

Aus der Abteilung
für Pädiatrische Hämatologie, Onkologie
und Stammzelltransplantation
Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Testung von Vistusertib im Vergleich zu Rapamycin in der
RIST-Therapie in einem In-vitro-Modell des Neuroblastoms**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Lotspeich

2025

Aus der Abteilung
für Pädiatrische Hämatologie, Onkologie
und Stammzelltransplantation
Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Testung von Vistusertib im Vergleich zu Rapamycin in der
RIST-Therapie in einem In-vitro-Modell des Neuroblastoms**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Lotspeich

2025

Dekan:	Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Gunhild Sommer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Markus J. Riemenschneider
Tag der mündlichen Prüfung:	25.06.2025

Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor of childhood. The amplification of the well-known *MYCN* oncogene in about 25 % of cases correlates with high-risk NB. Despite intensive treatment regimens the outcome for patients with relapsed or treatment-refractory high-risk NB remains poor and novel treatment strategies are urgently needed. The RIST therapy represents a novel multimodal treatment design for high-risk NB and is based on metronomically combining molecular-targeted inhibitors (Rapamycin and Dasatinib (*Sprycel*®)) with conventional cytostatics (Irinotecan and Temozolomid). The phase II prospective randomized RIST clinical trial (RIST-rNB-2011, ClinicalTrials.gov ID: NCT01467986) showed an improvement of progression-free survival and overall survival in *MYCN*-amplified relapsed or refractory neuroblastoma.

With the aim to improve the RIST therapy, we tested in this study the novel ATP-competitive mTORC_{1/2} inhibitor Vistusertib (AZD2014) as substitute for the allosteric mTORC₁ inhibitor Rapamycin. By determining the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values in three *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines (Kelly, SK-N-BE(2) and IMR-32), we demonstrated that nanomolar concentrations of Vistusertib effectively reduced the cell viability compared to high IC₅₀ values of Rapamycin in the micromolar range. Vistusertib treatment of NB cell lines at IC₅₀ values inhibited the mTOR signaling pathway with reduced phosphorylation of the ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1, Thr389) and the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1, Ser65) which represent two well-characterized substrates of mTORC₁. Cell cycle analysis revealed that Vistusertib induced a G₁ phase arrest in all three NB cell lines tested whereas apoptosis was not detectable by testing caspase-3 or PARP1 cleavage. Combination treatment of Dasatinib plus Vistusertib inhibited the cell viability significantly more effective compared to single treatments. In a pre-clinical *in vitro* model substitution of Rapamycin with Vistusertib in the multimodal VIST regimen showed that cell viability was significantly reduced in all three NB cell lines tested.

Taken together, our results suggest that Vistusertib acts at much lower drug concentrations as effective as Rapamycin in the RIST protocol. Recent clinical studies applying Vistusertib in other types of high-risk cancers indicate an acceptable toxicity

profile. Therefore, Vistusertib may represent a valid option to be evaluated in prospective clinical trials for relapsed or treatment-refractory high-risk neuroblastoma.

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter. Die Amplifikation des bekannten *MYCN*-Onkogens in ungefähr 25 % aller Fälle korreliert mit dem Vorliegen eines Hochrisiko-Neuroblastom. Trotz intensiven Behandlungsverfahren bleibt das Outcome für Patient*innen mit rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom schlecht und neue Therapieansätze werden dringend benötigt. Die RIST-Therapie stellt einen neuen multimodalen Therapieansatz für das Hochrisiko-Neuroblastom dar und basiert auf der metronomischen Kombination der molekular-zielgerichteten Inhibitoren (Rapamycin und Dasatinib (*Sprycel*®)) mit den konventionellen Zytostatika (Irinotecan und Temozolomid). Die offene, randomisierte Phase-II-Studie RIST-rNB-2011 (ClinicalTrials.gov ID: NCT01467986) zeigte eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bei *MYCN*-amplifizierten rezidivierendem oder therapierefraktärem Neuroblastom.

Mit dem Ziel die RIST-Therapie zu verbessern, wurde im Rahmen dieser Studie der neue ATP-kompetitive mTORC_{1/2}-Inhibitor Vistusertib (AZD2014) anstelle des allosterischen mTORC₁-Inhibitors Rapamycin getestet. Bei der Ermittlung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) in drei *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom-Zelllinien (Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32) konnte gezeigt werden, dass nanomolare Konzentrationen von Vistusertib effektiv die Zellviabilität im Vergleich zu den hohen IC₅₀-Werten von Rapamycin im mikromolaren Bereich hemmen. Die Behandlung von Neuroblastom-Zelllinien mit IC₅₀-Werten von Vistusertib inhibierte den mTOR-Signalweg mit reduzierter Phosphorylierung der *ribosomal protein S6 kinase 1* (S6K1, Thr389) und des *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding proteins 1* (4E-BP1, Ser65), welche zwei bekannte Substrate von mTORC₁ sind. Zellzyklusanalysen zeigten, dass Vistusertib in allen drei Neuroblastom-Zelllinien einen G₁-Phase-Arrest induziert, wohingegen keine Induktion von Apoptose bei der Testung von Caspase-3 oder PARP1-Spaltung nachgewiesen wurde. Die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib inhibierte die Zellviabilität signifikant stärker als im Vergleich zur Einzelbehandlung. In einem präklinischen In-vitro-Modell zeigte die Substitution von Rapamycin durch Vistusertib in der multimodalen VIST-Therapie, dass in allen drei untersuchten Neuroblastom-Zelllinien die Zellviabilität signifikant reduziert war.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Vistusertib bei deutlich niedrigeren Konzentrationen genauso effektiv wie Rapamycin in der RIST-Therapie agiert. Kürzlich durchgeführte klinische Studien mit Vistusertib bei anderen Hochrisiko-Karzinomen wiesen auf ein akzeptables Nebenwirkungsprofil hin. Deshalb könnte Vistusertib eine gute Option für die Evaluation in zukünftigen klinischen Studien bei rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom darstellen.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	3
Zusammenfassung	5
Inhaltsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	10
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	15
1 Einleitung	16
1.1 Das Neuroblastom	16
1.2 RIST- und VIST-Therapie	17
1.3 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg	22
1.3.1 Rolle des mTOR-Signalwegs bei Krebserkrankungen	25
1.3.2 <i>MYCN</i> -Amplifikation	25
1.4 mTOR-Inhibitoren	26
1.4.1 Rapamycin und Rapaloga	26
1.4.2 ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren	28
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	29
2 Materialien und Methoden	31
2.1 Materialien	31
2.1.1 Geräte und Messapparaturen	31
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.4 Antikörper	35
2.1.5 Medikamente	37
2.1.6 Zellkultur	37
2.1.6.1 Zelllinien	37
2.1.6.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur	39
2.1.7 Puffer und Reagenzien für die Westernblot-Analysen	40
2.1.8 Software	42
2.2 Methoden	42
2.2.1 Zellkultur, Passage und Aussaat	42
2.2.1.1 Zellkultur	42
2.2.1.2 Passage	42

2.2.1.3 Aussaat	43
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	44
2.2.3 Kryokonservierung von Zellen	44
2.2.4 MTT-Assay zur IC ₅₀ -Bestimmung	45
2.2.5 IC ₅₀ -Bestimmung bei Einzelbehandlung	46
2.2.6 IC ₅₀ -Bestimmung bei Doppelbehandlung	48
2.2.7 Untersuchung des <i>Combination Index</i> (CI) bei Doppelbehandlung	50
2.2.8 Durchführung der RIST- und VIST-Therapie <i>in vitro</i>	52
2.2.9 Durchflusszytometrie	54
2.2.10 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Proteinen mittels Westernblot-Analysen	55
2.2.11 Statistische Verfahren	59
3 Ergebnisse	60
3.1 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib bei Einzel- und Doppelbehandlung	60
3.2 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von Irinotecan und Temozolomid bei Einzel- und Doppelbehandlung	64
3.3 Untersuchung auf Synergismus und Antagonismus	67
3.4 Induktion des G ₁ -Phase-Arrests im Zellzyklus durch Vistusertib	68
3.5 Hemmung des mTOR-Signalwegs	70
3.6 Keine Induktion von Apoptose bei Einzelbehandlung mit Vistusertib oder bei Doppelbehandlung mit Dasatinib (D+V)	73
3.7 Reduktion der Zellviabilität in der multimodalen RIST-Therapie im Vergleich zur alternativen VIST-Therapie bei IC ₅₀ -Behandlung	74
3.8 Reduktion der Zellviabilität nach der Behandlung mit 1,5-fach erhöhten IC ₅₀ -Werten in der VIST-Therapie	76
4 Diskussion	78
4.1 Signifikante Reduktion der IC ₅₀ -Werte bei Verwendung von Vistusertib anstelle von Rapamycin	78
4.2 Überprüfung der Doppelbehandlung auf Synergismus bzw. Antagonismus	79
4.3 Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Vistusertib	80
4.4 Keine Apoptoseinduktion durch Vistusertib	82
4.5 Vergleichbare Wirkung der VIST-Therapie	83

4.6 Unterschiedliches Ansprechen der Neuroblastom-Zelllinien auf die VIST-Therapie	84
4.7 Kritische Betrachtung von Vistusertib	86
4.8 Ausblick	86
5 Literaturverzeichnis	88
6 Anhang	102
6.1 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib bei Einzelbehandlung	102
6.2 Original-Westernblots	103
7 Danksagung	
8 Eidesstattliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

AKT (PKB)	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Caspase-3	<i>cysteine-dependent aspartate-directed/specific protease 3</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CI	<i>Combination Index</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Dasatinib
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DRF	Dosis-Reduktions-Faktor
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i> oder <i>et alia</i>
FA	<i>fraction affected</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
I	Irinotecan
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
L-Gln	L-Glutamin
m	Meter
M	Molar

mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mTOR	<i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC ₁	<i>mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC ₂	<i>mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Versuche
NB	Neuroblastom
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH-Wert	<i>Pondus/Potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
R	Rapamycin
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RIST-Therapie	Kombinationstherapie aus Rapamycin, Irinotecan, Dasatinib (<i>Sprycel</i> ®) und Temozolomid
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serin

SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (aktiver Metabolit von Irinotecan)
Src	Tyrosinkinase Src (<i>sarcoma</i>)
S6K1 (p70S6K1)	(70 kDa) <i>ribosomal protein S6 kinase 1</i>
T	Temozolomid
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween® 20</i>
TC	<i>tissue culture</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trypsin/EDTA	Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure
Tyr	Tyrosin
V	Vistuertib (AZD2014)
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
VIST-Therapie	Kombinationstherapie aus Vistusertib, Irinotecan, Dasatinib (<i>Sprycel®</i>) und Temozolomid
WB	Westernblot
x	-fach
z. B.	zum Beispiel
4E-BP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: RIST-Therapieschema <i>in vivo</i> .	18
Abbildung 2: Wirkmechanismen der einzelnen Medikamente der RIST- bzw. VIST-Therapie.	20
Abbildung 3: Vereinfachtes RIST- und VIST-Therapieschema <i>in vitro</i> .	21
Abbildung 4: PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.	23
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinie.	39
Abbildung 6: Metabolische Umwandlung von MTT in vitalen Zellen.	46
Abbildung 7: Schematische Darstellung der IC ₅₀ -Bestimmung bei Einzelbehandlung.	48
Abbildung 8: Titrationsschema für die IC ₅₀ -Bestimmung bei Doppelbehandlung.	49
Abbildung 9: Schematische Darstellung der RIST- und VIST-Therapie <i>in vitro</i> .	53
Abbildung 10: Aufbau des Westernblots.	57
Abbildung 11: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie SK-N-BE(2) zur IC ₅₀ -Bestimmung der verwendeten molekular-zielgerichteten Inhibitoren.	61
Abbildung 12: Reduktion der Zellviabilität bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V).	63
Abbildung 13: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie SK-N-BE(2) zur Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von Irinotecan und Temozolomid.	64
Abbildung 14: Reduktion der Zellviabilität in der Zelllinie SK-N-BE(2) bei Doppelbehandlung mit den Chemotherapeutika Irinotecan plus Temozolomid (I+T).	66
Abbildung 15: Induktion des G ₁ -Arrests im Zellzyklus nach der Behandlung mit Vistusertib.	69
Abbildung 16: Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Einzelbehandlung mit Vistusertib.	70
Abbildung 17: Hemmung neoplastischer Signalwege durch Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).	71
Abbildung 18: Keine Induktion von Apoptose bei Einzelbehandlung mit Vistusertib.	73
Abbildung 19: Keine Induktion von Apoptose bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).	74

Abbildung 20: Vergleich der RIST- und VIST-Therapie bei Behandlung mit IC ₅₀ -Werten.	75
Abbildung 21: Vergleich der RIST- und VIST-Therapie bei Behandlung mit 1,5-fach erhöhten IC ₅₀ -Werten in der VIST-Therapie.	76
Abbildung 22: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie Kelly zur IC ₅₀ -Bestimmung der verwendeten molekular-zielgerichteten Inhibitoren.	102
Abbildung 23: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie IMR-32 zur IC ₅₀ -Bestimmung der verwendeten molekular-zielgerichteten Inhibitoren.	102
Abbildung 24: Original-Westernblots zu Abbildung 16: Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Einzelbehandlung mit Vistusertib.	103
Abbildung 25: Original-Westernblots zu Abbildung 17: Hemmung neoplastischer Signalwege durch Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).	104
Abbildung 26: Original-Westernblots zu Abbildung 18: Keine Induktion von Apoptose durch Vistusertib bei Einzelbehandlung.	108
Abbildung 27: Original-Westernblots zu Abbildung 19: Keine Induktion von Apoptose bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Messapparaturen.	31
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.	32
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.	33
Tabelle 4: Antikörper.	35
Tabelle 5: Medikamente für die Behandlung.	37
Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Neuroblastom-Zelllinien: Morphologie, <i>MYCN</i> -Status, Herkunft und DSMZ-Nummer.	39
Tabelle 7: Software.	42
Tabelle 8: Bedeutung der <i>Combination Index</i> (CI)-Werte.	51
Tabelle 9: Zusammensetzung der Trenn- bzw. Sammelgele.	56
Tabelle 10: IC ₅₀ -Werte bei Einzelbehandlung mit den molekular-zielgerichteten Inhibitoren Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib in drei verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien.	61
Tabelle 11: IC ₅₀ -Werte bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V) und Angabe des daraus resultierenden Dosis-Reduktions-Faktors (DRF).	62
Tabelle 12: IC ₅₀ -Werte bei Einzelbehandlung mit Irinotecan und Temozolomid in drei verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien.	65
Tabelle 13: IC ₅₀ -Werte bei Doppelbehandlung mit den Chemotherapeutika Irinotecan plus Temozolomid (I+T) und Angabe des daraus resultierenden Dosis-Reduktions-Faktors (DRF).	65
Tabelle 14: <i>Combination Index</i> (CI)-Werte bei Doppelbehandlung mit den molekular-zielgerichteten Inhibitoren Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).	67

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom stellt im Kindesalter den häufigsten extrakraniellen soliden Tumor dar (1). Ungefähr 15 % aller pädiatrisch-onkologischen Todesfälle lassen sich auf das Neuroblastom zurückführen (2). 30 % der Diagnosen werden im ersten Lebensjahr gestellt und 90 % der Diagnosen in den ersten fünf Lebensjahren (3).

Das Neuroblastom entspringt den primitiven Zellen des Neuralrohrs und ist somit ein embryonaler Tumor des sympathischen Nervensystems (4). Der Primärtumor tritt zu 65 % im Abdomen auf, wovon die Hälfte im Nebennierenmark entsteht. Jedoch lässt sich der Primärtumor auch im Hals, Mediastinum oder Becken diagnostizieren (5, 6). Klinisch betrachtet ist das Neuroblastom eine sehr variable maligne Erkrankung, bei der die Symptome von der Lokalisation des Primärtumors, der Metastasierung und Paraneoplasien abhängig sind (2). Darüber hinaus reicht die Prognose des Neuroblastoms abhängig von dem Erkrankungsalter, dem Erkrankungsstadium, der Molekularbiologie und den zytogenetischen Eigenschaften von spontaner Regression im Säuglingsalter bis zu metastasierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom mit schlechter Prognose (7, 8). Während bei Vorliegen eines Niedrigrisiko-Neuroblastoms die Gesamtüberlebensrate bei etwa 97 % liegt (7), liegt bei Vorliegen eines Hochrisiko-Neuroblastoms das Langzeitüberleben trotz intensiver Therapie nur bei etwa 40 % (9).

Das *International Neuroblastoma Staging System (INSS)* teilt Patient*innen postoperativ anhand der initialen Tumorausdehnung, der Lymphknoteninfiltration und dem Ausmaß der chirurgischen Tumorresektion in die Stadien 1 - 4S ein (10, 11). Um jedoch bereits vor Behandlung eine Risikostratifikation der Patient*innen anhand von klinischen Kriterien und *image-defined risk factors (IDRF)* durchzuführen, wurde das *International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)* eingeführt. Hierbei reicht die Stadieneinteilung von L1 (lokalisierter Tumor in einem Körperbereich ohne bildgebende Risikofaktoren) über L2 (lokoregionaler Tumor mit einem oder mehreren bildgebenden Risikofaktoren) und M (Metastasierung) zu MS (Metastasierung in die Haut, Leber oder das Knochenmark). Neben der Stadieneinteilung fließen auch das Alter, die histologische Klassifikation, der Grad der Tumordifferenzierung, der *MYCN*-Onkogen-Status, das Vorliegen bzw. Fehlen von Chromosom 11q und der Ploidiegrad

in das Klassifikationsschema ein. Dadurch werden die Patienten*innen in vier verschiedene Risikogruppen eingeteilt: *very low risk* (ereignisfreies 5-Jahres-Überleben > 85 %), *low risk* (ereignisfreies 5-Jahres-Überleben > 75 %, aber < 85 %), *intermediate* (ereignisfreies 5-Jahres-Überleben > 50 %, aber < 75 %) und *high risk* (ereignisfreies 5-Jahres-Überleben < 50 %) (12, 13).

Bei etwa 25 % aller Neuroblastompatient*innen lässt sich eine Amplifikation des *MYCN*-Onkogens finden, welche bei einem Hochrisiko-Neuroblastom vorliegt und mit schlechter Prognose assoziiert ist (14-16). Das Vorliegen einer *MYCN*-Amplifikation beim Neuroblastom zählt als wichtiger prognostischer Faktor (12, 15), denn diese korreliert mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer raschen Tumorprogression (14, 16). Das *MYCN*-Onkogen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher für diverse Prozesse des Zellzyklus entscheidend ist und beim Neuroblastom Angiogenese, Überleben und Metastasierung fördert (15, 17, 18).

1.2 RIST- und VIST-Therapie

Besonders ungünstig ist die Prognose bei rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom (19-21). Trotz intensiver Behandlung liegt das mediane Gesamtüberleben für Patient*innen mit therapierefraktärem Neuroblastom bei etwa 28 Monaten und bei Patient*innen mit rezidivierendem Neuroblastom bei etwa 11 Monaten (22). Neue Therapieansätze werden besonders für diese Patientengruppe dringend benötigt und sind Gegenstand aktueller Forschung.

Die unter der Leitung von Prof. Dr. Corbacioglu durchgeführte offene, randomisierte Phase-II-Studie RIST-rNB-2011 (ClinicalTrials.gov ID: NCT01467986) wurde im September 2020 beendet und richtete sich an Patient*innen mit rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom. Die RIST-Therapie stellt ein neuartiges, multimodales Modell dar, bei dem die Zytostatika Irinotecan (I) und Temozolomid (T) mittels metronomischer Gabe mit Rapamycin (R), einem mTOR-Inhibitor der 1. Generation, und Dasatinib (*Sprycel*®, S), einem ATP-kompetitiven Tyrosinkinase-Inhibitor, kombiniert werden (Abbildung 1) (21, 23). In der Pilotstudie zur RIST-Therapie konnte gezeigt werden, dass das mediane progressionsfreie Überleben bei 90 Wochen lag und das mediane Gesamtüberleben nach 148 Wochen

bei 43 % lag (24). Die Veröffentlichung der Studienergebnisse zeigte, dass durch die RIST-Therapie im Vergleich zur alleinigen Gabe der Zytostatika Irinotecan und Temozolomid bei *MYCN*-amplifizierten rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom das progressionsfreie Überleben signifikant verbessert und die Gesamtüberlebenszeit erheblich verlängert werden konnte (21).

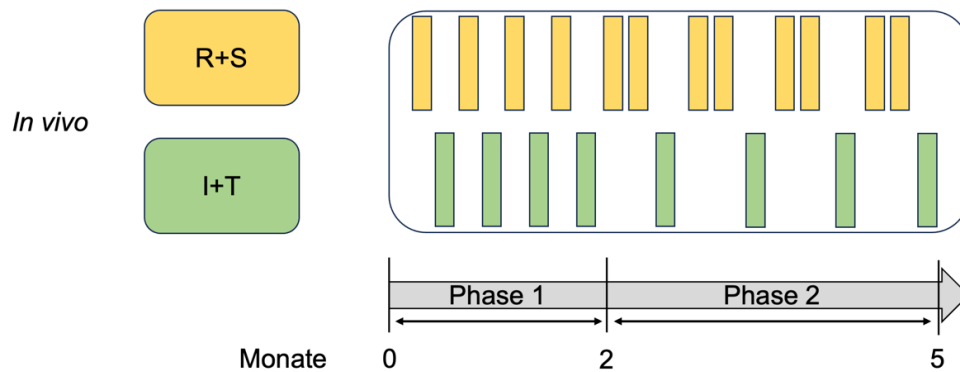


Abbildung 1: RIST-Therapieschema in vivo.

In der offenen, randomisierten Phase-II-Studie RIST-rNB-2011 besteht die Behandlung im metronomischen Therapiedesign in Phase 1 aus vier Zyklen mit jeweils 1x Rapamycin plus Dasatinib (Sprycel®) (R+S) für 4 Tage gefolgt von 3 Tagen Pause und anschließend jeweils 1x Irinotecan plus Temozolomid (I+T) für 5 Tage gefolgt von 2 Tagen Pause über insgesamt 8 Wochen. Phase 2 besteht aus vier Zyklen mit jeweils 2x Rapamycin plus Dasatinib über 4 Tage gefolgt von 3 Tagen Pause und anschließend jeweils 1x Irinotecan plus Temozolomid (I+T) für 5 Tage gefolgt von 2 Tagen Pause über insgesamt 12 Wochen.

Kombinationstherapien

In der Krebstherapie spielen Kombinationstherapien mit zwei oder mehreren Medikamenten eine wichtige Rolle, da diese Einzeltherapien oft überlegen sind. Kombinationstherapien weisen eine geringere Toxizität als Einzeltherapien auf, da unterschiedliche Signalwege betroffen sind (25). Ebenfalls wird bei Kombinationstherapien mit einer niedrigeren Dosis ein ähnlicher therapeutischer Effekt erzielt als mit höheren Konzentrationen bei Einzelbehandlung (26). Durch das Vorliegen eines Synergismus werden niedrigere Dosierungen der einzelnen Medikamente benötigt, was Nebenwirkungen reduzieren kann (27, 28). In einem Mausmodell zeigte die Kombinationsbehandlung der Zytostatika Irinotecan und Temozolomid sogar eine höhere Aktivität als die Einzelbehandlung mit dem jeweiligen Zytostatikum und die Toxizität von Temozolomid wurde durch die Kombination mit Irinotecan reduziert (29). Darüber hinaus können Kombinationstherapien das Auftreten von Medikamentenresistenzen reduzieren oder verzögern (30-32).

Kombinationstherapien, bei denen eines der verwendeten Medikamente antagonistisch zu einem der anderen Medikamente in gesunden Zellen wirkt, können gleichzeitig einen zytotoxischen Effekt auf Krebszellen und einen protektiven Effekt auf gesunde Zellen haben (33, 34).

Metronomische Therapien

Unter einer metronomischen Chemotherapie versteht man die Gabe von Chemotherapeutika in vergleichsweise niedriger Dosierung, welche in regelmäßigen Abständen ohne längere Unterbrechungen verabreicht wird (35). Vorteile von metronomischen Therapieschemata im Vergleich zu konventionellen Therapieschemata sind durch die niedrigere Dosierung eine reduzierte Toxizität, ein verlängertes Überleben und eine Minimierung von Therapieresistenzen (30, 36-41).

Die RIST-Therapie macht sich die Vorteile beider genannter Therapieschemata zunutze. Durch die Vorbehandlung mit Dasatinib und Rapamycin wird ein G₁-Phase-Arrest im Zellzyklus induziert und die Zellen werden für die darauffolgende Chemotherapie sensibilisiert (21, 42-44). Neben der offenen, randomisierten Phase-II-Studie RIST-rNB-2011 (ClinicalTrials.gov ID: NCT01467986) wurde die RIST-Therapie auch am Glioblastom *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell getestet und lieferte mit einer signifikanten Viabilitätsreduktion im Vergleich zur Behandlung mit den einzelnen Medikamenten der RIST-Therapie, einer deutlichen Reduktion der Tumorlast über antiproliferative und proapoptotische Effekte und einer signifikanten Verlängerung des Überlebens vielversprechende Ergebnisse (44).

In der folgenden Abbildung 2 sind die Wirkmechanismen bzw. Angriffspunkte der einzelnen Medikamente der RIST- bzw. VIST-Therapie dargestellt.

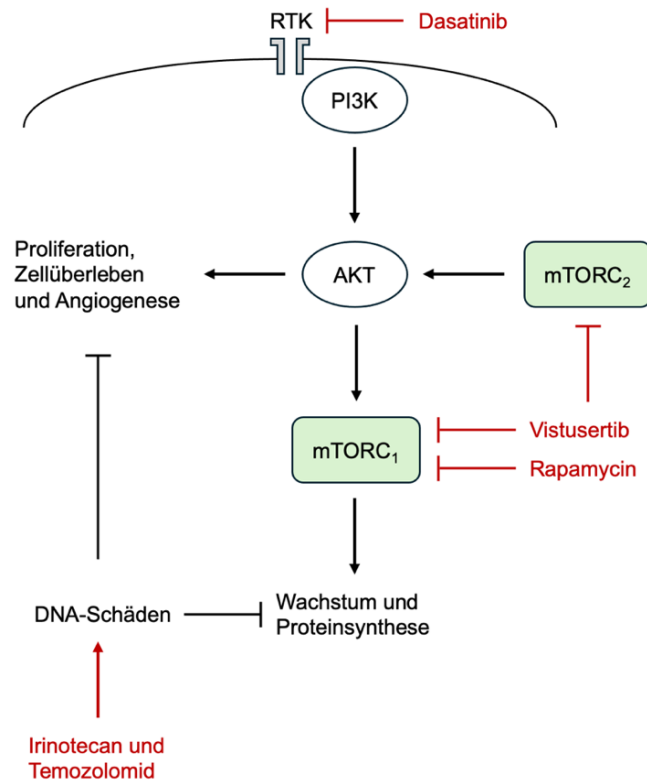


Abbildung 2: Wirkmechanismen der einzelnen Medikamente der RIST- bzw. VIST-Therapie.

Darstellung der Wirkmechanismen der einzelnen Medikamente. AKT: Proteinkinase B, mTORC₁ bzw. mTORC₂: mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 bzw. 2, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase. Abbildung modifiziert nach Rebecca Wätzig, Dissertation, Universitätsklinikum Regensburg, 2022, Titel: „Testung verschiedener mTOR-Inhibitoren zur Verbesserung der RIST-Therapie in einem in-vitro Modell des Neuroblastoms“ (45).

Dasatinib (Sprycel®, S)

Dasatinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor der 2. Generation, der unter anderem die BCR-ABL-Tyrosinkinase, die Src-Tyrosinkinase und die c-KIT-Tyrosinkinase hemmt (46-48). Verwendung findet Dasatinib bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) (49, 50). In Neuroblastom-Zelllinien konnten durch die Behandlung mit Dasatinib neben einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität (51) auch antiproliferative und antimigratorische Effekte festgestellt werden (52).

Rapamycin (R) und Vistusertib (V)

Rapamycin und Vistusertib gehören zu den *mammalian/mechanistic target of Rapamycin* (mTOR)-Inhibitoren und werden ausführlicher in den Kapiteln 1.4.1 und 1.4.2 erläutert.

Irinotecan (I)

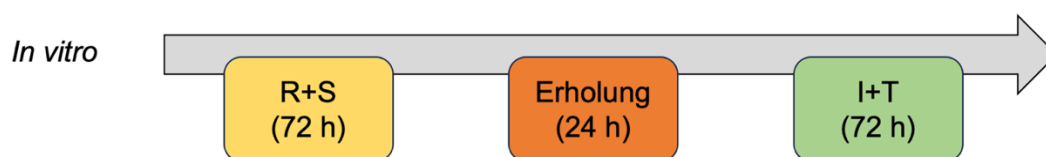
Irinotecan wird in der Leber verstoffwechselt und durch eine Carboxyesterase in den aktiven Metaboliten SN-38 (7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin) überführt (53-55). Durch die Anlagerung von Irinotecan an den Komplex aus Topoisomerase I und DNA kann der zuvor erfolgte DNA-Einzelstrangbruch nicht wieder verschlossen werden, da Enzyme wie die DNA-Polymerase bei Kontakt mit dem Komplex einen Doppelstrangbruch verursachen, wodurch die DNA-Replikation gestört und Apoptose induziert wird (56-58). In den durchgeführten In-vitro-Versuchen dieser Arbeit wurde der aktive Metabolit SN-38 von Irinotecan verwendet.

Temozolomid (T)

Temozolomid ist wie Irinotecan ein Prodrug und wird im Körper spontan in seinen aktiven Metaboliten MTIC (5-(3-Methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid) hydrolysiert. Durch Methylierung an N7 von Guanin, an N3 von Adenin und an O6 von Guanin (59) kommt es zu DNA-Basenschädigung und infolgedessen zu Apoptose (60).

In vitro wurden die Neuroblastomzellen mit Rapamycin plus Dasatinib (R+S) bzw. Vistusertib plus Dasatinib (V+S) vorbehandelt und dann für 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen konnten sich für 24 Stunden erholen. Abschließend wurden die Neuroblastomzellen mit Irinotecan plus Temozolomid (I+T) behandelt und für 72 Stunden inkubiert (Abbildung 3).

RIST-Therapie:



VIST-Therapie:

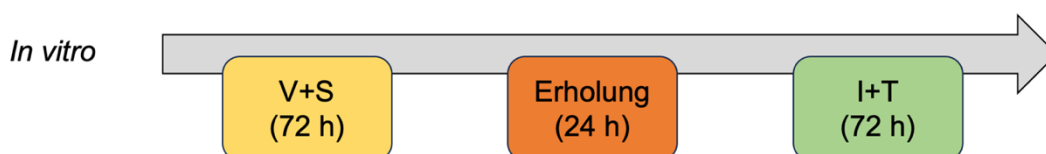


Abbildung 3: Vereinfachtes RIST- und VIST-Therapieschema *in vitro*.

Für die RIST-Therapie *in vitro* wurden die Neuroblastomzellen mit Rapamycin plus Dasatinib (Sprycel®) (R+S) vorbehandelt und für 72 h inkubiert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel und nach 24 h wurden die

Neuroblastomzellen mit Irinotecan plus Temozolomid (I+T) behandelt und für 72 h inkubiert. Für die VIST-Therapie *in vitro* wurden die Neuroblastomzellen mit Vistusertib plus Dasatinib (Sprycel®) (V+S) vorbehandelt und für 72 h inkubiert. Dann erfolgte, wie in der RIST-Therapie, ein Mediumwechsel und nach 24 h wurden die Neuroblastomzellen mit Irinotecan plus Temozolomid (I+T) behandelt und für 72 h inkubiert.

1.3 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/ Proteinkinase B (AKT)/ *mammalian/mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg ist entscheidend für Zellwachstum, Zellüberleben, Metabolismus und Angiogenese (61, 62) und ist in vielen humanen Krebserkrankungen dysreguliert (63). Im Neuroblastom ist der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg oftmals aktiviert und resultiert durch maligne Transformation und Progression in schlechter Prognose (64-66). In Tumorzellen führen häufig genetische Mutationen in Genen, die für Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) kodieren, zu einer aberranten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs. Diese Aktivierung löst eine Signaltransduktionskaskade aus, die das Wachstum, das Überleben und den Metabolismus von Tumorzellen fördert (67).

Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs beginnt mit der Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche PI3K aktivieren. Durch die Aktivierung von PI3K wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) phosphoryliert, was in der Aktivierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) resultiert. Hierdurch wird die *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK1) aktiviert, welche AKT phosphoryliert und somit aktiviert (Abbildung 4) (68, 69). AKT ist eine Serin/Threonin-Kinase, die infolge der Aktivierung von PI3K aktiviert wird und als Haupteffektor von PI3K in Tumoren gilt. AKT ist für vermehrtes Zellwachstum und Zellüberleben verantwortlich (67) und ein wichtiger Bestandteil in der Aktivierung von mTORC₁ (70).

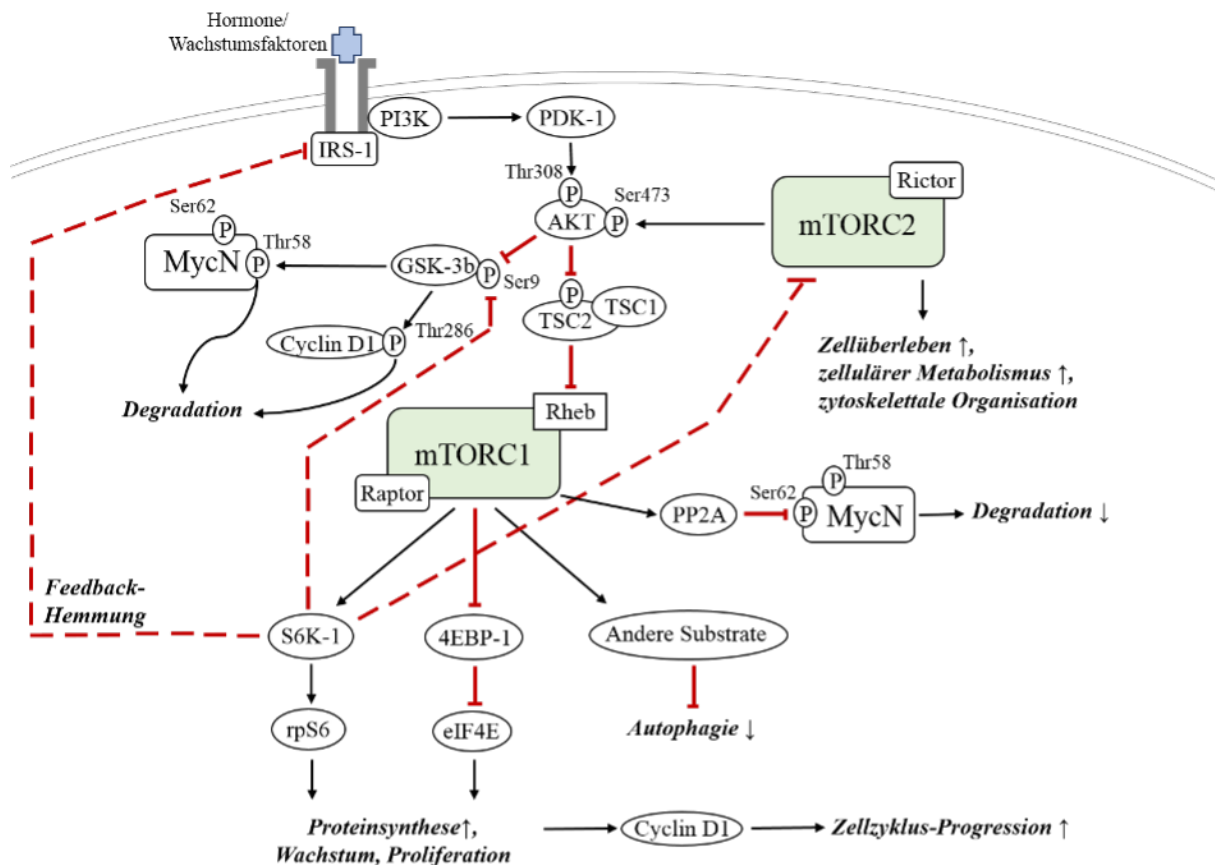


Abbildung 4: PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.

Darstellung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs. AKT: Proteinkinase B, eIF4E: eukaryotic translation initiation factor 4E, GSK3b (GSK3B): Glykogensynthase-Kinase 3 beta, IRS-1: Insulinrezeptorsubstrat 1, mTORC₁ bzw. mTORC₂: mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 bzw. 2, PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PP2A: protein phosphatase 2A, Raptor (RPTOR): regulatory-associated protein of mTOR, Rheb (RHEB): Ras homolog enriched in brain, Rictor (RICTOR): Rapamycin-insensitive companion of mTOR, rpS6: ribosomal protein S6, RTK: Rezeptor-Tyrosinkinasen, S6K1: ribosomal protein S6 kinase 1, TSC1 bzw. TSC2: tuberous sclerosis complex 1 bzw. 2, 4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1. Abbildung nach Rebecca Wätzig, Dissertation, Universitätsklinikum Regensburg, 2022, Titel: „Testung verschiedener mTOR-Inhibitoren zur Verbesserung der RIST-Therapie in einem in-vitro Modell des Neuroblastoms“ (45).

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg stellt ein vielversprechendes Ziel in der Krebstherapie und auch in der Therapie des Neuroblastoms dar. In In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen beim Neuroblastom konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren des PI3K/AKT-Signalwegs die Tumorpherifation reduzieren, Angiogenese hemmen, zu einer Abnahme der MYCN-Proteinlevel führen und das Gesamtüberleben signifikant verbessern (siehe Kapitel 1.3.2) (71-74). Ein medikamentöser Eingriff in den komplexen PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. In

der folgenden Arbeit wird der Schwerpunkt auf dem ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor Vistusertib (AZD2014) liegen.

Das mTOR spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zellzyklusprogression und Zellproliferation (75). Das mTOR ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die aus zwei Komplexen, dem mTOR-Komplex 1 (mTORC₁) und dem mTOR-Komplex 2 (mTORC₂), besteht (76).

Die Hauptsubstrate des mTORC₁ sind die *ribosomal protein S6 kinase 1* (S6K1) und das *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1). Beide regulieren die mRNA-Translation und dadurch die Proteinsynthese (77, 78). Die mTORC₁-vermittelte Phosphorylierung von 4E-BP1 löst die Bindung von 4E-BP1 von dem *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E), wodurch die Initiation der Cap-abhängigen mRNA-Translation beginnt (77) und durch Phosphorylierung von S6K1 wird die Elongation der Translation gefördert (79, 80). Über das mTORC₁-Substrat 4E-BP1 wird die Zellproliferation reguliert (81), wohingegen über das mTORC₁-Substrat S6K1 das Zellwachstum reguliert wird (81, 82). Der Knotenpunkt mTORC₁ integriert diverse Stimuli wie Stress, Sauerstoff, Wachstumsfaktoren, Energie und Aminosäuren, was in der Förderung der Synthese von Lipiden, Nukleotiden und Proteinen resultiert. Zudem hemmt mTORC₁ Autophagie, was in Zellwachstum resultiert (76). Die mTORC₁-Aktivität ist abhängig von intrazellulären und umwelttechnischen Einflüssen. So wird die Aktivität durch niedrige ATP-Level, Hypoxie und DNA-Schäden gehemmt (76, 83, 84). Der *tuberous sclerosis complex* (TSC)-Proteinkomplex fungiert als Guanosintriphosphat (GTP)ase-aktivierendes Protein (GAP) für RHEB (*Ras homolog enriched in brain*), was als GTP-bindendes Protein direkt an mTORC₁ bindet und diesen aktiviert (83, 85-87). Paradoxerweise führt die Hemmung von mTORC₁ und damit seines Substrats S6K1 über die ausbleibende Degradation des Insulinrezeptorsubstrats 1 (IRS-1) zu einer Aufhebung des negativen Feedback-Mechanismus. Das bedeutet, dass eine Inhibition von S6K1 in einer erneuten Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs resultiert (88-90).

Die mTORC₂-Substrate AKT (Proteinkinase B), SGK1 (Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1) und PKC (Proteinkinase C) werden durch Phosphorylierung aktiviert und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellüberleben, Zellzyklusprogression und Anabolismus (91-94). Zudem wird mTORC₂ durch Wachstumsfaktoren aktiviert, was zur Förderung von Zellüberleben und Zellproliferation führt (76). Für die vollständige Aktivierung von AKT muss zunächst

Serin 473 (Ser473) durch mTORC₂ phosphoryliert werden, was zur weiteren Phosphorylierung von Threonin 308 (T308) durch PDK1 führt (91, 92, 94, 95). AKT ist nicht nur Substrat von mTORC₂, sondern wird auch infolge der Aufhebung des negativen Feedback-Mechanismus durch die Inhibition von mTORC₁ selbst aktiviert (88, 90, 96).

1.3.1 Rolle des mTOR-Signalwegs bei Krebserkrankungen

Der mTOR-Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Fortschreitens des Zellzyklus und der Zellproliferation (75). In diversen Tumoren ist der mTOR-Signalweg dysreguliert und hyperaktiv – entweder durch Mutationen, die Enzyme vor dem Signalweg betreffen und ihn aktivieren oder durch mTOR-Substrate selbst (76, 97, 98). Der aberrant aktivierte mTOR-Signalweg kann in Tumoren metabolische Transformation, Neovaskularisation, Metastasierung, geringeres Überleben und Resistenz gegenüber Krebsmedikamenten bewirken (98, 99). Die Aufrechterhaltung von Tumoren, die einen hyperaktiven PI3K/AKT-Signalweg aufweisen, erfordert einen intakten mTOR-Signalweg (69). Durch den mTORC₂ kann AKT direkt phosphoryliert werden (91). AKT spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von diversen zellulären Prozessen wie Zellüberleben, Proliferation, Wachstum, Metabolismus und Angiogenese. Die Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung korreliert mit reduziertem Überleben und der Amplifikation von *MYCN*, was beim Neuroblastom einen Marker für aggressiven Verlauf darstellt (64). Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass im Neuroblastom häufig eine Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs vorliegt (64, 72, 74). Zudem ist bekannt, dass dieser Signalweg besonders häufig beim Hochrisiko-Neuroblastom aktiviert ist (100).

Durch die Behandlung mit mTORC_{1/2}-Inhibitoren wird der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg gehemmt, was einen vielversprechenden Therapieansatz beim Neuroblastom und insbesondere beim Hochrisiko-Neuroblastom darstellt.

1.3.2 *MYCN*-Amplifikation

Die Amplifikation des *MYCN*-Onkogens tritt in 25 % aller Neuroblastomfälle und in 40 - 50 % der Hochrisiko-Neuroblastome auf und korreliert mit einem schlechten klinischen Outcome (2, 101). Es konnte gezeigt werden, dass in Neuroblastomzellen

MYCN indirekt in der Lage ist die Expression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zu induzieren und dadurch Angiogenese fördern kann (102, 103). Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg trägt zur Stabilisierung von MYCN bei (Abbildung 4), was mit vermehrter Proliferation, Angiogenese und Metastasierung assoziiert ist (65, 104). Demzufolge können Inhibitoren, die in den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg eingreifen, die Degradation von MYCN fördern (72, 105). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass mTOR-Inhibitoren die MYCN-Proteinexpression in Neuroblastom-Zelllinien herunterregulieren und *in vivo* Apoptose erhöhen, Proliferation vermindern und Angiogenese hemmen (72). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Degradation von MYCN mit der kompletten Blockade von mTORC₁ und mTORC₂ korreliert (105). Zudem hemmt MYCN die Immunüberwachung (18). Für Patient*innen mit einem Hochrisiko-MYCN-amplifizierten Neuroblastom stellen mTORC_{1/2}-Inhibitoren eine Verbesserung der Prognose bzw. des Outcomes dar.

1.4 mTOR-Inhibitoren

Durch die signifikante Bedeutung des mTOR-Signalwegs bei Krebserkrankungen werden mTOR-Inhibitoren als vielversprechende Krebsmedikamente betrachtet (106). Im folgenden Kapitel werden die mTOR-Inhibitoren der 1. Generation (Rapamycin und seine Analoga) und die mTOR-Inhibitoren der 2. Generation (ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren) genauer betrachtet.

1.4.1 Rapamycin und Rapaloga

Rapamycin wurde als antifungaler Metabolit des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus* auf der Insel Rapa Nui (Osterinseln) entdeckt (107, 108). Durch die immunsuppressiven Eigenschaften wird Rapamycin (Sirolimus, *Rapamune*®) heute als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen verwendet (109, 110). Durch die Dysregulation des mTOR-Signalwegs bei vielen Krebserkrankungen (111) wird Rapamycin in Kombination zur Behandlung bei rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom oder bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom eingesetzt (21, 112).

Neben Rapamycin wurden weitere Rapamycin-Analoga, sogenannte Rapaloga, entwickelt. Diese Derivate von Rapamycin, zum Beispiel Everolimus, weisen

verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften (113), wie eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit und Wasserlöslichkeit, auf (114). Im Folgenden werden unter dem Begriff „Rapamycin“ sowohl die Ausgangssubstanz Rapamycin selbst als auch ihre Analoga verstanden.

Rapamycin wirkt über einen Gain-of-Function-Mechanismus, wodurch es mit dem intrazellulären Protein FKBP12 einen Medikamenten-Rezeptor-Komplex bildet und an mTORC₁ bindet. Dadurch wird dieser Komplex und dessen Substrate 4E-BP1 und S6K1 allosterisch gehemmt (106, 115). FKBP12-Rapamycin bindet nicht direkt an mTORC₂, wodurch dieser nicht von Rapamycin gehemmt wird (115). Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei längerer Behandlung von bestimmten Zelllinien auch teilweise mTORC₂ gehemmt wird, jedoch ist dieser Wirkmechanismus noch nicht geklärt (116).

Trotz ursprünglicher großer Hoffnung als vielversprechendes Krebsmedikament konnte Rapamycin in klinischen Studien nicht komplett überzeugen. Dem zugrunde liegen folgende Faktoren:

- 1) Rapamycin hat – im Gegensatz zu seinen Rapaloga – eine schlechtere Löslichkeit und Pharmakokinetik (106).
- 2) Rapamycin kann in Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien und Konzentrationen zytostatisch oder zytotoxisch wirken (106, 117, 118), weshalb Rapamycin häufig im Rahmen von Kombinationstherapien eingesetzt wird (106).
- 3) Rapamycin hemmt den mTOR-Signalweg größtenteils über die Inhibition des mTORC₁ und teilweise auch über die Inhibition des mTORC₂ (siehe oben stehender Abschnitt). Jedoch ist die Inhibition der Phosphorylierung der mTORC₁-Substrate 4E-BP1 und S6K1 und des mTORC₂-Substrats AKT in bestimmten Krebszelllinien und bei unterschiedlich langer Behandlungsdauer verschieden stark ausgeprägt (116, 119, 120). Länger andauernde Behandlungen mit Rapamycin sorgen für eine Resistenz von Rapamycin gegen das mTORC₁-Substrat 4E-BP1, welches trotz initialer Reduzierung der Phosphorylierung wieder phosphoryliert wird (119). Kurz andauernde Behandlungen mit Rapamycin reduzieren die Phosphorylierung des mTORC₂-Substrats AKT nicht, jedoch führen länger andauernder Behandlungen mit Rapamycin in bestimmten Zelllinien zu reduzierter oder sogar gehemmter Aktivität von AKT (116, 120).
- 4) Wie in Kapitel 1.3 bereits erläutert, führt die Inhibition von mTORC₁ paradoxerweise über die Aufhebung des negativen Feedback-Mechanismus zur

Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs (88-90). Durch die Aktivierung von AKT wird die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen gefördert und Apoptose gehemmt (121-123), wodurch die tumorhemmenden Effekte von Rapamycin möglicherweise abgeschwächt werden (90).

- 5) Es ist bekannt, dass Rapamycin immunsuppressive Eigenschaften hat (124). In der Behandlung von T-ALL-Zellen mit ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren hatten diese einen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen, jedoch zeigten sich bei der Behandlung von ruhenden CD4⁺-T-Lymphozyten keine Anzeichen von Apoptose (125). Zudem wurde gezeigt, dass ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren weniger immunsuppressiv als allosterische mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin sind (126) und durch potentere antineoplastische Effekte bessere Therapieoptionen bei Krebserkrankungen sein könnten (127).

1.4.2 ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren

Aufgrund der in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Limitationen von Rapamycin wurden ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren entwickelt und in klinischen Studien getestet (128-130). Vistusertib (AZD2014) gehört zu den ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren (131, 132) und soll in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der VIST-Therapie im Vergleich zu Rapamycin in der RIST-Therapie untersucht werden.

Die ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren gehören zur 2. Generation der mTOR-Inhibitoren und wirken über einen ATP-kompetitiven Mechanismus, der sowohl mTORC₁ als auch mTORC₂ effektiv hemmt (131, 133). In Studien konnte gezeigt werden, dass ATP-kompetitive Inhibitoren die bei längerer Behandlung auftretende Rapamycin-resistente Phosphorylierung des mTORC₁-Substrats 4E-BP1 effektiv hemmen, was der Zellproliferation stärker entgegenwirkt (81, 119, 133). Durch die zusätzliche Hemmung von mTORC₂ kommt es zur Inhibition des mTORC₂-Substrats AKT. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, führt die Inhibition des mTORC₁ durch Rapamycin über die Aufhebung des negativen Feedback-Mechanismus zur paradoxen Aktivierung von AKT (88-90). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ATP-kompetitive Inhibitoren die Phosphorylierung von AKT an Ser473 und Thr308 hemmen, wobei die Inhibition der Phosphorylierung an Ser473 entscheidender ist, da abhängig von dieser auch eine geringere Phosphorylierung an Thr308 stattfindet (96). Die ATP-kompetitiven Inhibitoren weisen somit eine potentere Hemmung von

mTORC₁ und mTORC₂ als Rapamycin auf (134), was für Vistusertib *in vitro* und *in vivo* bei Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs mit endokriner Resistenz gezeigt werden konnte (135).

Durch die Blockade beider mTOR-Komplexe und damit das Eingreifen in mehrere Signalwege, wurde befürchtet, dass ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen könnten (136). In klinischen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Nebenwirkungen von Vistusertib größtenteils zwischen Grad 1 und 2 befanden (Müdigkeit, Hautausschlag und milde gastrointestinale Symptomatik wie Übelkeit, Erbrechen und orale Mukositis), jedoch kaum schwerwiegenden Nebenwirkungen auftraten (128, 129, 131). Darüber hinaus zeigte sich in der AcSé-ESMART-Phase-I/II-Studie, dass Vistusertib als Monotherapie und auch in Kombination mit Topotecan und Temozolomid von pädiatrischen Patient*innen gut vertragen wurde (137).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Kindesalter ist das Neuroblastom der häufigste maligne extrakranielle Tumor. Die Prognose des Neuroblastoms gestaltet sich als schwierig, da es zu spontaner Regression, jedoch auch zu Metastasierung und tödlichem Verlauf kommen kann. Besonders ungünstig ist die Prognose bei rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-Neuroblastom (19-21). Da gerade für diese Patient*innen keine empfohlene Standardtherapie existiert, stellt der von Prof. Dr. Corbacioglu entwickelte Therapieansatz, die sogenannte RIST-Therapie (RIST-rNB-2011, ClinicalTrials.gov ID: NCT01467986), eine vielversprechende Therapieoption dar. Hierbei handelt es sich um einen neuartigen, multimodalen Therapieansatz bei dem die Zytostatika Irinotecan und Temozolomid mit den molekular-zielgerichteten Inhibitoren Rapamycin und Dasatinib metronomisch kombiniert werden. Die offene, randomisierte Phase-II-Studie RIST-rNB-2011 zeigte, dass Patient*innen mit rezidivierendem oder therapierefraktärem Hochrisiko-MYCN-amplifizierten Neuroblastom ein signifikant verbessertes progressionsfreies Überleben haben (21, 23).

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in diversen Zellregulationsprozessen wie Proliferation und Differenzierung und nimmt somit eine entscheidende Rolle als Target in der Krebstherapie ein (138). Die mTOR-Inhibitoren

der 2. Generation wirken über einen ATP-kompetitiven Mechanismus und hemmen sowohl mTORC₁ als auch mTORC₂. Somit wird die Feedback-vermittelte Aktivierung von AKT durch die alleinige Inhibition von mTORC₁ verhindert und der PI3K/AKT-Signalweg bleibt vollständig gehemmt (139). Da der mTORC₂ im Vergleich zu mTORC₁ signifikant weniger sensitiv auf Rapamycin reagiert (140), erscheint die Testung mit einem mTORC_{1/2}-Inhibitor zur Verbesserung der RIST-Therapie sinnvoll. Zudem ist bekannt, dass Rapamycin unerwünschte immunsuppressive Eigenschaften hat (124).

Vistusertib (AZD2014) ist ein ATP-kompetitiver mTORC_{1/2}-Inhibitor, der in diversen klinischen Phase-II-Studien zur Behandlung des Mamma-, Endometriums- und Ovarialkarzinoms getestet wurde (128, 130, 141). Die Behandlung mit Vistusertib bei Neuroblastomen mit *MYCN*-Amplifikation zeigte in Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen in der T1-Wichtung eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens, was mit einer erhöhten Konzentration von apoptotischen Zellen assoziiert war (142). Des Weiteren sieht die Europäische Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie (*European Society for Paediatric Oncology*, SIOPE) mTORC_{1/2}-Inhibitoren als Medikamentengruppe mit priorisiertem Forschungsbedarf zur möglichen Behandlung von Neuroblastomen mit *MYCN*-Amplifikation an (143). Ebenfalls günstig zeigte sich das Nebenwirkungsprofil in durchgeführten klinischen Studien, bei denen sich die aufgetretenen Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Exanthem im milden bis moderaten Bereich (Grad 1-2) befanden (129). Demzufolge stellt die Testung mit Vistusertib als Ersatz für Rapamycin in der modifizierten RIST-Therapie, der sogenannten VIST-Therapie, eine erfolgversprechende und gut verträgliche Alternative bei der Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastom-Patient*innen dar und wurde auf seine Wirksamkeit im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Messapparaturen

Tabelle 1: Geräte und Messapparaturen.

Geräte und Messapparaturen	Hersteller
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc.
CO ₂ -Inkubator HERAccl® 240	Heraeus Holding GmbH
CLARIOStar® Plus Microplate Reader	BMG LABTECH GmbH
Integra PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences AG
MACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Magnetrührer mit Heizplatte VMS-C4 ADVANCED	VWR International (Avantor Inc.)
Mehrfachdispenser HandyStep® S	Brand GmbH & Co. KG
Mehrkanalpipette Eppendorf Research® plus, 12-Kanal, 30 - 300 µl	Eppendorf SE
Mikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon Corporation
Mikroskopkamera Nikon DS-Vi1 mit Kamera- steuereinheit Nikon DS-U3 DS	Nikon Corporation
Mikrozentrifuge Micro Star 17R	VWR International (Avantor Inc.)
Milli-Q® EQ 7000 Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA
Mini-PROTEAN® Tetra Gelektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories Inc.
Mini-Vortexmischer	Gilson Inc.
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG
Pipetten Eppendorf Research® plus 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl und 100 - 1000 µl	Eppendorf SE
Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix Instrument GmbH
Schüttelwasserbad GFL 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Sonifizierer SONOPLUS Ultraschall-	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG
Homogenisator mini20	
Sterilbank HERAsafe®	Heraeus Holding GmbH

ThermoMixer® C mit SmartBlock 1,5 ml	Eppendorf SE
Tischzentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf SE
Vortexmischer Vortex-Genie™ ^R 2	Scientific Industries Inc.
Vortexschüttler	VWR International (Avantor Inc.)
Waagen	KERN & SOHN GmbH

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien mit Katalognummer (#)	Hersteller
Aluminiumfolie ROTILABO® 30 µm, 500 mm, 100 m #2596.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Combitips advanced® 5 ml und 10 ml	Eppendorf SE
CryoPure Röhre 2 ml mit Nennvolumen von 1,8 ml #72.379	Sarstedt AG & Co. KG
FACS-Reaktionsgefäß (Rundboden-Teströhrchen aus Polystyrol ohne Verschluss, 5 ml) #352052	Falcon (Corning Inc.)
FACS-Reaktionsgefäß mit Zellsieb (Rundboden-Teströhrchen aus Polystyrol mit Schnappverschluss und Zellsieb, 5 ml) #352235	Falcon (Corning Inc.)
Folie, transparent, 12,7 x 17,8 cm #L07020-025	Advansta Inc.
Incidin™ OxyWipe #3116140	Ecolab Inc.
MACSQuant® Bleach Solution #130-093-663	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
MACSQuant® Running Buffer #130-092-747	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
MACSQuant® Storage Solution #130-092-748	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
MACSQuant® Washing Solution #130-092-749	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Nitrozellulose-Membran (Amersham™ Protran® 0,45 µm NC), 150 mm x 4 m #10600012	Cytiva (Danaher Corporation)
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen aus Kalk-Natron-Glas, 2 ml, Gesamtlänge: 230 mm, unsteril #4522.1	Carl Roth GmbH & Co. KG

Pipettenspitzen mit Filter (Biosphere® plus) 0,5 - 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl und 1250 µl #70.3020.255, 70.3030.255, 70.3031.255, 70.3050.255, 70.1186.210	Sarstedt AG & Co. KG
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml und 2 ml #72.690.001, 72.695.500	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipetten mit Spitze, wattiert, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml #86.1252.025, 86.1253.025, 86.1254.025, 86.1685.020, 86.1256.001	Sarstedt AG & Co. KG
Western Blotting-Filterpapier, 0,83 mm Dicke, 7 x 8,4 cm #84783	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zellkulturflaschen 25 cm ² (TC-behandelt) #353014, 83.3910	Corning Inc., Sarstedt AG & Co. KG
Zellkulturflaschen 75 cm ² (TC-behandelt) #353135, 83.3911	Corning Inc., Sarstedt AG & Co. KG
Zentrifugenröhrchen, konisch, 15 ml und 50 ml #352096, 352070	Falcon (Corning Inc.)
12-Well-Platten, Zellkulturplatten (TC-behandelt) #353225, 83.3921.005	Falcon (Corning Inc.)
24-Well-Platten, Zellkulturplatten (TC-behandelt) #353226, 83.3922.005	Sarstedt AG & Co. KG
96-Well-Platten, Zellkulturplatten (TC-behandelt) #3598, 83.3924.005	Falcon (Corning Inc.), Sarstedt AG & Co. KG

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien mit Katalognummer (#)	Hersteller
2-Propanol > 99,5 % #19516	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Acryl/Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (ROTIPHORESE® Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumpersulfat (APS) #13375	SERVA Electrophoresis GmbH

β-Mercaptoethanol #444203	Merck KGaA
Bovines Serumalbumin (BSA) #A6588,0100	AppliChem (Illinois Tools Work (ITW) Inc.)
Bromphenolblau-Natriumsalz #1.11746	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid (DMSO), HybriMax™, steril filtriert #D2650	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Eagle's minimum essential medium (EMEM), ohne Glutamin #12-125F	Lonza Group AG
Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8 %, p.a. #9065.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Fetal calf serum (FCS) #F7524	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Glycin ≥ 98,5 %, #T873.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin BioXtra ≥ 99 % #G6279	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Ham's F-12 Nährstoffmischung, ohne Glutamin #N4888	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Isopropanol (2-Propanol) 70 %, rein #CN09.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Glutamin (L-Gln), 200 mM #25030-024	(Gibco) Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Minimum essential medium non-essential amino acids (MEM NEAA), 100x #11140035	(Gibco) Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Natriumazid #K305.1	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl) #3957.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Phosphate-buffered saline (PBS) nach Dulbecco (DPBS), 1x #14190094	(Gibco) Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), 10.000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml #P0781	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Propidiumiodid #P4864	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Proteinmarker (Blue Prestained Protein Standard) #P7718S	NewEngland BioLabs Inc.
Ribonuklease (RNase) A #EN0531	Thermo Fisher Scientific Inc.
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640- Medium mit Phenolrot, ohne Glutamin #31870025	(Gibco) Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-	(Gibco) Life Technologies (Thermo Fisher

Medium ohne Phenolrot, ohne Glutamin #32404014	Scientific Inc.)
Salzsäure ROTIPURAN® 37 % rauchend, p.a. #4625.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sodium dodecyl sulfate (SDS) ReagentPlus® #L4509	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszenz-Substrat #34577	Thermo Fisher Scientific Inc.
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrat #34075	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tetramethylethylenediamin (TEMED) #2367.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT) #M5655	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) #1083820500	Merck KGaA
Trypanblau-Lösung (0,4 %), liquid, steril filtriert #T8154	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Trypsin 0,05 %/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,02 %, (w/v) in PBS #T3924	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan- monolaurat) #P9416	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper.

	Antikörper mit Katalognummer (#)	Hersteller	Verdünnung	Typ	Molekular- gewicht
Primär- antikörper	AKT (pan) (C67E7) #4691	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	60 kDa
	Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP® #4060	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	60 kDa

Phospho-AKT (Thr308) (D25E6) XP® #13038	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	60 kDa
Caspase-3 (8G10) #9665	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	35 kDa (full-length), 17, 19 kDa (cleaved)
GAPDH (0411) #sc-47724	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1 : 2000	Maus	37 kDa
PARP #9542	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	116 kDa (full-length), 89 kDa (cleaved)
p70 S6 Kinase #9202	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	70, 85 kDa
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) #9234	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	70, 85 kDa
Src #2108	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	60 kDa
Phospho-Src Family (Tyr416) #2101	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	60 kDa
4E-BP1 (53H11) #9644	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	15 - 20 kDa
Phospho-4E-BP1 (Ser65) #9451	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 1000	Kaninchen	15 - 20 kDa

Sekundär-antikörper	Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert #7076S	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 3000	Pferd	/
	Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert #7074S	Cell Signaling Technology Inc.	1 : 3000	Ziege	/

2.1.5 Medikamente

Tabelle 5: Medikamente für die Behandlung.

Medikamente mit Katalognummer (#)	Hersteller
Dasatinib #D-3307	LC Laboratories
Rapamycin #R-5000	LC Laboratories
Irinotecan (SN-38) #2684	Tocris Bioscience (Bio-Techne Corporation)
Temozolomid #2226-10	BioVision Inc.
Vistusertib (AZD2014) #HY-15247	Hycultec GmbH

Die Medikamente wurden entsprechend der mitgelieferten Datenblätter in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die gelösten Medikamente wurden maximal fünf Mal aufgetaut und wieder eingefroren, um die Wirkung der jeweiligen Medikamente nicht zu beeinträchtigen. Nach dem Auftauen wurde durch sorgfältiges Vortexen der Aliquots sichergestellt, dass in diesen das jeweilige Medikament in einer gleich verteilten Substanzkonzentration vorlag.

2.1.6 Zellkultur

2.1.6.1 Zelllinien

Die verwendeten Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 mit ihrer charakteristischen Morphologie, ihrem *MYCN*-Status, ihrer Herkunft und ihrer DSMZ-Nummer können Tabelle 6 entnommen werden. Die Zelllinien wurden in ihrem zugehörigen Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.1.6.2) in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Diese wurden etwa zweimal pro Woche bei einer Konfluenz zwischen 70 - 100 % passagiert. Bei zu

geringer Konfluenz erfolgte nur ein Wechsel des jeweiligen Zellkulturmediums. Das Splitverhältnis der Zelllinien lag etwa zwischen 1 : 2 und 1 : 8.

Kelly

Die Neuroblastom-Zelllinie Kelly wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Die Zellen wurden 1983 von einem ein Jahr alten Mädchen mit Neuroblastom gewonnen (144). Die adhärent wachsende Zelllinie bildet sowohl runde als auch spindelförmige Zellen mit Neuriten und wächst als Mono- und Multilayer (Abbildung 5). In der Zelllinie Kelly liegt neben einer 100-fachen *MYCN*-Amplifikation auch eine *ALK*- und *TP53*-Mutation sowie die Deletion von Chromosom 1p vor (144).

SK-N-BE(2)

Die Neuroblastom-Zelllinie SK-N-BE(2) wurde ebenfalls von der DSMZ gekauft. Die Zellen wurden 1972 aus dem Knochenmark eines 22 Monate alten Jungen mit disseminiertem Neuroblastom nach zahlreichen Chemotherapie- und Bestrahlungszyklen gewonnen (145). Charakteristisch für die Zelllinie SK-N-BE(2) ist ihr adhärentes, epitheloides Wachstumsmuster als Monolayer (Abbildung 5) sowie neben einer *MYCN*-Amplifikation auch eine *TP53*-Mutation (145).

IMR-32

Ebenfalls wurde von der DSMZ die Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 bezogen. Diese wurde 1967 aus der abdominalen Masse eines einjährigen Jungen mit unbehandeltem Neuroblastom entnommen (146). Die Zelllinie IMR-32 wächst adhärent und erscheint fibroblastisch (Abbildung 5). Sie kommt als Monolayer wachsend vor, wobei eine Haufenbildung sowie schwimmende Zellen möglich sind. Neben einer *MYCN*-Amplifikation liegt auch eine *DDX1*-Amplifikation vor (146, 147).

Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Neuroblastom-Zelllinien: Morphologie, MYCN-Status, Herkunft und DSMZ-Nummer.

Zelllinie	Morphologie	MYCN-Status	Herkunft und DSMZ-Nummer (#)
Kelly	adhärentes Wachstum, runde oder spindelförmige Zellen mit Neuriten, als Mono- und Multilayer wachsend	amplifiziert	DSMZ #ACC 355
SK-N-BE(2)	adhärentes Wachstum, epitheloide Zellen, als Monolayer wachsend	amplifiziert	DSMZ #ACC 632
IMR-32	adhärentes Wachstum, Fibroblasten-ähnliche Zellen, als Monolayer wachsend, Haufenbildung und schwimmende Zellen möglich, Passagieren ohne PBS und Trypsin/EDTA	amplifiziert	DSMZ #ACC 165

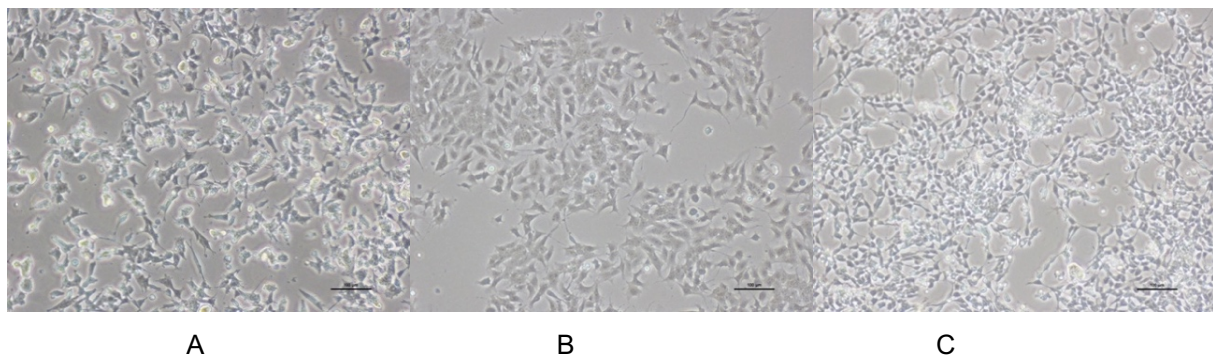


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme der Neuroblastom-Zelllinien.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien bei 100-facher Vergrößerung. A: Kelly, B: SK-N-BE(2) und C: IMR-32. Maßstabsleiste: 100 µm.

2.1.6.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Die jeweiligen Medien wurde ein- bis zweimal pro Monat frisch hergestellt und dauerhaft im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Kelly-Zellkulturmedium:

1x Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit Phenolrot, 10 % (v/v) fetal calf serum (FCS), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), 2 mM L-Glutamin (L-Gln)

SK-N-BE(2)-Zellkulturmedium:

½ x *Eagle's minimum essential medium* (EMEM), ½ x Ham's F-12, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen/Strep, 2 mM L-Gln

IMR-32-Zellkulturmedium:

1x RPMI 1640 mit Phenolrot, 20 % (v/v) FCS, 1 % Pen/Strep, 1x *non-essential amino acids* (NEAA)

Einfriermedium für die Kryokonservierung:

FCS (wurde frisch vor dem Einfrieren der Zellen hergestellt und danach verworfen), 10 % (v/v) DMSO

2.1.7 Puffer und Reagenzien für den Westernblot

APS 10 %:

1 g Ammoniumpersulfat (APS), mit Millipore®-Wasser auf 10 ml auffüllen; Lagerung der Aliquots (1 ml) bei -20 °C

SDS 10 %:

10 g Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) (unter dem Abzug abwiegen), mit Millipore®-Wasser auf 80 ml auffüllen, erhitzen, mit Millipore®-Wasser auf 100 ml auffüllen

Tris 0,5 M, pH-Wert 6,8:

15,14 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) ($M_{\text{Tris}} = 121,14 \text{ g/mol}$), mit Millipore®-Wasser auf 200 ml auffüllen, pH-Wert mit Salzsäure auf 6,8 einstellen, mit Millipore®-Wasser auf 250 ml auffüllen

Tris 1,5 M, pH-Wert 8,8:

45,43 g Tris ($M_{\text{Tris}} = 121,14 \text{ g/mol}$), mit Millipore®-Wasser auf 200 ml auffüllen, pH-Wert mit Salzsäure auf 8,8 einstellen, mit Millipore®-Wasser 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®-Wasser auf 1000 ml auffüllen

1x:

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

100 ml 10 x-SDS-Laufpuffer, 900 ml Millipore®-Wasser

SDS-Ladepuffer:

5 ml 0,5 M Tris, 8 ml 10 % SDS, 4 ml Glycerin, 21 ml Millipore®-Wasser, Bromphenolblau nach Augenmaß hinzugeben

Transfer-Puffer:

10x:

250 mM Tris (30,3 g), 1,92 M Glycin (144,13 g), mit Millipore®-Wasser auf 800 ml auffüllen, pH-Wert mit Salzsäure auf 8,5 einstellen, mit Millipore®-Wasser auf 1000 ml auffüllen

1x:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Ethanol

700 ml Millipore®-Wasser, 100 ml 10x-Transferpuffer, 200 ml Ethanol ($\geq 99,8 \%$) (Reihenfolge wichtig, da sich sonst Salzpräzipitate bilden); Lagerung des 1x-Transferpuffers bei 4 °C

Tris-buffered saline (TBS)-Waschpuffer:

10x Tris-buffered saline (TBS):

100 mM Tris (24,2 g), 1,5 M Natriumchlorid (87,8 g), mit Millipore®-Wasser auf 800 ml auffüllen, pH-Wert mit Salzsäure auf 7,5 einstellen, mit Millipore®-Wasser auf 1000 ml auffüllen

1x Tris-buffered saline with Tween® 20 (TBS-T):

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

100 ml 10x-TBS, 900 ml Millipore®-Wasser, 1 ml Tween® 20

2.1.8 Software

Tabelle 7: Software.

Software	Hersteller
CalcuSyn Version 2.0	BIOSOFT (Acropolis Company Ltd.)
CLARIOstar® MARS Data Analysis Software 3.32	BMG Labtech GmbH
CLARIOstar® Reader Control Software 5.40 R3	BMG Labtech GmbH
EndNote 20	Clarivate PLC
GraphPad Prism 10	GraphPad Software Inc.
ImageJ Version 1.53	Wayne Rasband (National Institutes of Health (NIH))
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation
Microsoft Word	Microsoft Corporation
NIS Elements Imaging Software F Package 3.22	Nikon Corporation

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur, Passage und Aussaat

2.2.1.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 erfolgte im Zellkulturmedium der jeweiligen Zelllinie (siehe Kapitel 2.1.6.2) in 75 cm²-Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. In der Zellkulturbank wurden die Arbeiten stets unter sterilen Bedingungen erledigt und die Arbeitsflächen und verwendeten Materialien mehrmals mit 70-prozentigem Propanol desinfiziert.

2.2.1.2 Passage

Die verwendeten Zelllinien wurden in der Regel zwei Mal pro Woche passagiert. Dabei wurden die Zellen zunächst unter dem Mikroskop beurteilt und bei einer vorliegenden

Konfluenz von 70 - 100 % passagiert. Betrug die Konfluenz der Zellen weniger als 70 %, dann wurde nur ein Mediumwechsel durchgeführt. Für die Passage wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml 1x *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Der Waschvorgang dient dem Entfernen von im Zellkulturmedium enthaltenen Magnesium- und Calciumionen, denn diese würden die darauffolgende Trypsin-Reaktion blockieren und so das Ablösen des Zellrasens vom Flaschenboden verhindern. Danach wurden die Zellen für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur trypsinisiert (1,8 ml 0,05 % Trypsin/EDTA pro 75 cm²-Zellkulturflasche). Das Stoppen der Trypsin-Reaktion erfolgte mit 10,2 ml frischem Zellkulturmedium der jeweiligen Zelllinie bei sichtbarer Ablösung des Zellrasens vom Flaschenboden. Der Flaschenboden wurde gründlich mit frischem Zellkulturmedium abgespült und die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Entsprechend des Splitverhältnisses, welches abhängig von der Konfluenz und der jeweiligen Zelllinie etwa zwischen 1 : 2 und 1 : 8 lag, wurde die Medium-Zell-Suspension in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und auf 12 ml pro 75 cm² Zellkulturflasche mit frischem Zellkulturmedium aufgefüllt.

Der Waschschritt mit 1x PBS sowie das Ablösen der Zellen mit Trypsin wurde bei der Zelllinie IMR-32 ausgelassen, da sich die Zellen problemlos durch Abspülen mit frischem Zellkulturmedium vom Flaschenboden ablösen ließen. Lediglich für die Aussaat in 24- oder 96-Well-Platten wurden die IMR-32-Zellen kurz mit 1x PBS gewaschen und trypsinisiert, da dadurch die Zellen besser vereinzelt werden konnten und somit leichter mit der Neubauer-Zählkammer gezählt werden konnten.

2.2.1.3 Aussaat

Um die Zellen in 24- oder 96-Well-Platten auszusäen, wurde wie beim Passagieren vorgegangen und die Zellen in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt (siehe Kapitel 2.2.2) und anschließend wurde die für den Versuch benötigte Zellzahl und das entsprechende Volumen Zellkulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Vor dem Ausplattieren wurde die Zellsuspension durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Für die Aussaat in der 96-Well-Platte wurde ein Mehrfachdispenser (*HandyStep*[®] S) verwendet.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Zunächst wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, von der Zellkulturflasche gelöst und mehrmals resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl der Zellsuspension in einem 1,5 ml Reagiergefäß mit 20 µl Trypanblau-Lösung (0,2 % in 1x PBS) vermischt. Durch die Trypanblau-Lösung werden tote Zellen intensiv blau angefärbt, da der Farbstoff nicht in lebende Zelle eindringen und diese anfärben kann. Unter dem Mikroskop kann dadurch zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Für die Auszählung wurden 10 µl der verdünnten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und alle vier Eckquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro Milliliter} = \text{durchschnittlich gezählte Zellzahl pro Eckquadrat} \cdot \text{VF} \cdot \text{KF}$$

Der Verdünnungsfaktor (VF) der Trypanblau-Lösung beträgt 2 und der Kammerfaktor (KF) beträgt 10^4 . Dieser berechnet sich aus dem Volumen von $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$ zwischen Neubauer-Zählkammer und Deckglas. Um die Zellzahl pro Milliliter zu berechnen, muss eine Multiplikation mit dem Kammerfaktor ($= 10^4$) erfolgen.

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Nach dem Waschschrift mit 1x PBS und der anschließenden Trypsinierung, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, erfolgte das Stoppen der Trypsin-Reaktion mit Zellkulturmedium, welches 10-prozentiges FCS enthält. Mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen ausgezählt (siehe Kapitel 2.2.2), damit pro CryoPure Röhre etwa 5×10^6 Zellen enthalten waren. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert (5 Minuten bei 300 rcf bei 20 °C) und im Anschluss daran wurde das Einfriermedium für die Kryokonservierung (1 ml, bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO) hinzugefügt. Die CryoPure Röhren wurden zuerst in einem isolierenden Behälter gelagert, dann für mindestens 6 Stunden bei -80 °C eingefroren und anschließend dauerhaft im Stickstofftank bei -200 °C gelagert.

Ab dem Überschreiten einer gewissen Passage bzw. bei mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Zellen wurden neue Zellen mit einer jungen Passage (in der Regel

< 10) aus dem Stickstofftank aufgetaut. Die CryoPure Röhren wurden zunächst aus dem Stickstofftank geholt und möglichst rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension mit 10 ml frisch angesetzttem Zellkulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Diese wurde zentrifugiert (siehe oberer Abschnitt), um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen und die Zellen wurden dann mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zell-Medium-Suspension wurde anschließend in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank gelagert. Vor der Verwendung in Versuchen wurden die Zellen mindestens dreimal passagiert.

2.2.4 MTT-Assay zur IC₅₀-Bestimmung

Zunächst wurden die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) der jeweiligen Medikamente bei Einzelbehandlung und dann bei Doppelbehandlung für die Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 bestimmt. Einige IC₅₀-Werte wurden bereits von Marie Matthes in laborinternen Vorversuchen ermittelt und von Johannes Leister (148) und Rebecca Wätzig (149) bestätigt. Die Versuche wurden wiederholt und die ermittelten IC₅₀-Werte bestätigt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Ein MTT-Assay wird zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von lebenden Zellen angewendet (Zellviabilitätsassay). Die Zellen werden mit dem gelben Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) behandelt. In vitalen Zellen wird das gelbe Salz in das dunkelblau-violette Formazan verstoffwechselt (Abbildung 6). In toten Zellen ist keine Reduktion von MTT zu Formazan mehr möglich. Formazan hat sein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 570 \text{ nm}$, wodurch mittels photometrischer Messung die Absorptionsänderung genutzt wird, um den Anteil vitaler Zellen in einer Probe zu bestimmen (150).

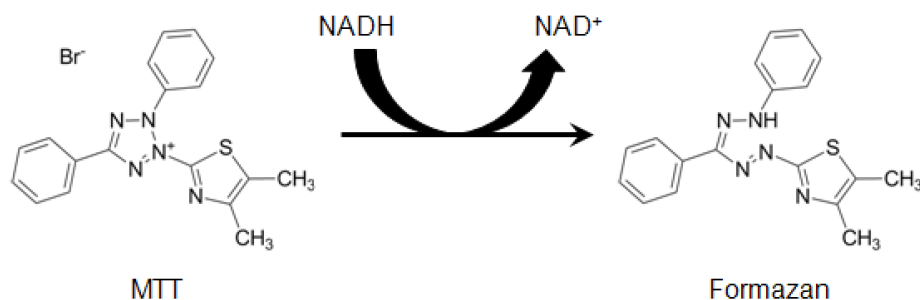


Abbildung 6: Metabolische Umwandlung von MTT in vitalen Zellen.

Darstellung der metabolischen Umwandlung des gelben MTT-Tetrazoliumsalz in das dunkelblau-violette Formazan in vitalen Zellen. MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, NAD⁺: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form), NADH: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form). Abbildung nach Riss et al., *Cell Viability Assays*, S. 357 (150).

2.2.5 IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung

Für die Durchführung der IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung wurden für die Medikamente Dasatinib, Rapamycin, Vistusertib, Irinotecan und Temozolomid Titrationsreihen mit je fünf Verdünnungsstufen festgelegt. Für die Messung der Zellviabilität im Rahmen des RIST-Therapieschemas an „Tag 4“ wurde, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, ein MTT-Assay durchgeführt.

Für die Durchführung der IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung wurden an „Tag 0“ 30.000 Kelly-Zellen, 10.000 SK-N-BE(2)-Zellen und 40.000 IMR-32-Zellen pro Well in 100 µl Zell-Medium-Suspension in 96-Well-Platten ausplattiert. Die äußeren Reihen der 96-Well-Platten wurden zum Verdunstungsschutz nicht mit Zellen, sondern mit je 200 µl 1x PBS befüllt. Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

An Tag „1“, also nach 24 Stunden, wurden Triplikate der ausplattierten Zellen mit je 100 µl Medikamentenverdünnung pro Well behandelt, sodass sich insgesamt ein Volumen von 200 µl in jedem Well befand. Vor der Behandlung wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und bei einer Konfluenz zwischen 30 - 50 % behandelt. Die verwendeten Medikamente waren in DMSO gelöst (siehe Kapitel 2.1.5) und wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die jeweiligen Verdünnungsstufen für die Medikamente wurden im entsprechenden Zellkulturmedium für jede Zelllinie separat hergestellt. Für die IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung wurden Titrationsreihen mit je fünf Verdünnungsstufen festgelegt. Als Negativkontrolle wurde ein Triplikat an Tag „0“ mit je 100 µl Zellkulturmedium pro Well befüllt und an Tag „1“ wurden erneut

je 100 µl Zellkulturmedium pro Well hinzugefügt. Als Lebendkontrolle wurde an Tag „1“ ein Triplikat der ausplattierten Zellen mit je 100 µl DMSO-Verdünnung behandelt. Dabei entsprach die DMSO-Verdünnung der maximalen DMSO-Konzentration in den mit Medikamenten behandelten Wells, wobei diese 1 % nicht überstieg. Bei der Auswertung wurde die Lebendkontrolle mit 100-prozentiger Zellviabilität gleichgesetzt und die gemessenen Zellviabilitäten wurden dieser entsprechend normalisiert, wodurch der Einfluss von DMSO als Lösungsmittel aus der Berechnung ausgeschlossen wurde. Wenn in den mit Medikamenten behandelten Wells die maximale DMSO-Konzentration unter 0,1 % lag, dann wurde die entsprechende Lebendkontrolle an Tag „1“ mit 100 µl Zellkulturmedium pro Well behandelt. Bei einer derart geringen Konzentration von DMSO pro Well ist von keinem Einfluss von DMSO auf die Zellviabilität auszugehen. Nach der Behandlung wurden die Zellen für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert und in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert.

An Tag „3“, also einen Tag vor der Messung der Zellviabilität, wurde die MTT-Stammlösung (5 mg/ml) angesetzt. Dafür wurde unter der Sterilbank mit ausgeschaltetem Licht 100 mg MTT (Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid) in 20 ml 1x PBS durch mehrmaliges Invertieren und Auf- und Abpipettieren gelöst. Die MTT-Stammlösung wurde bei 4 °C und mit Alufolie vor Licht schützend gelagert und nach Herstellung maximal 4 Wochen verwendet.

An Tag „4“, also 72 Stunden nach der Behandlung der Zellen, erfolgte die MTT-Reaktion und photometrische Messung der Zellviabilität (Abbildung 7). Vor der Messung der Zellviabilität wurden zunächst die Konfluenzen der jeweiligen Triplikate unter dem Mikroskop betrachtet und notiert. Dann wurde die MTT-Arbeitslösung (1 mg/ml) hergestellt, welche sich aus einem Teil MTT-Stammlösung und fünf Teilen RPMI 1640 ohne Phenolrot zusammensetzt. Diese wurde ohne Licht unter der Sterilbank für jede photometrische Messung frisch angesetzt. Zunächst wurde unter der Sterilbank vorsichtig das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt, ebenso wurde ein Triplikat mit 1x PBS abgesaugt, welches als Leerkontrolle diente. In jedes Well wurden 100 µl MTT-Arbeitslösung pipettiert und die Platte anschließend für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die MTT-Reaktion durch die Zugabe von 100 µl Isopropanol pro Well abgestoppt und die hierbei entstehenden dunkelblauen Formazan-Kristalle wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vollständig gelöst. Dann wurde die Platte mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt, bei

Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und abschließend wurde mit dem *CLARIOStar® Plus Microplate Reader* die Zellviabilität bei $\lambda = 570$ nm photometrisch gemessen. Vor dem Einführen der Platte in den *CLARIOStar® Plus Microplate Reader* wurden die einzelnen Wells auf Luftblasen überprüft und gegebenenfalls mit einer Pipette entfernt.

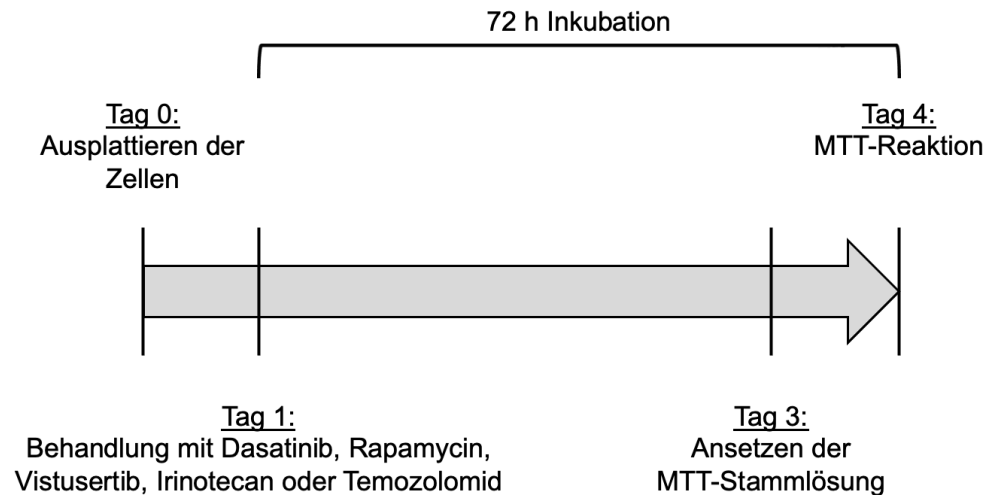


Abbildung 7: Schematische Darstellung der IC_{50} -Bestimmung bei Einzelbehandlung.
Darstellung der im Labor durchgeführten IC_{50} -Bestimmung bei Einzelbehandlung.

Für die Auswertung des MTT-Assays wurden die gemessenen Werte um die der Leerkontrollen korrigiert, mit *Microsoft Excel* in Prozent (%) berechnet und anschließend wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen anhand der DMSO-behandelten Lebendkontrolle normalisiert. Die weitere Auswertung mit IC_{50} -Wert-Ermittlung und Erstellung der Viabilitätskurven erfolgte mittels der Software *GraphPad Prism*.

2.2.6 IC_{50} -Bestimmung bei Doppelbehandlung

Für die Durchführung des MTT-Assays wurden an „Tag 0“ 30.000 Kelly-Zellen, 10.000 SK-N-BE(2)-Zellen und 40.000 IMR-32-Zellen pro Well in 100 μ l Zell-Medium-Suspension in 96-Well-Platten ausplattiert. Die äußeren Reihen der 96-Well-Platten wurden zum Verdunstungsschutz nicht mit Zellen, sondern mit je 200 μ l 1x PBS befüllt. Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

An Tag „1“, also nach 24 Stunden, wurden Triplikate der ausplattierten Zellen mit je 50 μ l von beiden Medikamentenverdünnungen pro Well behandelt, sodass sich insgesamt ein Volumen von 200 μ l in jedem Well befand. Vor der Behandlung wurden

die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und bei einer Konfluenz zwischen 30 – 50 % behandelt. Die verwendeten Medikamente waren in DMSO gelöst (siehe Kapitel 2.1.5) und wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die jeweiligen Verdünnungsstufen für die Medikamente wurden im entsprechenden Zellkulturmedium für jede Zelllinie separat hergestellt. Für die IC_{50} -Bestimmung bei Doppelbehandlung wurden Titrationsreihen mit je fünf Verdünnungsstufen pro Medikament festgelegt (Abbildung 8). Dieses Titrationsschema wurde von Johannes Leister (148) und Rebecca Wätzig (45) im Labor eingeführt und etabliert.

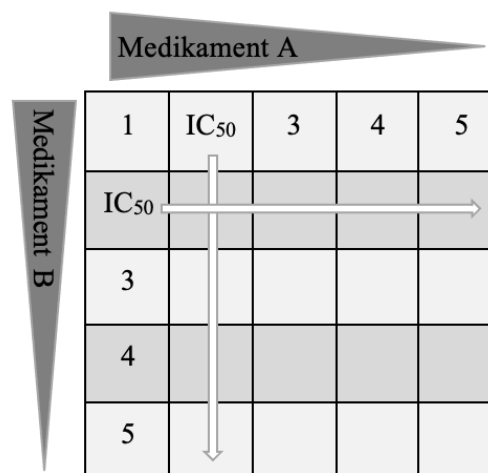


Abbildung 8: Titrationsschema für die IC_{50} -Bestimmung bei Doppelbehandlung.

Darstellung des Titrationsschemas für die IC_{50} -Bestimmung bei Doppelbehandlung mit zwei unterschiedlichen Medikamenten (Medikament A und Medikament B). Die Medikamentenkonzentrationen nehmen von 1 nach 5 ab. Die Verdünnungsstufe 2 entspricht bei der ersten Durchführung dem IC_{50} -Wert bei Einzelbehandlung mit dem jeweiligen Medikament. Bei der weiteren Durchführung von MTT-Assays wurden die Medikamentenkonzentrationen entsprechend den ausgewerteten Ergebnissen angepasst. Abbildung nach Rebecca Wätzig, Dissertation, Universitätsklinikum Regensburg, 2022, Titel: „Testung verschiedener mTOR-Inhibitoren zur Verbesserung der RIST-Therapie in einem in-vitro Modell des Neuroblastoms“ (45).

Die Medikamentenkonzentrationen wurden von 1 nach 5 fallend berechnet. Die Titrationsschritte für die jeweiligen Felder wurden abhängig von den Viabilitätskurven ausgewählt. Wenn die Viabilitätskurve des Medikaments steil verläuft, dann wurden kleine Titrationsschritte bzw. nur eine geringe Änderung der Medikamentenkonzentration gewählt, da bereits eine geringe Konzentrationsänderung zu einer deutlichen Viabilitätsänderung führt. Wenn die Viabilitätskurve des Medikaments hingegen flach verläuft, dann wurden große Titrationsschritte gewählt, da erst eine größere Änderung der Medikamentenkonzentration zu einer deutlichen Viabilitätsänderung führt. Diese Vorversuche dienen der groben Einschätzung des

Bereiches für die IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung. Die endgültige Festlegung für die IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung erfolgte nach der Durchführung von mindestens drei unabhängig voneinander wiederholten MTT-Assays bei denen die Zellviabilität bei etwa 50 % lag. Das Ansetzen der MTT-Stammlösung an Tag „3“ und die MTT-Reaktion und photometrische Messung der Zellviabilität an Tag „4“ erfolgte wie bei der IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung in Kapitel 2.2.5.

Nach der Ermittlung der IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung wurde der Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) für jedes Medikament wie folgt berechnet:

$$\text{DRF} = \frac{\text{IC}_{50}\text{-Wert bei Einzelbehandlung}}{\text{IC}_{50}\text{-Wert bei Doppelbehandlung}} \quad (151)$$

Der DRF gibt an, um welchen Faktor die Dosis bei der Kombination der einzelnen Medikamente (= Doppelbehandlung) im Vergleich zur Einzelbehandlung reduziert werden kann, damit weiterhin eine 50-prozentige Viabilitätshemmung der Zellen erreicht wird.

2.2.7 Untersuchung des *Combination Index* (CI) bei Doppelbehandlung

Durch die Kombination von zwei oder mehreren Medikamenten können synergistische, additive oder antagonistische Effekte auftreten (27). Synergismus bedeutet, dass der Effekt der Kombination der Medikamente größer ist als der kumulative Effekt der einzelnen Medikamente. Bei einem additiven Effekt entspricht der Effekt bei Kombination der Medikamente demselben Effekt als bei Einzelbehandlung (27, 152). Antagonismus hingegen bedeutet, dass der Effekt der Kombination der Medikamente geringer ist als der kumulative Effekt der einzelnen Medikamente (152).

Der *Combination Index* wird nach der Chou-Talalay-Methode berechnet und ermöglicht eine quantitative Aussage über den durch die Kombinationstherapie erzielten Effekt. Die Berechnung erfolgt mit der nachstehenden Formel:

$$\text{CI} = \frac{D_A}{(D_X)_A} + \frac{D_B}{(D_X)_B} + \frac{D_A \cdot D_B}{(D_X)_A \cdot (D_X)_B} \quad (153, 154)$$

Hierbei stellt „D“ die Dosis der kombinierten Medikamente A und B dar und „D_x“ den durch die beiden Medikamente entstehenden Effekt bei Dosis „D“.

Der Effekt bei IC₅₀-Werten wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{CI}_{\text{IC}_{50}} = \frac{\text{IC}_{50(A+B)}}{\text{IC}_{50A}} + \frac{\text{IC}_{50(A+B)}}{\text{IC}_{50B}} \quad (153, 154)$$

Die CI-Werte wurden durch die Software *CalcuSyn*, welche auf der Chou-Talalay-Methode beruht, berechnet. Der daraus resultierende Effekt der CI-Werte ist in der folgenden Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Bedeutung der Combination Index (CI)-Werte.

Bedeutung der CI-Werte nach Chou, T. C. (2008), S. 2065 (155).

CI-Wert	Bedeutung
< 0,1	sehr starker Synergismus
0,1 - 0,3	starker Synergismus
0,3 - 0,7	Synergismus
0,7 - 0,85	mäßiger Synergismus
0,85 - 0,9	leichter Synergismus
0,9 - 1,1	additiver Effekt
1,1 - 1,2	leichter Antagonismus
1,2 - 1,45	mäßiger Antagonismus
1,45 - 3,3	Antagonismus
3,3 - 10	starker Antagonismus
> 10	sehr starker Antagonismus

Zur Berechnung des *Combination Index* wurden neben den Zellviabilitäten für die Einzelbehandlung mit den Medikamenten auch die Zellviabilitäten für die Doppelbehandlung mit den Medikamenten benötigt. An „Tag 1“ wurden die Zellen mit fünf Konzentrationsstufen von Medikament A und Medikament B in den Kombinationen $A_1 + B_1$, $A_1 + B_2$, ..., $A_5 + B_5$ behandelt. Der Verdünnungsfaktor betrug für beide Medikamente über alle Konzentrationsstufen hinweg 1,5. Die Negativ- und Lebendkontrollen erfolgten wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Für die Untersuchung auf Synergismus bzw. Antagonismus mittels der Software *CalcuSyn* wurden die anhand der Lebendkontrolle normalisierten Viabilitätswerte der verschiedenen Konzentrationsstufen bei Einzel- und Doppelbehandlung mit der folgenden Formel umgerechnet und in *CalcuSyn* eingetragen:

$$FA \text{ (fraction affected)} = 1 - \left(\frac{\text{Viabilität (\%)}}{100} \right) \quad (156, 157)$$

2.2.8 Durchführung der RIST- und VIST-Therapie *in vitro*

Für die Durchführung der RIST- und VIST-Therapie *in vitro* wurden die Medikamente Dasatinib, Rapamycin, Vistusertib, Irinotecan und Temozolomid kombiniert. Die entsprechenden IC₅₀-Werte für die molekular-zielgerichteten Inhibitoren können Tabelle 11 in Kapitel 3.1 und die IC₅₀-Werte für die Chemotherapeutika können Tabelle 13 in Kapitel 3.2 entnommen werden. Für die Messung der Zellviabilität im Rahmen des RIST-Therapieschemas an „Tag 8“ wurde, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, ein MTT-Assay durchgeführt.

Für die Durchführung der RIST- und VIST-Therapie *in vitro* wurden an „Tag 0“ 30.000 Kelly-Zellen, 10.000 SK-N-BE(2)-Zellen und 40.000 IMR-32-Zellen pro Well in 100 µl Zell-Medium-Suspension in 96-Well-Platten ausplattiert. Um die Zellviabilitäten zu normalisieren, wurde eine DMSO-Kontrolle als Lebendkontrolle mit 7500 Zellen pro Well für die Kelly-Zellen, mit 2500 Zellen pro Well für die SK-N-BE(2)-Zellen und mit 10.000 Zellen pro Well für die IMR-32-Zellen ausplattiert. Die äußeren Reihen der 96-Well-Platten wurden zum Verdunstungsschutz nicht mit Zellen, sondern mit je 200 µl 1x PBS befüllt. Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

An Tag „1“, also nach 24 Stunden, erfolgte die Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) bzw. Dasatinib plus Vistusertib (D+V), welche als Vorbehandlung für das RIST- bzw. VIST-Therapieschema dient. Es wurden Triplikate der ausplattierten Zellen mit je 50 µl von beiden Medikamentenverdünnungen pro Well behandelt, sodass sich insgesamt ein Volumen von 200 µl in jedem Well befand. Die Kontrollzellen wurden mit der maximal verwendeten DMSO-Konzentration als Lebendkontrolle zur Normalisierung der Viabilitäten und mit Zellkulturmedium als Negativkontrolle behandelt. Vor der Behandlung wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und bei einer Konfluenz zwischen 30 - 50 % behandelt. Die verwendeten Medikamente waren in DMSO gelöst (siehe Kapitel 2.1.5) und wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die jeweiligen Verdünnungsstufen für die Medikamente wurden im entsprechenden Zellkulturmedium für jede Zelllinie separat hergestellt.

An Tag „4“, also nach 72 Stunden, wurde bei den ausplattierten Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt und es folgte eine 24-stündige Pause vor der Behandlung mit den Chemotherapeutika.

An Tag „5“ wurden die vorbehandelten Zellen mit Irinotecan plus Temozolomid (I+T) und die Kontrollzellen mit der maximal verwendeten DMSO-Konzentration behandelt. An Tag „8“, also 72 Stunden nach der Behandlung mit den Chemotherapeutika, erfolgte die MTT-Reaktion und photometrische Messung der Zellviabilität (Abbildung 9). Dies erfolgte wie bei der IC₅₀-Bestimmung bei Einzelbehandlung in Kapitel 2.2.5.

Zur Aktivitätskontrolle der Medikamente wurden zusätzlich Kontrollen für die Einzel- und Doppelbehandlungen, wie in den Kapiteln 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, durchgeführt („Tag 0“: Ausplattieren; „Tag 1“: Behandlung mit Dasatinib, Rapamycin, Vistusertib, Irinotecan, Temozolomid, Dasatinib plus Rapamycin (D+R), Dasatinib plus Vistusertib (D+V) bzw. Irinotecan plus Temozolomid (I+T); „Tag 4“: MTT-Reaktion und Messung der Zellviabilität). Die Behandlungen erfolgten mit den IC₅₀-Werten bei Einzel- bzw. Doppelbehandlung und den 1,5-fach erhöhten IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) (siehe Kapitel 3.1 und 3.2, Tabellen 10, 11, 12 und 13).

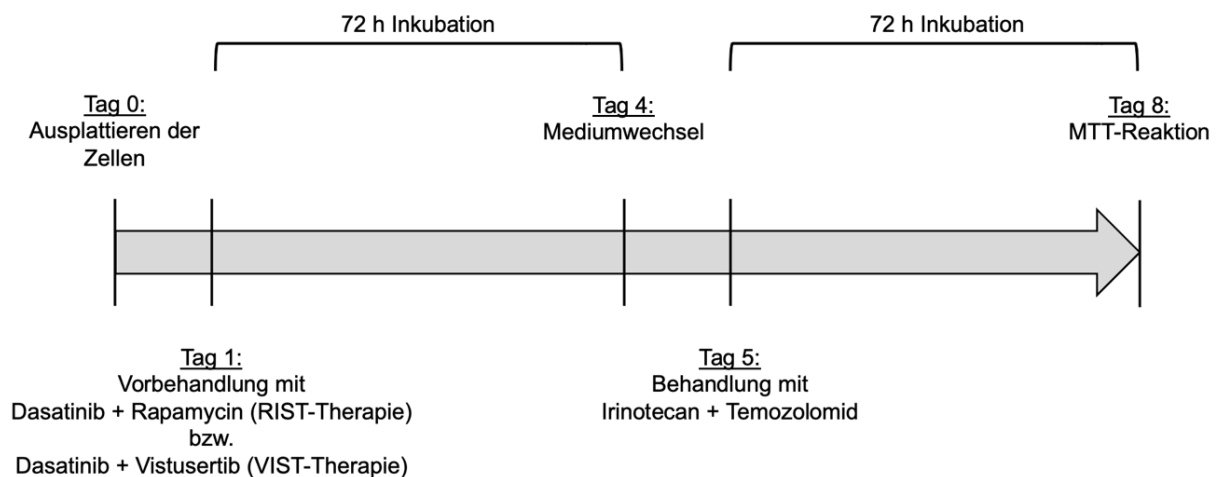


Abbildung 9: Schematische Darstellung der RIST- und VIST-Therapie in vitro.

Darstellung der im Labor durchgeführten RIST- und VIST-Therapie in vitro. RIST-Therapie: Dasatinib (Sprycel®) + Rapamycin und Irinotecan + Temozolomid, VIST-Therapie: Dasatinib (Sprycel®) + Vistusertib und Irinotecan + Temozolomid. Abbildung modifiziert nach Rebecca Wätzig, Dissertation, Universitätsklinikum Regensburg, 2022, Titel: „Testung verschiedener mTOR-Inhibitoren zur Verbesserung der RIST-Therapie in einem in-vitro Modell des Neuroblastoms“ (45).

2.2.9 Durchflusszytometrie

Für die Durchführung der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) wurden in 12-Well-Platten an Tag „0“ $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in 1 ml für zu behandelnde Kelly-Zellen und 2×10^5 Zellen pro Well in 1 ml für DMSO-Kontrollen, $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in 1 ml für zu behandelnde SK-N-BE(2)-Zellen und 6×10^4 Zellen pro Well in 1 ml für DMSO-Kontrollen, 3×10^5 Zellen pro Well in 1 ml für zu behandelnde IMR-32-Zellen und $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in 1 ml für DMSO-Kontrollen ausplattiert. Leere Wells wurden zum Verdunstungsschutz mit je 2 ml 1x PBS befüllt. Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

An Tag „1“, also nach 24 Stunden, wurden Triplikate der ausplattierten Zellen mit dem IC_{50} -Wert und dem doppelten IC_{50} -Wert von Vistusertib für die jeweilige Zelllinie (siehe Kapitel 3.1, Tabelle 10) behandelt. Dafür wurden diese mit je 1 ml Medikamentenverdünnung behandelt, sodass sich insgesamt ein Volumen von 2 ml in jedem Well befand. Vor der Behandlung wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und bei einer Konfluenz zwischen 30 - 50 % behandelt. Die verwendeten Medikamente waren in DMSO gelöst (siehe Kapitel 2.1.5) und wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die jeweiligen Verdünnungsstufen für Vistusertib wurden im entsprechenden Zellkulturmedium für jede Zelllinie separat hergestellt.

An Tag „3“, also 48 Stunden nach der Behandlung, wurden die Zellen nach abgewandeltem *Miltenyi-Protokoll* fixiert. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt, dann wurden die Wells mit je 1 ml 1x PBS gewaschen, was anschließend wieder abgesaugt wurde. Danach wurden 0,3 ml Trypsin/EDTA pro Well hinzugefügt und für 1 - 5 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst hatten. Daraufhin wurde 1 ml Probenpuffer (1x PBS mit 1 % FCS) pro Well hinzugefügt. Für die Zelllinie IMR-32 war eine Trypsinierung nicht erforderlich, da sich die Zellen problemlos durch Abspülen mit Probenpuffer ablösen ließen. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden in FACS-Reaktionsgefäße überführt und in einen Kühlblock mit Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 8 Minuten bei 300 rcf und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und 2 ml Probenpuffer pro FACS-Reaktionsgefäß hinzugefügt und gevortext, sodass sich das Zellpellet gelöst hat. Daraufhin wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand wieder abgesaugt und das Zellpellet im Restvolumen von etwa 100 µl gelöst. Nachfolgend wurden die FACS-Reaktionsgefäße für etwa 10 Sekunden gevortext und anschließend wurde vorsichtig und tröpfchenweise

70-prozentiges eiskaltes Ethanol unter Vortexen hinzugegeben, um die Zellen zu fixieren. Die FACS-Reaktionsgefäße wurden mit einem Deckel verschlossen und für mindestens 18 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Nach mindestens 18 Stunden wurden pro FACS-Reaktionsgefäß 2 ml Probenpuffer hinzugefügt und vorsichtig gevortext. Im Anschluss daran wurden die FACS-Reaktionsgefäße für 10 Minuten bei 400 rcf und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Durch vorsichtiges Vortexen wurde das Zellpellet im Restvolumen gelöst. Danach wurden 0,4 ml Färbelösung pro FACS-Reaktionsgefäß (0,4 ml Probenpuffer, 20 µg Propidiumiodid und 0,2 mg Ribonuklease (RNase) A) hinzugefügt und vorsichtig gevortext, dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend am *MACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer* gemessen. Vor der Messung wurde die Zellsuspension in ein FACS-Reaktionsgefäß mit Zellsieb pipettiert, um das Gerät vor Verstopfung zu schützen.

2.2.10 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Proteinen mittels Westernblot-Analysen

Herstellung der Proteinlysate

Für die Herstellung der Proteinlysate wurden in 24-Well-Platten 225.000 Kelly-Zellen pro Well, 50.000 SK-N-BE(2)-Zellen pro Well und 250.000 IMR-32-Zellen pro Well ausgesät. Bei einer Konfluenz von 30 - 50 % wurden diese 24 Stunden später mit Rapamycin, Vistusertib, Dasatinib plus Rapamycin (D+R), Dasatinib plus Vistusertib (D+V) bzw. DMSO behandelt und nach 24 Stunden geerntet.

Vor der Ernte wurden zunächst die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, ihre Konfluenz beurteilt und anhand dieser die Menge des SDS-Ladepuffers festgelegt. 100 % Konfluenz variierte zwischen 350 und 400 µl SDS-Ladepuffer. Dann wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen entsprechend ihrer Konfluenz in SDS-Ladepuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Falls durch die Einzel- bzw. Doppelbehandlung viele Zellen abgeschwommen waren, wurden die Zellen samt ihrem Zellkulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 rcf und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die sowohl toten als auch lebenden Zellen ebenfalls in SDS-Ladepuffer aufgenommen. Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*,

SDS) werden die Proteine denaturiert und ihnen wird eine negative Ladung verliehen. Diese ist notwendig, damit die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel von der Anode zur Kathode wandern und nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Anschließend wurden die Proteinlysate gevortext und abzentrifugiert. Um die Zellen vollständig aufzuschließen und die genomische DNA zu zerkleinern, wurden die Proteinlysate jeweils zweimal für drei Sekunden lang mit dem *SONOPLUS Ultraschall-Homogenisator mini20* sonifiziert, dann erneut gevortext und abschließend abzentrifugiert. Eine Spaltung der Disulfidbrücken wurde durch die Zugabe von 5 % β -Mercaptoethanol (β -ME) und Erhitzen der Proben auf 95 °C im Heizblock (*ThermoMixer® C mit SmartBlock*) für 10 Minuten bei 400 rpm erreicht. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgte bei -20 °C.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*)

Mittels SDS-Page wurden die denaturierten Proteine aufgetrennt und mittels Westernblot wurden die Proteinbanden vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Abschließend wurden die Proteinbanden durch Färbung mit Antikörpern gegen das entsprechende Zielprotein sichtbar gemacht.

Für die SDS-PAGE wurde das Gelelektrophoresesystem *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* verwendet. Zunächst wurde das Trenngel (12,5 %), welches die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt, und dann das Sammelgel, welches der Beladung und Konzentrierung der Proben dient, gegossen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung der Trenn- bzw. Sammelgele.

Angaben der Materialien für die Herstellung von jeweils 2 Trenn- bzw. Sammelgelen.

Materialien	Trenngele (12,5 %)	Materialien	Sammelgele
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 Materialien Acryl/Bisacrylamid, TEMED und APS wurden bei 4 °C aufbewahrt, wohingegen die übrigen Materialien bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Nach der abschließenden Zugabe von TEMED wurde das Gel zügig in die Gelkammer pipettiert, da TEMED als Katalysator der radikalischen Polymerisation das Aushärten des Gels induziert. Das Trenngel wurde mit je 500 µl Isopropanol überschichtet und für 45 Minuten ausgehärtet. Im Anschluss an die Polymerisation das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel gegossen und in die Kammern pipettiert sowie zügig ein Kamm zur Bildung von 15 Taschen eingeschoben. Das Sammelgel wurde für 45 Minuten ausgehärtet und anschließend entweder direkt beladen oder über Nacht in 1x SDS-Laufpuffer bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag beladen.

Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit 1x SDS-Ladepuffer befüllt, ebenso wurden damit die Taschen vor dem Beladen gespült, um mögliche Verunreinigungen zu beseitigen. Die Proteinlysate wurden direkt nach Herstellung in die Taschen pipettiert (15 µl bzw. 20 µl) oder auf Eis aufgetaut und dann in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wurde 5 µl Proteinmarker (*Blue Prestained Protein Standard*, NewEngland BioLabs Inc.) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V und 350 mA für 45 - 50 Minuten.

Proteintransfer mittels Westernblot-Verfahren

In einer mit 1x Transferpuffer befüllten Wanne wurden pro Gel zwei Filzmatten und zwei Filterpapiere befeuchtet und, wie in Abbildung 10 dargestellt, aufgebaut. Während des Blottens wandern die aufgrund des SDS-Ladepuffers negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anode, wodurch die Proteine im Gel auf die Membran übertragen werden.

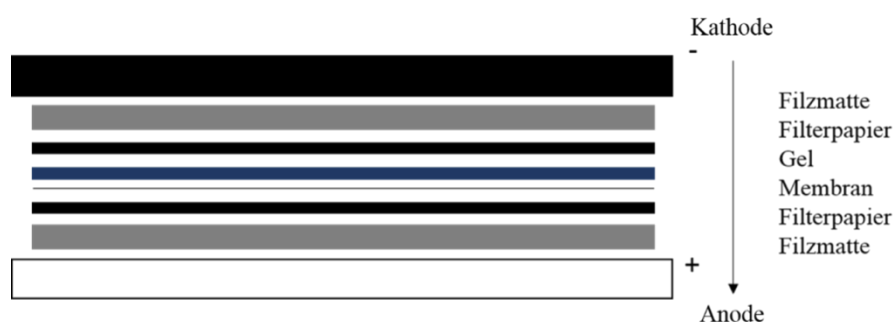


Abbildung 10: Aufbau des Westernblots.

Abbildung nach Rebecca Wätzig, Dissertation, Universitätsklinikum Regensburg, 2022, Titel: „Testung verschiedener mTOR-Inhibitoren zur Verbesserung der RIST-Therapie in einem in-vitro Modell des Neuroblastoms“ (45).

Für das Blotten wurde ein Magnetrührstäbchen, ein Gefrierblock und 1x Transferpuffer in die Transferkammer gegeben. Der Gefrierblock in der Transferkammer verhindert das Erhitzen des Transferpuffers während des Blottens. Der Transfer erfolgte bei 100 V und 350 mA für 1,5 Stunden. Danach wurden die Banden des Proteinmarkers mit Kugelschreiber markiert und freie Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation in 10 ml Waschpuffer (TBS-T) mit 2 % bovinem Serumalbumin (BSA) bei Raumtemperatur blockiert.

Immundetektion der Proteine und Nachweis mittels Chemilumineszenz

Nach dem Blockieren wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 5 Minuten mit Waschpuffer unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde unter konstantem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend erneut dreimal für je 5 Minuten mit Waschpuffer unter Schütteln gewaschen. Die verwendeten primären Antikörper wurden entsprechend der Produktdatenblätter in TBS-T mit 2 % BSA und 0,05 % Natriumazid (NaN₃) verdünnt (Tabelle 4) und bei 4 °C gelagert. Die sekundären Antikörper wurden stets frisch in TBS-T mit 2 % BSA ohne Natriumazid verdünnt, da diese an *horseadish peroxidase* (HRP) gekoppelt sind, was durch Natriumazid gehemmt wird.

Für die Entwicklung wurde das *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszenz-Substrat* oder das *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrat* verwendet. Die Entwicklungslösung besteht aus den beiden Substanzen *Stable Peroxide Solution* und *Luminol/Enhancer Solution*, welche im Verhältnis 1 : 1 (jeweils 500 µl) gemischt wurden. Anschließend wurde diese Lösung sorgfältig und gleichmäßig auf der gesamten Membran verteilt.

Zur Anfertigung der Aufnahmen wurde das *ChemiDoc™ Touch Imaging System* von Bio-Rad Laboratories Inc. verwendet und die Membran in transparenter Folie (Advansta Inc.) vor Verdunstung geschützt. Nach Anfertigung der Aufnahmen wurde die Membran bei 4 °C in TBS-T mit 0,05 % Natriumazid gelagert oder für weitere immunologische Färbungen mit anderen Antikörpern verwendet.

2.2.11 Statistische Verfahren

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden die gemessenen Zellviabilitäten auf die Vehikel (DMSO)-behandelte Kontrolle normalisiert [%], dann mittels *GraphPad Prism* in logarithmische Werte transformiert und auf 0 - 100 % normalisiert. Anschließend wurde eine nicht-lineare Regressionsanalyse durchgeführt und die Ergebnisse wurden graphisch als Viabilitätskurven dargestellt. Die IC₅₀-Werte wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Die Normalverteilung der Ergebnisse wurde durch den Shapiro-Wilk-Test mittels *GraphPad Prism* überprüft. Zur Signifikanzberechnung von Mittelwerten von mehr als drei zu untersuchenden Gruppen wurden einfaktorielle und zweifaktorielle Varianzanalysen (*analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt. Für Post-hoc-Analysen wurde der Tukey-Test verwendet. Es wurden keine konstanten Standardabweichungen für die *p*-Wert-Ermittlungen angenommen. *p*-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (ns) gewertet, *p*-Werte zwischen 0,01 und 0,05 als signifikant (*), *p*-Werte zwischen 0,001 und 0,01 als sehr signifikant (**) und *p*-Werte $< 0,001$ als hoch signifikant (***).

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte von Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib bei Einzel- und Doppelbehandlung

Zuerst erfolgte die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀). Diese gibt an, welche Konzentration eines Inhibitors (in diesem Fall eines Medikaments) benötigt wird, um *in vitro* einen biologischen Prozess um 50 % zu reduzieren (158). Nach der Bestimmung der IC₅₀-Werte bei Einzelbehandlung mit den molekular-zielgerichteten Inhibitoren Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib in den drei Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 wurden diese miteinander verglichen. Danach wurden die IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V) in den drei Neuroblastom-Zelllinien bestimmt und miteinander verglichen.

Die Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte 72 Stunden nach der Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren mittels Viabilitätsmessung (MTT-Assay). Laborintern wurden bei Vorversuchen bereits die IC₅₀-Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib in den drei Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 von Marie Matthes ermittelt. Von Rebecca Wätzig wurden die IC₅₀-Werte von Dasatinib und Rapamycin in den Zelllinien Kelly und IMR-32 in mindestens drei unabhängigen Versuchen bestätigt (149). Für die durchgeführten Versuche dieser Arbeit wurden die IC₅₀-Werte von Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib verifiziert, indem diese in mindestens drei unabhängigen Versuchen erneut bestätigt wurden. In der folgenden Abbildung 11 sind die Zellviabilitätskurven für die IC₅₀-Bestimmung der molekular-zielgerichteten Inhibitoren Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib in der Zelllinie SK-N-BE(2) dargestellt. Gezeigt ist die Zellviabilität in Prozent (%) in Abhängigkeit der logarithmischen Medikamentenkonzentration.

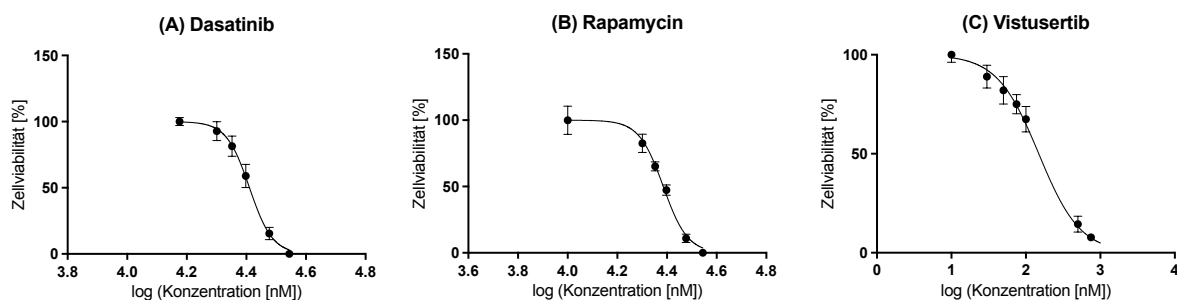


Abbildung 11: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie SK-N-BE(2) zur IC_{50} -Bestimmung der verwendeten molekular-zielgerichteten Inhibitoren.

Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren in einer 96-Well-Platte bei einer Konfluenz von etwa 30 - 50 % mit (A) Dasatinib, (B) Rapamycin, und (C) Vistusertib behandelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte 72 h nach der Behandlung mittels MTT-Assay. Die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib wurden von Marie Matthes in laborinternen Vorversuchen ermittelt und in dieser Arbeit bestätigt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

Die ermittelten IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung der Inhibitoren können aus Tabelle 10 entnommen werden. Die dazugehörigen Zellviabilitätskurven für die Zelllinien Kelly und IMR-32 sind im Anhang (Abbildung 22 und 23) aufgeführt.

Tabelle 10: IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit den molekular-zielgerichteten Inhibitoren Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib in drei verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien.

	Dasatinib [μ M]	Rapamycin [μ M]	Vistusertib [nM]
Kelly	$9,47 \pm 0,010$	$27,21 \pm 0,006$	$29,72 \pm 0,010$
SK-N-BE(2)	$25,73 \pm 0,003$	$24,27 \pm 0,003$	$149,0 \pm 0,014$
IMR-32	$1,53 \pm 0,057$	$37,47 \pm 0,003$	$87,44 \pm 0,016$

Die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib in den Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 wurden von Marie Matthes in laborinternen Vorversuchen ermittelt und die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib und Rapamycin in den Zelllinien Kelly und IMR-32 wurden von Rebecca Wätzig bestätigt (149). Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

Die IC_{50} -Werte von Dasatinib in den drei Zelllinien befanden sich im niedrig bis mittleren mikromolaren Bereich (1,5 - 25,7 μ M, Tabelle 10). Für Rapamycin lagen die IC_{50} -Werte im mittleren mikromolaren Bereich (24,3 - 37,5 μ M, Tabelle 10). Für Vistusertib hingegen befanden sich die IC_{50} -Werte im mittleren bis höheren nanomolaren Bereich (29,7 - 149,0 nM, Tabelle 10), was in der Zelllinie Kelly in etwa einer 1000-fachen Reduktion, in der Zelllinie SK-N-BE(2) in etwa einer 150-fachen

Reduktion und in der Zelllinie IMR-32 in etwa einer 400-fachen Reduktion der Konzentration von Vistusertib im Vergleich zu Rapamycin entspricht.

Im Vergleich zur Einzelbehandlung lagen in jeder Zelllinie bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) die IC_{50} -Werte bei einer leicht bis deutlich niedrigeren Konzentration. Die ermittelten IC_{50} -Werte bei Doppelbehandlung sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: IC_{50} -Werte bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V) und Angabe der daraus resultierenden Dosis-Reduktions-Faktoren (DRF).

	Dasatinib [μ M]	Rapamycin [μ M]	DRF Dasatinib	DRF Rapamycin
Kelly	5,00	2,00	1,9	13,6
SK-N-BE(2)	20,00	5,00	1,3	4,9
IMR-32	0,05	0,13	30,6	288,2

	Dasatinib [μ M]	Vistusertib [nM]	DRF Dasatinib	DRF Vistusertib
Kelly	4,00	15,00	2,4	2,0
SK-N-BE(2)	16,00	70,00	1,6	2,1
IMR-32	0,05	70,00	30,6	1,2

Die IC_{50} -Werte bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und die daraus resultierenden Dosis-Reduktions-Faktoren (DRF) wurden in der Zelllinie Kelly von Johannes Leister ermittelt (148) und von Rebecca Wätzig bestätigt (149), in der Zelllinie SK-N-BE(2) von Marie Matthes in laborinternen Vorversuchen ermittelt und in der Zelllinie IMR-32 von Rebecca Wätzig ermittelt (149). Sie dienen hier als Vergleich zur Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V). Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$).

Die Untersuchung der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) in der Zelllinie Kelly wurde bereits durch Johannes Leister durchgeführt (148) und von Rebecca Wätzig (149) bestätigt. In der Zelllinie Kelly konnte bei der Kombination von Dasatinib plus Vistusertib (D+V) gegenüber der Einzelbehandlung eine Dosisreduktion von 2,4 bei Dasatinib und 2,0 bei Vistusertib erzielt werden (Tabelle 11). In der Zelllinie SK-N-BE(2) wurde durch die Kombination beider Inhibitoren eine Dosisreduktion von 1,6 bei Dasatinib und 2,1 bei Vistusertib erreicht (Tabelle 11). In der Zelllinie IMR-32 war die Dosisreduktion bei Doppelbehandlung mit einer Dosisreduktion von 30,6 bei Dasatinib am stärksten im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Zelllinien, wohingegen die Dosisreduktion von 1,2 bei Vistusertib am geringsten im Vergleich zu

den anderen beiden untersuchten Zelllinien war (Tabelle 11). Die in Tabelle 11 ermittelten IC_{50} -Werte bei Doppelbehandlung wurden bei der Behandlung im Rahmen des RIST- und VIST-Therapieschemas verwendet.

Durch die Kombination von Dasatinib plus Vistusertib (D+V) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit den molekular-zielgerichteten Inhibitoren in gleicher Konzentration wurde in allen drei untersuchten Zelllinien eine deutlich reduzierte Zellviabilität erreicht (Abbildung 12). Behandelt wurde mit den in Tabelle 11 angegebenen IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung.

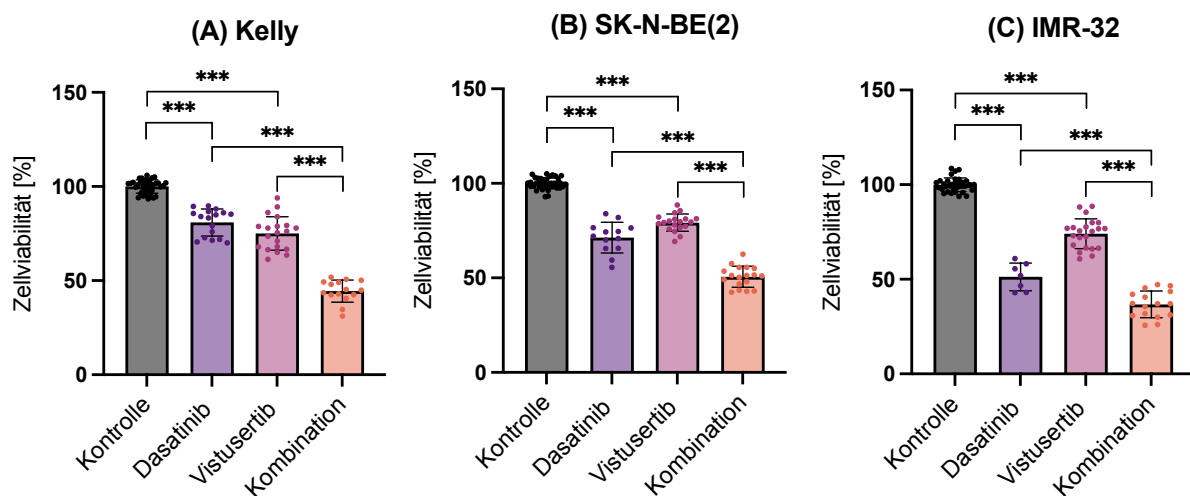


Abbildung 12: Reduktion der Zellviabilität bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V).

Die Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32 wurden 24 h nach dem Ausplattieren in einer 96-Well-Platte bei einer Konfluenz von etwa 30 - 50 % mit den entsprechenden IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung (Tabelle 11) behandelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte 72 h nach der Behandlung mittels MTT-Assay. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

In der Zelllinie Kelly wurde durch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Dasatinib und Vistusertib eine signifikant stärkere Hemmung der Zellviabilität erreicht (Abbildung 12A). Ebenfalls wurde die Zellviabilität durch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit dem jeweiligen Inhibitor in der Zelllinie SK-N-BE(2) signifikant stärker gehemmt (Abbildung 12B). Auch in der Zelllinie IMR-32 führte die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Dasatinib und Vistusertib. Abschließend lässt sich sagen, dass in allen drei untersuchten Zelllinien

die Zellviabilität bei Doppelbehandlung signifikant niedriger war als bei Einzelbehandlung.

3.2 Bestimmung der IC_{50} -Werte von Irinotecan und Temozolomid bei Einzel- und Doppelbehandlung

Für die In-vitro-Durchführung der RIST- bzw. VIST-Therapie wurden neben den IC_{50} -Werten der molekular-zielgerichteten Inhibitoren auch die IC_{50} -Werte der Chemotherapeutika Irinotecan und Temozolomid für die Einzel- und Doppelbehandlung in den Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 bestimmt.

Laborintern wurden bereits die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Irinotecan, Temozolomid und bei Doppelbehandlung mit Irinotecan plus Temozolomid (I+T) in den Zelllinien Kelly und IMR-32 von Rebecca Wätzig ermittelt (149). Für die Zelllinie SK-N-BE(2) wurden die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung und Doppelbehandlung in der vorliegenden Arbeit ermittelt.

In der folgenden Abbildung sind die Zellviabilitätskurven für die IC_{50} -Bestimmung der Chemotherapeutika Irinotecan und Temozolomid in der Zelllinie SK-N-BE(2) dargestellt (Abbildung 13). Gezeigt ist die Zellviabilität in Prozent (%) in Abhängigkeit der logarithmischen Medikamentenkonzentration.

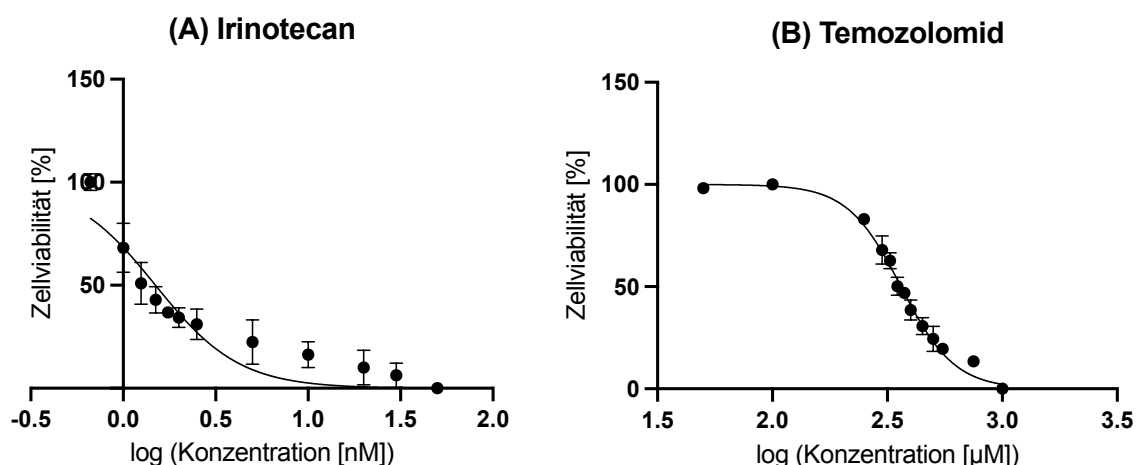


Abbildung 13: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie SK-N-BE(2) zur Bestimmung der IC_{50} -Werte von Irinotecan und Temozolomid.

Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren in einer 96-Well-Platte bei einer Konfluenz von etwa 30 - 50 % mit (A) Irinotecan und (B) Temozolomid behandelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte 72 h nach der Behandlung mittels MTT-Assay. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

Die ermittelten IC₅₀-Werte bei Einzelbehandlung können aus Tabelle 12 und die ermittelten IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung und der Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) können aus Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 12: IC₅₀-Werte bei Einzelbehandlung mit Irinotecan und Temozolomid in drei verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien.

	Irinotecan [nM]	Temozolomid [µM]
Kelly	2,74 ± 0,008	246,0 ± 0,004
SK-N-BE(2)	1,49 ± 0,022	362,5 ± 0,005
IMR-32	0,67 ± 0,009	159,9 ± 0,004

Die IC₅₀-Werte bei Einzelbehandlung mit Irinotecan und Temozolomid in den Zelllinien Kelly und IMR-32 wurden von Rebecca Wätzig ermittelt (149). Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt (n = 3), die Standardabweichung ist angegeben.

Die IC₅₀-Werte von Irinotecan in den drei Zelllinien befanden sich im niedrig nanomolaren Bereich (Tabelle 12). Für Temozolomid hingegen befanden sich die IC₅₀-Werte im höheren mikromolaren Bereich (Tabelle 12).

Tabelle 13: IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung der Chemotherapeutika Irinotecan plus Temozolomid (I+T) und Angabe der daraus resultierenden Dosis-Reduktions-Faktoren (DRF).

	Irinotecan [nM]	Temozolomid [µM]	DRF Irinotecan	DRF Temozolomid
Kelly	1,0	225,0	2,7	1,1
SK-N-BE(2)	0,9	230,0	1,7	1,6
IMR-32	0,4	120,0	1,7	1,3

Die IC₅₀-Werte bei Doppelbehandlung der Chemotherapeutika Irinotecan plus Temozolomid (I+T) und die daraus resultierenden Dosis-Reduktions-Faktoren (DRF) in den Zelllinien Kelly und IMR-32 wurden von Rebecca Wätzig ermittelt (149). Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt (n = 3).

Wie in Tabelle 13 ersichtlich, lagen in jeder Zelllinie bei Doppelbehandlung mit Irinotecan plus Temozolomid (I+T) die IC₅₀-Werte im Vergleich zur Einzelbehandlung bei einer leicht bis deutlich niedrigeren Konzentration. In Zelllinie Kelly konnte die Kombination der beiden Chemotherapeutika gegenüber der Einzelbehandlung eine Dosisreduktion von 2,7 bei Irinotecan und 1,1 bei Temozolomid erzielen (Tabelle 13). Ebenso wurde in der Zelllinie SK-N-BE(2) durch die Doppelbehandlung eine

Dosisreduktion von 1,7 bei Irinotecan und 1,6 bei Temozolomid erzielt. In der Zelllinie IMR-32 wurde durch die Kombination beider Chemotherapeutika eine Dosisreduktion von 1,7 bei Irinotecan und 1,3 bei Temozolomid erreicht.

In der Zelllinie SK-N-BE(2) wurde durch die Kombination der Chemotherapeutika Irinotecan plus Temozolomid (I+T) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit den Chemotherapeutika in gleicher Konzentration eine signifikant niedrigere Zellviabilität erreicht (Abbildung 14). Behandelt wurde mit den in Tabelle 13 angegebenen IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlung.

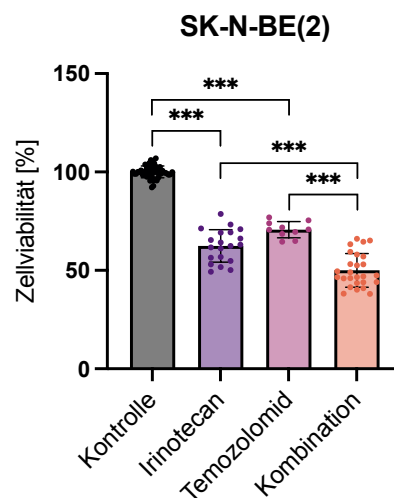


Abbildung 14: Reduktion der Zellviabilität in der Zelllinie SK-N-BE(2) bei Doppelbehandlung mit den Chemotherapeutika Irinotecan plus Temozolomid (I+T).

Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren in einer 96-Well-Platte bei einer Konfluenz von etwa 30 - 50 % mit den entsprechenden IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlung (Tabelle 13) behandelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte 72 h nach der Behandlung mittels MTT-Assay. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der Zelllinie SK-N-BE(2), wie in den Zelllinien Kelly und IMR-32 von Rebecca Wätzig ermittelt (149), ebenfalls eine signifikant stärkere Hemmung der Zellviabilität bei Doppelbehandlung der beiden Chemotherapeutika Irinotecan plus Temozolomid (I+T) im Vergleich zur Einzelbehandlung in den gleichen Konzentrationen erzielt werden konnte.

3.3 Untersuchung auf Synergismus und Antagonismus

Durch die Kombination von zwei oder mehreren Medikamenten können synergistische, additive oder antagonistische Effekte auftreten (27). Synergismus bedeutet, dass der Effekt der Kombination der Medikamente größer ist als der kumulative Effekt der einzelnen Medikamente. Bei einem additiven Effekt entspricht der Effekt bei Kombination der Medikamente demselben Effekt als bei Einzelbehandlung (27, 152). Antagonismus hingegen bedeutet, dass der Effekt der Kombination der Medikamente geringer ist als der kumulative Effekt der einzelnen Medikamente (152).

Ein starker Synergismus bei der Kombination von Dasatinib plus Rapamycin (D+R) konnte bereits in Brustkrebszellen durch Park *et al.* (159), in der Neuroblastom-Zelllinie Kelly durch Johannes Leister (148) und Rebecca Wätzig (149) und in der Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 durch Rebecca Wätzig (149) nachgewiesen werden. In der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-BE(2) konnte durch Rebecca Wätzig (149) ein mäßiger Synergismus nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch die Kombination von Dasatinib mit dem mTORC_{1/2}-Inhibitor Vistusertib in den Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 ebenfalls ein Synergismus auftritt.

Tabelle 14: Combination Index (CI)-Werte bei Doppelbehandlung mit den molekular-zielgerichteten Inhibitoren Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).

	Dasatinib plus Rapamycin (D+R)	Dasatinib plus Vistusertib (D+V)
Kelly	0,23 ± 0,07	1,18 ± 0,12
SK-N-BE(2)	0,75 ± 0,02	1,09 ± 0,15
IMR-32	0,20 ± 0,02	0,004 ± 0,003

Die CI-Werte bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) wurden in der Zelllinie Kelly von Johannes Leister ermittelt (148) und von Rebecca Wätzig bestätigt (149) und in den Zelllinien SK-N-BE(2) und IMR-32 von Rebecca Wätzig ermittelt (149). Sie dienen hier als Vergleich zur Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V). Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt (n = 3), die Standardabweichung ist angegeben. CI: < 0,9 = synergistisch, 0,9 - 1,1 = additiv, > 1,1 = antagonistisch (154).

Der ermittelte CI-Wert bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) in der Zelllinie Kelly lag bei 1,18, was einer leicht antagonistischen Wirkung entspricht

(Tabelle 14). Das bedeutet, dass der Effekt der Doppelbehandlung geringer ist als der additive Effekt der einzelnen Inhibitoren. Im Vergleich dazu lag bei der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) in der Zelllinie Kelly eine stark synergistische Wirkung vor (148, 149). In der Zelllinie SK-N-BE(2) lag der CI-Wert bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) bei 1,09, was einer additiven Wirkung entspricht (Tabelle 14). Die Doppelbehandlung mit beiden Inhibitoren lieferte also denselben Effekt wie die Einzelbehandlung mit den jeweiligen Inhibitoren. Hingegen wurde durch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) in der Zelllinie SK-N-BE(2) ein mäßiger Synergismus nachgewiesen (149). Der ermittelte CI-Wert bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) lag in der Zelllinie IMR-32 bei 0,004, was einem sehr starken Synergismus entspricht (Tabelle 14). Der Effekt dieser Doppelbehandlung ist also stärker als die kumulative Wirkung der einzelnen Medikamente. Durch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) in der Zelllinie IMR-32 konnte ebenfalls ein starker Synergismus nachgewiesen werden (149).

3.4 Induktion des G₁-Phase-Arrests im Zellzyklus durch Vistusertib

Es ist bekannt, dass Rapamycin den Übergang von der G₁- zur S-Phase im Zellzyklus hemmt (160). Im Vergleich hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Behandlung mit Vistusertib in den drei Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 auf den Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie untersucht.

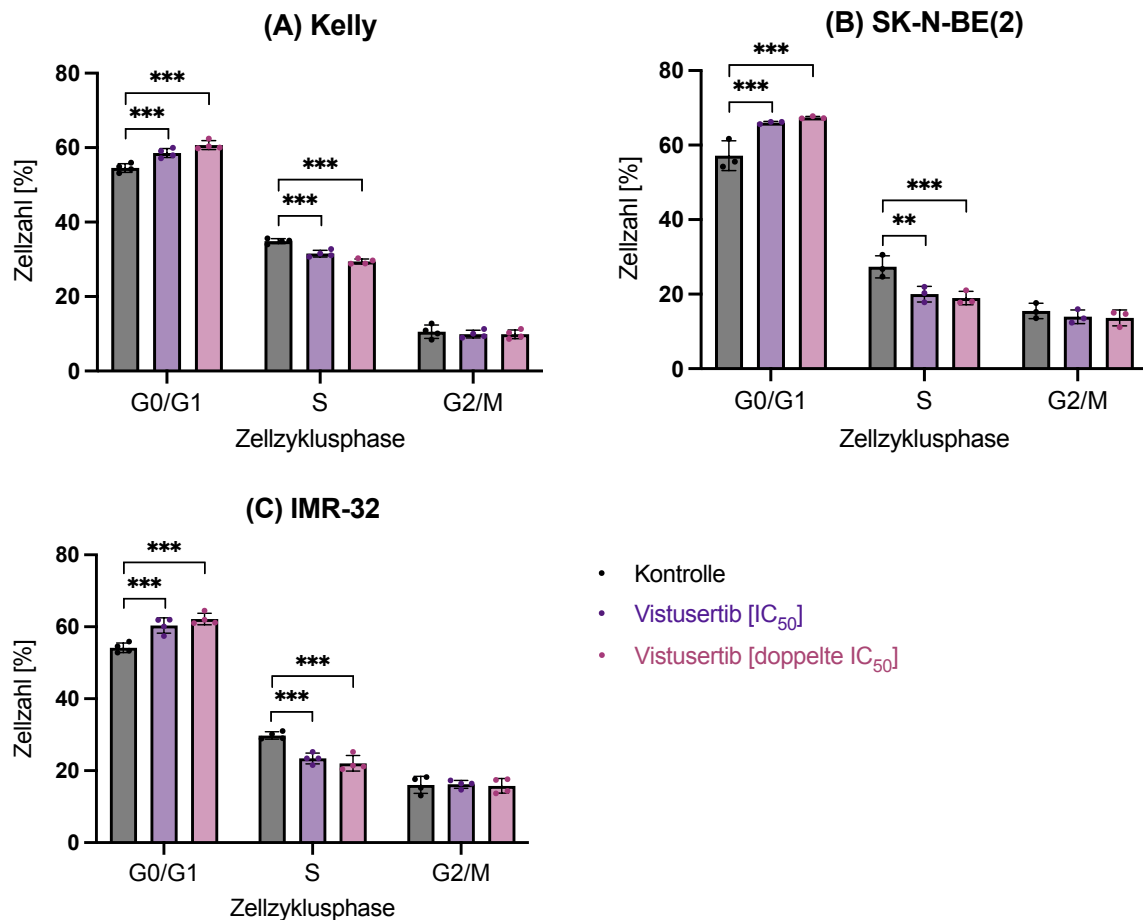


Abbildung 15: Induktion des G_1 -Arrests im Zellzyklus nach der Behandlung mit Vistusertib.

Untersuchung der Effekte der Einzelbehandlung mit Vistusertib im Vergleich zu einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle auf den Zellzyklus in den Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32. Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren in einer 24-Well-Platte bei einer Konfluenz von etwa 30 - 50 % zum einen mit den entsprechenden IC_{50} -Werten bei Einzelbehandlung (Tabelle 10) und zum anderen mit den doppelten IC_{50} -Werten bei Einzelbehandlung behandelt. Die Fixierung der Zellen wurde 48 h nach der Behandlung durchgeführt. Die Färbung und Messung erfolgten 72 h nach der Behandlung. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

In jeder der drei untersuchten Zelllinien befanden sich nach der Behandlung mit Vistusertib signifikant mehr Zellen in der G_0/G_1 -Phase als in der Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle (Abbildung 15). Darüber hinaus befand sich in jeder Zelllinie eine nochmals leicht erhöhte Zellzahl in der G_0/G_1 -Phase, wenn der doppelte IC_{50} -Wert von Vistusertib verwendet wurde. Ebenfalls befanden sich in allen untersuchten Zelllinien nach der Behandlung mit Vistusertib signifikant weniger Zellen in der S-Phase als in der Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle (Abbildung 15). Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit dem doppelten IC_{50} -Wert von Vistusertib verstärkt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Vistusertib ein

Arrest des Zellzyklus in der G₁-Phase in allen drei untersuchten Neuroblastom-Zelllinien induziert wurde.

3.5 Hemmung des mTOR-Signalwegs

Der mTOR-Signalweg ist, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, in vielen Tumoren (63), wie auch dem Neuroblastom dysreguliert, und spielt somit eine essentielle Rolle bei möglichen Therapieoptionen des Neuroblastoms (161). Um die Effekte der Einzelbehandlung mit Vistusertib auf die Expression und Phosphorylierung der mTORC₁-Substrate 4E-BP1 und S6K1 zu untersuchen, wurden die Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 mit Vistusertib und einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle behandelt, nach 24 Stunden geerntet und mittels Westernblot analysiert (Abbildung 16). Verwendet wurde dabei jeweils ein Antikörper, welcher die Gesamtexpression des zu untersuchenden Proteins (z. B. p70S6K1) nachweist, sowie der entsprechende phosphospezifische Antikörper (z. B. P-p70S6K1), welcher die Phosphorylierung des Proteins nachweist.

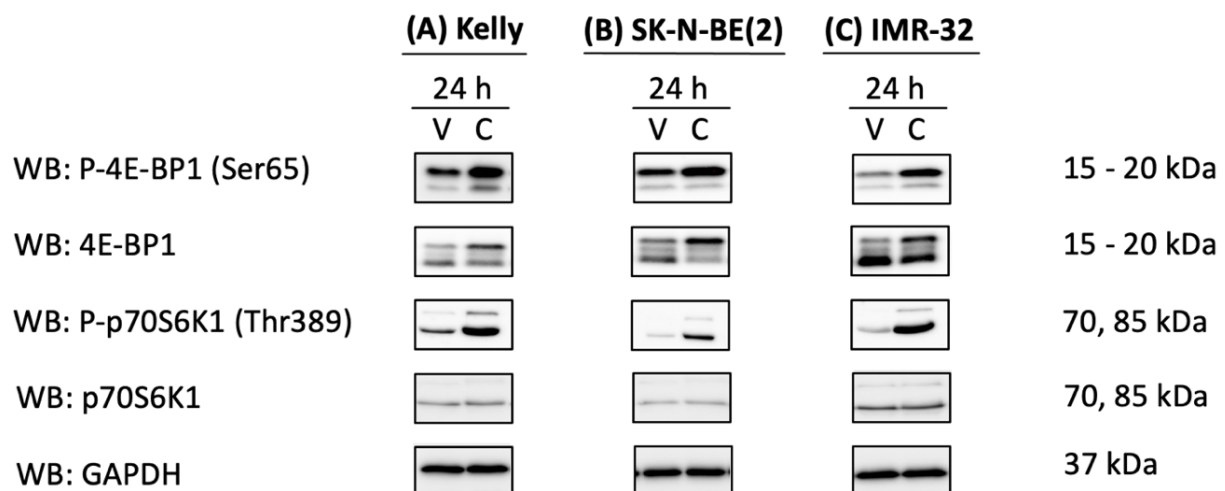


Abbildung 16: Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Einzelbehandlung mit Vistusertib. Untersuchung der Effekte der Einzelbehandlung mit Vistusertib (V) im Vergleich zu einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle (C) auf die Phosphorylierung (P) der mTOR-Substrate in den Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32. Die Zellen wurden mit den entsprechenden IC₅₀-Werten bei Einzelbehandlung (Tabelle 10) behandelt und nach 24 h geerntet. Mittels Westernblot-Analysen wurde der Status der Phosphorylierung der Proteine 4E-BP1 (Ser65) und p70S6K (Thr389) untersucht. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. WB: Westernblot.

Durch die Einzelbehandlung mit Vistusertib konnte in jeder der drei untersuchten Zelllinien die Phosphorylierung der mTORC₁-Substrate 4E-BP1 an Serin 65 (Ser65)

und p70S6K1 an Threonin 389 (Thr389) im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert werden (Abbildung 16).

Weiterhin wurde mittels Westernblot-Analysen der Effekt der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V) im Vergleich zu einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle 24 Stunden nach der Behandlung auf die mTORC₁-Substrate 4E-BP1 und S6K1 untersucht (Abbildung 17). Außerdem wurde in den drei Zelllinien die Aktivität des Tyrosinkinase-Inhibitors Dasatinib anhand der Phosphorylierung von Src (Tyr416) untersucht. Zudem wurde das mTORC₂-Substrat AKT (Ser473) und AKT (Thr308) in allen drei Zelllinien untersucht, jedoch zeigte sich nach vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in keiner Zelllinie eine Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Daten in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt). Vistusertib als ATP-kompetitiver mTORC_{1/2}-Inhibitor müsste jedoch zu einer Abnahme der Phosphorylierung des mTORC₂-Substrats AKT führen. Da auch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R), welche zuvor eine Abnahme der Phosphorylierung von AKT zeigte (149), nicht effektiv wirkte, wird davon ausgegangen, dass technische Probleme vorlagen und die Antikörper möglicherweise nicht in Ordnung waren.

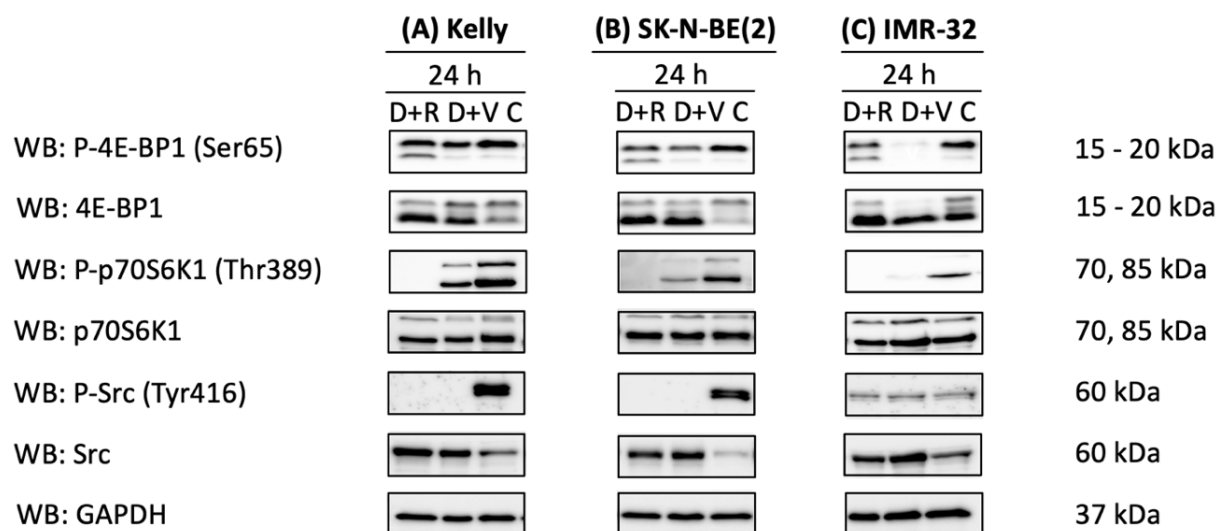


Abbildung 17: Hemmung neoplastischer Signalwege durch Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).

Untersuchung der Effekte der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R), Dasatinib plus Vistusertib (D+V) bzw. einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle (C) auf die Phosphorylierung (P) der mTOR-Substrate und der Tyrosinkinase Src in den Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32. Die Zellen wurden mit den entsprechenden IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlung (Tabelle 11) behandelt und nach 24 h geerntet. Mittels Westernblot-Analysen wurde die Phosphorylierung der Proteine 4E-BP1, p70S6K und Src untersucht. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH

verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. WB: Westernblot.

In allen drei untersuchten Zelllinien führte die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) zu einer deutlichen Reduzierung der Phosphorylierung der mTORC1-Substrate 4E-BP1 und p70S6K1 (Abbildung 17). Die Phosphorylierung von 4E-BP1 nahm in der Zelllinie Kelly bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V) im Vergleich zur Kontrolle leicht ab (Abbildung 17A). In der Zelllinie Kelly wurde die Phosphorylierung von p70S6K1 bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) leicht reduziert (Abbildung 17A), wohingegen sie bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) gehemmt wurde (Abbildung 17A). Die Phosphorylierung von 4E-BP1 wurde in der Zelllinie SK-N-BE(2) bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V) im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert (Abbildung 17B). In der Zelllinie SK-N-BE(2) wurde die Phosphorylierung von p70S6K1 bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) sehr stark reduziert und bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) sogar inhibiert (Abbildung 17B). In der Zelllinie IMR-32 wurde die Phosphorylierung von 4E-BP1 bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) gehemmt (Abbildung 17C), wohingegen sie bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) stark reduziert wurde (Abbildung 17C). Die Phosphorylierung von p70S6K1 wurde sowohl bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) als auch bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) in der Zelllinie IMR-32 inhibiert (Abbildung 17C).

Die Phosphorylierung von Src (Tyr416) konnte durch beide Doppelbehandlungen in den Zelllinien Kelly und SK-N-BE(2) gehemmt werden (Abbildung 17A+B), obwohl die Gesamtproteinmenge von Src in beiden Zelllinien deutlich zunahm (Abbildung 17A+B). In der Zelllinie IMR-32 konnte auch nach vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten die Phosphorylierung von Src (Tyr416) im Vergleich zur Kontrolle nicht reduziert werden (Abbildung 17C). Jedoch nahm hier ebenfalls, wie in den Zelllinien Kelly und SK-N-BE(2), die Gesamtproteinmenge deutlich zu (Abbildung 17C), wodurch die relative Phosphorylierung von Src (Tyr416) auch in der Zelllinie IMR-32 abnahm.

3.6 Keine Induktion von Apoptose bei Einzelbehandlung mit Vistusertib oder bei Doppelbehandlung mit Dasatinib (D+V)

Um zu überprüfen, ob Vistusertib in den Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 neben dem in Kapitel 3.4 beschriebenen G₁-Phase-Arrest auch Apoptose induziert, wurde dies mittels *cysteine-dependent aspartate-directed/specific protease 3* (Caspase-3)- und Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1)-Spaltung in Westernblot-Analysen untersucht.

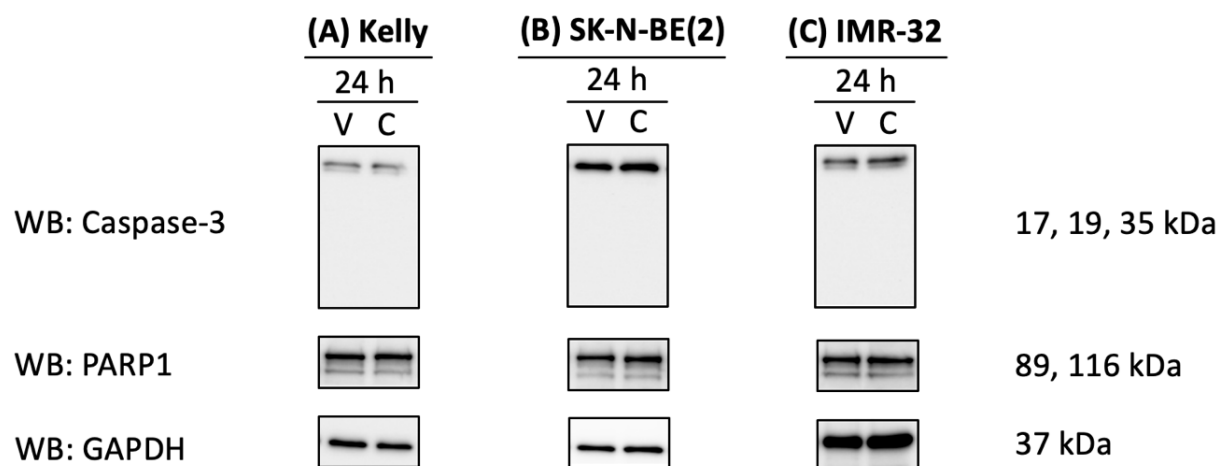


Abbildung 18: Keine Induktion von Apoptose bei Einzelbehandlung mit Vistusertib.

Untersuchung der Effekte der Einzelbehandlung mit Vistusertib (V) im Vergleich zu einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle (C) auf die Induktion von Apoptose anhand von Caspase-3- und PARP1-Spaltung mittels Westernblot-Analysen in den Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32. Die Zellen wurden mit den entsprechenden IC₅₀-Werten bei Einzelbehandlung (Tabelle 10) behandelt und nach 24 h geerntet. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. WB: Westernblot.

In keiner der drei untersuchten Zelllinien konnte 24 Stunden nach der Behandlung der Zellen mit Vistusertib ein positiver Nachweis der Apoptoseinduktion durch Caspase-3- oder PARP1-Spaltprodukte gezeigt werden (Abbildung 18). In allen drei Zelllinien war nach der Behandlung mit Vistusertib das PARP1-Spaltprodukt (89 kDa) vergleichbar zur Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle sichtbar, was nicht als eine erhöhte Spaltung durch die Behandlung, sondern als Hintergrund gewertet werden kann. Diese Schlussfolgerung wird dadurch unterstützt, dass kein Caspase-3-Spaltprodukt (17, 19 kDa) nachgewiesen wurde. Im Vergleich dazu konnte 24 Stunden nach der Behandlung mit den entsprechenden IC₅₀-Werten von Rapamycin (Tabelle 11) in der Neuroblastom-Zelllinie Kelly Apoptose induziert werden, jedoch nicht in den Zelllinien SK-N-BE(2) und IMR-32 (Abbildung 26 im Anhang).

Danach wurde untersucht, ob durch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) Apoptose induziert werden kann.

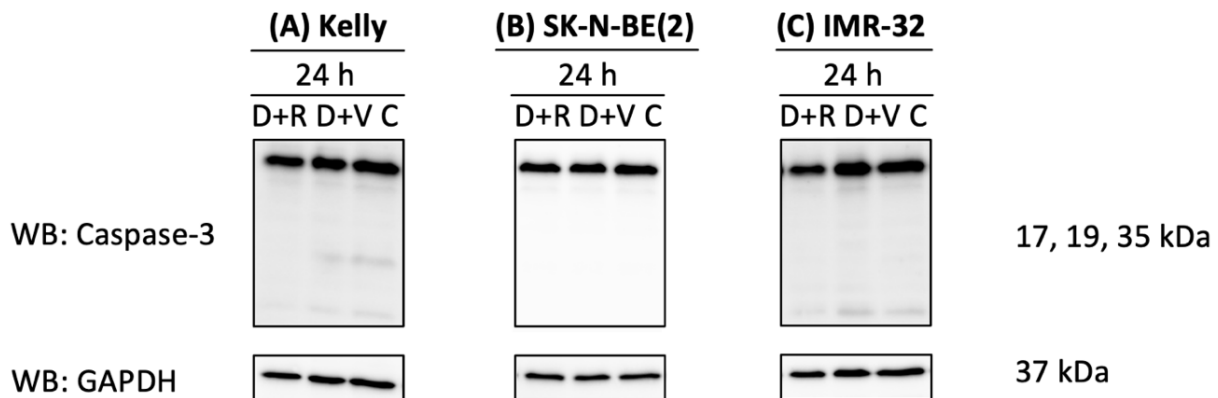


Abbildung 19: Keine Induktion von Apoptose bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).

Untersuchung der Effekte der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R), Dasatinib plus Vistusertib (D+V) bzw. einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle (C) auf die Induktion von Apoptose anhand von Caspase-3-Spaltung mittels Westernblot-Analysen in den Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32. Die Zellen wurden mit den entsprechenden IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung (Tabelle 11) behandelt und nach 24 h geerntet. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde GAPDH verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. WB: Westernblot.

Weder durch die Vorbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) noch durch die Vorbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) konnte 24 Stunden nach der Behandlung Apoptose in den Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 induziert werden (Abbildung 19). Es wurden in keiner Zelllinie Caspase-3-Spaltprodukte sichtbar, denn die sichtbaren Caspase-3-Spaltprodukte in den Zelllinien waren vergleichbar mit der Kontrolle und können somit als Hintergrund gewertet werden. In der IMR-32-Zelllinie konnten jedoch 72 Stunden nach der Behandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) geringe Caspase-3-Spaltprodukte nachgewiesen werden, was auf eine Induktion von Apoptose hinweist (149).

3.7 Reduktion der Zellviabilität in der multimodalen RIST-Therapie im Vergleich zur alternativen VIST-Therapie bei IC_{50} -Behandlung

Um das etablierte RIST-Therapieschema mit dem alternativen VIST-Therapieschema zu vergleichen, wurde mittels MTT-Assays die Viabilitätshemmung der beiden Schemata im Vergleich zu Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle überprüft (Abbildung 20). Wie in Kapitel 1.4 bereits erläutert, besteht der Unterschied zwischen

dem RIST- und VIST-Therapieschema im Austausch des allosterischen mTOR-Inhibitors Rapamycin durch den ATP-kompetitiven mTORC_{1/2}-Inhibitor Vistusertib. Die Durchführung beider Schemata ist in Kapitel 2.2.8 (Abbildung 9) dargestellt.

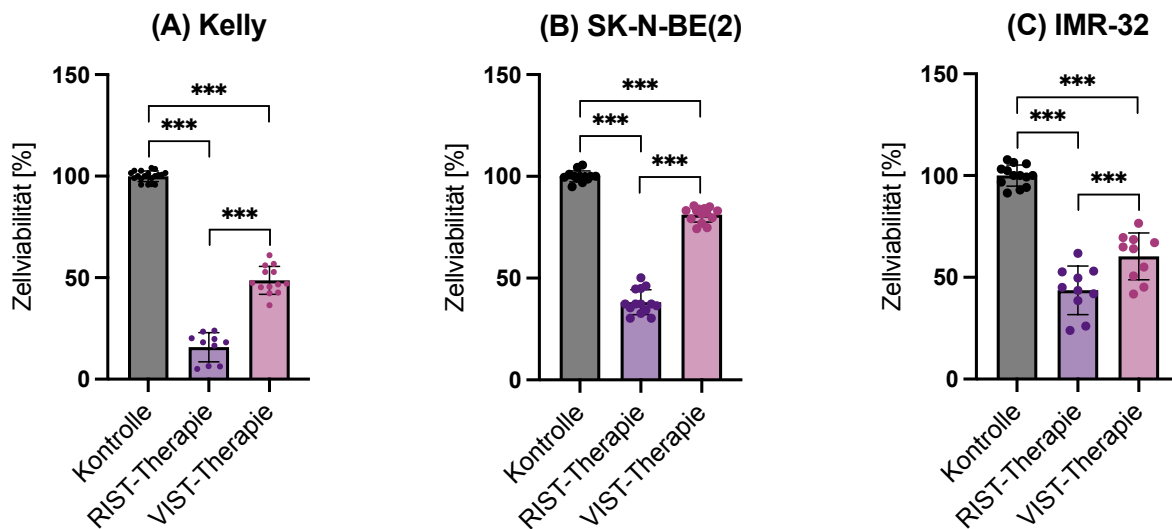


Abbildung 20: Vergleich der RIST- und VIST-Therapie bei IC₅₀-Behandlung.

Untersuchung der Zellviabilität nach der Behandlung mit der RIST-Therapie, der VIST-Therapie bzw. einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle in den Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32. Die Zellen wurden entsprechend des Schemas (Abbildung 9) und mit den entsprechenden IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlung (Tabelle 11 und Tabelle 13) behandelt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte an „Tag 8“ mittels MTT-Assay. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

Beide Therapieschemata führten im Vergleich zur Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 20). In allen drei untersuchten Zelllinien konnte die Behandlung mit der RIST-Therapie eine signifikant stärkere Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Behandlung mit der VIST-Therapie erzielen. Besonders deutlich ist der Unterschied zwischen beiden Therapieschemata in den Zelllinien Kelly (Abbildung 20A) und SK-N-BE(2) (Abbildung 20B). In der Zelllinie Kelly konnte durch die VIST-Therapie eine Reduktion der Zellviabilität auf etwa 49 % erreicht werden, wohingegen durch die RIST-Therapie sogar eine Reduktion auf 16 % erreicht wurde (Abbildung 20A). Durch die VIST-Therapie wurde in der Zelllinie SK-N-BE(2) die Zellviabilität nur auf etwa 82 % reduziert, durch die RIST-Therapie hingegen auf etwa 38 % (Abbildung 20B). In der Zelllinie IMR-32 konnte durch die VIST-Therapie die Zellviabilität auf etwa 60 % und durch die RIST-Therapie auf etwa 44 % reduziert werden (Abbildung 20C).

3.8 Reduktion der Zellviabilität nach der Behandlung mit 1,5-fach erhöhten IC_{50} -Werten in der VIST-Therapie

Mit dem Ziel die Zellviabilität in der VIST-Therapie in allen drei untersuchten Zelllinien weiter zu reduzieren, wurden Kelly-, SK-N-BE(2)- und IMR-32-Zellen mit 1,5-fach erhöhten IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) behandelt. Diese behandelten Zellen wurden mit gleichbleibenden IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle verglichen.

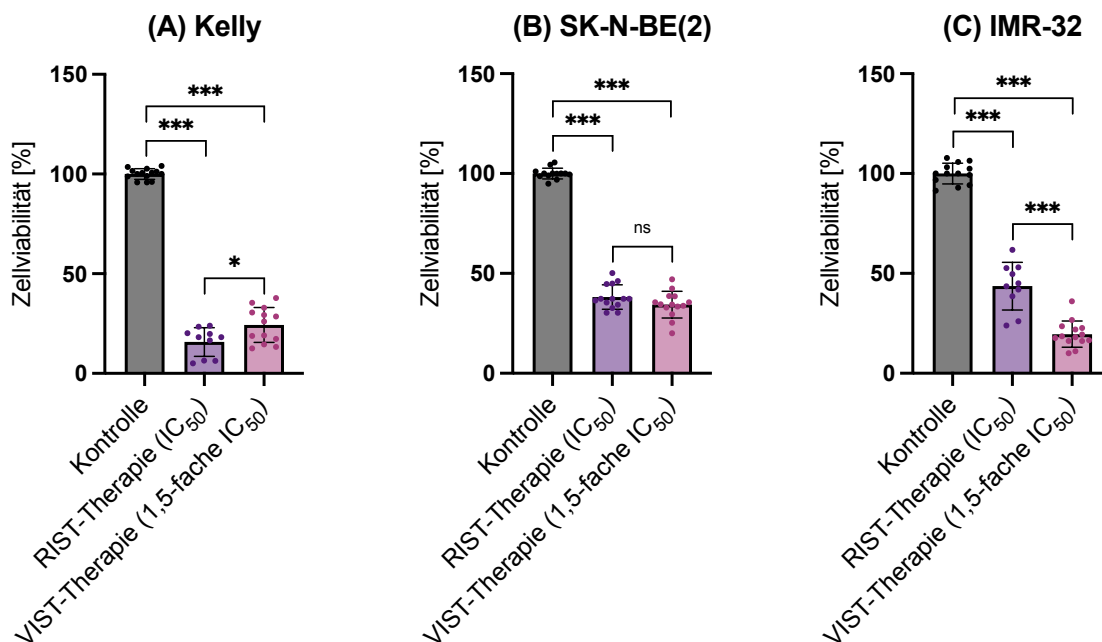


Abbildung 21: Vergleich der RIST- und VIST-Therapie bei Behandlung mit 1,5-fach erhöhten IC_{50} -Werten in der VIST-Therapie.

Untersuchung der Zellviabilität nach der Behandlung mit der RIST-Therapie, der VIST-Therapie bzw. einer Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle in den Zelllinien (A) Kelly, (B) SK-N-BE(2) und (C) IMR-32. Die Zellen, die mit der RIST-Therapie behandelt wurden, wurden entsprechend des Schemas (Abbildung 9) und mit den entsprechenden IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung (Tabelle 11 und Tabelle 13) behandelt. Die Zellen, die mit der VIST-Therapie behandelt wurden, wurden entsprechend des Schemas (Abbildung 9) und mit den 1,5-fach erhöhten IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) behandelt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte an „Tag 8“ mittels MTT-Assay. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt ($n = 3$), die Standardabweichung ist angegeben.

Beide Therapieschemata führten im Vergleich zur Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität um mindestens 50 % (Abbildung 21). In der Zelllinie Kelly führte die modifizierte VIST-Therapie zu einer Reduktion der Zellviabilität auf etwa 24 %, wobei

die Zellviabilität in der RIST-Therapie mit etwa 16 % noch stärker reduziert wurde (Abbildung 21A). Somit wurde in der Zelllinie Kelly trotz modifizierter VIST-Therapie mit 1,5-fach erhöhten IC_{50} -Werten bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) die Zellviabilität in der RIST-Therapie mit IC_{50} -Werten signifikant stärker reduziert. In der Zelllinie SK-N-BE(2) konnte die modifizierte VIST-Therapie eine Reduktion der Zellviabilität auf etwa 34 % erzielen, was annähernd gleich im Vergleich zur RIST-Therapie war (Abbildung 21B). Durch die Behandlung mit der modifizierten VIST-Therapie konnte in der Zelllinie IMR-32 eine Reduktion der Zellviabilität auf etwa 20 % erreicht werden, was im Vergleich zur RIST-Therapie eine signifikant stärkere Reduktion der Zellviabilität darstellte (Abbildung 21C).

4 Diskussion

4.1 Signifikante Reduktion der IC₅₀-Werte bei Verwendung von Vistusertib anstelle von Rapamycin

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den drei *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von Vistusertib im nanomolaren Bereich im Vergleich zu den hohen IC₅₀-Werten von Rapamycin im mikromolaren Bereich die Zellviabilität effektiv reduziert hat. Um eine 50-prozentige Viabilitätshemmung bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) zu erreichen, wurden in jeder der drei untersuchten Zelllinien signifikant niedrigere Konzentrationen von den molekular-zielgerichteten Inhibitoren benötigt als bei der jeweiligen Einzelbehandlung. Die Untersuchung des *Combination Index* (CI) bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) zeigte in der Zelllinie Kelly einen leichten Antagonismus, in der Zelllinie SK-N-BE(2) eine additive Wirkung und in der Zelllinie IMR-32 einen sehr starken Synergismus. Darüber hinaus wurde durch Vistusertib in allen drei untersuchten Neuroblastom-Zelllinien in Zellzyklusanalysen ein G₁-Phase-Arrest ausgelöst, wohingegen in keiner Zelllinie durch Vistusertib Apoptose induziert wurde, was anhand von Caspase-3- oder PARP1-Spaltung in Westernblot-Analysen untersucht wurde. In weiteren Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Neuroblastom-Zelllinien mit Vistusertib und mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) den mTOR-Signalweg durch eine reduzierte Phosphorylierung der mTORC₁-Substrate 4E-BP1 und S6K1 inhibiert. Zudem führte die Behandlung mit der VIST-Therapie im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität und mit 1,5-fach erhöhten IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) in der VIST-Therapie konnte die Zellviabilität im Vergleich zur RIST-Therapie in den Zelllinien SK-N-BE(2) und IMR-32 stärker reduziert werden.

Vistusertib ist ein ATP-kompetitiver mTOR-Inhibitor, der sowohl mTORC₁ als auch mTORC₂ effektiv hemmt (131, 132). In den Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 konnte gezeigt werden, dass sich die IC₅₀-Werte von Rapamycin im mikromolaren Bereich auf den nanomolaren Bereich bei Vistusertib reduzieren lassen. Eine vorangegangene Studie stellte fest, dass der mTOR-Signalweg auch von

anderen ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren wie Torin-2 bei deutlich geringeren IC₅₀-Werten im Vergleich zu Rapamycin gehemmt wird (149).

4.2 Überprüfung der Doppelbehandlung auf Synergismus bzw. Antagonismus

Bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V) wurde vorliegend gezeigt, dass die Konzentrationen beider Inhibitoren bei Doppelbehandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit dem jeweiligen Inhibitor in allen untersuchten Neuroblastom-Zelllinien gesenkt werden konnten. Bei der Kombination von zwei oder mehreren Medikamenten im Rahmen einer Behandlung können synergistische, additive oder antagonistische Effekte auftreten. In der Krebstherapie haben synergistische Kombinationsbehandlungen von Medikamenten den Vorteil, dass eine niedrigere Dosis der Medikamente im Vergleich zur Einzelbehandlung benötigt wird und dadurch Nebenwirkungen reduziert werden können (26-28). Jedoch konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass synergistische Medikamentenkombinationen das Auftreten von Resistenzen durch Spontanmutationen begünstigen können (162).

Eine synergistische Wirkung der Kombination von Dasatinib plus Rapamycin (D+R) in den Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 wurde sowohl von Johannes Leister als auch von Rebecca Wätzig gefunden und bestätigt den Vorteil der Doppelbehandlung im Vergleich zur Behandlung mit den einzelnen Medikamenten (45, 148). Bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) in der Zelllinie IMR-32 liegt der ermittelte CI-Wert bei 0,004, was für einen sehr starken Synergismus spricht (siehe Kapitel 3.3). Der Effekt dieser Doppelbehandlung ist also stärker als die kumulative Wirkung der einzelnen Medikamente. In einer vorangegangenen Studie wurde bei der Verwendung des ATP-kompetitiven Inhibitors Torin-2 in der Zelllinie IMR-32 ebenfalls ein Synergismus beobachtet (45). Bei dem hier vorliegenden sehr starken Synergismus in der IMR-32-Zelllinie kann durch eine erniedrigte Medikamentenkonzentration auch eine mögliche Reduktion der Nebenwirkungen erfolgen, da sich die beiden Medikamente Dasatinib und Vistusertib „ergänzen“, wodurch in dieser Zelllinie Vistusertib in der alternativen VIST-Therapie im Vergleich zu Rapamycin in der RIST-Therapie überlegen sein könnte.

In der Zelllinie SK-N-BE(2) entspricht der ermittelte CI-Wert bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) einer additiven Wirkung. Die Doppelbehandlung mit

beiden Inhibitoren hat also fast denselben Effekt wie die Einzelbehandlung mit den jeweiligen Inhibitoren.

Der ermittelte CI-Wert bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) in der Zelllinie Kelly weist auf eine leicht antagonistische Wirkung hin, was bedeutet, dass der Effekt der Doppelbehandlung geringer ist als der additive Effekt der einzelnen Inhibitoren. Kombinationstherapien können gleichzeitig einen zytotoxischen Effekt auf Krebszellen und einen protektiven Effekt auf gesunde Zellen haben, wenn eines der verwendeten Medikamente antagonistisch zu einem der anderen Medikamente in gesunden Zellen wirkt (33, 34). Auch konnten Studien zeigen, dass antagonistische Medikamentenkombinationen eher das Auftreten von Resistenzen verhindern und synergistische Medikamentenkombinationen eher das Auftreten von Resistenzen fördern können (162, 163). Eine weitere Studie identifizierte die Co-Aktivierung von apoptotischen und nicht-apoptotischen Signalwegen als eine Ursache von Antagonismus bei der Kombination von zwei oder mehreren Medikamenten (164).

Die drei untersuchten Neuroblastom-Zelllinien haben unterschiedlich auf die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) angesprochen, worauf in Kapitel 4.6 ausführlicher eingegangen wird.

4.3 Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Vistusertib

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist in vielen Tumoren (63), wie auch dem Neuroblastom, dysreguliert. Die Aktivierung von AKT korreliert mit schlechter Prognose (64) und spielt somit eine wichtige Rolle bei möglichen Therapieoptionen des Neuroblastoms (161). Rapamycin hemmt größtenteils nur mTORC₁, wohingegen mTORC₂ oft nur in bestimmten Zelllinien und nach längerer Behandlung gehemmt wird (106, 115, 116). ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren wie Vistusertib hemmen beide mTOR-Komplexe effektiv (134, 135).

In allen drei untersuchten Zelllinien führte die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) zu einer deutlichen Reduzierung der Phosphorylierung der mTORC₁-Substrate 4E-BP1 und p70S6K1. Darüber hinaus wurde in den drei untersuchten Neuroblastom-Zelllinien die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Serin 65 bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) stärker reduziert als bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R). Eine Resistenz von Rapamycin gegen das mTORC₁-Substrat 4E-BP1 zeigte eine Studie von Feldman *et*

al., denn der ATP-kompetitive mTOR-Inhibitor PP242 inhibiert die Phosphorylierung von 4E-BP1 vollständig an Serin 65, wohingegen Rapamycin die Phosphorylierung nur teilweise inhibiert (96). Des Weiteren konnte in anderen Studien bestätigt werden, dass ATP-kompetitive Inhibitoren die Rapamycin-resistente Phosphorylierung des mTORC₁-Substrats 4E-BP1 effektiv hemmen (119, 133). Über 4E-BP1 wird die mTORC₁-vermittelte mRNA-Translation und Zellproliferation reguliert (77, 81), weshalb die durch Vistusertib vermittelte stärkere Inhibition von mTORC₁ eine Steigerung der antiproliferativen Wirkung der VIST-Therapie im Vergleich zur RIST-Therapie bedeuten könnte.

Die Phosphorylierung von p70S6K1 wurde bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) in allen drei Zelllinien inhibiert, wohingegen sie bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) in den Zelllinien Kelly und SK-N-BE(2) signifikant reduziert und in der Zelllinie IMR-32 gehemmt wurde. Eine vollständige Hemmung der Phosphorylierung von p70S6K1 durch Vistusertib im Vergleich zu Rapamycin wurde somit nicht in allen untersuchten Neuroblastom-Zelllinien erreicht.

Zudem wurden die mTORC₂-Substrate AKT (Ser473) und AKT (Thr308) in allen drei Zelllinien untersucht, jedoch zeigte sich nach vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in keiner Zelllinie eine Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Vistusertib als ATP-kompetitiver mTORC_{1/2}-Inhibitor müsste jedoch zu einer Abnahme der Phosphorylierung des mTORC₂-Substrats AKT führen (165). Da auch die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) zuvor eine Abnahme der Phosphorylierung von AKT zeigte (149) und nicht effektiv wirkte, wird davon ausgegangen, dass die Antikörper möglicherweise nicht in Ordnung waren. In einer vorangegangenen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass Vistusertib effektiv die Phosphorylierung von AKT an Ser473 reduziert und somit mTORC₂ effektiv hemmt (135). Auch Rebecca Wätzig bestätigte, dass der ATP-kompetitive Inhibitor Torin-2 über eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von AKT an Ser473 und Thr308 den mTORC₂ effektiv hemmt (149). Jedoch zeigt eine vorangegangene Studie mit dem ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor WYE-125132 unter anderem an Brust- und Lungenkarzinomzellen ebenfalls keine Suppression von P-AKT (Thr308), allerdings eine Suppression von P-AKT (Ser473) und P-p70S6K (Thr389) (166). Es ist unklar, ob dies auf die verwendeten Zelllinien oder auf die

pharmakologischen bzw. strukturellen Unterschiede der jeweiligen ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren zurückzuführen ist.

Durch beide Doppelbehandlungen konnte in den Zelllinien Kelly und SK-N-BE(2) die Phosphorylierung von Src (Tyr416) gehemmt werden, wohingegen die Gesamtproteinmenge von Src in beiden Zelllinien deutlich zunahm. In der Zelllinie IMR-32 konnte auch nach vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten die Phosphorylierung von Src (Tyr416) im Vergleich zur Kontrolle nicht reduziert werden, jedoch nahm auch hier wie in den Zelllinien Kelly und SK-N-BE(2) die Gesamtproteinmenge deutlich zu, wodurch auch in der Zelllinie IMR-32 von einer relativen Abnahme der Src-Phosphorylierung ausgegangen werden kann.

4.4 Keine Apoptoseinduktion durch Vistusertib

In veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass Rapamycin und ATP-kompetitive Inhibitoren abhängig von der verwendeten Dosis und den verwendeten Zelllinien in der Lage sind, Apoptose zu induzieren (105, 118, 167, 168). Dies zeigt auch eine zuvor durchgeführte Studie bei der in AML-Zelllinien durch die Kombination des pan-PIM-Inhibitors AZD1208 mit Vistusertib Proliferation reduziert und Apoptose gesteigert werden konnte (169). Möglicherweise ist dies auf den pan-PIM-Inhibitor zurückzuführen, da PIM-Kinasen Apoptose verhindern (170).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich in den drei Neuroblastom-Zelllinien weder bei Einzelbehandlung mit Vistusertib noch bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) Caspase-3- oder PARP1-Spaltprodukte. In anderen Untersuchungen mit Zelllinien für das Hepatozelluläre Karzinom und das Prostatakarzinom konnte Vistusertib Apoptose induzieren, jedoch lagen die dort verwendeten Konzentrationen (200 - 600 nM) deutlich über den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen (165, 171). Auch konnte nach der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) in keiner Zelllinie Apoptose induziert werden. Es stellte sich aber heraus, dass Rapamycin im höheren mikromolaren Bereich Apoptose induzieren kann (118). Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurde der ATP-kompetitive mTOR-Inhibitor Vistusertib nur in sehr niedrigen Konzentrationen verwendet. Dass in den durchgeführten Westernblot-Analysen keine Induktion von Apoptose stattgefunden hat, könnte somit daran liegen, dass die verwendeten IC₅₀-Werte von Rapamycin und Vistusertib zu niedrig waren, um Apoptose zu induzieren.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass der Zeitpunkt der Ernte der behandelten Zellen mit 24 Stunden nach Einzel- oder Doppelbehandlung möglicherweise zu früh war. In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass in der Zelllinie IMR-32 72 Stunden nach Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) Apoptose induziert werden konnte (149).

Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Vistusertib bei den verwendeten Konzentrationen zwischen 30 - 149 nM bei Einzelbehandlung und 15 - 70 nM bei Doppelbehandlung keine zytotoxischen Eigenschaften in den untersuchten Neuroblastom-Zelllinien besitzt, sondern nur zytostatische Eigenschaften durch die Induktion des G₁-Phase-Arrests im Zellzyklus, was Vistusertib für die Vorbehandlung in der alternativen VIST-Therapie eignet, jedoch nicht als Monotherapie.

4.5 Vergleichbare Wirkung der VIST-Therapie

In der vorliegenden Arbeit wurde die alternative VIST-Therapie mit der RIST-Therapie verglichen. In allen drei untersuchten Neuroblastom-Zelllinien führten beide angewendete Therapieschemata im Vergleich zur Vehikel (DMSO)-behandelten Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. Mit dem Ziel die Zellviabilität in der VIST-Therapie weiter zu reduzieren, wurden die Neuroblastom-Zelllinien mit 1,5-fach erhöhten IC₅₀-Werten bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) behandelt und mit der RIST-Therapie verglichen. In der Zelllinie Kelly führte dies bei der modifizierten VIST-Therapie zu etwas höheren Zellviabilitäten als in der RIST-Therapie. In den Zelllinien SK-N-BE(2) und IMR-32 konnte die modifizierte VIST-Therapie dabei eine stärkere Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur RIST-Therapie erzielen. Diese Ergebnisse zeigen, dass in den untersuchten Neuroblastom-Zelllinien SK-N-BE(2) und IMR-32 die modifizierte VIST-Therapie in Hinblick auf die Zellviabilität eine Verbesserung gegenüber der RIST-Therapie bei niedrigeren Konzentrationen und somit möglicher Reduktion der Nebenwirkungen darstellt.

Eine randomisierte Phase-II-Studie bei klarzelligem Nierenzellkarzinom verglich Vistusertib mit Everolimus, einem Derivat von Rapamycin (Sirolimus). Obwohl das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Vistusertib schlechter war, überzeugte Vistusertib im Vergleich zu Everolimus mit einem akzeptablem Nebenwirkungsprofil und Pharmakokinetikprofil (172). In einer weiteren Phase-I-Studie bei Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Ovarialkarzinom lagen die

Nebenwirkungen nach Einteilung der *Common Terminology Criteria of Adverse Events* (CTCAE) überwiegend zwischen Grad 1 und 2 (leicht bis mittelschwer) (173). Darüber hinaus zeigte sich in der AcSé-ESMART-Phase-I-/II-Studie eine gute Verträglichkeit von Vistusertib bei pädiatrischen Patient*innen (137). Zudem zeigte Vistusertib bei *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen in MRT-Untersuchungen in der T1-Wichtung eine signifikante Antitumoraktivität. Hierbei stellt sich die Frage, inwiefern dies als diagnostischer Marker zum Ansprechen der Therapie beim Neuroblastom geeignet ist (142). In zwei durchgeführten Phase-II-Studien konnte Vistusertib allein im Vergleich zu Everolimus oder in Kombination mit Fulvestrant keine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens erzielen (130, 172).

4.6 Unterschiedliches Ansprechen der Neuroblastom-Zelllinien auf die VIST-Therapie

Das Neuroblastom ist ein Tumor mit einer sehr variablen klinischen Heterogenität (1, 174). Das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) dient der postoperativen Einteilung der Patient*innen in die Stadien 1 - 4S (10, 11) und das *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS) teilt Patient*innen bereits vor Behandlung anhand von klinischen Kriterien und *image-defined risk factors* (IDRF) in die Stadien L1, L2, M und MS ein. Darüber hinaus spielen auch das Alter, die histologische Klassifikation, der Grad der Tumordifferenzierung, der *MYCN*-Onkogen-Status, das Vorliegen bzw. Fehlen von Chromosom 11q und der Ploidiegrad eine wichtige Rolle bei der Einteilung in die Risikogruppen (12, 13).

In einer veröffentlichten Studie von Rodriguez-Fos *et al.* wurde nachgewiesen, dass Mutationen im Genom von Neuroblastomen mit der Prognose der Patient*innen korrelieren (175). Hierbei konnte gezeigt werden, dass DNA-Schäden durch Sauerstoffradikale und *replication slippage* das Genom von Hochrisiko-*MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen mit geringem Gesamtüberleben auszeichnen. Zudem lagen in Hochrisiko-*MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen Kopienzahlvariationen in Form von Insertionen und Deletionen vor, welche zu *replication slippage* beitragen. Das Genom von Hochrisiko-Nicht-*MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen mit geringem Gesamtüberleben zeichnet sich durch fehlerhafte homologe Rekombination aus. In Nicht-Hochrisiko-Neuroblastom-Genomen mit guter Prognose wurde eine fehlende Segregation von Chromosomen und eine mutierte Topoisomerase-1-Aktivität

gefunden. Generell wurde eine fehlerhafte Segregation in allen Neuroblastomgenomen nachgewiesen (175).

Eine Studie von Bei *et al.* (147) identifizierte das *DEAD-Box Helicase 1 (DDX1)*-Gen als häufigen Co-Amplifikator mit *MYCN*, wobei keine *DDX1*-Amplifikation ohne *MYCN*-Amplifikation vorlag. Bei den *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom-Zelllinien Kelly und SK-N-BE(2) wurde keine *DDX1-MYCN*-Co-Amplifikation nachgewiesen, wohingegen bei der *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 eine *DDX1-MYCN*-Co-Amplifikation nachgewiesen wurde (147). Zudem konnten Bei *et al.* (147) feststellen, dass eine *DDX1-MYCN*-Amplifikation mit einer Abhängigkeit von mTORC₁ einherging. Hier zeigte sich, dass Zelllinien mit *DDX1-MYCN*-Co-Amplifikation besser auf Rapamycin ansprechen als nur *MYCN*-amplifizierte Zelllinien. Das lässt die Frage aufkommen, ob das Vorliegen einer *DDX1-MYCN*-Amplifikation als möglicher Biomarker für das Ansprechen auf mTORC₁-Inhibitoren beim Neuroblastom zu werten ist (147). Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob das Vorliegen einer *DDX1-MYCN*-Amplifikation neben der Abhängigkeit von mTORC₁ auch mit einer zusätzlichen Abhängigkeit von mTORC₂ einhergeht. Dies wurde in der Studie von Bei *et al.* (147) nicht untersucht, könnte aber Hinweise liefern, ob Vistusertib als mTORC_{1/2}-Inhibitor hierbei Rapamycin als mTORC₁-Inhibitor überlegen ist.

Rebecca Wätzig konnte bei der Doppelbehandlung mit Dasatinib und dem mTORC_{1/2}-Inhibitor Torin-2 in der Zelllinie Kelly einen starken Synergismus nachweisen (149), wohingegen in dieser Arbeit bei der Doppelbehandlung mit Dasatinib und dem mTORC_{1/2}-Inhibitor Vistusertib in der Zelllinie Kelly ein leichter Antagonismus vorlag. Ebenfalls wurde bei der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Torin-2 in der Zelllinie SK-N-BE(2) ein mäßiger Antagonismus nachgewiesen (149), jedoch lag in dieser Arbeit bei der Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Vistusertib (D+V) ein additiver Effekt vor. Im Vergleich dazu lag bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) ein mäßiger Synergismus vor (148, 149). In der Zelllinie IMR-32 konnte sowohl bei Einzel- als auch bei Doppelbehandlung die Phosphorylierung von 4E-EP1 nahezu gehemmt werden, was in den anderen Zelllinien Kelly und SK-N-BE(2) nicht gelang. Sowohl in dieser Arbeit als auch bei Rebecca Wätzig konnten beide alternativen Therapieschemata (VIST- und TIST-Therapie) in der Zelllinie Kelly keine niedrigere Zellviabilität als die RIST-Therapie erreichen (149). Die VIST-Therapie sprach am besten bei der Zelllinie IMR-32 an, bei Rebecca Wätzig sprach die TIST-Therapie ebenfalls am besten bei der Zelllinie IMR-32 an (149). Somit liefert der mTORC_{1/2}-

Inhibitor Vistusertib in der VIST-Therapie in der Zelllinie Kelly ein schlechteres Ansprechen, wohingegen in der Zelllinie IMR-32 ein besseres Ansprechen erreicht wurde. Ob das unterschiedliche Ansprechen der Neuroblastom-Zelllinien auf die VIST-Therapie möglicherweise am Vorliegen oder Fehlen einer *DDX1-MYCN*-Co-Amplifikation der untersuchten Zelllinien liegt oder an der Aktivierung bzw. Inhibition weiterer Signalwege des mTORC_{1/2}-Inhibitors Vistusertib, ist nicht abschließend geklärt und bedarf weiterer Forschung.

4.7 Kritische Betrachtung von Vistusertib

Bei den laborinternen Arbeiten mit Vistusertib zeigte sich eine gewisse Photolabilität, weswegen alle Arbeiten unter der Sterilbank ohne Licht und mit Aluminiumfolie durchgeführt wurden. Zudem zeigte sich bei bereits in DMSO gelöstem Vistusertib eine Erhöhung der Zellviabilität nach etwa 2 Monaten, wobei die Haltbarkeit vom Hersteller mit 3 Monaten angegeben ist. Daraufhin wurde ungelöstes Vistusertib in Pulverform bestellt und nach Bedarf aliquotiert. Hier stellt sich die Frage, inwiefern Vistusertib im präklinischen Setting am besten gehandhabt werden sollte, damit die gewonnenen Ergebnisse reproduzierbar sind.

4.8 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen präklinisch eine mögliche Verbesserung der RIST-Therapie durch den Austausch von Rapamycin mit Vistusertib. Weitere präklinische Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um diese Ergebnisse zu untermauern. Hierzu könnte in Neuroblastom-Zelllinien getestet werden, ob durch das VIST-Therapieschema nach der Behandlung mit den Chemotherapeutika, ebenfalls wie durch das RIST-Therapieschema, Apoptose induziert wird (149).

Um die Effektivität in weiteren Studien zu untersuchen, könnte die VIST-Therapie an dreidimensionalen (3D-) Sphäroiden getestet werden, die dem Tumor *in vivo* in Bezug auf Tumorbilogie, -architektur und -metabolismus ähneln (176-178). Eine vorangegangene Studie hat die 3D-Zellkulturen für die in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastom-Zelllinien Kelly, SK-N-BE(2) und IMR-32 und die RIST-Therapie etabliert. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) auch in Sphäroiden zu einer reduzierten Zellviabilität, einem

eingeschränkten neoplastischen Signaling und einer reduzierten Expression von Krebsstammzellmarkern führt (179). Interessant wäre zu vergleichen, wie effektiv Vistusertib in Kombination mit Dasatinib und die VIST-Therapie in 3D-Zellkulturen wirkt.

Eine In-vivo-Testung im Mausmodell mit besonderem Augenmerk auf der Toxizität und dem Nebenwirkungsprofil müsste durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob Vistusertib in beiden Kriterien ein akzeptables Ergebnis aufweist. Veröffentlichte Phase-II-Studien zeigten bereits, dass sich die Nebenwirkungen von Vistusertib überwiegend im leicht bis mittelschweren Bereich befinden (172, 180) und somit kein schlechteres Nebenwirkungsprofil als allosterische mTOR-Inhibitoren aufweisen. Anschließend müsste eine klinische Studie zur Testung der Wirksamkeit der VIST-Therapie durchgeführt werden, auch in Hinblick auf mögliche Biomarker, die ein Ansprechen der VIST-Therapie prognostizieren könnten.

5 Literaturverzeichnis

1. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(3):203-16.
2. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007;369(9579):2106-20.
3. Colon NC, Chung DH. Neuroblastoma. *Adv Pediatr*. 2011;58(1):297-311.
4. 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.
5. Kushner BH. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med*. 2004;45(7):1172-88.
6. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(1):65-86.
7. Strother DR, London WB, Schmidt ML, Brodeur GM, Shimada H, Thorner P, et al. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1842-8.
8. Bosse KR, Maris JM. Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer*. 2016;122(1):20-33.
9. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med*. 1999;341(16):1165-73.
10. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1988;6(12):1874-81.
11. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993;11(8):1466-77.
12. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):289-97.
13. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):298-303.
14. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985;313(18):1111-6.

15. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(10):a014415.
16. 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(4653):1121-4.
17. Huang R, Cheung NK, Vider J, Cheung IY, Gerald WL, Tickoo SK, et al. MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas. Faseb j. 2011;25(12):4138-49.
18. 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.
19. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, et al. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. J Clin Oncol. 2011;29(24):3286-92.
20. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. Expert Rev Anticancer Ther. 2017;17(4):369-86.
21. Corbacioglu S, Lode H, Ellinger S, Zeman F, Suttorp M, Escherich G, et al. Irinotecan and temozolomide in combination with dasatinib and rapamycin versus irinotecan and temozolomide for patients with relapsed or refractory neuroblastoma (RIST-rNB-2011): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2024;25(7):922-32.
22. Moreno L, Rubie H, Varo A, Le Deley MC, Amoroso L, Chevance A, et al. Outcome of children with relapsed or refractory neuroblastoma: A meta-analysis of ITCC/SIOPEN European phase II clinical trials. Pediatr Blood Cancer. 2017;64(1):25-31.
23. ClinicalTrial.gov. Prospective, Open Label, Randomized Phase II Trial to Assess a Multimodal Molecular Targeted Therapy in Children, Adolescent and Young Adults With Relapsed or Refractory High-risk Neuroblastoma (RIST-rNB-2011) [updated 06.10.2020, 09.09.2024]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01467986>.
24. Corbacioglu S, Steinbach D, Lode HN, Gruhn B, Fruehwald M, Broeckelmann M, et al. The RIST design: A molecularly targeted multimodal approach for the treatment of patients with relapsed and refractory neuroblastoma. Journal of Clinical Oncology. 2013;31(15_suppl):10017-.
25. 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.

26. Chou TC, Tan QH, Sirotnak FM. Quantitation of the synergistic interaction of edatrexate and cisplatin in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1993;31(4):259-64.
27. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*. 2015;3(3):e00149.
28. Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from Across Disciplines. *Front Pharmacol*. 2017;8:158.
29. Houghton PJ, Stewart CF, Cheshire PJ, Richmond LB, Kirstein MN, Poquette CA, et al. Antitumor activity of temozolomide combined with irinotecan is partly independent of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair phenotypes in xenograft models. *Clin Cancer Res*. 2000;6(10):4110-8.
30. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*. 2000;105(8):R15-24.
31. Mouton JW. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. *Infection*. 1999;27 Suppl 2:S24-8.
32. Saputra EC, Huang L, Chen Y, Tucker-Kellogg L. Combination Therapy and the Evolution of Resistance: The Theoretical Merits of Synergism and Antagonism in Cancer. *Cancer Res*. 2018;78(9):2419-31.
33. Blagosklonny MV, Darzynkiewicz Z. Cyclotherapy: protection of normal cells and unshielding of cancer cells. *Cell Cycle*. 2002;1(6):375-82.
34. Blagosklonny MV. Overcoming limitations of natural anticancer drugs by combining with artificial agents. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(2):77-81.
35. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1045-7.
36. Bello L, Carrabba G, Giussani C, Lucini V, Cerutti F, Scaglione F, et al. Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth in vivo. *Cancer Res*. 2001;61(20):7501-6.
37. Bertolini F, Paul S, Mancuso P, Monestiroli S, Gobbi A, Shaked Y, et al. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res*. 2003;63(15):4342-6.
38. Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, et al. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res*. 2002;62(10):2731-5.

39. Hahnfeldt P, Folkman J, Hlatky L. Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis. *J Theor Biol.* 2003;220(4):545-54.
40. 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. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2005;27(11):573-81.
41. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):423-36.
42. Bender A, Opel D, Naumann I, Kappler R, Friedman L, von Schweinitz D, et al. PI3K inhibitors prime neuroblastoma cells for chemotherapy by shifting the balance towards pro-apoptotic Bcl-2 proteins and enhanced mitochondrial apoptosis. *Oncogene.* 2011;30(4):494-503.
43. Corbacioglu S, Kilic M, Westhoff MA, Reinhardt D, Fulda S, Debatin KM. 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.
44. Nonnenmacher L, Westhoff MA, Fulda S, Karpel-Massler G, Halatsch ME, Engelke J, et al. RIST: a potent new combination therapy for glioblastoma. *Int J Cancer.* 2015;136(4):E173-87.
45. Wätzig R. Testung verschiedener mTOR-Inhibitoren zur Verbesserung der RIST-Therapie in einem in-vitro Modell des Neuroblastoms: Regensburg; 2022.
46. 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.
47. 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.
48. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.* 2004;305(5682):399-401.
49. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;362(24):2260-70.
50. Keam SJ. Dasatinib: in chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *BioDrugs.* 2008;22(1):59-69.

51. Vitali R, Mancini C, Cesi V, Tanno B, Piscitelli M, Mancuso M, et al. Activity of tyrosine kinase inhibitor Dasatinib in neuroblastoma cells in vitro and in orthotopic mouse model. *Int J Cancer*. 2009;125(11):2547-55.
52. Timeus F, Crescenzo N, Fandi A, Doria A, Foglia L, Cordero di Montezemolo L. In vitro antiproliferative and antimigratory activity of dasatinib in neuroblastoma and Ewing sarcoma cell lines. *Oncol Rep*. 2008;19(2):353-9.
53. Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hakusui H, Nagai E. Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase. *Biol Pharm Bull*. 1994;17(5):662-4.
54. Rivory LP, Bowles MR, Robert J, Pond SM. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochem Pharmacol*. 1996;52(7):1103-11.
55. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res*. 1991;51(16):4187-91.
56. Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;922:1-10.
57. Hsiang YH, Liu LF. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res*. 1988;48(7):1722-6.
58. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 1985;260(27):14873-8.
59. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(1):102-14.
60. 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.
61. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8):606-19.
62. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:615-75.
63. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 2017;170(4):605-35.
64. Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin KM, Fulda S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2007;67(2):735-45.

65. King D, Yeomanson D, Bryant HE. PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(4):245-51.
66. Fulda S. The PI3K/Akt/mTOR pathway as therapeutic target in neuroblastoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(6):729-37.
67. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):550-62.
68. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 1997;7(4):261-9.
69. 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.
70. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32081-9.
71. 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. *Int J Cancer*. 2011;129(12):2958-65.
72. 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(20):2910-22.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
77. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):307-18.
78. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-45.

79. Redpath NT, Foulstone EJ, Proud CG. Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signalling pathway. *Embo j.* 1996;15(9):2291-7.
80. Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo j.* 2001;20(16):4370-9.
81. Dowling RJ, 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.
82. Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, et al. Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol.* 2005;7(3):286-94.
83. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003;17(15):1829-34.
84. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008;30(2):214-26.
85. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol.* 2005;15(8):702-13.
86. Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Stocker H, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell.* 2003;11(6):1457-66.
87. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol.* 2003;13(15):1259-68.
88. Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(11):2477-88.
89. 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.
90. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, 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.
91. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307(5712):1098-101.

92. Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *Embo j.* 2008;27(14):1919-31.
93. García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J.* 2008;416(3):375-85.
94. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, et al. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *Embo j.* 2008;27(14):1932-43.
95. 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.
96. 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.
97. Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene.* 2006;25(48):6436-46.
98. 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).
99. Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat.* 2008;11(3):63-76.
100. 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.
101. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010;362(23):2202-11.
102. Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, Russell RG, Iavarone A. Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice. *Mol Cell Biol.* 2005;25(9):3563-74.
103. Kang J, Rychahou PG, Ishola TA, Mouroi JM, Evers BM, Chung DH. N-myc is a novel regulator of PI3K-mediated VEGF expression in neuroblastoma. *Oncogene.* 2008;27(28):3999-4007.
104. Hogarty MD, Maris JM. PI3King on MYCN to improve neuroblastoma therapeutics. *Cancer Cell.* 2012;21(2):145-7.
105. 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.
106. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* 2014;19(3):373-9.

107. 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 (Tokyo)*. 1975;28(10):721-6.
108. Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):727-32.
109. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*. 1977;55(1):48-51.
110. Kreis H, Oberbauer R, Campistol JM, Mathew T, Daloze P, Schena FP, et al. Long-term benefits with sirolimus-based therapy after early cyclosporine withdrawal. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(3):809-17.
111. Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol*. 2008;1(1-4):27-36.
112. Battelli C, Cho DC. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy*. 2011;8(4):359-67.
113. Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest*. 2013;123(3):980-9.
114. Moes DJ, Guchelaar HJ, de Fijter JW. Sirolimus and everolimus in kidney transplantation. *Drug Discov Today*. 2015;20(10):1243-9.
115. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004;6(11):1122-8.
116. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22(2):159-68.
117. Easton JB, Houghton PJ. Therapeutic potential of target of rapamycin inhibitors. *Expert Opin Ther Targets*. 2004;8(6):551-64.
118. Yellen P, Saqcena M, Salloum D, Feng J, Preda A, Xu L, et al. High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell Cycle*. 2011;10(22):3948-56.
119. Choo AY, Yoon SO, 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.
120. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):729-34.
121. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 2001;3(3):245-52.

122. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-68.
123. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 16):2903-10.
124. Baroja-Mazo A, Revilla-Nuin B, Ramírez P, Pons JA. Immunosuppressive potency of mechanistic target of rapamycin inhibitors in solid-organ transplantation. *World J Transplant*. 2016;6(1):183-92.
125. Alameen AA, 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.
126. Janes MR, Limon JJ, So L, Chen J, Lim RJ, Chavez MA, et al. Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nat Med*. 2010;16(2):205-13.
127. Colamonici M, Blyth G, Saleiro D, Szilard A, Bliss-Moreau M, Giles FJ, et al. Dual targeting of acute myeloid leukemia progenitors by catalytic mTOR inhibition and blockade of the p110 α subunit of PI3 kinase. *Oncotarget*. 2015;6(10):8062-70.
128. Heudel P, Frenel JS, Dalban C, Bazan F, Joly F, Arnaud A, et al. Safety and Efficacy of the mTOR Inhibitor, Vistusertib, Combined With Anastrozole in Patients With Hormone Receptor-Positive Recurrent or Metastatic Endometrial Cancer: The VICTORIA Multicenter, Open-label, Phase 1/2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2022;8(7):1001-9.
129. Lapointe S, Mason W, MacNeil M, Harlos C, Tsang R, Sederias J, et al. A phase I study of vistusertib (dual mTORC1/2 inhibitor) in patients with previously treated glioblastoma multiforme: a CCTG study. *Invest New Drugs*. 2020;38(4):1137-44.
130. Schmid P, Zaiss M, Harper-Wynne C, Ferreira M, Dubey S, Chan S, et al. Fulvestrant Plus Vistusertib vs Fulvestrant Plus Everolimus vs Fulvestrant Alone for Women With Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: The MANTA Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019;5(11):1556-64.
131. Basu B, Dean E, Puglisi M, Greystoke A, Ong M, Burke W, et al. First-in-Human Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Dual m-TORC 1/2 Inhibitor AZD2014. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3412-9.
132. Pike KG, Malagu K, Hummersone MG, Menear KA, Duggan HM, Gomez S, et al. Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: the discovery of AZD8055 and AZD2014. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(5):1212-6.

133. 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.
134. Bhagwat SV, Gokhale PC, Crew AP, Cooke A, Yao Y, Mantis C, et al. Preclinical characterization of OSI-027, a potent and selective inhibitor of mTORC1 and mTORC2: distinct from rapamycin. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(8):1394-406.
135. Pancholi S, Leal MF, Ribas R, Simigdala N, Schuster E, Chateau-Joubert S, et al. Combination of mTORC1/2 inhibitor vistusertib plus fulvestrant in vitro and in vivo targets oestrogen receptor-positive endocrine-resistant breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):135.
136. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today*. 2007;12(3-4):112-24.
137. Morscher RJ, Brard C, Berlanga P, Marshall LV, André N, Rubino J, et al. First-in-child phase I/II study of the dual mTORC1/2 inhibitor vistusertib (AZD2014) as monotherapy and in combination with topotecan-temozolomide in children with advanced malignancies: arms E and F of the AcSé-ESMART trial. *Eur J Cancer*. 2021;157:268-77.
138. Hillmann P, Fabbro D. PI3K/mTOR Pathway Inhibition: Opportunities in Oncology and Rare Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).
139. Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1231-41.
140. Kennedy BK, Lamming DW. The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. *Cell Metab*. 2016;23(6):990-1003.
141. Banerjee S, Giannone G, Clamp AR, Ennis DP, Glasspool RM, Herbertson R, et al. Efficacy and Safety of Weekly Paclitaxel Plus Vistusertib vs Paclitaxel Alone in Patients With Platinum-Resistant Ovarian High-Grade Serous Carcinoma: The OCTOPUS Multicenter, Phase 2, Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2023;9(5):675-82.
142. Zormpas-Petridis K, Poon E, Clarke M, Jerome NP, Boulton JKR, Blackledge MD, et al. Noninvasive MRI Native T(1) Mapping Detects Response to MYCN-targeted Therapies in the Th-MYCN Model of Neuroblastoma. *Cancer Res*. 2020;80(16):3424-35.
143. Moreno L, Barone G, DuBois SG, Molenaar J, Fischer M, Schulte J, et al. Accelerating drug development for neuroblastoma: Summary of the Second Neuroblastoma Drug Development Strategy forum from Innovative Therapies for Children with Cancer and International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2020;136:52-68.

144. DSMZ. Data Sheet Kelly (ACC 355). Braunschweig, Deutschland [26.11.2024]. Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-355>.
145. DSMZ. Data Sheet SK-N-BE(2) (ACC 632). Braunschweig, Deutschland [26.11.2024]. Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-632>.
146. DSMZ. Data Sheet IMR-32 (ACC 165). Braunschweig, Deutschland [26.11.2024]. Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-165>.
147. Bei Y, Bramé L, Kirchner M, Fritsche-Guenther R, Kunz S, Bhattacharya A, et al. Amplicon structure creates collateral therapeutic vulnerability in cancer. *bioRxiv*. 2022:2022.09.08.506647.
148. Leister J. Multimodale molekulare Therapieansätze in einem in-vitro-Modell des Neuroblastoms: Regensburg; 2019.
149. Waetzig R, Matthes M, Leister J, Penkivech G, Heise T, Corbacioglu S, et al. Comparing mTOR inhibitor Rapamycin with Torin-2 within the RIST molecular-targeted regimen in neuroblastoma cells. *Int J Med Sci*. 2021;18(1):137-49.
150. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
151. Chou JC, T. C. Computerized simulation of dose reduction index (DRI) in synergistic drug combinations. *Pharmacologist*. 1988;30:231.
152. Tallarida RJ. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer*. 2011;2(11):1003-8.
153. Chou T-C, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends in pharmacological sciences*. 1983;4:450-4.
154. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55.
155. Chou TC. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(11):2059-80.
156. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621-81.
157. Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol*. 2011;731:421-34.
158. Aykul S, Martinez-Hackert E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal Biochem*. 2016;508:97-103.

159. 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.
160. Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres 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.
161. Mei H, Wang Y, Lin Z, Tong Q. The mTOR signaling pathway in pediatric neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol.* 2013;30(7):605-15.
162. Michel JB, Yeh PJ, Chait R, Moellering RC, Jr., Kishony R. Drug interactions modulate the potential for evolution of resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):14918-23.
163. Chait R, Craney A, Kishony R. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature.* 2007;446(7136):668-71.
164. Richards R, Schwartz HR, Honeywell ME, Stewart MS, Cruz-Gordillo P, Joyce AJ, et al. Drug antagonism and single-agent dominance result from differences in death kinetics. *Nat Chem Biol.* 2020;16(7):791-800.
165. Li S, Sheng J, Liu Z, Fan Y, Zhang C, Lv T, et al. Potent antitumour of the mTORC1/2 dual inhibitor AZD2014 in docetaxel-sensitive and docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2021;25(5):2436-49.
166. Yu K, Shi C, Toral-Barza L, Lucas J, Shor B, Kim JE, et al. Beyond rapalog therapy: preclinical pharmacology and antitumor activity of WYE-125132, an ATP-competitive and specific inhibitor of mTORC1 and mTORC2. *Cancer Res.* 2010;70(2):621-31.
167. Sini P, James D, Chresta C, Guichard S. Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells. *Autophagy.* 2010;6(4):553-4.
168. 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.
169. Harada M, Benito J, Yamamoto S, Kaur S, Arslan D, Ramirez S, et al. The novel combination of dual mTOR inhibitor AZD2014 and pan-PIM inhibitor AZD1208 inhibits growth in acute myeloid leukemia via HSF pathway suppression. *Oncotarget.* 2015;6(35):37930-47.
170. Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett.* 2004;571(1-3):43-9.

171. Liao H, Huang Y, Guo B, Liang B, Liu X, Ou H, et al. Dramatic antitumor effects of the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD2014 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2015;5(1):125-39.
172. Powles T, Wheeler M, Din O, Geldart T, Boleti E, Stockdale A, et al. A Randomised Phase 2 Study of AZD2014 Versus Everolimus in Patients with VEGF-Refractory Metastatic Clear Cell Renal Cancer. *Eur Urol.* 2016;69(3):450-6.
173. Basu B, Krebs MG, Sundar R, Wilson RH, Spicer J, Jones R, et al. Vistusertib (dual m-TORC1/2 inhibitor) in combination with paclitaxel in patients with high-grade serous ovarian and squamous non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(9):1918-25.
174. Capasso M, Diskin SJ. Genetics and genomics of neuroblastoma. *Cancer Treat Res.* 2010;155:65-84.
175. Rodriguez-Fos E, Planas-Fèlix M, Burkert M, Puiggròs M, Toedling J, Thiessen N, et al. Mutational topography reflects clinical neuroblastoma heterogeneity. *Cell Genom.* 2023;3(10):100402.
176. Pinto B, Henriques AC, Silva PMA, Bousbaa H. Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics.* 2020;12(12).
177. Nunes AS, Barros AS, Costa EC, Moreira AF, Correia IJ. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng.* 2019;116(1):206-26.
178. Nolan JC, Frawley T, Tighe J, Soh H, Curtin C, Piskareva O. Preclinical models for neuroblastoma: Advances and challenges. *Cancer Lett.* 2020;474:53-62.
179. Kaess C, Matthes M, Gross J, Waetzig R, Heise T, Corbacioglu S, et al. Evaluating the RIST Molecular-Targeted Regimen in a Three-Dimensional Neuroblastoma Spheroid Cell Culture Model. *Cancers (Basel).* 2023;15(6).
180. Eyre TA, Hildyard C, Hamblin A, Ali AS, Houlton A, Hopkins L, et al. A phase II study to assess the safety and efficacy of the dual mTORC1/2 inhibitor vistusertib in relapsed, refractory DLBCL. *Hematol Oncol.* 2019;37(4):352-9.

6 Anhang

6.1 Bestimmung der IC_{50} -Werte von Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib bei Einzelbehandlung

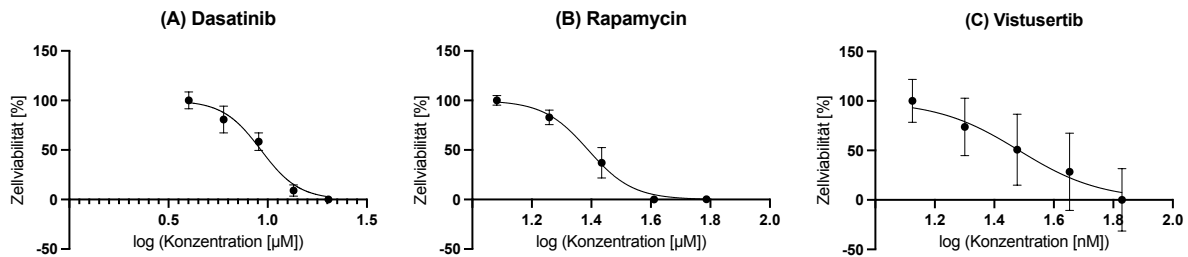


Abbildung 22: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie Kelly zur IC_{50} -Bestimmung der verwendeten molekular-zielgerichteten Inhibitoren.

Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren in einer 96-Well-Platte bei einer Konfluenz von etwa 30 - 50 % mit (A) Dasatinib, (B) Rapamycin und (C) Vistusertib behandelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte 72 h nach der Behandlung mittels MTT-Assay. Die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib wurden von Marie Matthes in laborinternen Vorversuchen ermittelt und die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib und Rapamycin wurden von Rebecca Wätzig bestätigt (149). In dieser Arbeit wurden die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib erneut verifiziert. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt, die Standardabweichung ist angegeben.

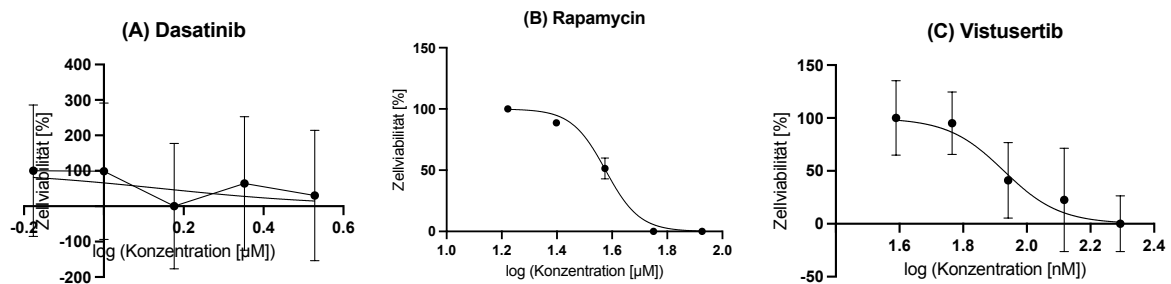
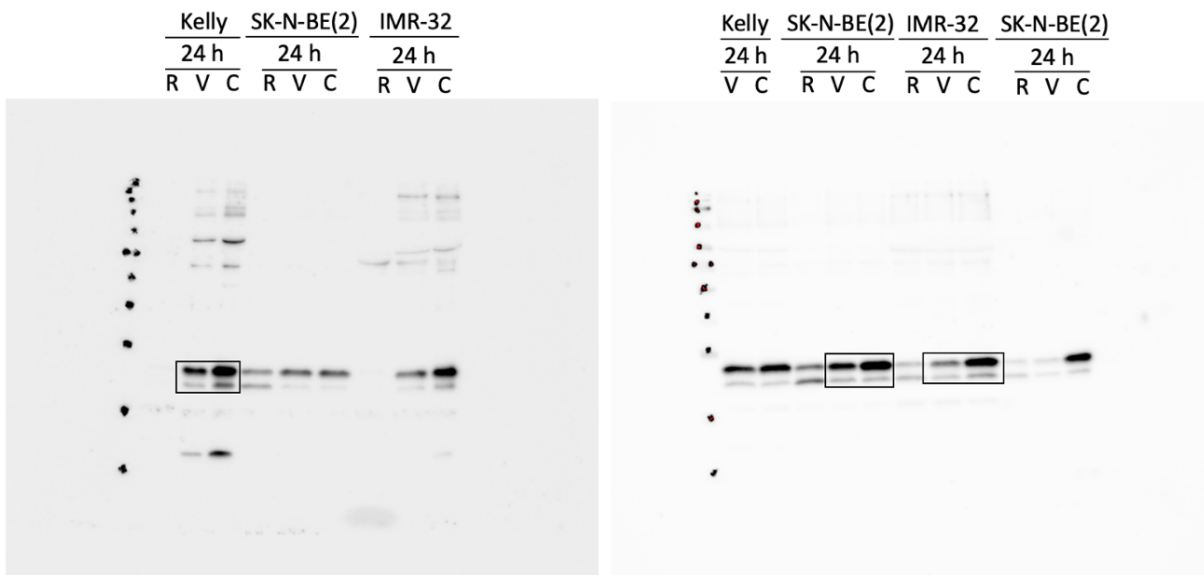


Abbildung 23: Zellviabilitätskurven für die Zelllinie IMR-32 zur IC_{50} -Bestimmung der verwendeten molekular-zielgerichteten Inhibitoren.

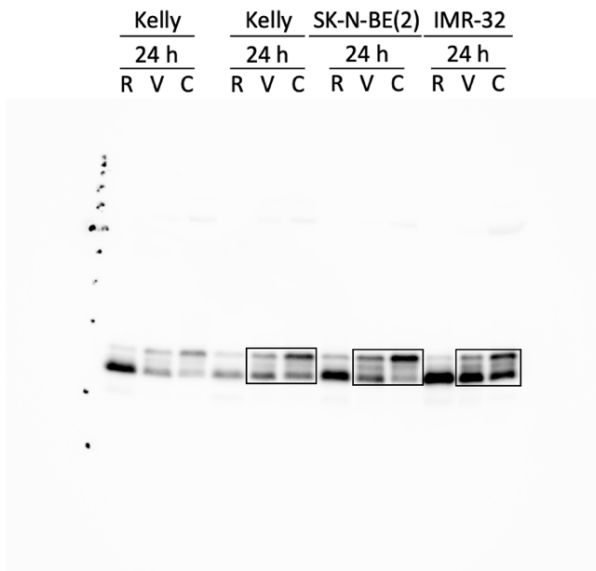
Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren in einer 96-Well-Platte bei einer Konfluenz von etwa 30 - 50 % mit (A) Dasatinib, (B) Rapamycin, und (C) Vistusertib behandelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte 72 h nach der Behandlung mittels MTT-Assay. Die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib wurden von Marie Matthes in laborinternen Vorversuchen ermittelt und die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib und Rapamycin wurden von Rebecca Wätzig bestätigt (149). In dieser Arbeit wurden die IC_{50} -Werte bei Einzelbehandlung mit Dasatinib, Rapamycin und Vistusertib erneut verifiziert. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt, die Standardabweichung ist angegeben.

6.2 Original-Westernblots

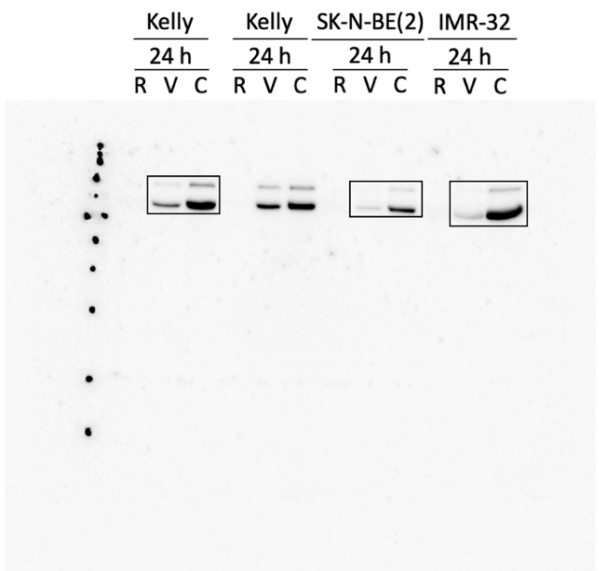
P-4E-BP1 (Ser65), 15 - 20 kDa



4E-BP1, 15 - 20 kDa



P-p70S6K1 (Thr389), 70, 85 kDa



p70S6K1, 70, 85 kDa

GAPDH, 37 kDa

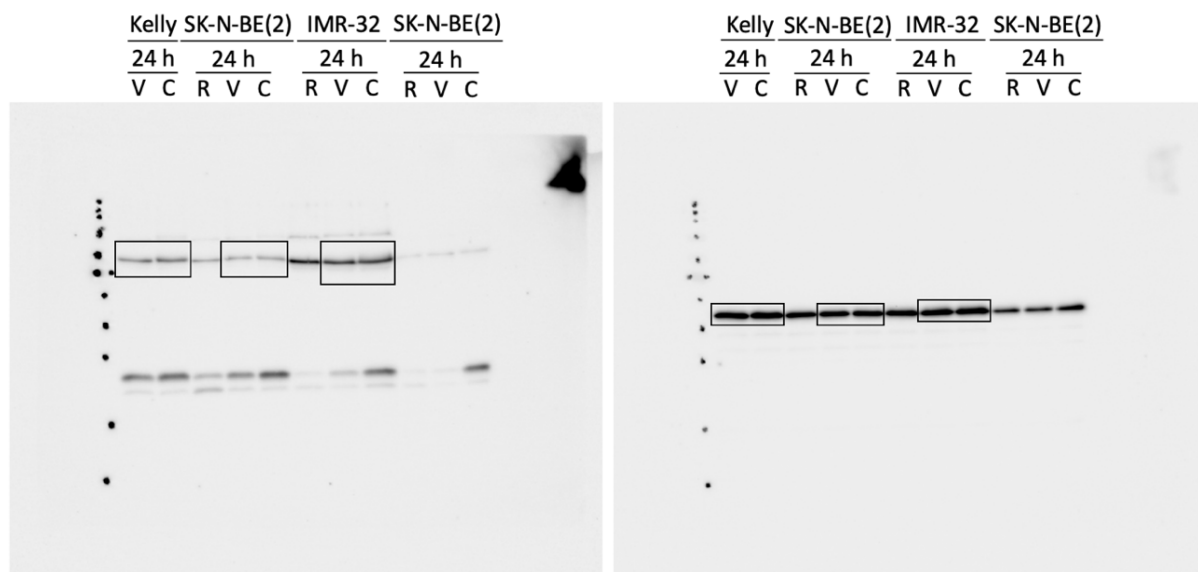
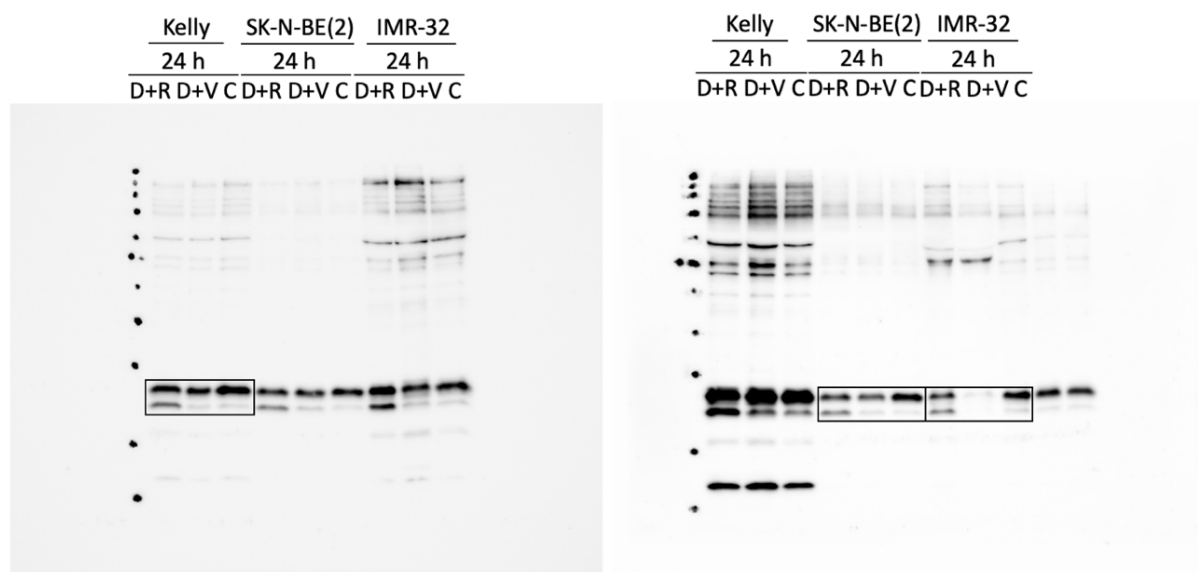
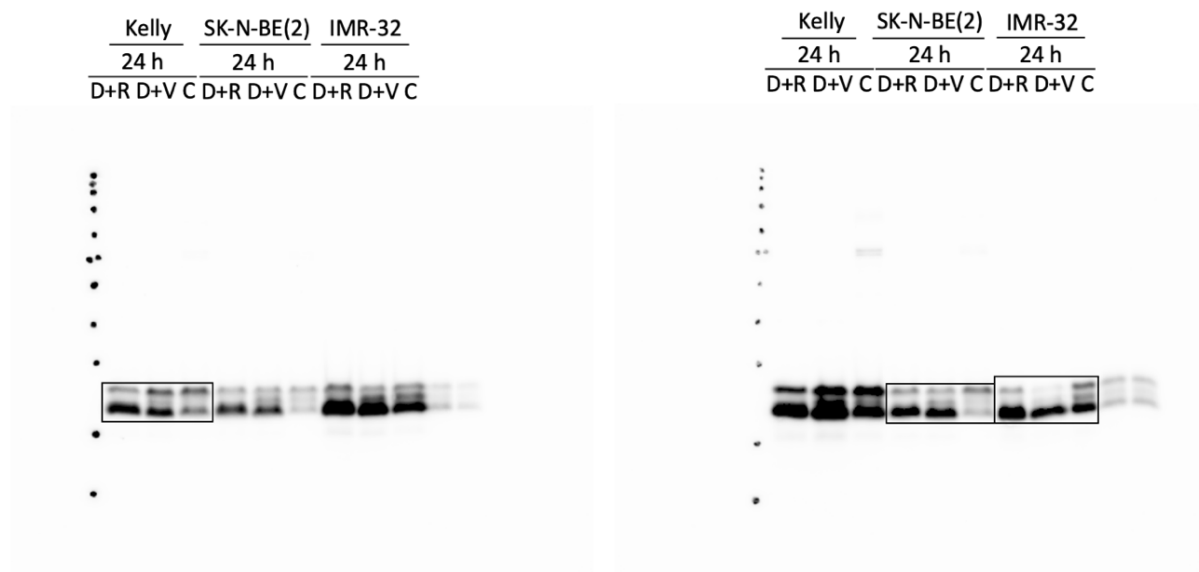


Abbildung 24: Original-Westernblots zu Abbildung 16: Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Einzelbehandlung mit Vistusertib.

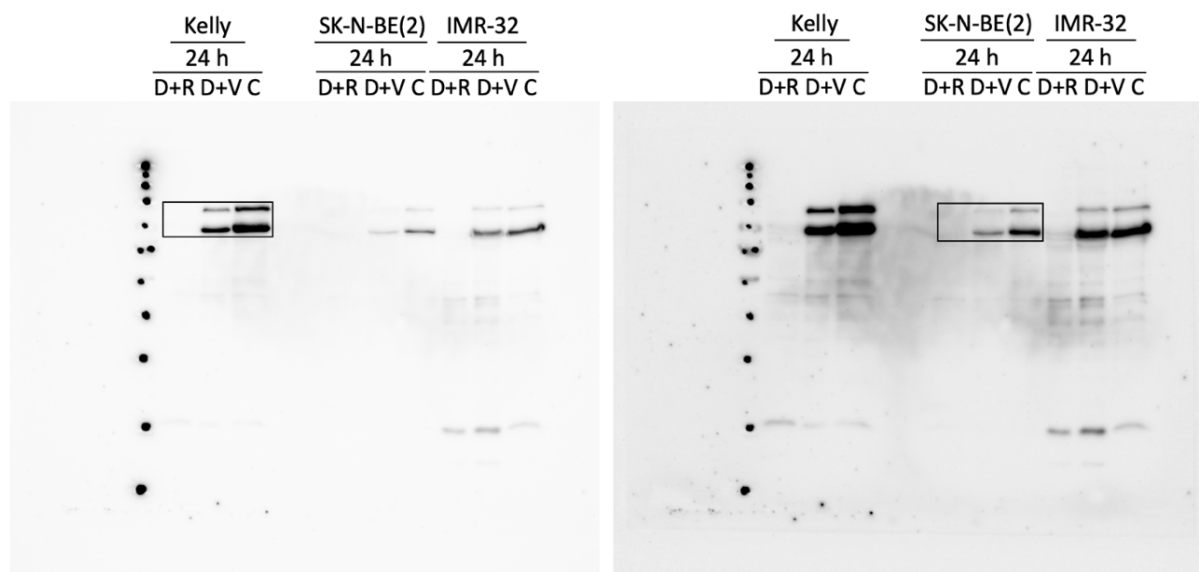
P-4E-BP1 (Ser65), 15 - 20 kDa



4E-BP1, 15 - 20 kDa

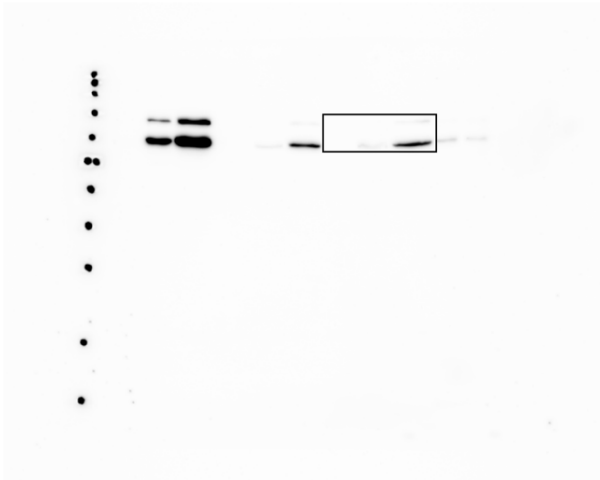


P-p70S6K1 (Thr389), 70, 85 kDa



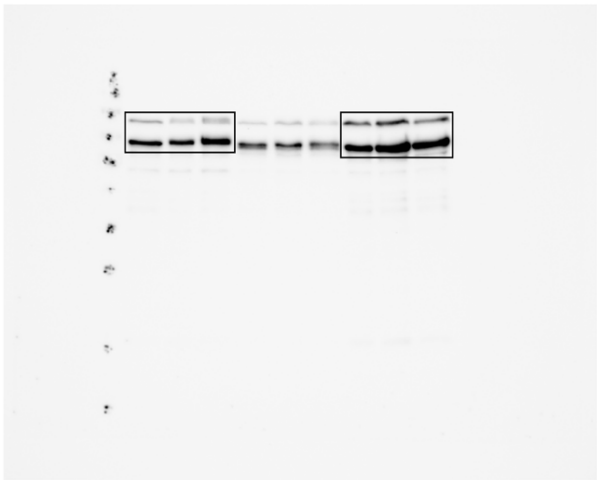
P-p70S6K1 (Thr389), 70, 85 kDa

Kelly		SK-N-BE(2)		IMR-32	
24 h		24 h		24 h	
D+R	D+V	C	D+R	D+V	C



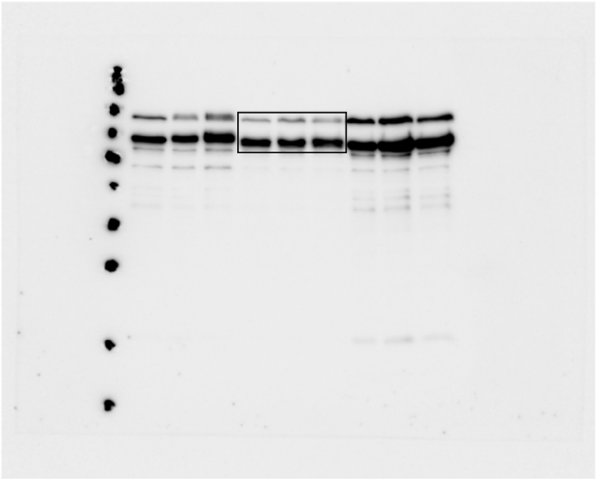
p70S6K1, 70, 85 kDa

Kelly		SK-N-BE(2)		IMR-32	
24 h		24 h		24 h	
D+R	D+V	C	D+R	D+V	C



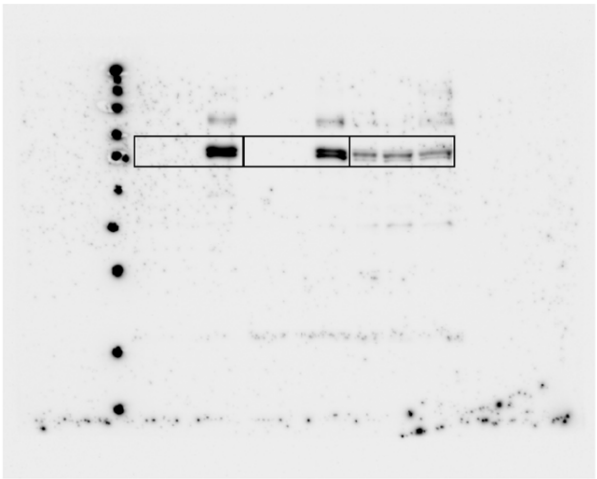
p70S6K1, 70, 85 kDa

Kelly		SK-N-BE(2)		IMR-32	
24 h		24 h		24 h	
D+R	D+V	C	D+R	D+V	C

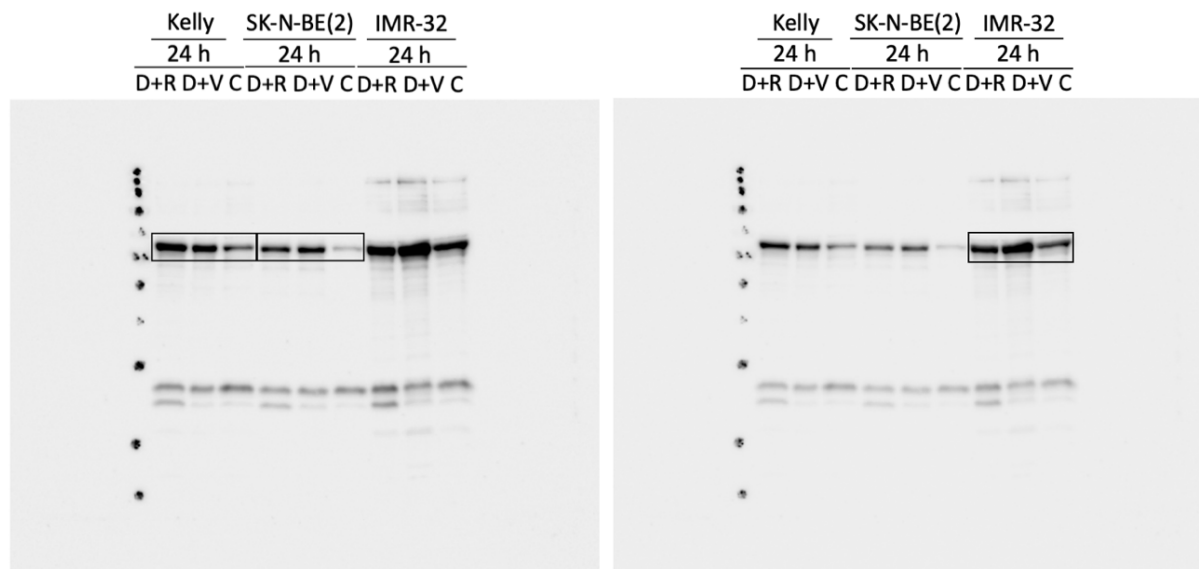


P-Src (Tyr416), 60 kDa

Kelly		SK-N-BE(2)		IMR-32	
24 h		24 h		24 h	
D+R	D+V	C	D+R	D+V	C



Src, 60 kDa



GAPDH, 37 kDa

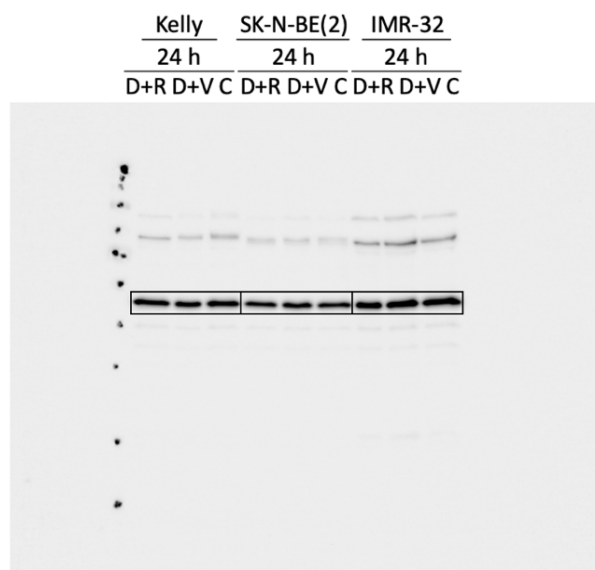
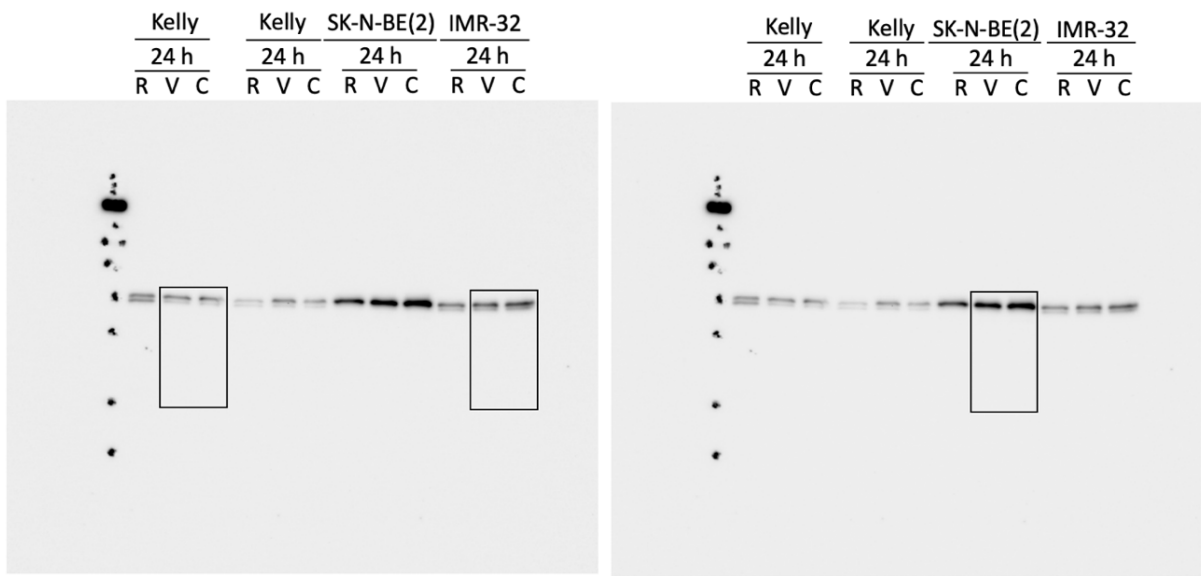
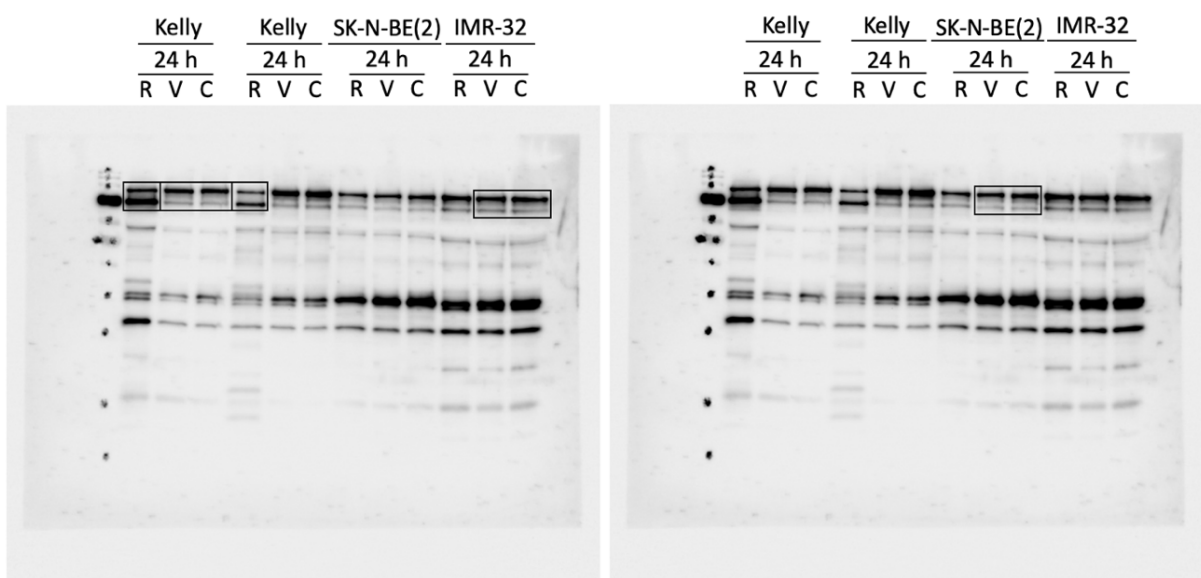


Abbildung 25: Original-Westernblots zu Abbildung 17: Hemmung neoplastischer Signalwege durch Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).

Caspase-3, 17, 19, 35 kDa



PARP1, 89, 116 kDa



GAPDH, 37 kDa

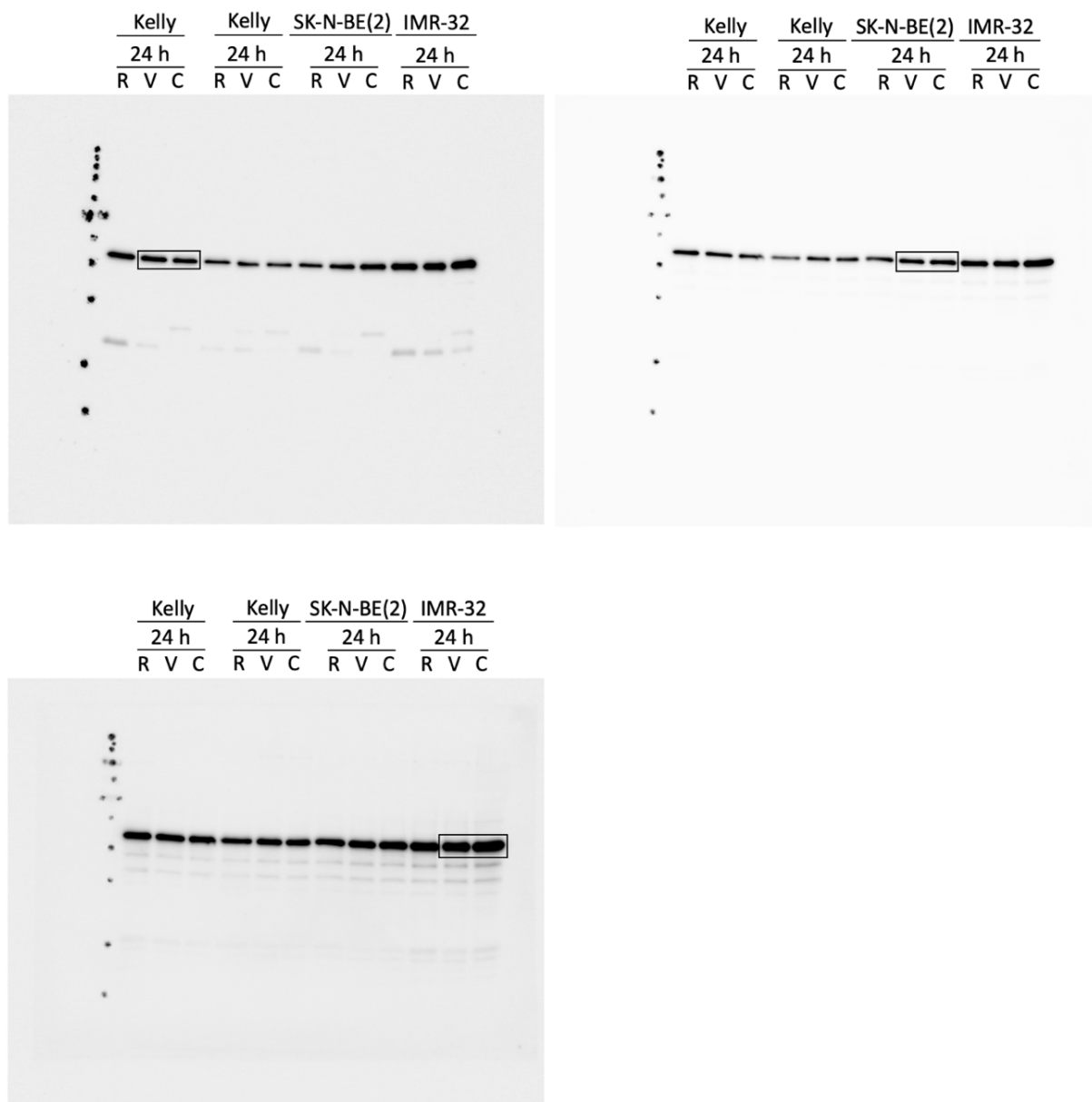
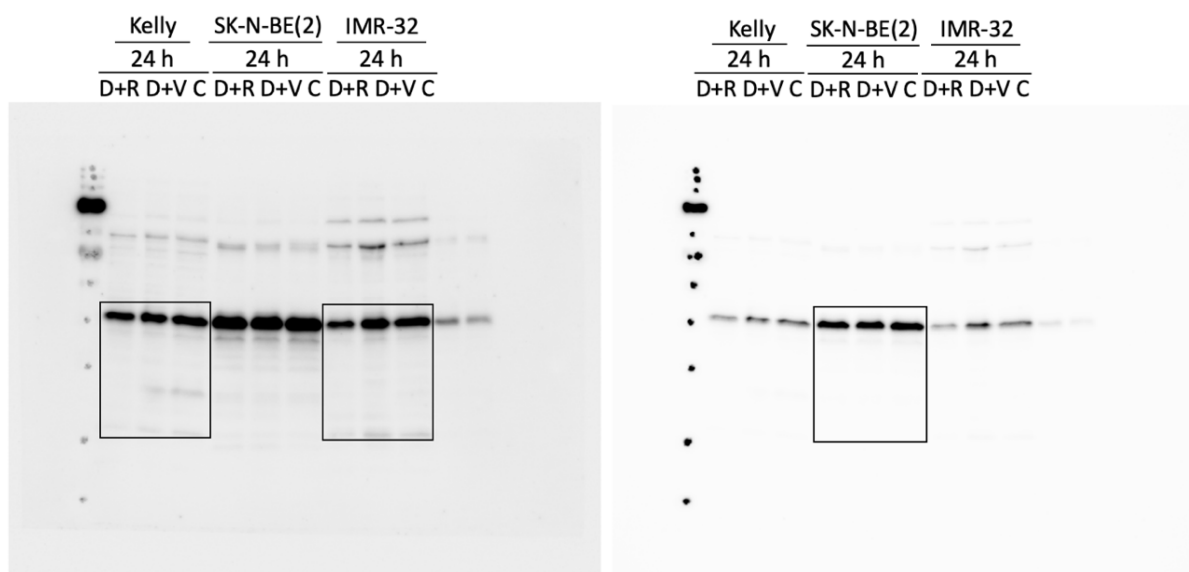


Abbildung 26: Original-Westernblots zu Abbildung 18: Keine Induktion von Apoptose durch Vistusertib bei Einzelbehandlung.

Caspase-3, 17, 19, 35 kDa



GAPDH, 37 kDa

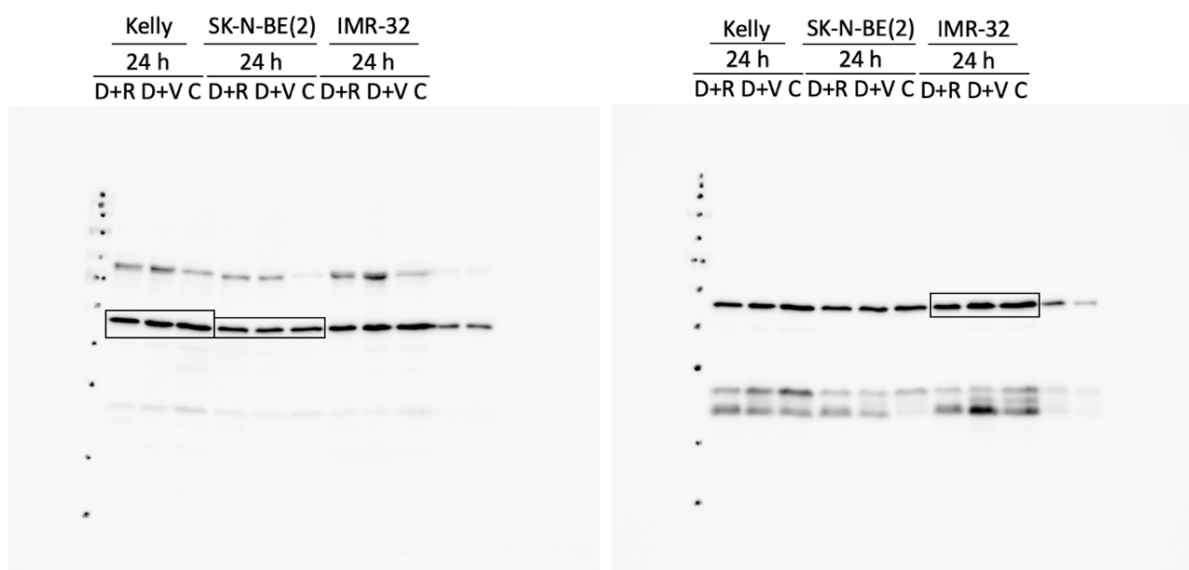


Abbildung 27: Original-Westernblots zu Abbildung 19: Keine Induktion von Apoptose bei Doppelbehandlung mit Dasatinib plus Rapamycin (D+R) und Dasatinib plus Vistusertib (D+V).

7 Danksagung

An dieser Stelle vielen Dank an alle, die mich bei der Anfertigung der Dissertation auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt insbesondere meiner Betreuerin Frau PD Dr. rer. nat. Gunhild Sommer für Ihre exzellente Betreuung, stetige Unterstützung, unermüdliche Geduld bei der Beantwortung meiner offenen Fragen und zahlreichen Anregungen bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Der konstruktive Austausch sowie die regelmäßigen fachlichen und auch persönlichen Gespräche mit Ihr über die gesamte Zeit hinweg waren mir immer eine sehr große Hilfe.

Dem Chef der Pädiatrischen Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation Herrn Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu danke ich für die Themenstellung, das Mentoring und somit das Ermöglichen dieser Dissertation. Ich erhielt hierdurch einen wertvollen Einblick in die wissenschaftliche Grundlagenforschung.

Ein besonderer Dank geht an Marie Matthes für die aufopferungsvolle Einarbeitung und hilfsbereite Unterstützung bei den Arbeiten im Labor. Dank deiner unermüdlichen Hilfe konnte ich alle Verdünnungsrechnungen lösen.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe um Dr. rer. nat. Tilman Heise, Dr. rer. physiol. Nina Weigert, Carina Gerl und Jonas Groß für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre, wertvollen Anregungen, stetige Hilfsbereitschaft und täglichen Kaffee- und Mittagspausen, bei denen wir uns durch unzählige Süßigkeiten getestet haben. Ich möchte keinen Labortag mit euch missen.

Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg danke ich für die finanzielle Unterstützung durch das Promotionsstipendium und die Aufnahme in die Medizinische Regensburger Graduiertenschule (MedReGS).

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Petra und Robert Lotspeich, und meinem Bruder Tim für die großartige Unterstützung während dem Verfassen dieser Arbeit und des gesamten Studiums. Danke für eure Geduld, Motivation und das Ermöglichen meines Studiums – ich weiß, wie glücklich ich mich schätzen kann.

Darüber hinaus danke ich auch all meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Arbeit an meiner Dissertation begleitet haben und mir viel Verständnis entgegengebracht haben.

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „**Testung von Vistusertib im Vergleich zu Rapamycin in der RIST-Therapie in einem In-vitro-Modell des Neuroblastoms**“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Abbildungen und Schemata sind unter Angabe der jeweiligen 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 Arbeit stehen.

Des Weiteren erkläre ich, dass die hier vorliegende Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift