antibodies AKT (pan, #4691), phospho-AKT (Ser473, #4060), phospho-AKT (Thr308, #13038), 4E-BP1 (#9644), phospho-4E-BP1 (Ser65, #9456), MycN (#9405), p70S6 kinase (#9202), phospho-p70S6 kinase (Thr389, #9234), Src kinase (#2108), phospho-Src family (Tyr416, #2101), caspase-3 (#9665) and p21 Waf1/Cip (DCS60, #2946) were purchased from Cell Signaling. The LC3B antibody (#NB100-2220SS) was purchased from NovusBio, the PARP-1 antibody (#1072-1) was purchased from Epitomics and the GAPDH antibody (#Sc-47724) was purchased from Santa Cruz. ImageJ was used for quantification of the protein expression.

Cell cycle analysis

For the cell cycle analysis, we followed the univariate cell cycle analysis protocol for the MACSQuant® Analyzer (Miltenyi) with minor changes: We used 20 µg propidium iodide (Sigma, #P4864) and 0,2 mg RNase A (Thermo Fisher, #EN0531). The measurement of the fluorescence signal was done with the MACSQuant Analyzer10 (Miltenyi).

Statistical analysis

For the IC₅₀ value of a single drug we created a graph of cell viability versus the logarithm of the molar drug concentration in GraphPad Prism 6 using the viability values of the MTT assay: First the cell viabilities were transformed to logarithmic values and then normalized to get a range between 0 and 100% viability. Afterwards, a non-linear regression analysis was performed. The results are presented as the mean ± standard deviation (SD). To evaluate the effect on viability reduction by combination treatment or multimodal treatments compared to the control an unpaired t-test was performed. For the *P* value consistent SD were not assumed. For statistical significance, the Holm-Sidak method and a significance level of $\alpha = 5,00\%$ were used.

Results

Inhibition of cell viability by Torin-2 compares to Rapamycin

Firstly, the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of four different ATP competitive mTOR inhibitors was determined by performing MTT assays for the neuroblastoma (NB) cell lines Kelly and IMR-32 (Table 1, Fig. S1 and S2). The IC₅₀ values for Torin-1, AZD3147 and PP242 varied widely in the two cell lines tested. In contrast, the IC₅₀ value of Torin-2 was in both cell lines in the low nanomolar range (Kelly: 11.69 nM, IMR-32: 29.67 nM, Table 1, Fig. S2A and B). Due to the consistent effect of Torin-2 in two cell lines and the large variability of sensitivity to the inhibitors Torin-1, AZD3147, and PP242, further studies were performed with Torin-2. Moreover, we confirmed in an additional NB cell line that Torin-2 is effective in nanomolar range by establishing an IC₅₀ of 28.52 nM for SK-N-BE cells (2) (Fig. S2C). The comparison of the IC₅₀ values demonstrated a thousand-fold lower IC₅₀ for Torin-2 compared to Rapamycin in three different NB cell lines (Table 1). Hence the cell viability of all NB cell lines tested is impaired by treatment with low nanomolar concentrations of the ATP-competitive mTOR inhibitor Torin-2.

Table 1. Viability test to determine half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of various mTOR inhibitors in neuroblastoma (NB) cell line Kelly and IMR-32

NB cell line/mTOR inhibitor	Kelly [IC ₅₀]	IMR-32 [IC ₅₀]
Rapamycin	27.21 ± 0.006 µM	37.47 ± 0.003 µM
Torin-1	42.41 ± 0.017 nM	397.10 ± 0.037 nM
Torin-2	11.69 ± 0.019 nM	29.67 ± 0.013 nM
AZD3147	0.88 ± 0.015 nM	662.40 ± 0.033 nM
PP242	191.50 ± 0.019 nM	390.50 ± 0.015 nM

Note: IC₅₀ of Rapamycin = [24.27 ± 0.003 µM] and Torin-2 = [28.52 ± 0.012 nM] in NB cell line SK-N-BE(2).

Induction of a G₁ cell cycle arrest by Torin-2

It has been shown earlier that the allosteric mTOR inhibitor Rapamycin inhibits the progression of the cell cycle from G₁ to S phase [36]. In an effort to study the underlying cellular mechanisms whereby Torin-2 impairs NB cells viability, we tested the impact of Torin-2 on cell cycle progression. Our data confirm the cell cycle inhibiting effect of Rapamycin and demonstrate for the first time that Torin-2 induces a G₁ arrest in NB cells as shown by a significant increase in cell counts in G₁ and a significantly decrease in the S phase (Fig. 1A and B).

Effect of single drug treatment with Torin-2 or Rapamycin on the expression of cell cycle regulator cyclin D1 and p21 as well as autophagy marker LC3B-II

We have shown that Rapamycin and Torin-2 treatment at IC₅₀ concentrations (Table 1) induced a G₁ arrest in both NB cell lines (Fig. 1). Next, we tested whether those drug concentrations change the expression of two important cell cycle regulators cyclin D1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 regulating the cell cycle progression from G₁ to S phase. As shown, cyclin D1 expression was increased by Torin-2 treatment in Kelly but barely in IMR-32 cells and p21 expression was reduced by Rapamycin in Kelly, but only slightly increased in IMR-32 cells (Fig. 2). Those data suggest that the observed G₁ arrest in single drug treated Kelly and IMR-32 cells did not result from reduced cyclin D1 or increased p21 expression.

Because ATP competitive mTOR inhibitors such as Rapamycin can induce autophagy [37], we asked next whether single drug treatment induces the expression of autophagy marker LC3B-II [38]. Torin-2 treatment at IC₅₀ concentrations or even several magnitudes higher did not increase the expression of LC3B-II in Kelly nor IMR-32 cells, whereas Rapamycin treatment caused an increase of LC3B-II in both NB cell lines at concentrations slightly higher than the IC₅₀ value (Fig. 4). In summary, in both cell lines the expression of autophagy marker LC3B-II was not induced at IC₅₀ concentrations. However,

increasing Rapamycin but not Torin-2 concentrations lead to enhanced LC3B-II expression suggesting that autophagy induced by Rapamycin but not Torin-2 treatment contributes to the observed G₁ arrest [39] in both cell lines.

Reduced induction of apoptosis by Torin-2 compared to Rapamycin

Further, we analyzed whether treatment with Rapamycin or Torin-2 induces apoptosis in NB cells. Therefore, we monitored the apoptosis-dependent processing of PARP-1 upon treatment with increasing concentrations of Rapamycin or Torin-2 in Kelly and IMR-32 cells. Treatment of cells with Rapamycin concentrations slightly above the IC₅₀ value (Rapamycin in Kelly (IC₅₀: 27 μM) or IMR-32 (IC₅₀: 37 μM)) clearly induced PARP-1 cleavage (Fig. 3A and B). In contrast, treatment of NB cells with even a high dose – more than tenfold – of Torin-2 (160 nM) only marginally induced PARP-1 cleavage (Fig. 3A and B). We therefore conclude that nanomolar Torin-2 concentrations do not induce apoptosis and impair cell viability mainly through induction of a G₁ cell cycle arrest.

Synergistic effect of combination treatment with Dasatinib and Torin-2

Next, we tested whether the drug combination Dasatinib and Torin-2 (D+T) inhibits cell viability as effective as the combination of Dasatinib and Rapamycin (D+R). Accordingly, we first determined the IC₅₀ values for Dasatinib in Kelly (IC₅₀: 9.47 μM), IMR-32 (IC₅₀: 1.53 μM), and SK-N-BE(2) (IC₅₀: 25.73 μM) (Fig. S3, Table S1).

Subsequently, we determined the combinatorial index (CI) for the combination treatments (Dasatinib/Rapamycin (D+R) and Dasatinib/Torin-2 (D+T)) by using the Chou-Talalay method [34]. Both combination treatments showed a synergistic effect in Kelly (D+R: CI = 0.23; D+T: CI = 0.60, Table 2) and in

IMR-32 (D+R: CI = 0.20; D+T: CI = 0.17, Table 2). In SK-N-BE(2) the combination Dasatinib/Rapamycin was synergistic (D+R: CI = 0.75, Table 2) as well, whereas Dasatinib/Torin-2 showed a slight antagonistic effect (D+T: CI = 1.25, Table 2). Due to the increased efficacy of all drug combination treatments compared to single treatments, it was possible to calculate a dose reduction factor (DRF) for each drug (Table S2 and S3). Based on the combinatorial effects and the calculated DRF, all drugs were used at concentrations below their IC₅₀ applied for the single drug treatment (compare Table 3 and Table 4) in the following combination treatment experiments.

The combination treatment with Dasatinib/Rapamycin (D+R) induced a significantly stronger inhibition of cell viability compared to the treatment with both single drugs in Kelly (Fig. 5A; (D): 5 μM, (R): 2 μM) and SK-N-BE(2) (Fig. 5C; (D): 20 μM, (R): 5 μM), however, in IMR-32 cells the viability was not significant but strongly reduced (p=0.20, Fig. 5B; (D): 0.05 μM, (R): 0.13 μM). The combination treatment with Dasatinib/Torin-2 (D+T) induced a significantly stronger inhibition of cell viability compared to the treatment with both single drugs in IMR-32 (Fig. 5B; (D): 1 μM, (T): 6 nM) and SK-N-BE(2) (Fig. 5C; (D): 12.5 μM, (T): 15 nM), however, in Kelly cells the viability was not significant but strongly reduced (p=0.07, Fig. 5A; (D): 1.5 μM, (T): 9 nM) in the combination treatment compared to the single treatment with Torin-2.

Table 2. Combinatorial viability tests to determine the combinatorial index (CI) of Dasatinib (D) combined with mTOR inhibitor Rapamycin (R) or Torin-2 (T) in neuroblastoma (NB) cell line Kelly, IMR-32, and SK-N-BE(2)

NB cell line/mTOR inhibitors	Kelly [CI]	IMR-32 [CI]	SK-N-BE(2) [CI]
Dasatinib/Rapamycin (D+R)	0.23 ± 0.07	0.20 ± 0.12	0.75 ± 0.02
Dasatinib/Torin-2 (D+T)	0.60 ± 0.15	0.17 ± 0.11	1.25 ± 0.11

Note: CI < 0.9 = synergistic; 0.9-1.1 = additive; > 1.1 = antagonistic

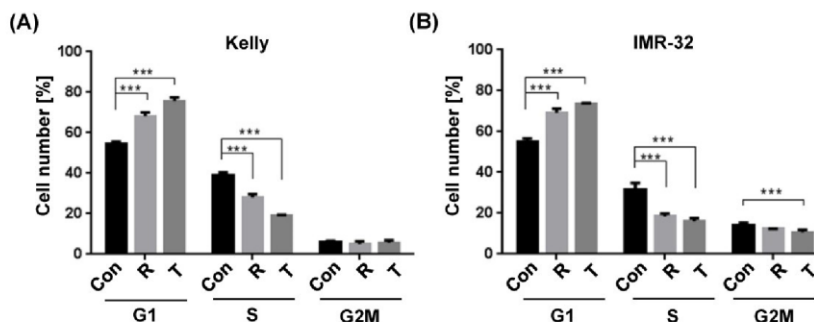


Figure 1. Cell cycle analysis comparing Rapamycin (R) and Torin-2 (T) at the corresponding IC₅₀ concentrations in neuroblastoma cell line (A) Kelly [R: 30 μM, T: 12 nM] and (B) IMR-32 [R: 40 μM, T: 30 nM]. Con: DMSO-treated control cells. G₁-, S-, and G₂M cell cycle phases. Cells were seeded 24h before treatment with Rapamycin and Torin 2, respectively, and DMSO concentrations applied as vehicle for control cells. After an incubation of 72h, the cells were harvested, prepared and stained following the univariate cell cycle analysis protocol for the MACSQuant® Analyzer (Miltenyi) with minor changes described in Materials and Methods.

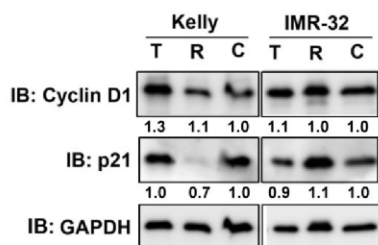


Figure 2. Immunoblot for cell cycle regulator Cyclin D1 and p21. Kelly cells were treated with IC_{50} concentration of Torin-2 (T) [IC_{50} = 12 nM] or Rapamycin (R) [IC_{50} = 30 μ M]. IMR-32 cells were treated with IC_{50} concentrations of Torin-2 [IC_{50} = 30 nM] or Rapamycin [IC_{50} = 40 μ M]. C: DMSO-treated control cells. GAPDH was applied as loading control. Numbers below bands state protein expression normalized to GAPDH. Cells were harvested 24 h (Cyclin D1), respectively 72 h (p21) after treatment.

Table 3. Drug concentrations for single treatment

Drug/NB cell line	Kelly	IMR-32	SK-N-BE(2)
Rapamycin	27.2 μ M	37.5 μ M	24.3 μ M
Torin-2	11.7 nM	29.7 nM	28.5 nM
Dasatinib	9.5 μ M	1.5 μ M	25.7 μ M
Irinotecan (SN-38)	2.7 nM	0.7 nM	-
Temozolomide (TMZ)	246.0 μ M	159.9 μ M	-
Torin-1	42.4 nM	397.1 nM	-
AZD3147	0.9 nM	662.4 nM	-
PP242	191.5 nM	390.5 nM	-

Table 4. Drug concentrations for combination treatment

NB cell line/drug	Drug	Kelly	IMR-32	SK-N-BE(2)
Dasatinib/Rapamycin	Dasatinib [μ M]	5.00	0.05	20.00
	Rapamycin [μ M]	2.00	0.13	5.00
Dasatinib/Torin-2	Dasatinib [μ M]	1.50	1.00	12.50
	Torin-2 [nM]	9.00	6.00	15.00
Irinotecan (SN-38)/	Irinotecan [nM]	1.00	0.40	-
Temozolomide (TMZ)	Temozolomide [μ M]	225.00	120.00	-

Taken together, both Dasatinib/Rapamycin and Dasatinib/Torin-2 treatments inhibited the cell viability of NB cells at reduced concentrations compared to single drug treatments.

Combination treatments impact the expression of cell cycle regulator cyclin D1 and p21

We have shown that Rapamycin as well as Torin-2 treatment induced a G_1 arrest in NB cell line Kelly and IMR-32 (Fig. 1). In a next step we wanted to test whether combination treatments with Dasatinib inhibit the cell cycle progression as well. Therefore, we tested the expression of cell cycle regulators cyclin D1 after 24 h and p21 after 72 h in NB cells treated with Dasatinib/Rapamycin (D+R) and Dasatinib/Torin-2 (D+T) using immunoblot analysis. As shown, D+R treatment reduced cyclin D1 expression in both cell lines compared to the control-treated cells (Fig. 6A). On the contrary, we did not detect any reduction of cyclin D1 expression upon D+T treatment in Kelly and only a slight reduction in IMR-32 cells (Fig. 6A).

In both NB cell lines, the D+T treatment resulted in a significant increase in p21 expression compared to untreated controls (Fig. 6B). The effect of D+R treatment on p21 expression was approximately strong in IMR-32 cells and less pronounced in Kelly cells compared to D+T treatment. We concluded that both mechanisms – inhibition of cyclin D1 and induction of the G_1 cell cycle arrest in NB cells by Dasatinib/Rapamycin and Dasatinib/Torin-2 combination treatment.

Both combination treatments only marginally induced apoptosis or autophagy

Next, we investigated the effect of the combination treatment with Dasatinib/Rapamycin (D+R) or Dasatinib/Torin-2 (D+T) on induction of apoptosis. In Kelly cells both treatment combinations did not induce the cleavage of caspase-3 or PARP-1 (Fig. 7, compare lane 1-3), which was applied as marker for apoptosis, however, both D+R and D+T induced apoptosis in IMR-32 cells (Fig. 7, lane 4-6). Because ATP competitive mTOR inhibitors, such as Rapamycin, can induce autophagy [37], we asked next whether D+R or D+T treatment induces the expression of the autophagy marker LC3B-II [38]. Both combination treatments caused a minor increase of LC3B-II in Kelly cells only (Fig. 7, lane 4-6). Taken together, D+R and D+T combination treatments marginally induced apoptosis in IMR-32, but autophagy in Kelly cells.

Combination treatment with Dasatinib/Torin-2 results in stronger mTOR pathway inhibition compared to Dasatinib/Rapamycin

To determine and compare how Dasatinib/Torin-2 (D+T) or Dasatinib/Rapamycin (D+R) combination treatment affects the mTOR signaling pathway, we analyzed the phosphorylation status of downstream targets of mTORC1 (4E-BP, Ser65 and ribosomal protein kinase S6, Thr389) and mTORC2 (AKT, Ser473), as well as AKT phosphorylation at Thr308 by PDK-1, a kinase activated by PI3K signaling [31] in NB cell lines Kelly and IMR-32 6 and 24 h after treatment using immunoblot analysis.

It is shown that phosphorylation of 4E-BP at Ser65 (P-4E-BP, Ser65), a well-known regulator of protein synthesis and downstream target of mTORC1, was more strongly inhibited by D+T compared to D+R treatment in Kelly (Fig. 8, set 1, lane 1-6), but only modestly in IMR-32 (Fig. 8, set 1, lane 7-12). In both cell lines, D+T and D+R treatment dramatically reduced phosphorylation of ribosomal protein kinase S6 at Thr389 (P-p70S6K, Thr389), which is another well-known mTORC1 target (Fig. 8, set 2, lane 1-12).

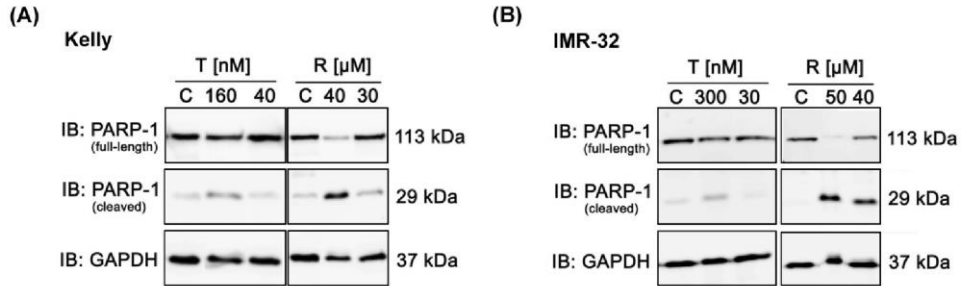


Figure 3. Immunoblot (IB) analysis of apoptotic marker expression (PARP cleavage) comparing Rapamycin (R) and Torin-2 (T) in neuroblastoma cell line (A) Kelly and (B) IMR-32. C: Vehicle (DMSO)-treated control cells. GAPDH served as loading control. To test for the induction of apoptosis, neuroblastoma cells were seeded 24h before treatment with Torin-2 or Rapamycin at the corresponding IC₅₀ and higher concentrations in (A) Kelly [T: IC₅₀ = 12nM, R: IC₅₀ = 30μM] and (B) IMR-32 [T: IC₅₀ = 30nM, R: IC₅₀ = 40 μM]. 72 h after treatment cells were harvested.

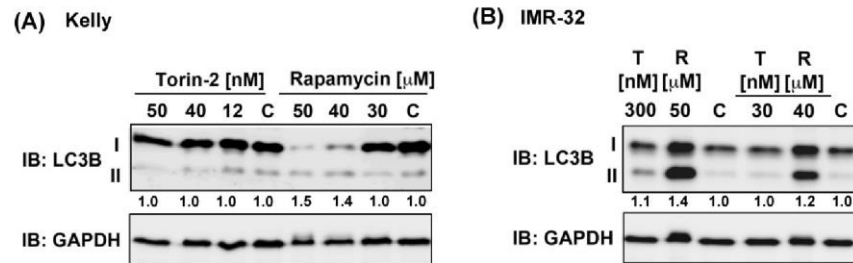


Figure 4. Immunoblot for autophagy marker LC3B-II. (A) Kelly cells were treated with IC₅₀ and increasing concentrations of Torin-2 [IC₅₀ = 12nM] or Rapamycin [IC₅₀ = 30μM]. (B) IMR-32 cells were treated with IC₅₀ and increasing concentrations of Torin-2 (T) [IC₅₀ = 30nM] or Rapamycin (R) [IC₅₀ = 40μM]. C: DMSO-treated control cells. Numbers below bands state ratio between autophagy marker LC3B-II/I. GAPDH was applied as loading control.

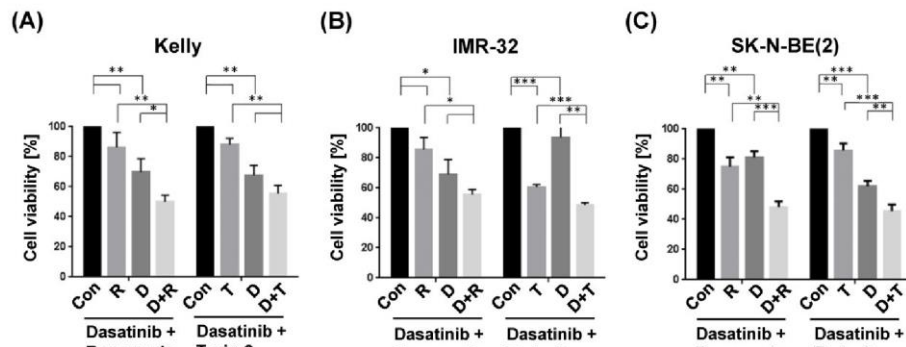


Figure 5. Viability tests of single and combination drug treatment applying tyrosine kinase inhibitor Dasatinib (D), and mTOR inhibitors Rapamycin (R) or Torin-2 (T) in neuroblastoma cell line (A) Kelly, (B) IMR-32, and (C) SK-N-BE(2). Con: Vehicle (DMSO)-treated control cells. Neuroblastoma cells were seeded 24h before treatment. For single treatments the concentrations of the combination treatments was used: (A) Kelly [D+R = 5μM + 2μM; D+T = 1.5μM + 9nM]; (B) IMR-32 [D+R = 0.05μM + 0.13μM; D+T = 1μM + 6nM]; (C) SK-N-BE(2) [D+R = 20μM + 5μM; D+T = 12.5μM + 15nM]. After an incubation of 72h, the cell viability was tested by applying the MTT test as described under Methods. The cell viability was normalized to control-treated cells.

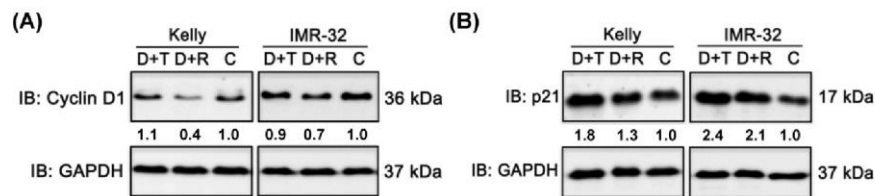


Figure 6. Immunoblot (IB) analysis of cell cycle regulator (A) cyclin D1 expression and (B) cyclin-dependent kinase inhibitor p21 expression comparing Dasatinib combined with Torin-2 (D+T) or Rapamycin (D+R) treatment in neuroblastoma cell line Kelly and IMR-32. C: Vehicle (DMSO)-treated control cells. GAPDH served as loading control. Protein expression corrected to GAPDH is indicated in numbers below bands. Cells were seeded 24 h before drug treatment with a combination of Dasatinib with Torin-2 or Rapamycin, respectively. Drug concentration used for the combination treatment in Kelly [D+T = 1.5 μM + 9 nM; D+R = 5 μM + 2 μM;] and IMR-32 [D+T = 1 μM + 6 nM; D+R = 0.05 μM + 0.13 μM]. Cells were harvested 24 h (cyclin D1), respectively 72 h (p21) after treatment.

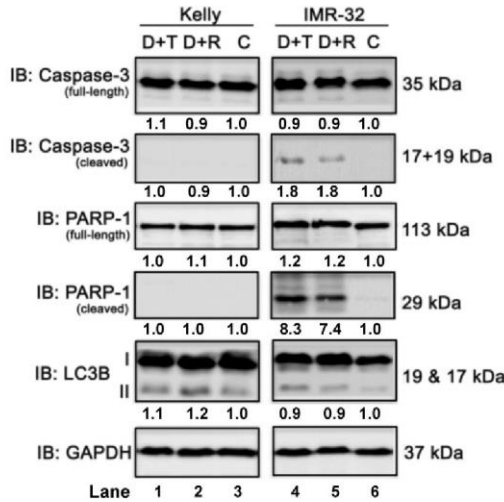


Figure 7. Immunoblot (IB) analysis of apoptosis (caspase-3 and PARP) and autophagy (LC3B) marker expression comparing Dasatinib combined with Torin-2 (D+T) or Rapamycin (D+R) treatment for 72h in neuroblastoma cell line Kelly and IMR-32. C: Vehicle (DMSO)-treated control cells. GAPDH served as loading control. Numbers below bands state protein expression normalized to GAPDH. Numbers below bands of autophagy marker LC3B represent the ratio between LC3B-I/II. Cells were seeded 24h before drug treatment with a combination of Dasatinib with Torin-2 or Rapamycin, respectively. Drug concentrations used for the combination treatments in Kelly [D+T = 1.5 μ M + 9 nM; D+R = 5 μ M + 2 μ M;] and IMR-32 [D+T = 1 μ M + 6 nM; D+R = 0.05 μ M + 0.13 μ M]. Cells were harvested 72h after treatment.

Further, we investigated the phosphorylation of AKT at Ser473, representing a downstream target of

mTORC2. The combination treatment with D+R did not reduce phosphorylation at Ser473 after 6 h in both cell lines (Fig. 8, set 3, lane 2 and 8). The effect at 24 h was cell line-specific: In Kelly cells the phosphorylation was not reduced by D+R compared to the control (Fig. 8, set 3, lane 5 and 6), while there was a clear reduction in IMR-32 cells (Fig. 8, set 3, lane 11 and 12). It has been shown that Rapamycin can affect mTORC2 in a cell line-specific manner and after prolonged treatment.²⁶ In contrast, AKT (Ser473) was effectively inhibited by D+T treatment at 6 and 24 h in both cell lines (Fig. 8, set 3, compare lane 1 and 3, lane 4 and 6, lane 7 and 9, lane 10 and 12).

Besides the inhibition of AKT phosphorylation at Ser473 we also assessed the effect of D+T or D+R treatment on phosphorylation site Thr308, a direct target site of protein kinase PDK-1. The D+T treatment impaired Thr308 phosphorylation at 6 and 24 h in Kelly cells (Fig. 8, set 3, compare lane 1 and 3, lane 4 and 6), whereas D+R treatment only inhibited Thr308 phosphorylation at 6 h after treatment and slightly increased after 24 h of treatment compared to control cells (Fig. 8, set 3, compare lane 2 and 3, lane 5 and 6). Puzzlingly, in IMR-32 cells D+T as well as D+R treatment induced Thr308 phosphorylation (Fig. 8, set 3, compare lane 7, 8 with 9, and lane 10, 11 with 12).

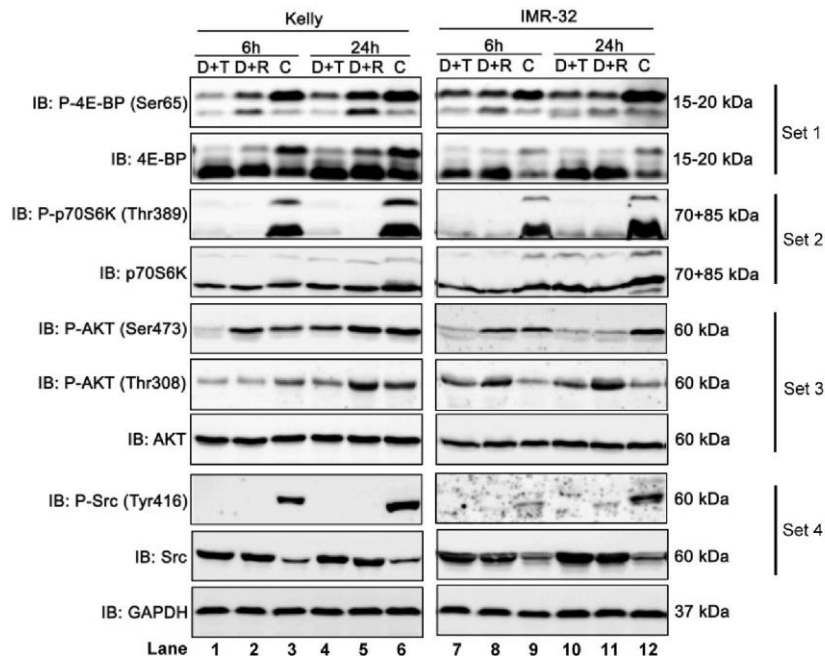


Figure 8. Immunoblot (IB) analysis comparing Dasatinib combined with Rapamycin (D+R) or Torin-2 (D+T) in neuroblastoma cell line Kelly and IMR-32. C: Vehicle (DMSO)-treated control cells. GAPDH served as loading control. Cells were seeded 24 h before drug treatment with a combination of Dasatinib with Torin-2 or Rapamycin, respectively. Drug concentrations used for the combination treatments in Kelly [D+T = 1.5 μ M + 9 nM; D+R = 5 μ M + 2 μ M;] and IMR-32 [D+T = 1 μ M + 6 nM; D+R = 0.05 μ M + 0.13 μ M]. The cells were harvested 6 h or 24 h after treatment.

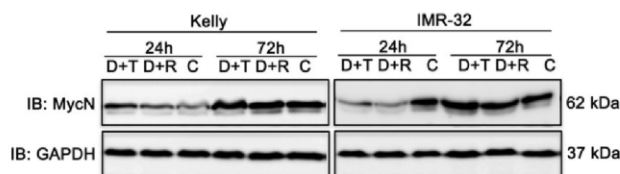


Figure 9. Immunoblot (IB) analysis of oncogene expression MycN comparing Dasatinib combined with Rapamycin (D+R) or Torin-2 (D+T) treatment for 24 h and 72 h in neuroblastoma cell line Kelly and IMR-32. C: Vehicle (DMSO)-treated control cells. GAPDH served as loading control. Cells were seeded 24 h before drug treatment with a combination of Dasatinib and Torin-2 or Rapamycin, respectively. Drug concentrations used for the combination treatment in Kelly [D+T = 1.5 μ M + 9 nM; D+R = 5 μ M + 2 μ M;] and IMR-32 [D+T = 1 μ M + 6 nM; D+R = 0.05 μ M + 0.13 μ M]. The cells were harvested 24 h and 72 h after treatment.

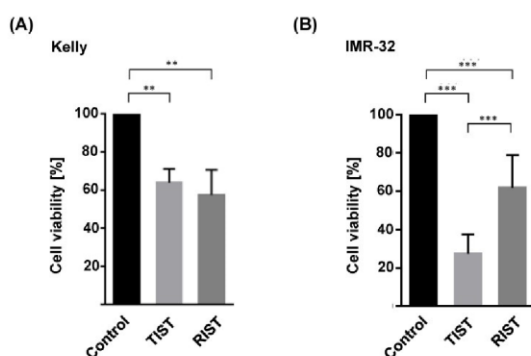


Figure 10. Viability test of multimodal drug treatment applying the RIST or TIST protocol in neuroblastoma cell line (A) Kelly and (B) IMR-32. Control: Vehicle (DMSO)-treated cells. Cells were seeded and treated with RIST, respectively TIST combination therapy as shown in Figure 10. Cells were seeded 24 h before drug treatment with a combination of Dasatinib with Torin-2 or Rapamycin, respectively. Drug concentrations used for the combination treatments in Kelly [D+T (TIST) = 1.5 μ M + 9 nM; D+R (RIST) = 5 μ M + 2 μ M; SN-38+TMZ = 1 nM + 225 μ M] and IMR-32 [D+T (TIST) = 1 μ M + 6 nM; D+R = 0.05 μ M + 0.13 μ M; SN-38+TMZ = 0.4 nM + 120 μ M]. At day 8, the cell viability was tested by applying the MTT test as described under Methods. The cell viability was normalized to control-treated cells.

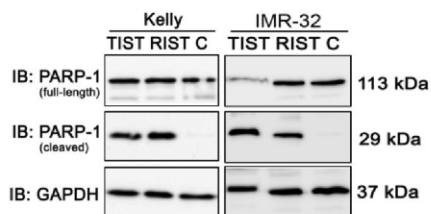


Figure 11. Immunoblot (IB) analysis of apoptotic marker expression (PARP cleavage) after multimodal drug treatment applying the RIST or TIST protocol, respectively, in neuroblastoma cell line Kelly and IMR-32. C: Vehicle (DMSO)-treated control cells. GAPDH served as loading control. Drug concentrations used for the combination treatment in Kelly [D+T (TIST) = 1.5 μ M + 9 nM; D+R (RIST) = 5 μ M + 2 μ M; SN-38+TMZ = 1 nM + 225 μ M] and IMR-32 [D+T (TIST) = 1 μ M + 6 nM; D+R = 0.05 μ M + 0.13 μ M; SN-38+TMZ = 0.4 nM + 120 μ M]. At day 8 cells were harvested and cell lysates were analyzed.

As expected, in both cell lines, D+T and D+R treatments inhibited the phosphorylation of Src kinase at Tyr416 (Fig. 8, set 4, lane 1-12) by the tyrosine-kinase inhibitor Dasatinib.

In summary, Dasatinib/Torin-2 treatment potently inhibits both mTOR complexes, whereas the Dasatinib/Rapamycin treatment inhibited mainly mTORC1 and – in a cell line dependent manner – also mTORC2 after prolonged drug treatment.

Both combination treatments strongly impair MycN expression in IMR-32 cells

MYC transcription factors significantly stimulate cell growth and differentiation explaining why increased expression of MYCN leads to progression of cell cycle and inhibition of apoptosis of neuroblastoma cell lines [2]. Hence, therapeutic reduction of MycN expression is a noteworthy approach to improve treatment of neuroblastoma [40] as supported by studies in mouse models of MYCN-driven neuroblastoma. In those studies, inhibition of PI3K/AKT/mTOR induced destabilization of the MYCN oncoprotein and triggered anti-tumor effects [41,42]. Therefore, we tested the impact of D+R and D+T treatment on MycN expression in Kelly and IMR-32 cells 24 h and

72 h after treatment using immunoblot analysis. Whereas both treatments had no effect on MycN expression in Kelly cells, a marked decrease of MycN expression was observed in IMR-32 cells (Fig. 9).

Comparable efficacy of TIST and RIST treatment despite a thousand-fold reduced mTOR inhibitor Torin-2 concentration

The multimodal RIST treatment protocol includes pre-treatment with the molecular targeted drugs Dasatinib and Rapamycin followed by treatment with the chemotherapeutics Irinotecan and Temozolomide (Fig. S4 and S5). To compare the RIST protocol with the alternative TIST protocol – replacing the allosteric mTOR inhibitor Rapamycin with the ATP competitive mTOR inhibitor Torin-2 – we first carried out an MTT assay to measure the cell viability. The *in vitro* treatment protocol is represented graphically (Fig. 12). All drugs were applied in IC₅₀ concentrations of the corresponding combination treatments as listed in Table 4. Both multimodal drug treatment protocols showed a comparable inhibition of cell viability with 57.6 % for RIST and 64.1 % for TIST treatment in Kelly (Fig. 10) compared to control treated cells. In IMR-32, the inhibition of cell viability by TIST was significantly stronger (27.3%) compared to RIST treatment (61.7%) (Fig. 10).

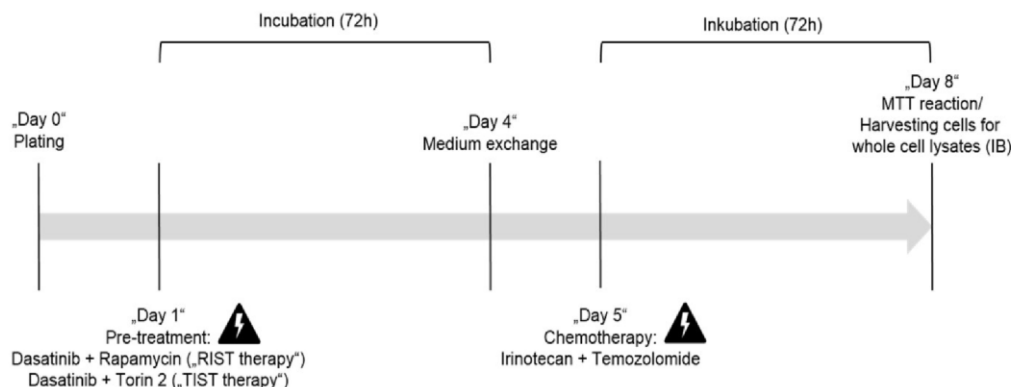


Figure 12. *In vitro* protocol for the multimodal RIST, respectively TIST treatment. Pre-treatment with the drug combination Dasatinib + Rapamycin for RIST respectively Dasatinib + Torin-2 for TIST for 72 h. Thereafter the medium was changed and 24h later the drug combination of conventional chemotherapeutics Irinotecan (SN-38) + Temozolomide (TMZ) was applied for additional 72 h.

We also investigated the induction of apoptosis by PARP-1 cleavage after both multimodal treatment protocols using immunoblot (Fig. 11). Compared to the control, both treatment protocols showed a marked cleavage of PARP-1 in NB cell line Kelly and IMR-32, indicating effective induction of apoptosis by both RIST and TIST treatment in neuroblastoma cells. In IMR-32 the induction of apoptosis by TIST treatment was even stronger compared to RIST as shown by increased PARP-1 cleavage products and – as a result of the strong cleavage – a marked decrease in full-length protein.

Taken together, although the reduction in cell viability as well as induction of apoptosis was comparable upon RIST or TIST treatment, it is important to note that the treatment concentration of Torin-2 is a thousand-fold lower compared to Rapamycin.

Discussion

Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway exhibits promising efficacy against human cancer and has been tested in various clinical trials, however, the complexity of the signaling network involving feedback loops and compensatory pathways, and intrinsic and acquired resistance limits the therapeutic success but may be addressed with combination treatments [43,44]. Specifically for neuroblastoma numerous studies have shown that targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is a valid treatment option for aggressive neuroblastoma and decreased proliferation *in vitro* and reduced tumor growth *in vivo* [17-19,41,42,45-48].

The limited success of Rapamycin as an anti-cancer drug led to the development of ATP competitive mTOR inhibitors such as Torin-2 [30,31]. Herein we demonstrate that the treatment of

neuroblastoma cells with Torin-2 alone or in combination with Dasatinib have several advantages over Rapamycin treatment. Whether our results suggest that the replacement of Rapamycin by Torin-2 may improve the RIST treatment protocol will be discussed.

First, the IC_{50} of Torin-2 is reduced by more than a thousand-fold compared to Rapamycin (Table 1) which may result in a decrease of the required dose in clinical applications. Torin-2 is a highly selective mTOR inhibitor [49] with a 800-fold selectivity over PI3K [50] implicating that at low Torin-2 concentrations other kinases may only be minimally affected which also may result in reduced clinically relevant adverse events. Additionally, Torin-2 exhibits favorable pharmacokinetic properties. Compared to Torin-1, bioavailability, metabolic stability and plasma exposure was significantly improved [50]. Moreover, it has been shown that Torin-2 induces a strong cytotoxic effect on T-ALL cells and stimulated T lymphocytes whereas it did not affect the viability of quiescent healthy $CD4^+$ T lymphocytes [51]. Therefore, Torin-2 rather preserves the immune system during molecular targeted anti-cancer therapy in contrast to the well-known immunosuppressive properties of Rapamycin that is broadly applied for prevention of acute rejection in transplant patients [36].

Aiming to illuminate the underlying cellular mechanism leading to impaired cell viability of neuroblastoma cells as observed in single as well as combination drug treatments, we found that cell cycle progression was inhibited. These results are well in line with Rapamycin and Torin-2 studies performed in other cancer cell types demonstrating reduced G_1 to S cell cycle progression as well [36]. We further analyzed potential mechanisms of the cell cycle arrest

and detected a marked increase of p21 expression by both combination treatments (Fig. 6B). The overexpression of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, resulted in inhibition of proliferation in various types of cancer cells [52]. Furthermore, p21 is associated with cellular senescence [53]. It is assumed that senescence has an inhibitory effect on tumorigenesis and loss of senescence markers is associated with malignant progression [54]. Therapy-induced senescence represents a new approach of anti-cancer treatment. It has been shown that senescent tumor cells are efficiently eliminated by immune cells migrating into the tumor leading to tumor regression [54].

Rapamycin is known to only incompletely inhibit mTORC1 while ATP competitive inhibitors were shown to additionally suppress these Rapamycin-resistant functions [23,24,55]. In this study, combination treatment with Dasatinib/Rapamycin only slightly reduced phosphorylation of mTORC1 substrate 4E-BP while Dasatinib/Torin-2 potently suppressed 4E-BP phosphorylation (Fig. 8). By regulating the translation of specific mRNAs, 4E-BP strongly affects proliferation [56]. The increased inhibition of mTORC1 by Torin-2 resulting in reduced phosphorylation of 4E-BP is likely to significantly contribute to the strong anti-proliferative effect of ATP competitive mTOR inhibitors [24,55].

Our study confirmed the known cell line specific mechanism of mTORC2 inhibition by Rapamycin after prolonged treatment (Fig. 8) [26]. Interestingly, Rapamycin treatment induced even a slight hyperphosphorylation of the mTORC2 substrate AKT (Ser473) at 6h post treatment compared to the control-treated cells whereas Torin-2 efficiently blocked the phosphorylation at this site (Fig. 8). This increased AKT phosphorylation may be caused by activation of PI3K signaling as a result of reduced negative feedback inhibition by Rapamycin-mediated inhibition of mTORC1 [28,29]. This AKT activation is likely to weaken the anti-tumor properties of Rapamycin by stimulating cancer promoting pathways [28]. Furthermore, our data demonstrate that Torin-2 suppresses in addition the phosphorylation of AKT at Thr308 in cell line Kelly (Fig. 8). This phosphorylation site is a direct target of PDK-1 downstream of PI3K signaling [31]. Phosphorylation of AKT at both sites is required for full activation of AKT [31,57,58]. Studies have shown earlier that the inhibition of the phosphorylation of AKT at Ser473 by mTORC2 suppression also affects phosphorylation at Thr308 [24,49,58,59]. Feldman et al. [24] have shown that the reduced phosphorylation at Thr308 by an ATP competitive mTOR inhibitor (PP242) was dependent on the inhibition of Ser473

phosphorylation. A possible explanation for this might be that the inhibition of Ser473 phosphorylation transiently reduces the recruitment of AKT to the plasma membrane where AKT phosphorylation at Thr308 is catalyzed by the kinase PDK-1 [49]. Therefore, we conclude that reduced AKT Thr308 phosphorylation is a consequence of reduced Ser473 phosphorylation caused by Torin-2 induced mTORC2 inhibition as observed in both neuroblastoma cell lines (Fig. 8). In summary, the effective inhibition of mTORC2 by Torin-2 causes a strong suppression of cell survival, proliferation and metabolism promoting kinase AKT [28,31,60]. Hence, replacing Rapamycin with Torin-2 may improve the anti-tumor property of the RIST treatment protocol.

Amplification of the oncogene MycN is frequent in neuroblastoma and is associated with a poor prognosis and rapid tumor progression [4,5]. Hence, a therapy-induced decrease of MycN expression represents a promising approach for neuroblastoma therapy [40]. Several studies have shown a decrease of MycN expression mediated by mTOR inhibitors [17,48]. Our data demonstrate a reduction of MycN expression after both combination treatments in IMR-32 cells, whereas the MycN expression was not affected by any combination in Kelly cells (Fig. 9). This observed cell line-dependent impact of mTOR inhibition on MycN expression might be based on differences in expression of protein kinases like Aurora-A kinase or Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK). Aurora A is known to prevent MycN degradation by protein:protein interaction [61]. Thereby, neuroblastoma cells with high Aurora A expression are less dependent on growth factor and active PI3K/AKT signaling to maintain high MycN levels [61,62]. Consequently, in Kelly cells the oncogene MycN may escape mTOR inhibition-mediated degradation by potentially high Aurora A expression. For a deeper understanding MycN expression should be examined in combination with an Aurora-A inhibitor that changes the conformation and prevents protein:protein interaction with MycN [for Aurora-A inhibitors: see 63]. On the other hand ALK is known to enhance the protein stability by reducing the phosphorylation of MycN at Thr58 [62]. In contrast to IMR-32, ALK is mutated in cell line Kelly (ALK^{F1174L}) [64]. Overexpression of ALK^{F1174L} has been shown to increase the oncogenic potential of MycN and led to early onset and lethality of disease [65]. The protein stability of MycN was enhanced by ALK^{F1174L}-mediated constitutive signaling [65]. While Torin-2 induced ablation of MycN amplified tumors and reduction of MycN protein level, the ATP competitive mTOR inhibitor alone did not affect growth of tumors with both MycN amplification and

ALK^{F1174L} mutation. Further, in those double mutated tumors, combination treatment with the ALK inhibitor Crizotinib and Torin-2 reduced tumor growth and partly initiated tumor regression [65]. Therefore, in our study the ALK^{F1174L} mutation in Kelly cells is a likely cause of the failure to reduce MycN expression by the tested treatments with mTOR inhibitors Torin-2 and Rapamycin. In the future this assumption should be clarified by analyzing the MycN expression in Kelly cells treated with a combination of mTOR and ALK inhibitor such as Crizotinib.

Concluding, the combination treatment with Dasatinib and Torin-2 instead of Rapamycin revealed an increased mTOR pathway inhibition in neuroblastoma cells. In agreement, the alternative TIST treatment protocol inhibits cell viability and induces apoptosis despite a considerably reduced drug concentration. Our results suggest replacing Rapamycin by Torin-2 for the treatment protocol of relapsed or refractory high-risk neuroblastoma. However, *in vivo* testing in murine neuroblastoma models is critical to proof the validity of the TIST protocol and test for adverse effects.

Supplementary Material

Supplementary figures and tables.

<http://www.medsci.org/v18p0137s1.pdf>

Acknowledgments

The first author has been granted a student scholarship for the course of her studies from the Faculty of Medicine at the University of Regensburg (Germany). The authors received financial support for this work from the Jan und Berta Schmidt-Stiftung (Burghausen, Germany).

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet*. 2007;369(9579):2106–2120. doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0.
- Kholodenko IV, Kalinovsky DV, Doronin II, Deyev SM, Kholodenko RV. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J Immunol Res*. 2018;2018:7394268. doi:10.1155/2018/7394268.
- Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(3):203–216. doi:10.1038/nrc1014.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;(224):1121–1124.
- Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet Oncology*. 2003;4(8):472–480. doi:10.1016/S1470-2045(03)01166-5.
- Swift CC, Eklund MJ, Kravcka JM, Alazraki AL. Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma. *Radiographics*. 2018;38(2):566–580. doi:10.1148/rg.2018107132.
- Zage PE. Novel Therapies for Relapsed and Refractory Neuroblastoma. *Children (Basel)*. 2018;5(11). doi:10.3390/children5110148.
- ClinicalTrials.gov. Multimodal Molecular Targeted Therapy to Treat Relapsed or Refractory High-risk Neuroblastoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov: R1ST-rNB-2011-Studienprotokoll.
- Nonnenmacher L, Westhoff M-A, Fulda S, Karpel-Massler G, Halatsch M-E, Engelke J, Simmet T, Corbacioglu S, Debatin K-M. R1ST: A potent new combination therapy for glioblastoma. *International Journal of Cancer*. 2015;(136):E173–E187.
- La Rosée P, Martiat P, Leitner A, Klag T, Müller MC, Erben P, Schenk T, Saussele S, Hochhaus A. Improved tolerability by a modified intermittent treatment schedule of dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to imatinib. *Ann Hematol*. 2013;92(10):1345–1350. doi:10.1007/s00277-013-1769-2.
- Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):38022–38043. doi:10.18632/oncotarget.16723.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12):988–1004. doi:10.1038/nrd1902.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489–501. doi:10.1038/nrc839.
- Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):550–562. doi:10.1038/nrc2664.
- Lżycka-Świeszewska E, Drożyńska E, Rzepko R, Kobierska-Gulida G, Grajkowska W, Perek D, Balcerska A. Analysis of PI3K/AKT/mTOR signalling pathway in high risk neuroblastic tumours. *Pol J Pathol*. 2010;61(4):192–198.
- Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin K-M, Fulda S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2007;67(2):735–745. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2201.
- Johnsen JI, Segerström L, Orrego A, Elfman L, Henriksson M, Kägedal B, Eksborg S, Sveinbjörnsson B, Kogner P. Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*. 2008;(27):2910–2922. doi:10.1038/sj.onc.1210938.
- Segerström L, Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Wickström M, Elfman L, Kogner P, Johnsen JI. Effects of small molecule inhibitors of PI3K/Akt/mTOR signaling on neuroblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Cancer*. 2011;129(12):2958–2965. doi:10.1002/ijc.26268.
- Chesler L, Schlieve C, Goldenberg DD, Kenney A, Kim G, McMillan A, Matthey KK, Rowitch D, Weiss WA. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2006;66(16):8139–8146. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2769.
- Rad E, Murray JT, Tee AR. Oncogenic Signalling through Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR): A Driver of Metabolic Transformation and Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1). doi:10.3390/cancers10010005.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR Complexes, Only One of Which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell*. 2002;10(3):457–468. doi:10.1016/S1097-2765(02)00636-6.
- Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;36:79–90. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.011.
- Thoreen CC, Sabatini DM. Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy*. 2009;5(5):725–726.
- Feldman ME, Apse B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*. 2009;7(2):e38. doi:10.1371/journal.pbio.1000038.
- Choo AY, Yoon S-O, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(45):17414–17419. doi:10.1073/pnas.0809136105.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*. 2006;22(2):159–168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029.
- Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):729–734. doi:10.1038/nrc1974.
- O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*. 2006;66(3):1500–1508. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2925.
- Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. 2007;26(13):1932–1940. doi:10.1038/sj.onc.1209990.
- Xie J, Wang X, Proud CG. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res*. 2016;5:2078. doi:10.12688/f1000research.9207.1.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):21–35. doi:10.1038/nrm3025.
- King D, Yeomanson D, Bryant HE. PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2015;37(4):245–251. doi:10.1097/MPH.0000000000000329.

33. Morgan DML. Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. In: Morgan DML, editor. Polyamine Protocols. Totowa, NJ: Humana Press. 1998; 79:179-184 (Methods in Molecular Biology™; vol. 79).
34. Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*. 1984;22:27-55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4.
35. Bijnisdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol*. 2011;731:421-434. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_34.
36. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003;35(3 Suppl):75-145.
37. Kim YC, Guan K-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*. 2015;125(1):25-32. doi:10.1172/JCI73939.
38. Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-545. doi:10.4161/auto.4600.
39. Mathiasen SG, Zio D de, Cecconi F. Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Front Oncol*. 2017;7:51. doi:10.3389/fonc.2017.00051.
40. Barone G, Anderson J, Pearson ADJ, Petrie K, Chesler L. New strategies in neuroblastoma: Therapeutic targeting of MYCN and ALK. *Clin Cancer Res*. 2013;19(21):5814-5821. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0680.
41. Chantry YH, Gustafson WC, Itsara M, Persson A, Hackett CS, Grimmer M, Charron E, Yakovenko S, Kim G, Matthay KK, et al. Paracrine signaling through MYCN enhances tumor-vascular interactions in neuroblastoma. *Sci Transl Med*. 2012;4(115):115ra3. doi:10.1126/scitranslmed.3002977.
42. Cage TA, Chantry Y, Chesler L, Grimmer M, Knight Z, Shokat K, Weiss WA, Gustafson WC. Downregulation of MYCN through PI3K Inhibition in Mouse Models of Pediatric Neural Cancer. *Front Oncol*. 2015;5:111. doi:10.3389/fonc.2015.00111.
43. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 2017;170(4):605-635. doi:10.1016/j.cell.2017.07.029.
44. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*. 2019;18(1):26. doi:10.1186/s12943-019-0954-x.
45. Erdreich-Epstein A, Singh AR, Joshi S, Vega FM, Guo P, Xu J, Groshen S, Ye W, Millard M, Campan M, et al. Association of high microvessel $\alpha\beta$ and low PTEN with poor outcome in stage 3 neuroblastoma: rationale for using first in class dual PI3K/BRD4 inhibitor, SF1126. *Oncotarget*. 2017;8(32):52193-52210. doi:10.18632/oncotarget.13386.
46. Mohlin S, Hamidian A, Stedingk K von, Bridges E, Wigerup C, Bexell D, Pahlman S. PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2015;75(21):4617-4628. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0708.
47. Stewart E, Shelat A, Bradley C, Chen X, Federico S, Thiagarajan S, Shirinifard A, Bahrami A, Pappo A, Qu C, et al. Development and characterization of a human orthotopic neuroblastoma xenograft. *Dev Biol*. 2015;407(2):344-355. doi:10.1016/j.jydbio.2015.02.002.
48. Vaughan L, Clarke PA, Barker K, Chantry Y, Gustafson CW, Tucker E, Renshaw J, Raynaud F, Li X, Burke R, et al. Inhibition of mTOR-kinase destabilizes MYCN and is a potential therapy for MYCN-dependent tumors. *Oncotarget*. 2016;7(36):57525-57544. doi:10.18632/oncotarget.10544.
49. Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, Zhang X, Hur W, Liu Y, Kwiatkowski NP, Wang J, Westover KD, Gao P, et al. Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res*. 2013;73(8):2574-2586. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1702.
50. Liu Q, Wang J, Kang SA, Thoreen CC, Hur W, Ahmed T, Sabatini DM, Gray NS. Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzoh1,6naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a potent, selective, and orally available mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for treatment of cancer. *J Med Chem*. 2011;54(5):1473-1480. doi:10.1021/jm101520v.
51. Alameen AAM, Simioni C, Martelli AM, Zauli G, Ultimo S, McCubrey JA, Gonelli A, Marisi G, Ulivi P, Capitani S, et al. Healthy CD4+ T lymphocytes are not affected by targeted therapies against the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(34):55690-55703. doi:10.18632/oncotarget.10984.
52. Gartel AL, Tyner AL. The growth-regulatory role of p21 (WAF1/CIP1). *Prog Mol Subcell Biol*. 1998;20:43-71.
53. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, Roninson IB. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 1999;18(34):4808-4818. doi:10.1038/sj.onc.1203078.
54. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):51-57. doi:10.1038/nrc2772.
55. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 2009;284(12):8023-8032. doi:10.1074/jbc.M900301200.
56. Dowling RJO, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*. 2010;328(5982):1172-1176. doi:10.1126/science.1187532.
57. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal*. 1996;15(23):6541-6551.
58. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(1):9-22. doi:10.1016/j.ccr.2007.05.008.
59. Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulikakos PI, Scaltriti M, Moskatel E, Baselga J, Guichard S, Rosen N. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov*. 2011;1(3):248-259. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0085.
60. Sparks CA, Guertin DA. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene*. 2010;29(26):3733-3744. doi:10.1038/onc.2010.139.
61. Otto T, Horn S, Brockmann M, Eilers U, Schüttrumpf L, Popov N, Kenney AM, Schulte JH, Beijersbergen R, Christiansen H, et al. Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2009;15(1):67-78. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.005.
62. Otto T. MYCN and Its Posttranslational Regulation in Neuroblastoma. In: Christiansen H, Christiansen NM, editors. *Progressive Neuroblastoma*. 2015;20:47-58 (Pediatric and Adolescent Medicine).
63. Gustafson WC, Meyerowitz JG, Nekritz EA, Chen J, Benes C, Charron E, Simonds EF, Seeger R, Matthay KK, Hertz NT, et al. Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A. *Cancer Cell*. 2014;26(3):414-427. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.015.
64. Harenza JL, Diamond MA, Adams RN, Song MM, Davidson HL, Hart LS, Dent MH, Fortina P, Reynolds CP, Maris JM. Transcriptomic profiling of 39 commonly-used neuroblastoma cell lines. *Sci Data*. 2017;4:170033. doi:10.1038/sdata.2017.33.
65. Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, Pei D, Sharma B, Vetharoy WR, Hallsworth A, et al. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2012;22(1):117-130. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.001.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung der Dissertation auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu für die Betreuung und Ermöglichung dieser Dissertation.

Besonders danken möchte ich Frau PD. Dr. rer. nat. Gunhild Sommer für die Themenstellung und die Betreuung, freundliche Hilfestellung und zahlreichen Anregungen bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen fachlichen, wie auch persönlichen Gespräche waren stets eine große Hilfe und haben mich positiv beeinflusst und ermutigt.

Ein besonderer Dank geht auch an Marie Matthes für die Einarbeitung und hilfsbereite Unterstützung bei den Arbeiten im Labor. In diesem Zuge möchte ich mich auch herzlich bei Monika Buchner bedanken. Vielen Dank euch beiden für die vielen aufmunternden Worte, das immer offene Ohr, den Kaffee zwischendurch und den liebevollen, freundschaftlichen Rückhalt. Vielen lieben Dank für euere Freundschaft und den wertvollen, unterstützenden Beistand!

Außerdem möchte ich Tilman Heise und der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre, wertvollen Anregungen und stetige Hilfsbereitschaft danken.

Für die finanzielle Unterstützung durch das Promotionsstipendium danke ich der Fakultät Medizin der Universität Regensburg.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei meinen Freunden, ganz besonders Marie, Miriam und meiner WG mit Katharina, Friedemann, Clara, Isabel und Jana herzlich bedanken, die mich während des Studiums und der Arbeit an meiner Promotion stets begleitet haben!

Außerdem möchte ich meinem Freund Sebastian von Herzen Danke sagen für die Unterstützung, Geduld und das entgegengebrachte Verständnis während meines Studiums und dieser Promotionsarbeit.

Und ganz besonders möchte ich mich schließlich bei meiner Mutter und meinen Schwestern für die Ermöglichung und die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während meines

gesamten Studiums, sowie die Ermutigung und den Zuspruch während der Arbeit an meiner Dissertation bedanken. Dies war stets ein großer Rückhalt für mich, der als wichtiger Teil zum Erfolg meines Studiums und dieser Arbeit beigetragen hat!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift